Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	14 47158 0000 0000	2014-03-05 16:05:28	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	379	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 174
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	25060	$ 735300	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	**Titulo de la Invención** (200 caractares o espacios máximos)
	MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEGENERACIÓN RETINIANA

2	**Datos del Solicitante / Titular**			
Nombre:	Maria Pia COSMA	**Dirección Electrónica:**	tobos@tobos.com.co
Dirección:	Carrer Fernando Poo, 16; 2-3, E-08005	**Domicilio/País de constitución:**	ESPAÑA - BARCELONA - BARCELONA

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA
- ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
- ☐ EMPRESA EXTRANJERA
- ☐ NIT
- ☒ PASAPORTE

Número: 3039338-

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	COSMA Maria Pia	PA	3039338
2.	SANGES Daniela	PA	1133583

4	**Datos del Inventor**

Nombre:	Maria Pia COSMA	**Dirección Electrónica:**	tobos@tobos.com.co
Dirección:	Carrer Fernando Poo, 16; 2-3, E-08005	**Domicilio/País de constitución:**	ESPAÑA - BARCELONA - BARCELONA

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA

☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT

☒ PASAPORTE

Número: 3039338-

5	**Inventor(es)**

	Apellidos - Nombres	**Domicilio**
1.	COSMA Maria Pia	ESPAÑA
2.	SANGES Daniela	ESPAÑA

6	**Datos Inventor(es)**

	País de Residencia	**Departamento/Estado**	**Ciudad**	**Dirección**
1.	ESPAÑA	BARCELONA	BARCELONA	Carrer Fernando Poo, 16; 2-3, E-08005
2.	ESPAÑA	BARCELONA	BARCELONA	C/Gombau, 12, E-08003

7	**Datos del Representante Legal / Apoderado**

Nombre:	ANDREA TOBOS MATEUS	**Dirección Electrónica:**	andrea.tobos@tobos.com.co
Dirección:	Carrera 7 C No. 138-19 Oficina 901	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.

Identificación:

☒ CEDULA DE CIUDADANIA	☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA	☐ NIT
☐ PASAPORTE	
Número:	52223325-

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	**Datos Solicitud: PCT / WO**		
Número Solicitud:	PCT/EP2012/065327	**Fecha Solicitud:**	06/08/2012
Número Publicacion:	WO/2013/020945	**Fecha Publicacion:**	14/02/2013

9	**Declaraciones de prioridad**	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	**Codigo del país**	**(31) No. Solicitud**	**(32) Fecha** _
1.	EUROP PATENT ORGANIZATION(EPO)	EP	11176713.3	05/08/2011

10	**Reivindicaciones**			
Número reivindicaciones:	20	**Pago Reivindicaciones:**	Si	

11 Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☒ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional

☒ Listado de secuencias
☐ Artes finales 12 x 12 cm
☒ Poderes, si fuere el caso
☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
☒ Otros Anexos

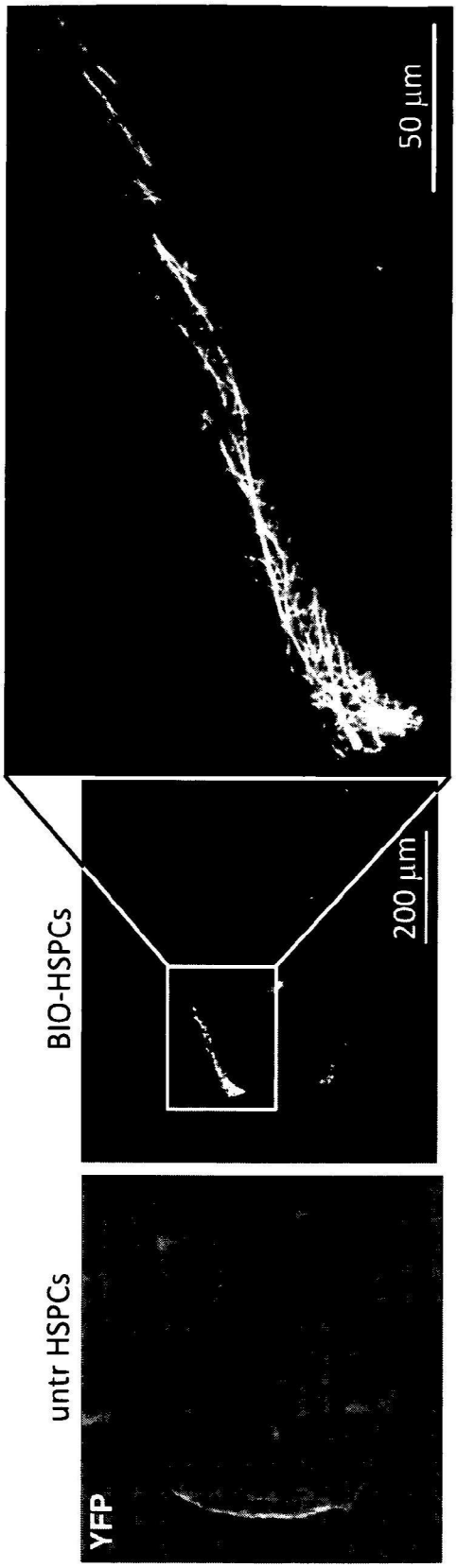


Fig. 18D

A

Células de sangre	Valores	Unidad de Medida	Valor del Rango
WBC	6,18	10^9/l	[2,60-13,00]
LYM	3,92	10^9/l	[3,40-7,44]
MID	0,40	10^9/l	[<0,60]
GRA	1,85	10^9/l	[0,50-3,80]
LY%	63,5	%	[57,0-93,0]
MI%	6,5	%	[<7,0]
GR%	30,0	%	[8,0-48,0]
RBC	10,23	10^{12}/l	[7,00-12,00]
HGB	15,5	g/dl	[12,2-17,3]
HCT	43,24	%	[35,00-52,00]
MCV	42	Fl	[40-51]
MCH	15,1	pg	[13,5-17,6]
MCHC	35,7	g/dl	[30,0-38,0]
RDWc	17,1	%	
PLT	496	10^9/l	[485-1800]
PCT	0,32	%	
MPV	6,4	fl	
PDWc	31,7	%	
RFP+	65%	%	

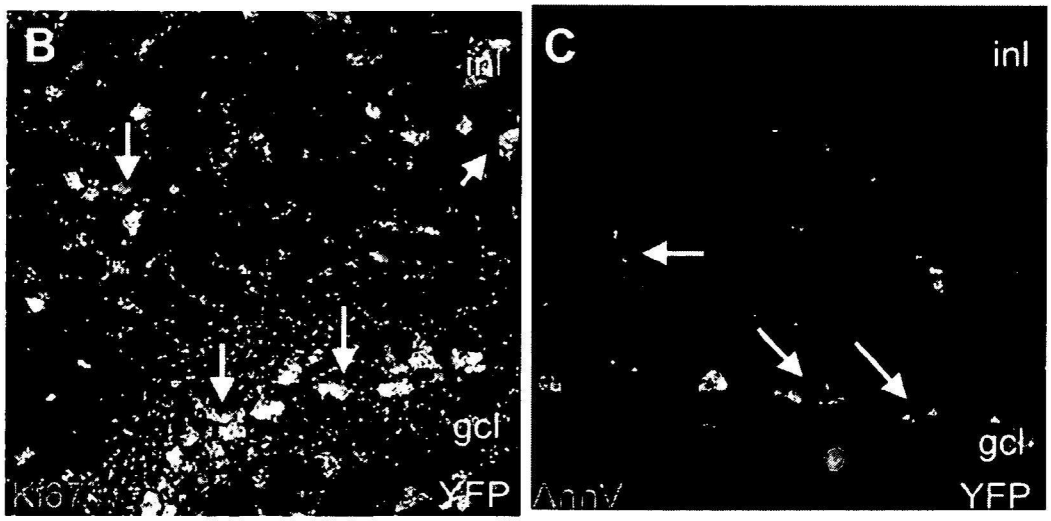


Fig. 19

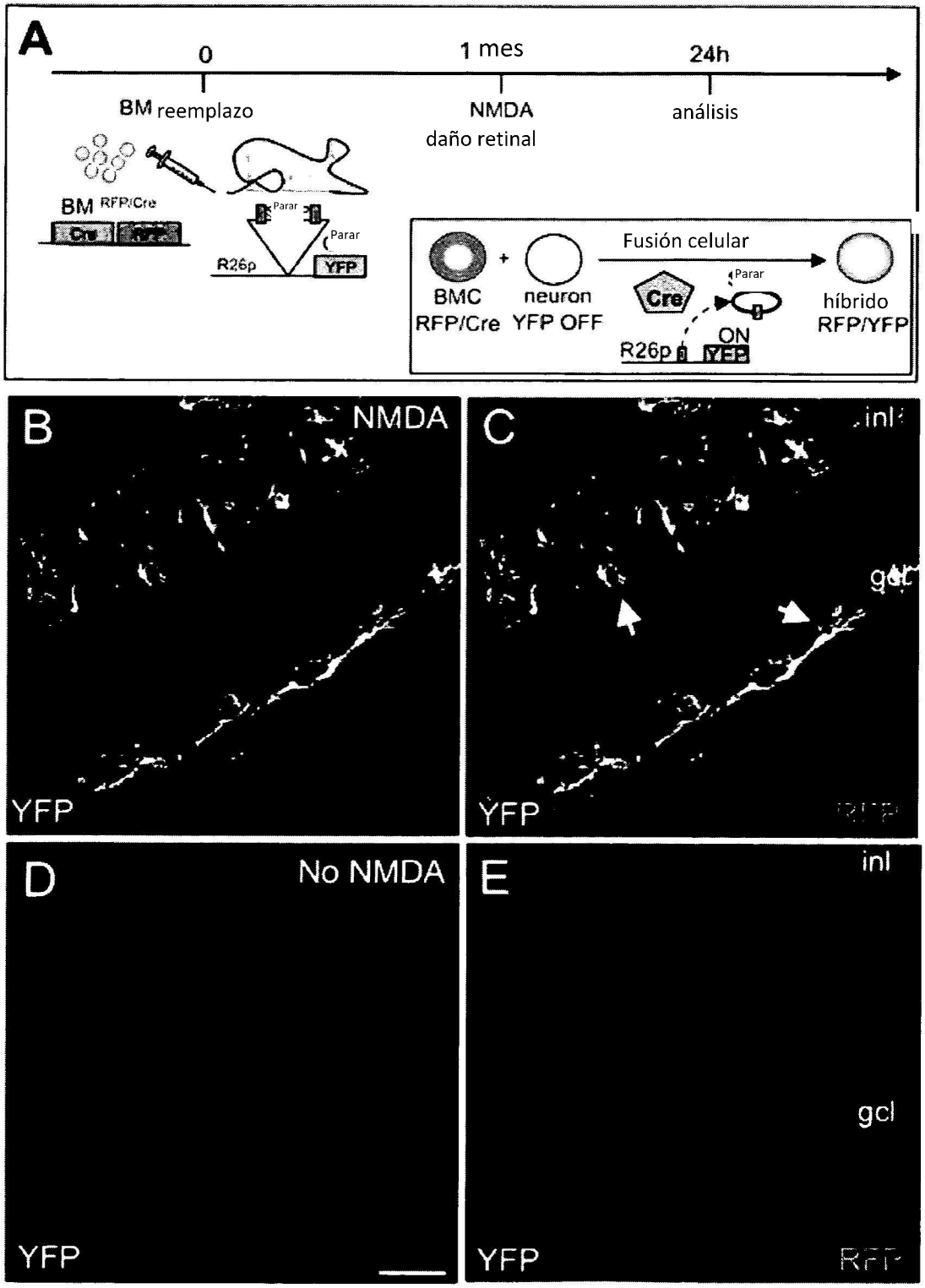

A
0
1 mes
24h
BM reemplazo
NMDA
daño retinal
análisis
BM RFP/Cre
Parar
Parar
R26p
YFP
Fusión celular
BMC
RFP/Cre
neuron
YFP OFF
Cre
Parar
ON
R26p
YFP
híbrido
RFP/YFP
B
NMDA
YFP
C
inl
gcl
YFP
D
No NMDA
YFP
E
inl
gcl
YFP

Fig. 20

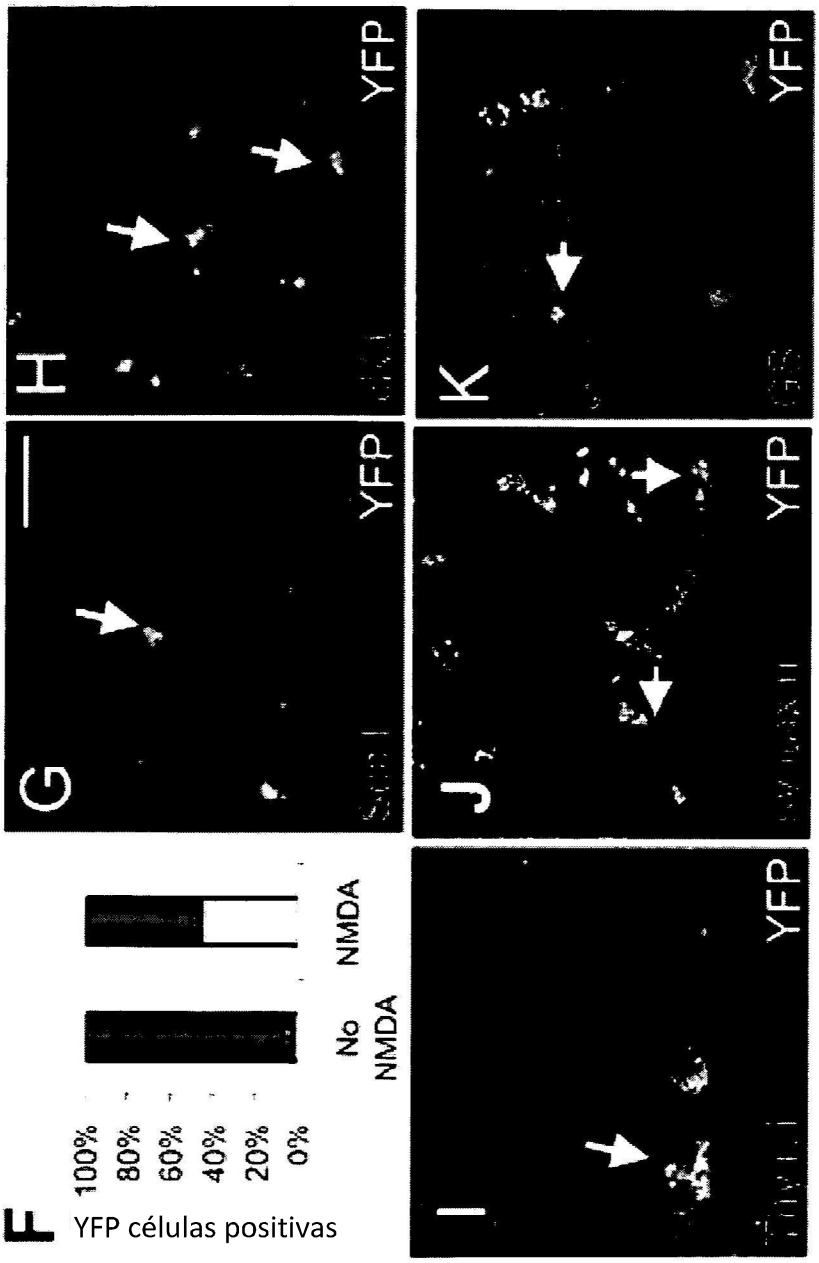

F
YFP células positivas
100%
80%
60%
40%
20%
0%
No NMDA
NMDA
G
H
I
J
K
YFP

Fig. 20

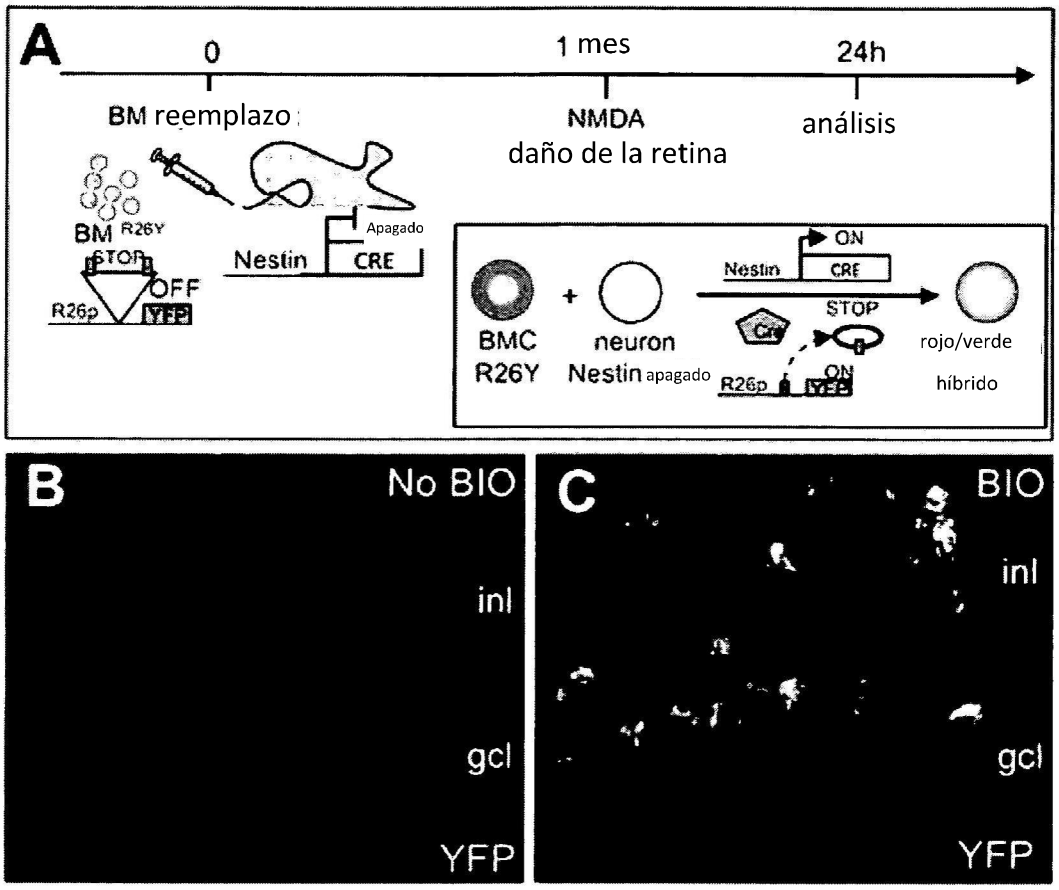

A
0
1 mes
24h
BM reemplazo
NMDA
daño de la retina
análisis
BM R26Y
STOP
OFF
YFP
R26p
Nestin
Apagado
CRE
ON
Nestin
CRE
STOP
Cre
ON
R26p
YFP
BMC
R26Y
neuron
Nestin apagado
rojo/verde
híbrido
B
No BIO
inl
gcl
YFP
C
BIO
inl
gcl
YFP

Fig. 21

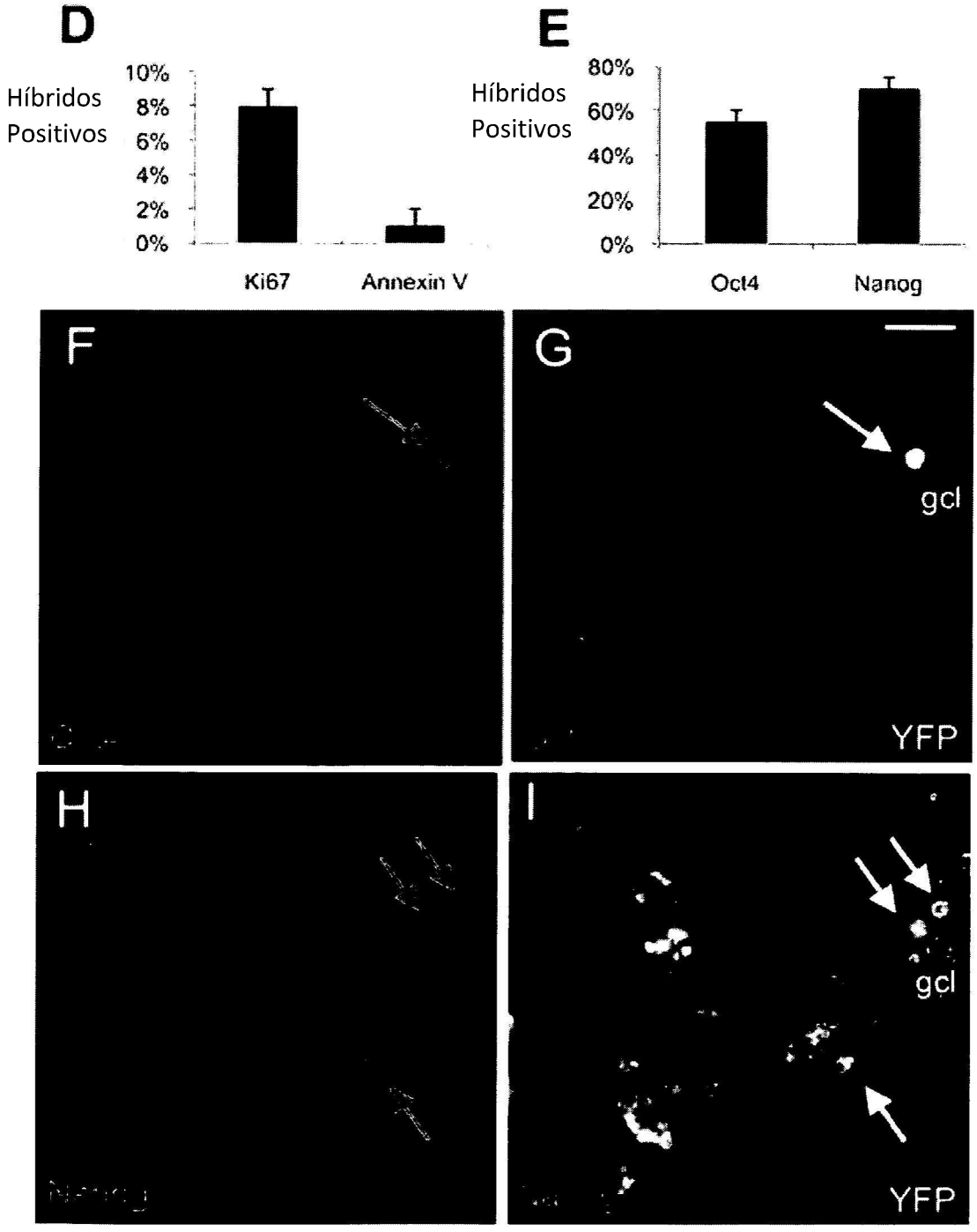

D
Híbridos Positivos
10%
8%
6%
4%
2%
0%
Ki67
Annexin V
E
Híbridos Positivos
80%
60%
40%
20%
0%
Oct4
Nanog
F
G
gcl
YFP
H
I
gcl
YFP

Fig. 21

HSPCs sin tratar

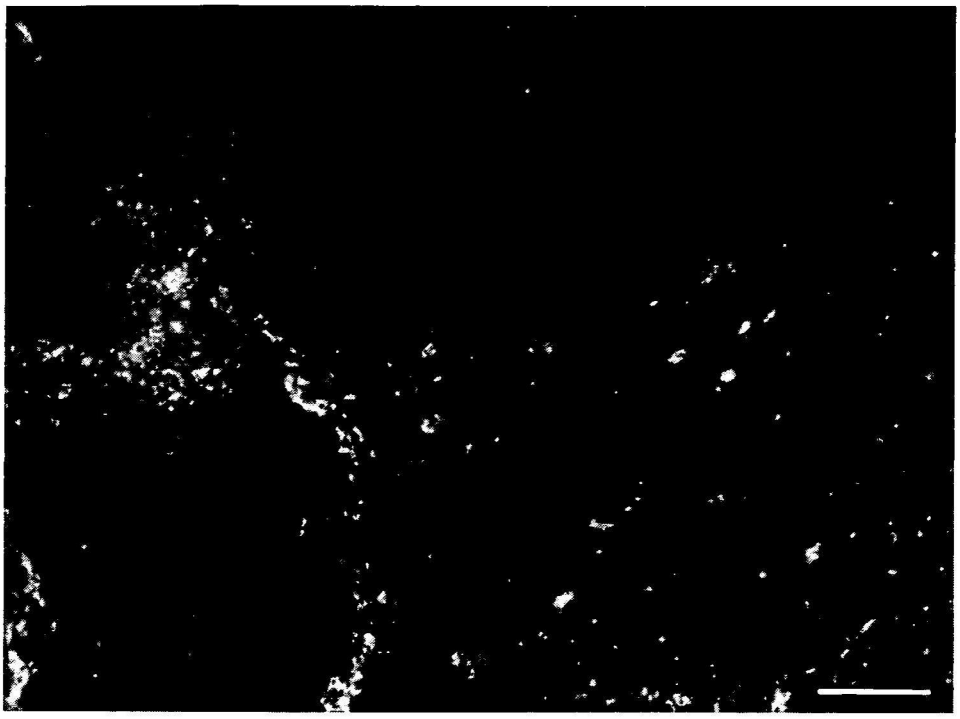


Fig. 22A

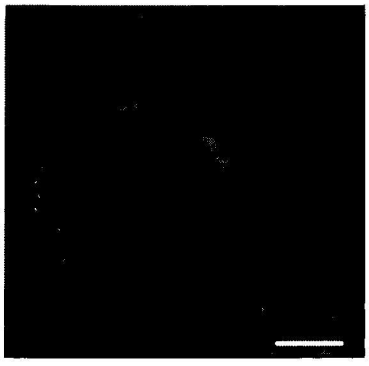


Fig. 22B

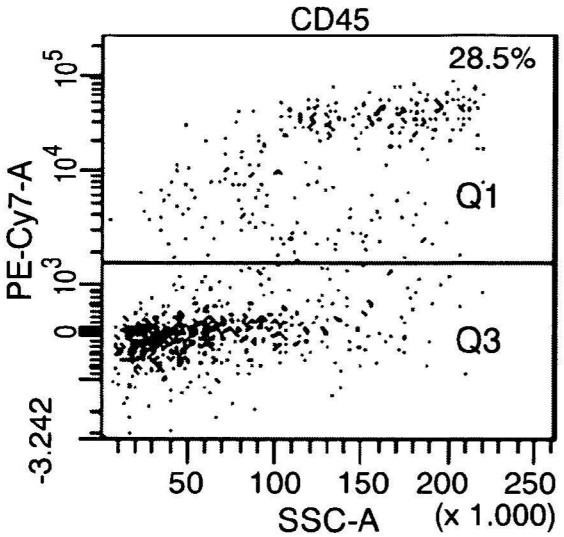


Fig. 22C

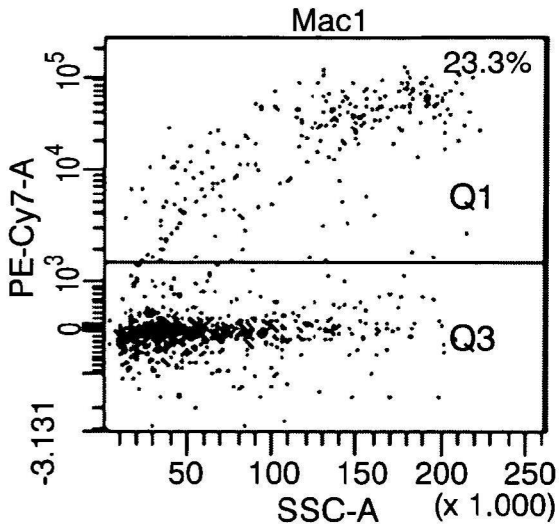


Fig. 22D

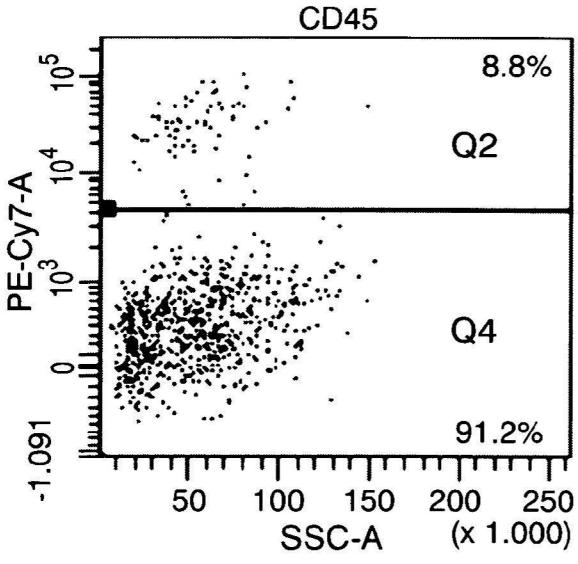


Fig. 22E

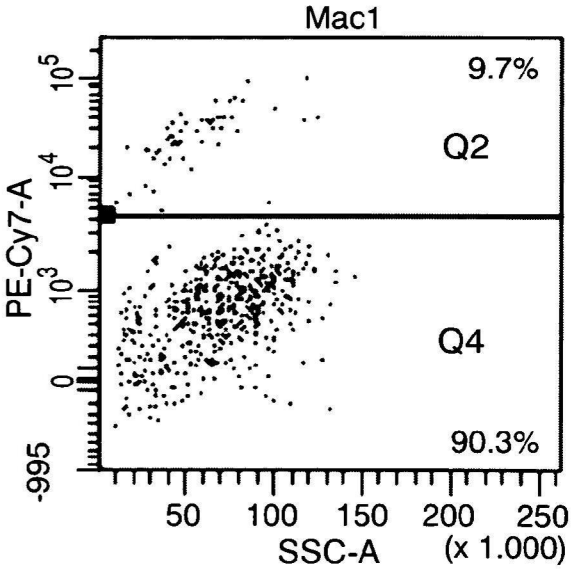


Fig. 22F

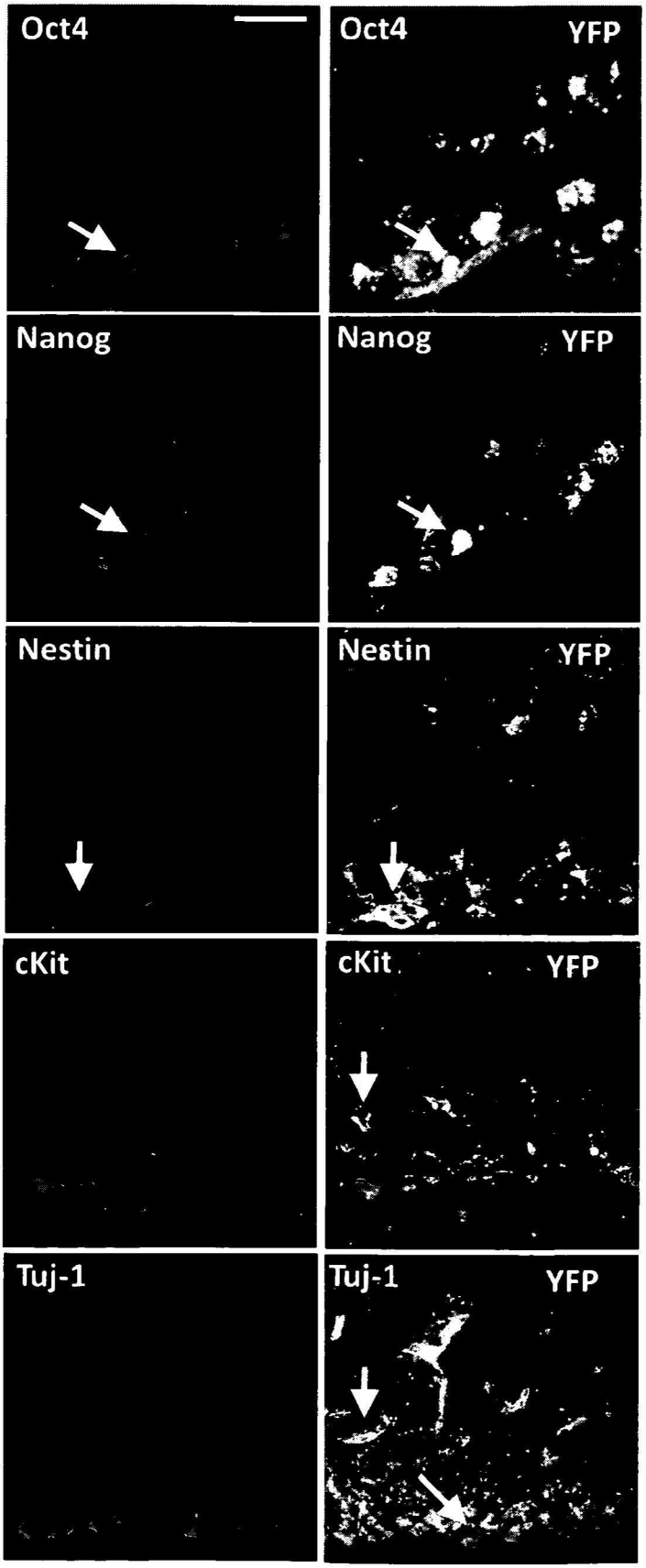

Oct4
Oct4
YFP
Nanog
Nanog
YFP
Nestin
Nestin
YFP
cKit
cKit
YFP
Tuj-1
Tuj-1
YFP

Fig. 15B

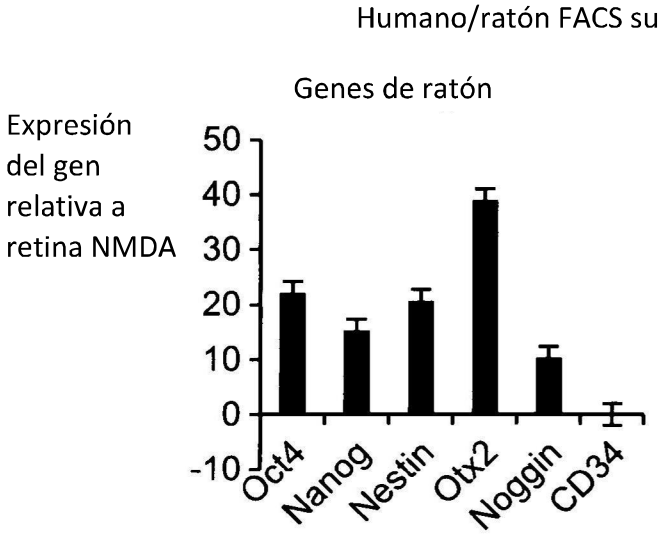


Fig. 15C

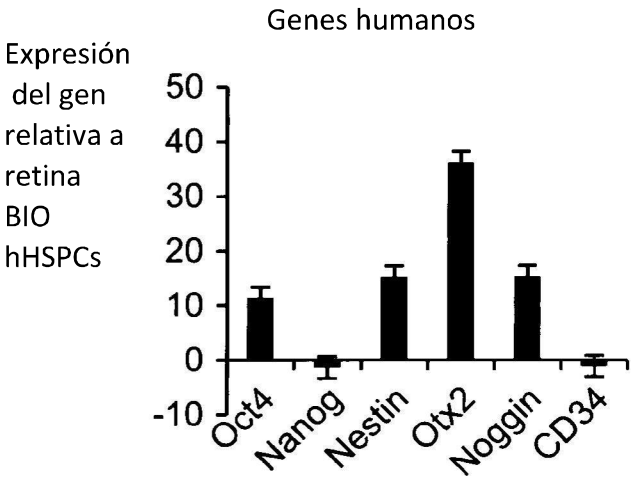


Fig. 15D

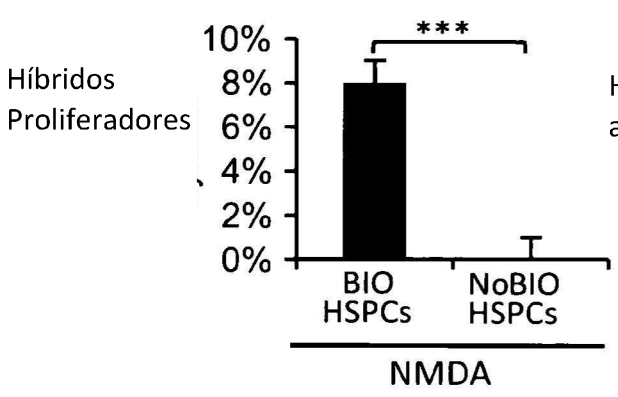


Fig. 15E

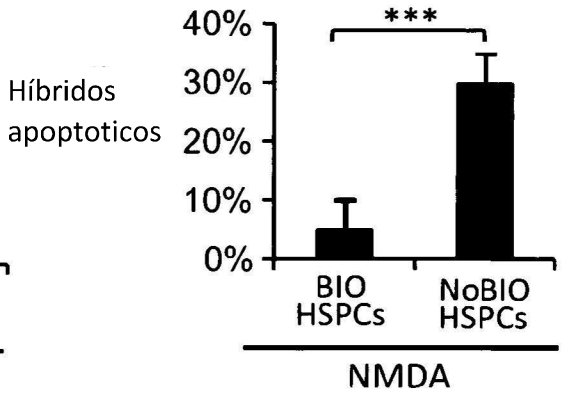


Fig. 15F

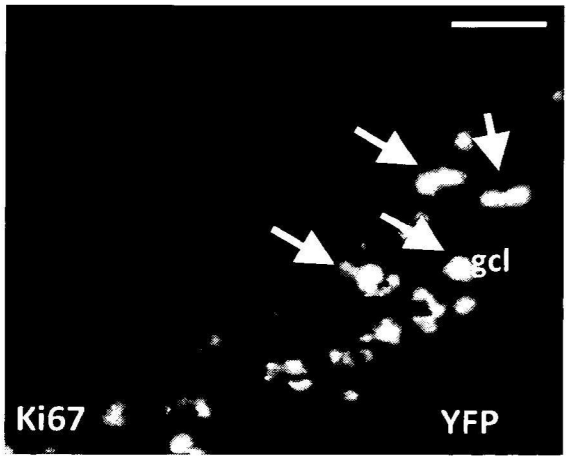


Fig. 15G

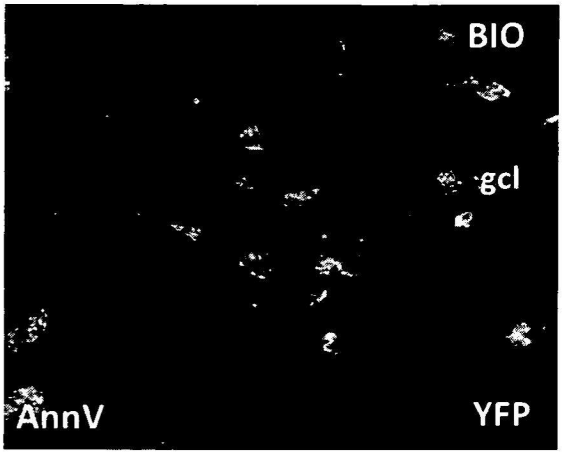


Fig. 15H

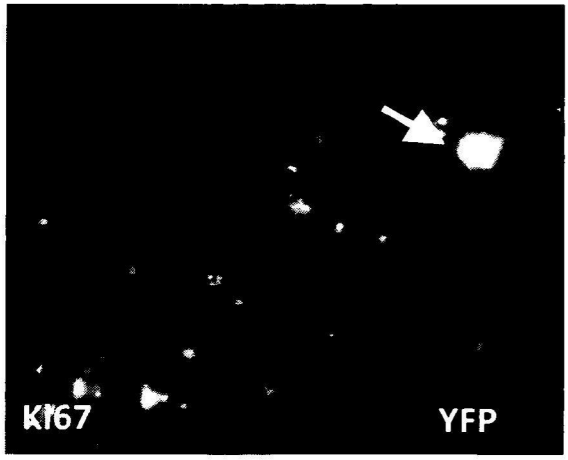


Fig. 15I

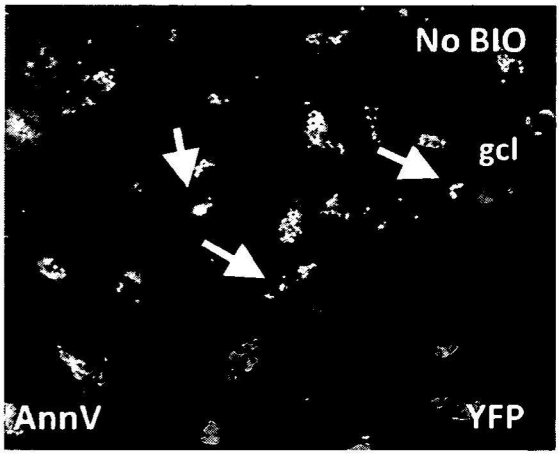


Fig. 15J

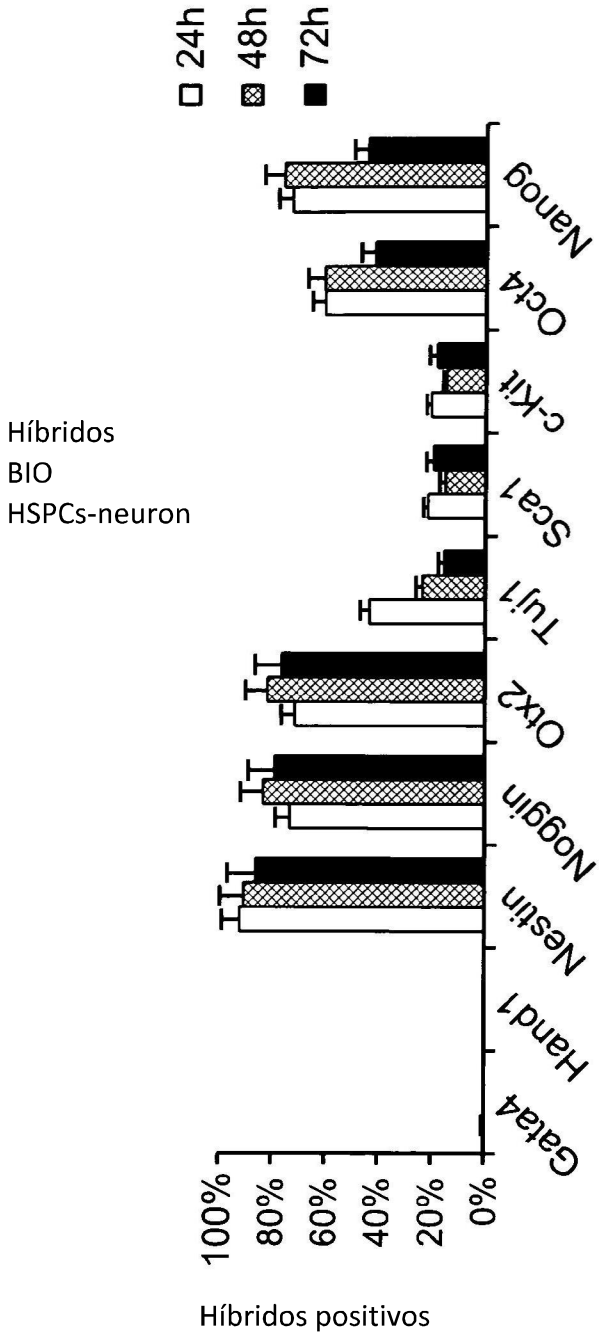


Fig. 15K

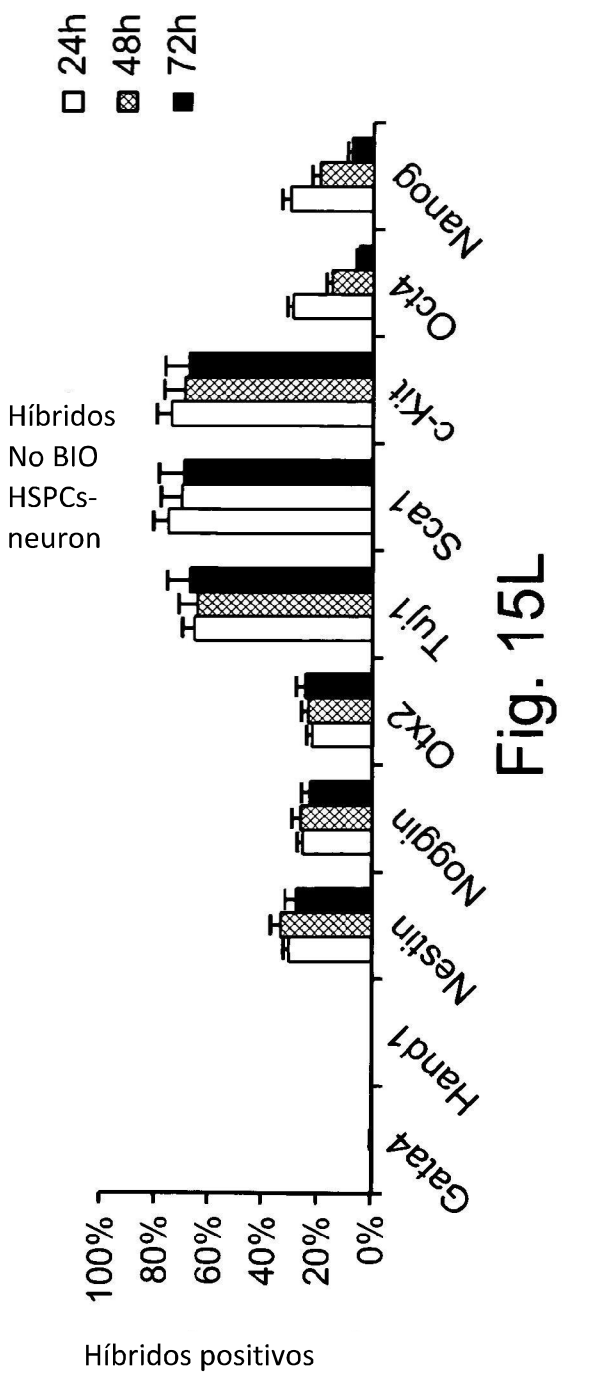


Fig. 15L

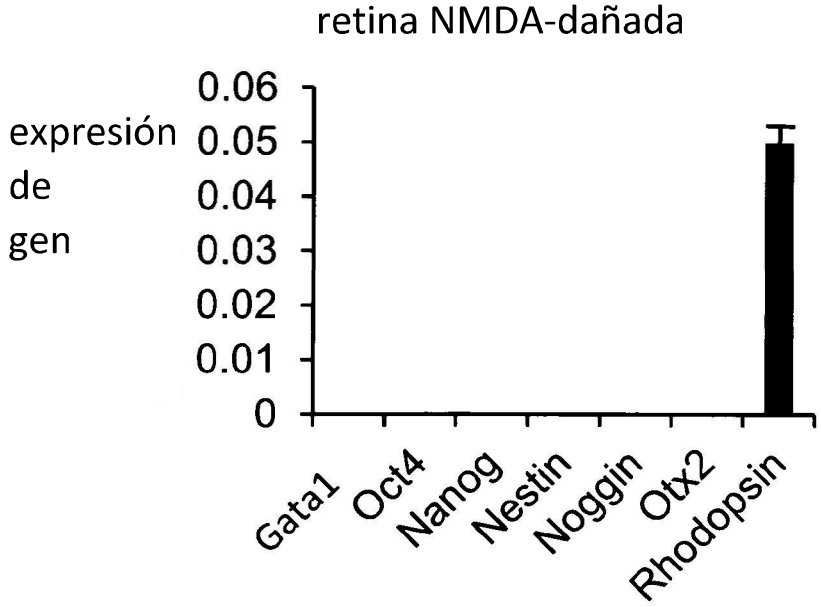


Fig. 16A

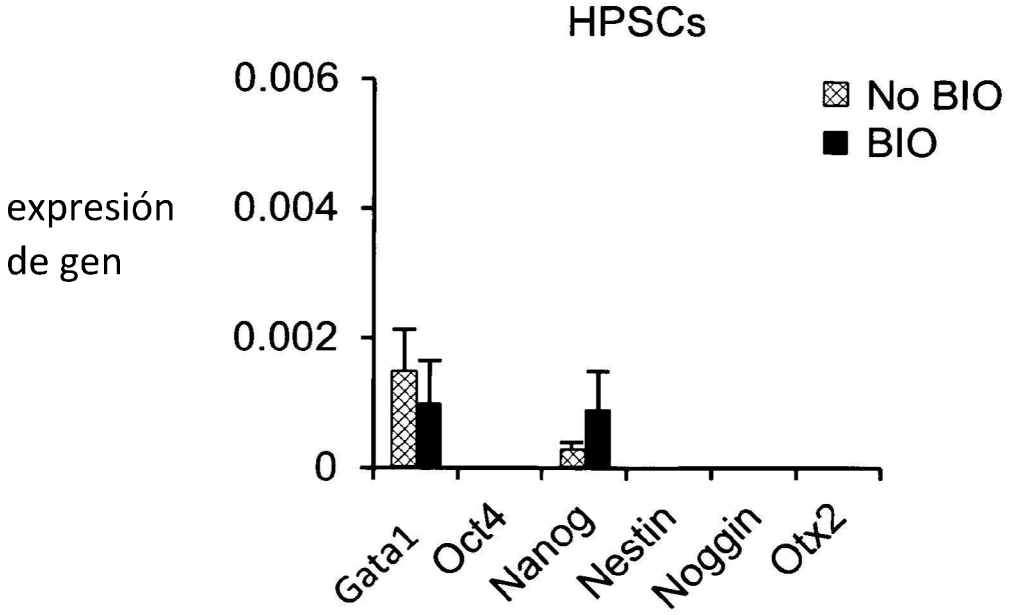


Fig. 16B

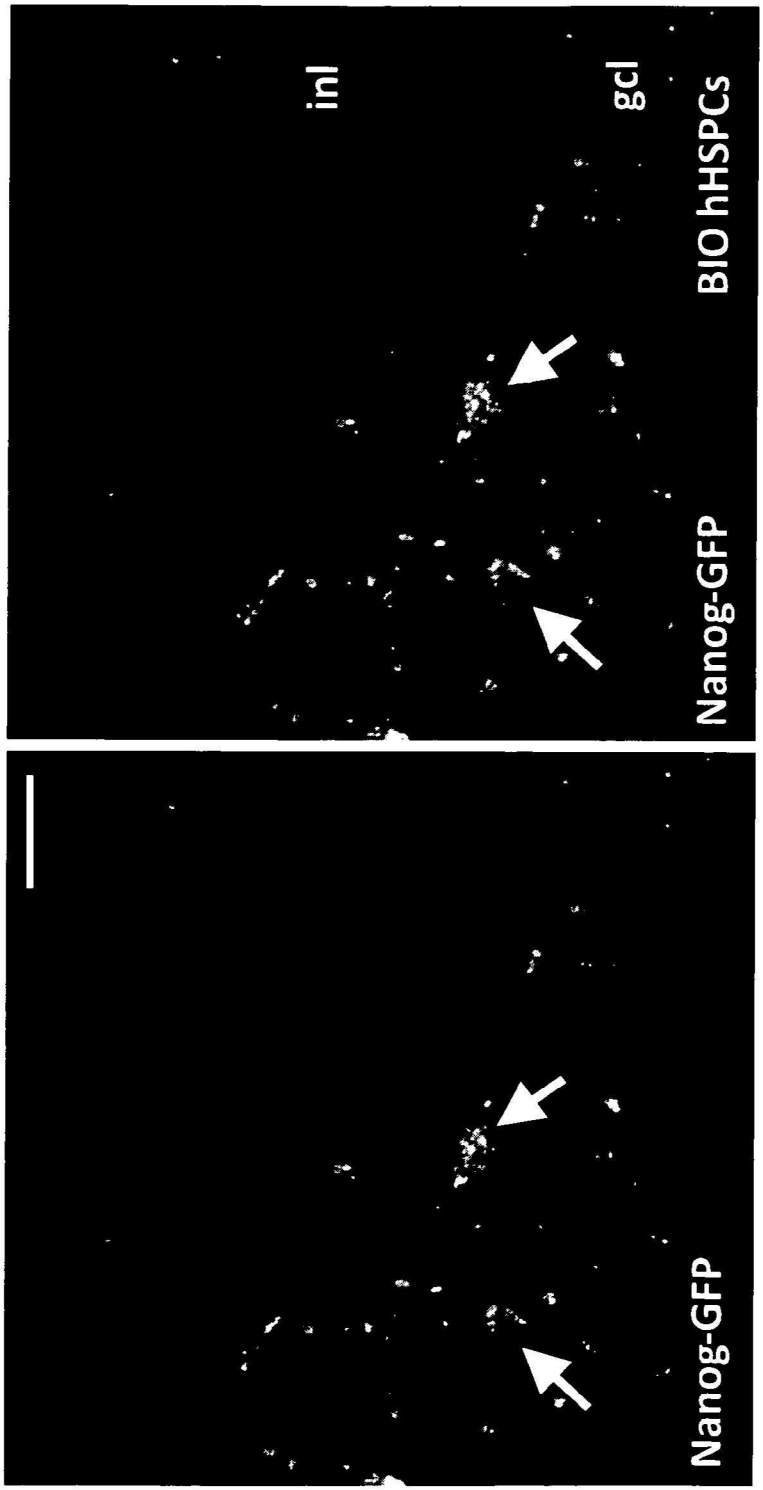


Fig. 16C

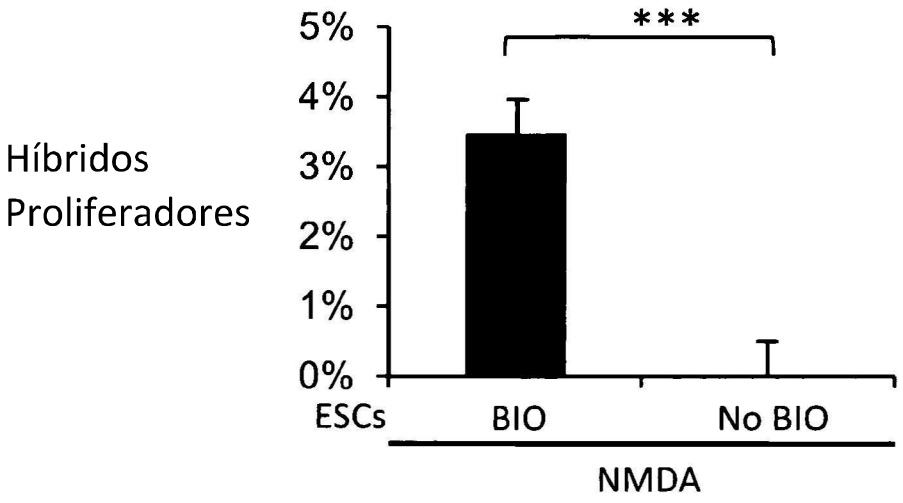


Fig. 16D

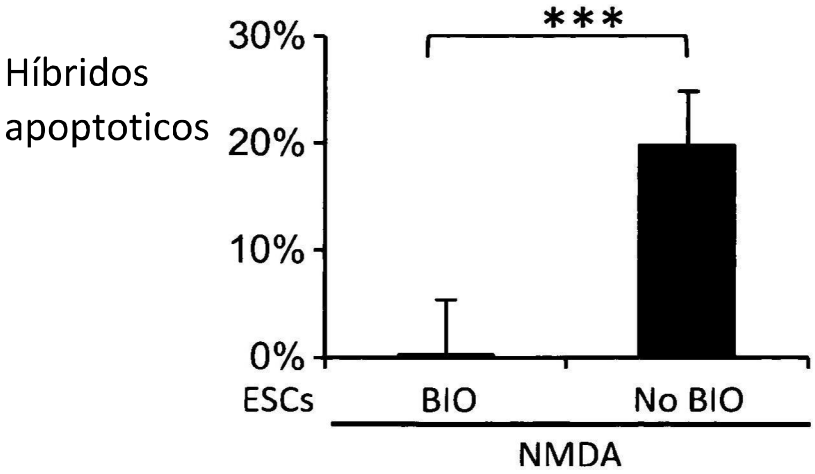


Fig. 16E

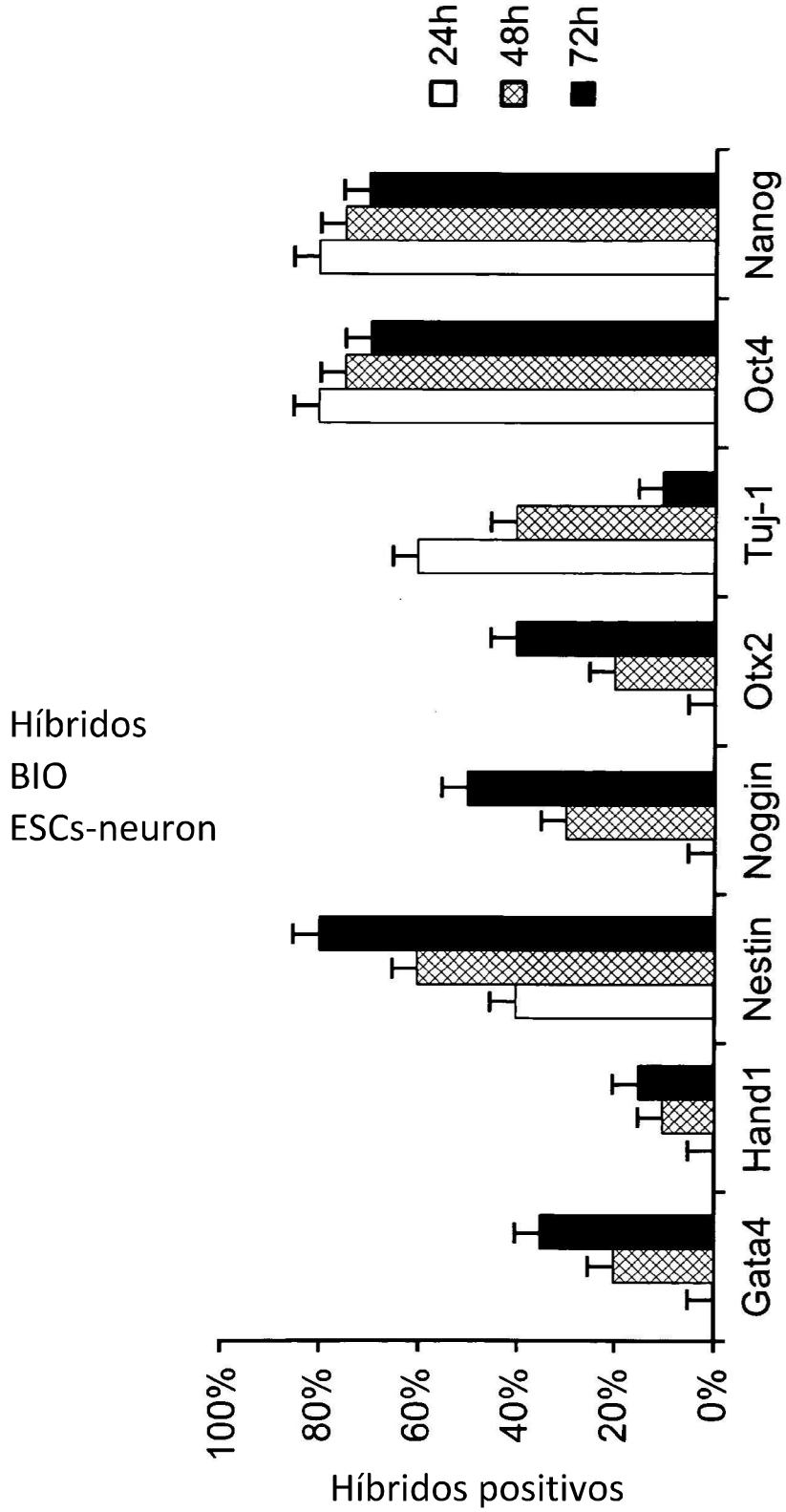

24h
48h
72h
Nanog
Oct4
Tuj-1
Otx2
Noggin
Nestin
Hand1
Gata4
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Híbridos positivos
Híbridos
BIO
ESCs-neuron

Fig. 16F

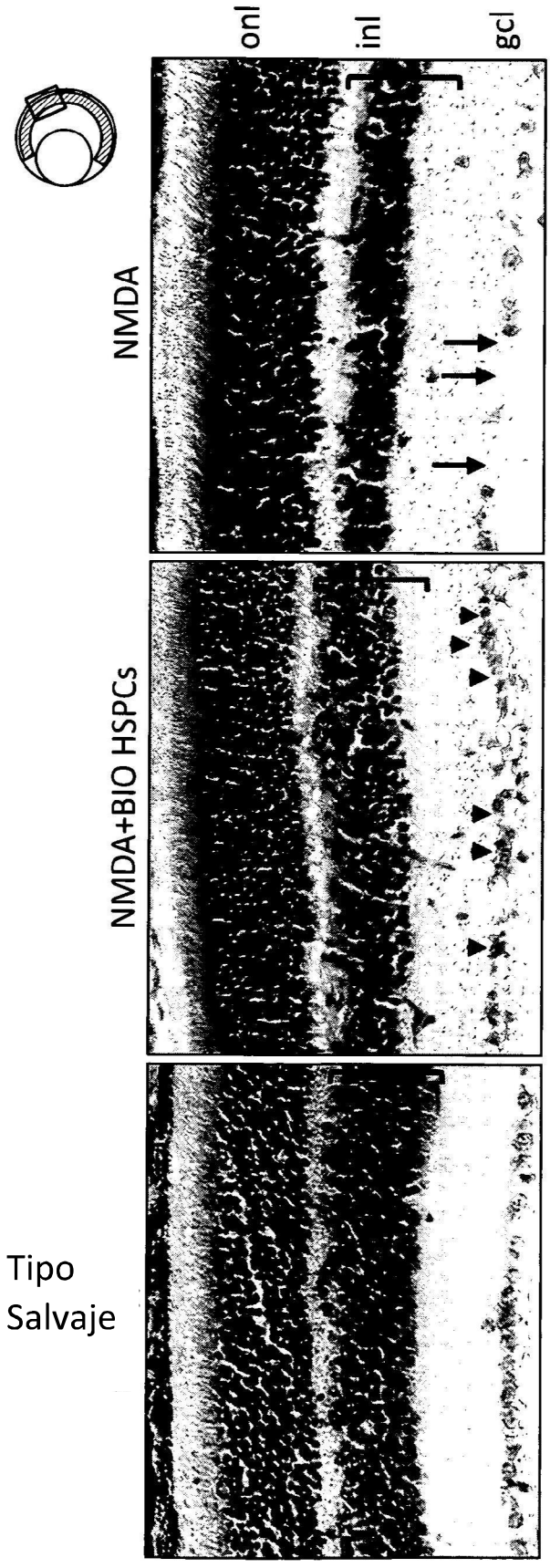


Fig. 17A

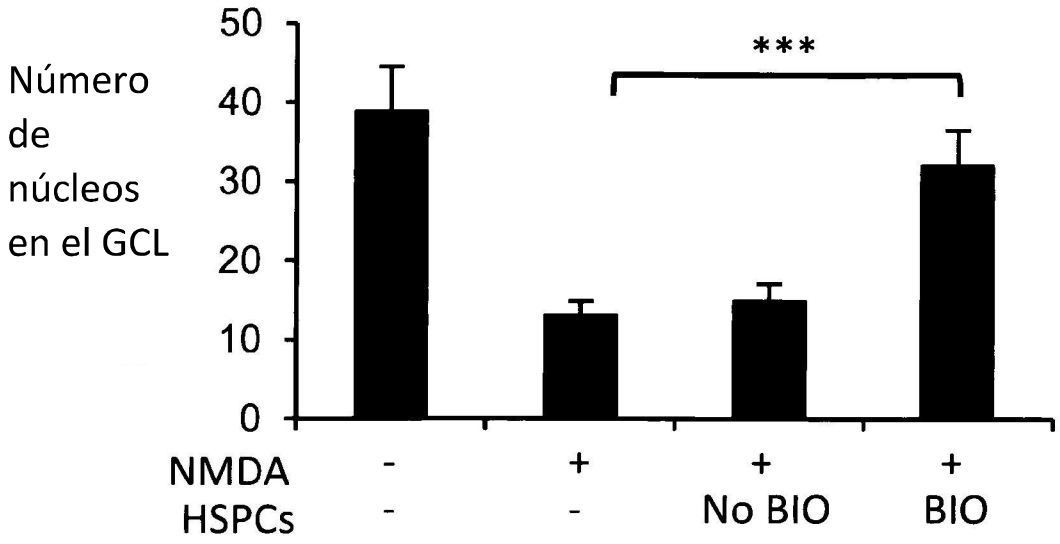


Fig. 17B

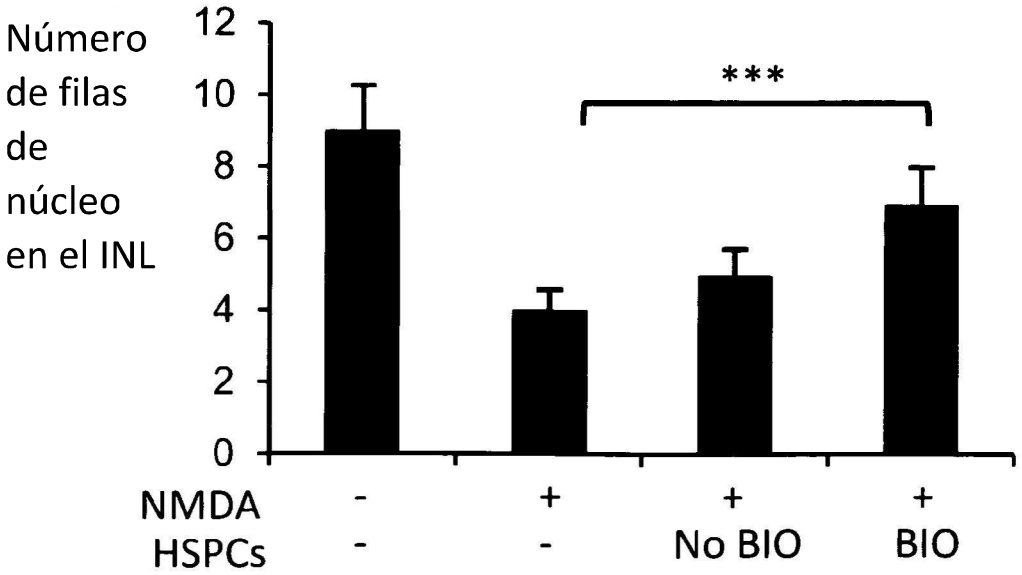


Fig. 17C

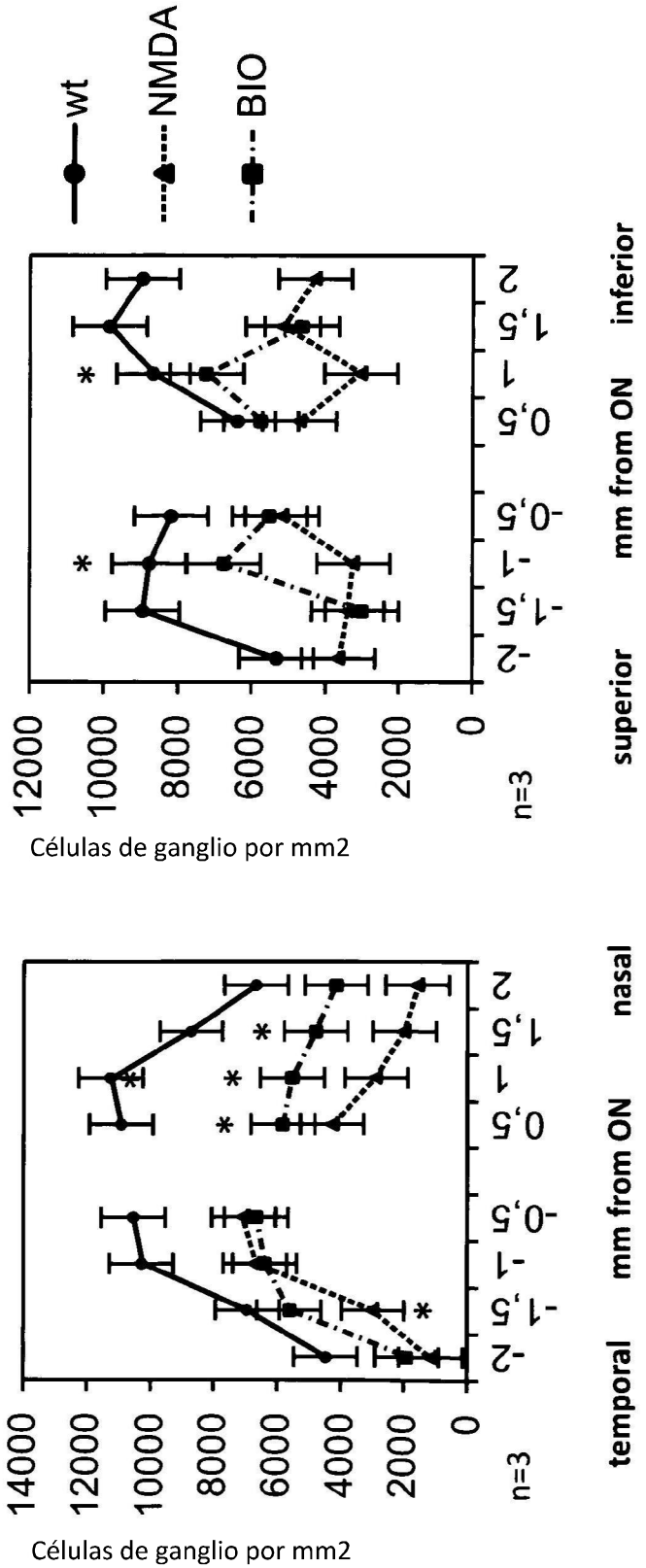

wt
NMDA
BIO
Células de ganglio por mm2
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
n=3
superior
mm from ON
inferior
2
1,5
1
0,5
-0,5
-1
-1,5
-2
*
Células de ganglio por mm2
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
n=3
temporal
mm from ON
nasal
2
1,5
1
0,5
-0,5
-1
-1,5
-2
*

Fig. 17D

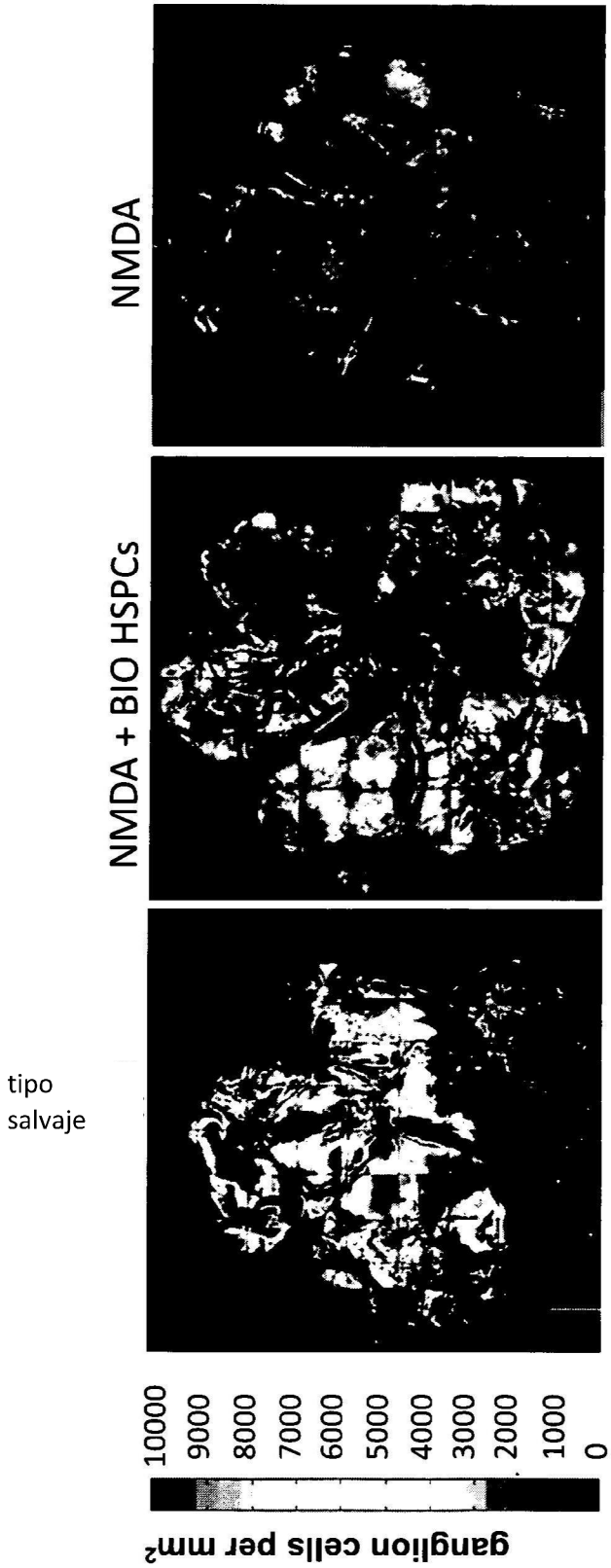

NMDA
NMDA + BIO HSPCs
tipo salvaje
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ganglion cells per mm²

Fig. 17E

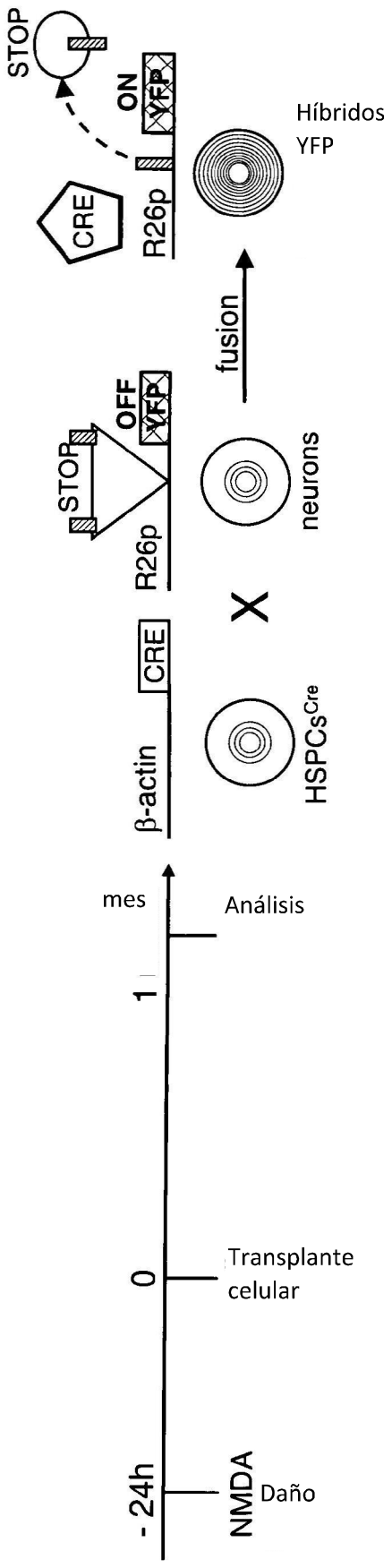

STOP
ON
YFP
CRE
R26p
Híbridos
YFP
fusion
OFF
YFP
STOP
R26p
neurons
X
β-actin
CRE
HSPCs^{Cre}
mes
Análisis
1
0
Transplante
celular
- 24h
NMDA
Daño

Fig. 18A

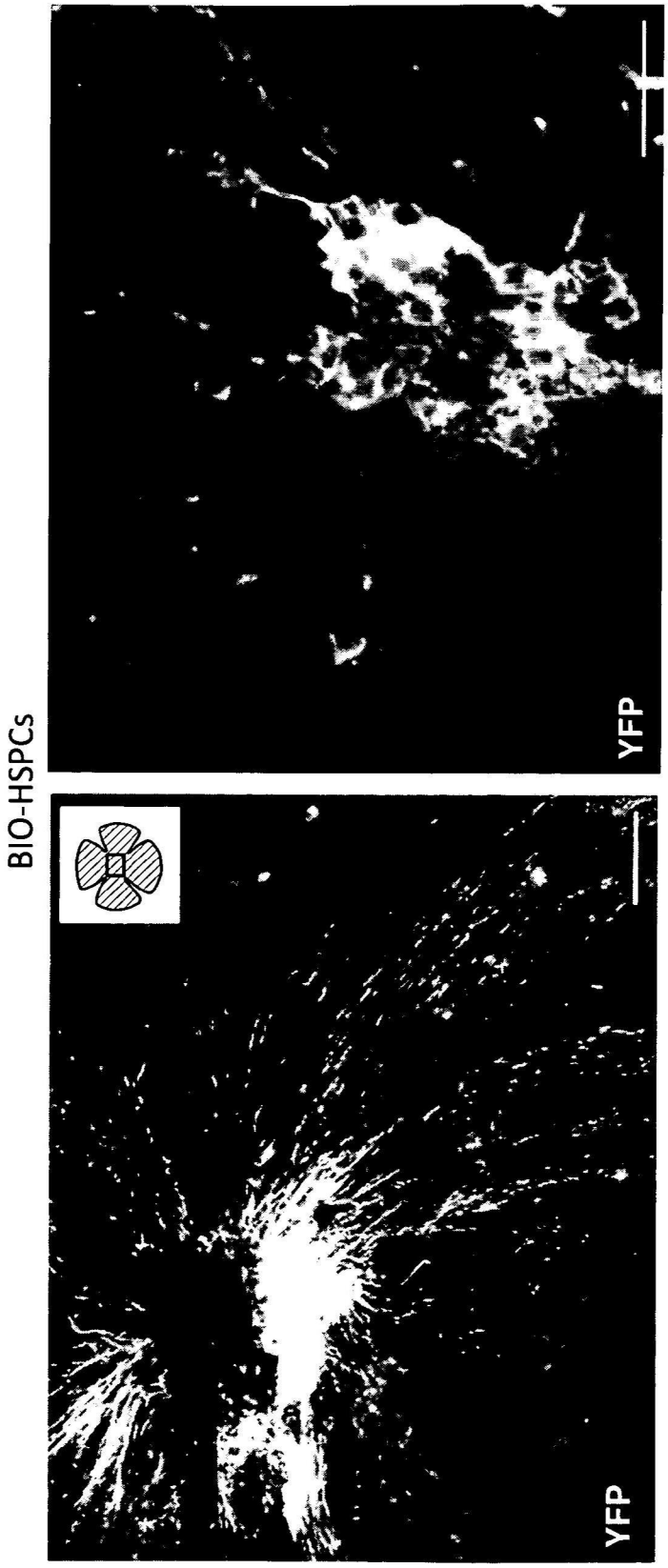


Fig. 18B

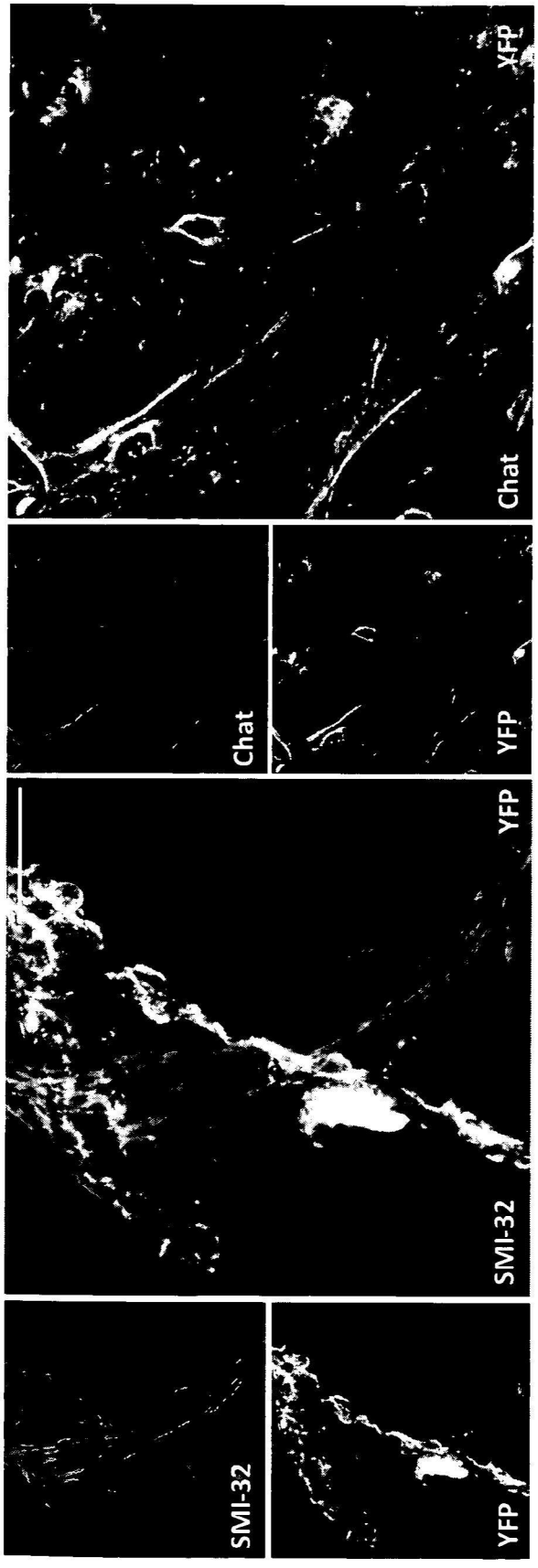


Fig. 18C

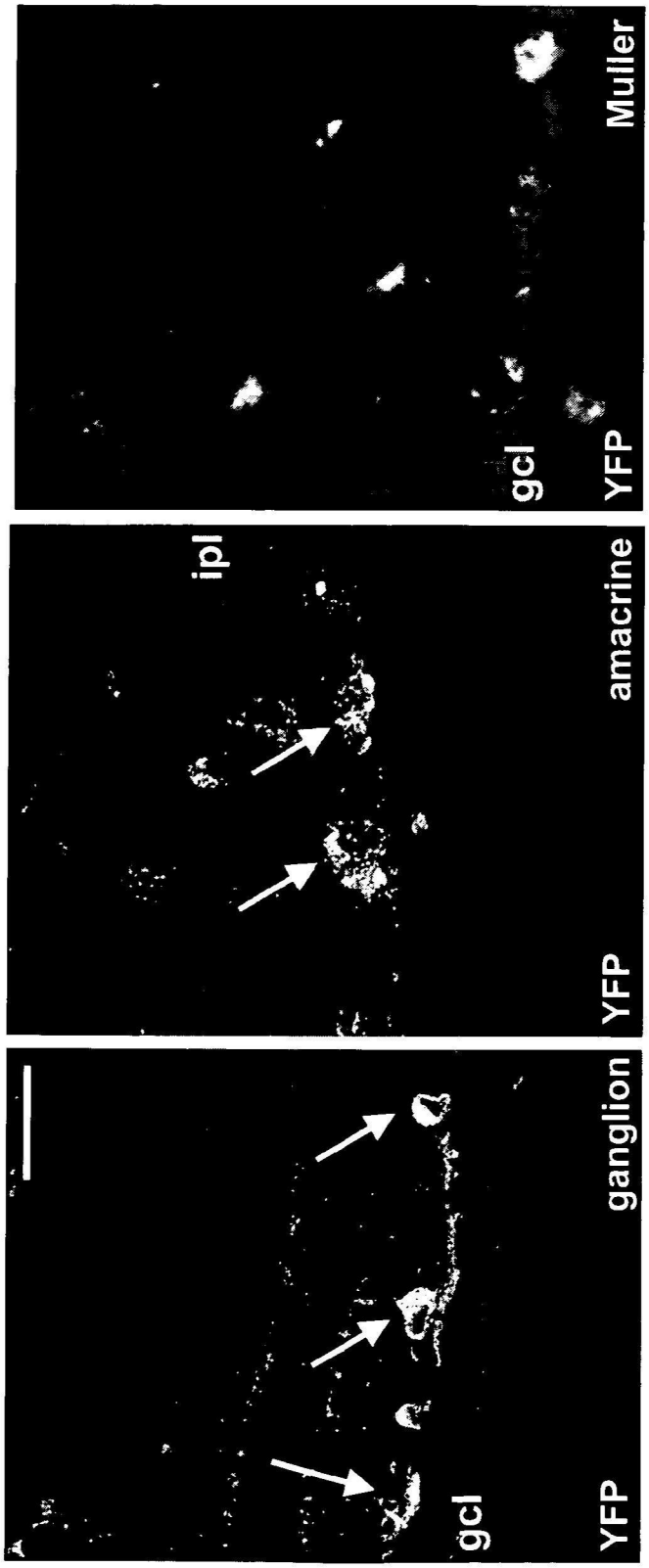


Fig. 9E

Fig. 9F

Fig. 9G

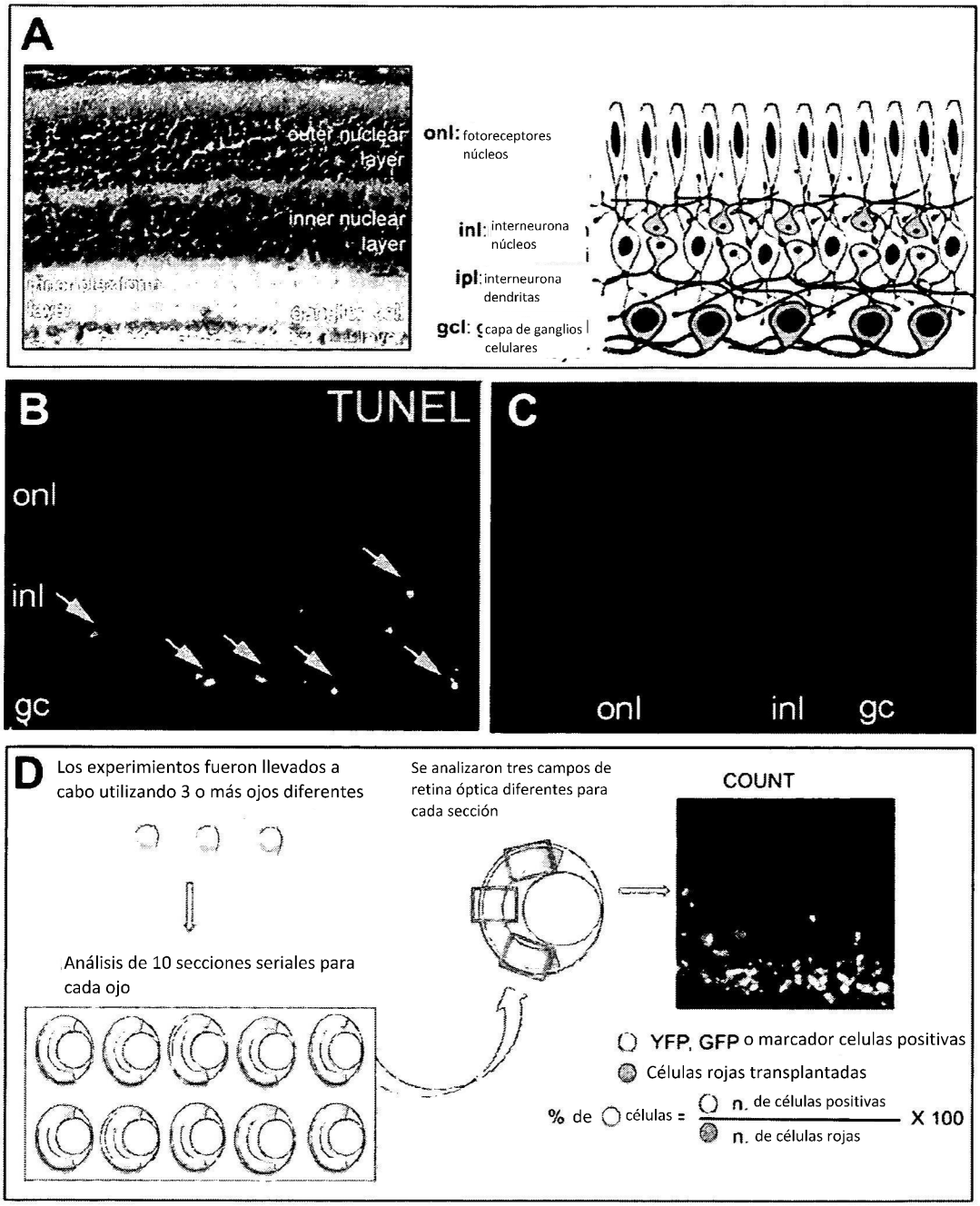

A
outer nuclear layer
inner nuclear layer
onl: fotoreceptores núcleos
inl: interneurona núcleos
ipl: interneurona dendritas
gcl: capa de ganglios celulares
B
TUNEL
onl
inl
gc
C
onl
inl
gc
D
Los experimientos fueron llevados a cabo utilizando 3 o más ojos diferentes
Análisis de 10 secciones seriales para cada ojo
Se analizaron tres campos de retina óptica diferentes para cada sección
COUNT
YFP, GFP o marcador celulas positivas
Células rojas transplantadas
% de células = n. de células positivas / n. de células rojas X 100

Fig. 10

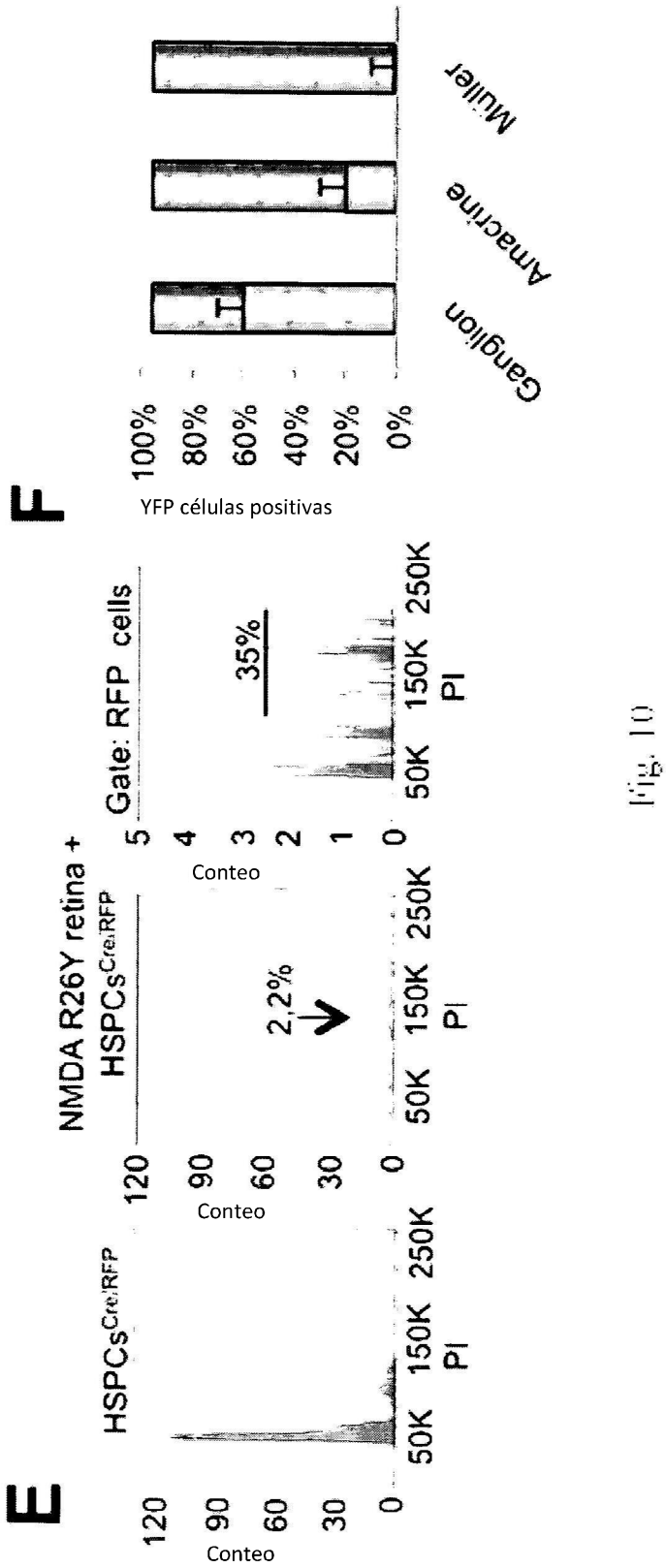

F
100%
80%
60%
40%
20%
0%
YFP células positivas
Ganglion
Amacrine
Muller
E
NMDA R26Y retina +
HSPCs Cre:RFP
Gate: RFP cells
35%
2,2%
Conteo
PI
50K
150K
250K
0
30
60
90
120
1
2
3
4
5

Fig. 10

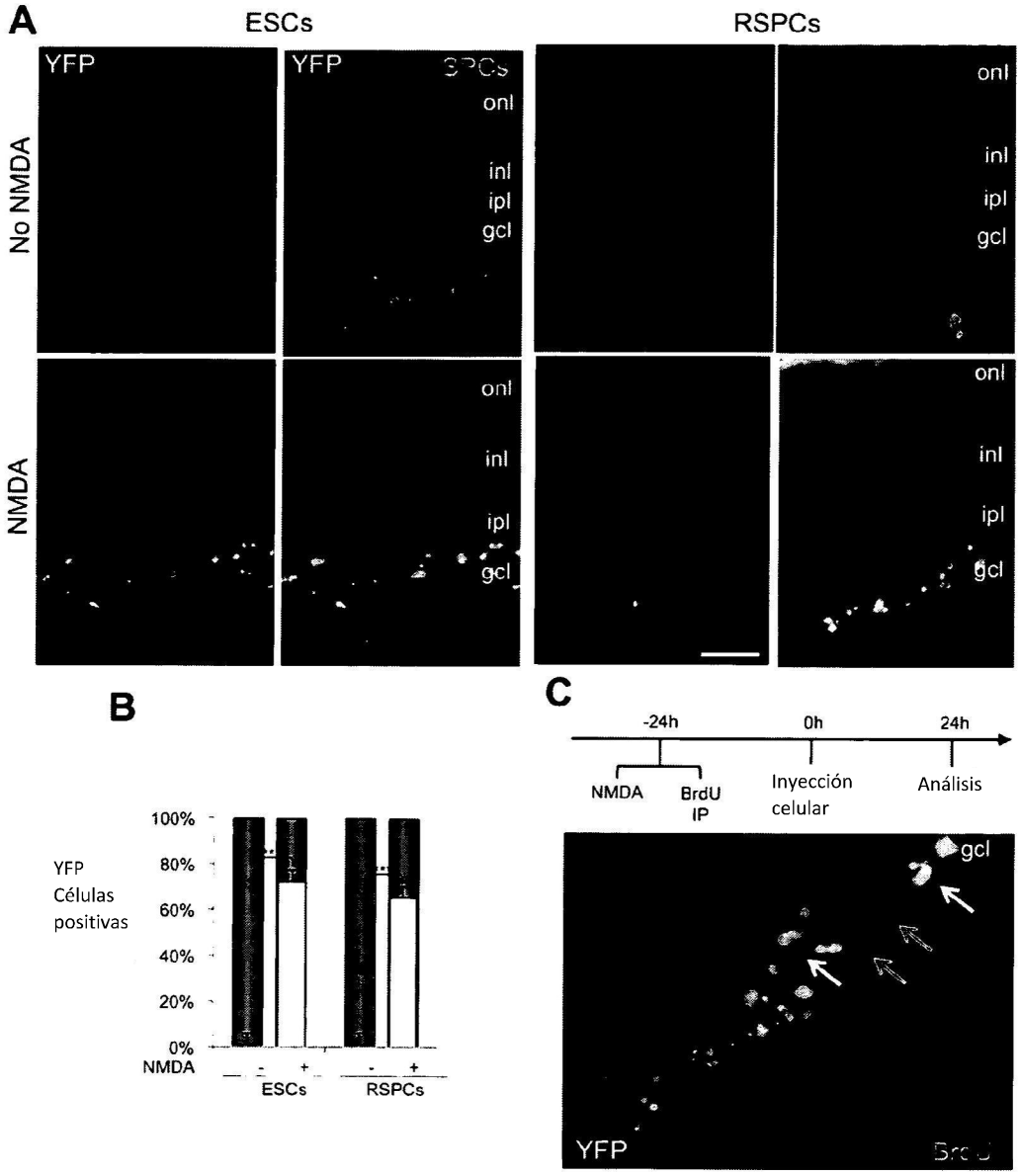

A
ESCs
RSPCs
YFP
YFP
onl
inl
ipl
gcl
No NMDA
NMDA
B
YFP
Células
positivas
100%
80%
60%
40%
20%
0%
NMDA
ESCs
RSPCs
C
-24h
0h
24h
NMDA
BrdU
IP
Inyección
celular
Análisis
gcl
YFP

Fig. 11

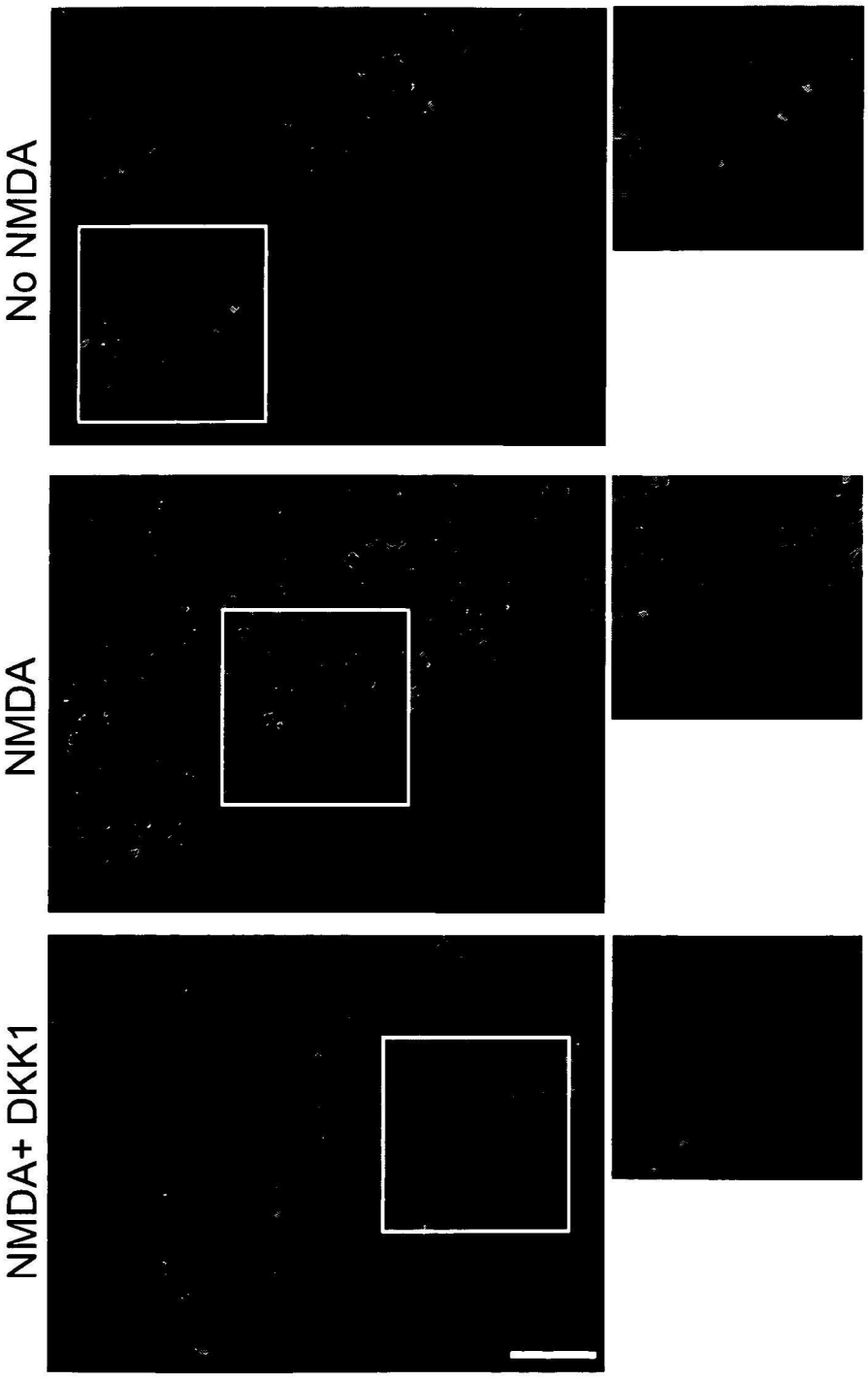


Fig. 12A

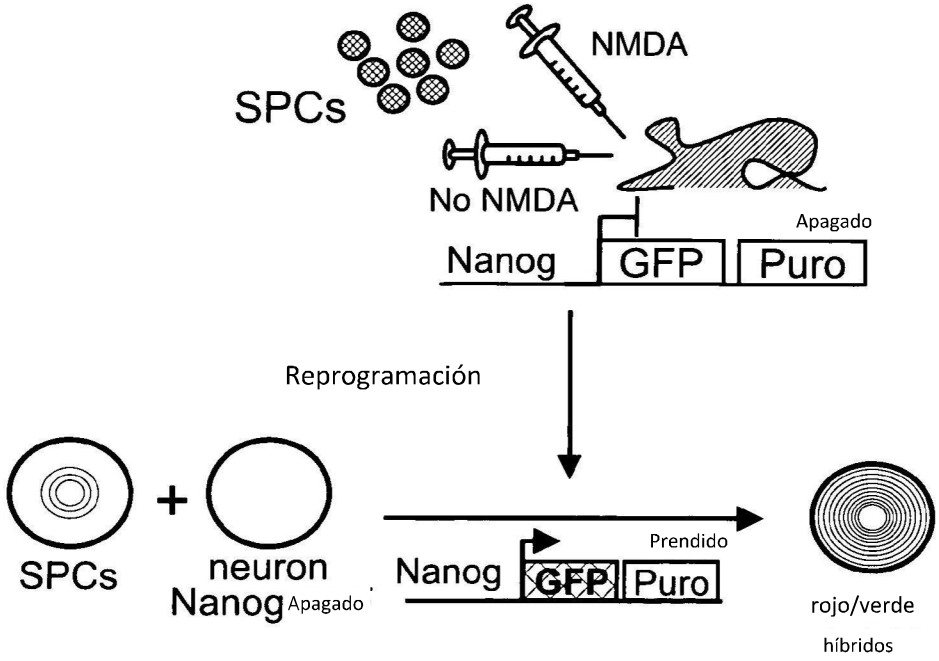


Fig. 12B

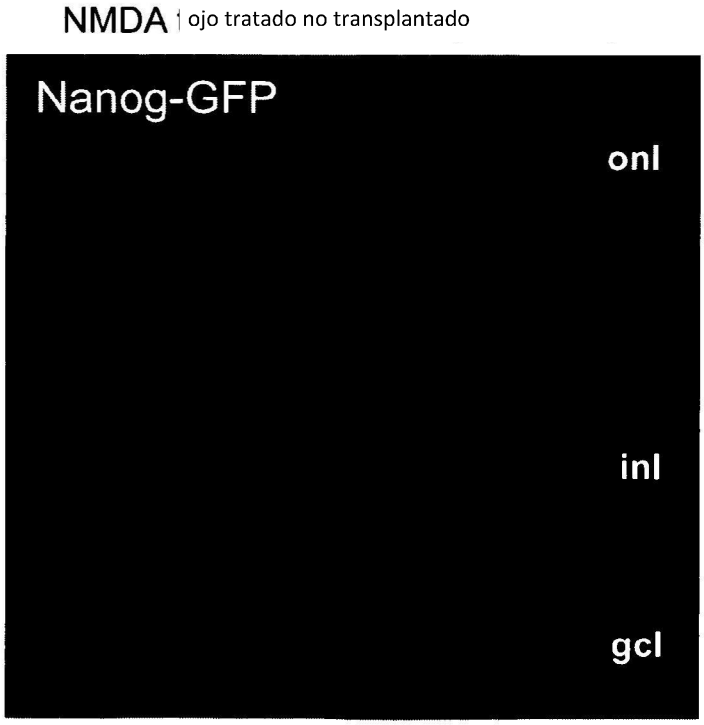


Fig. 12C

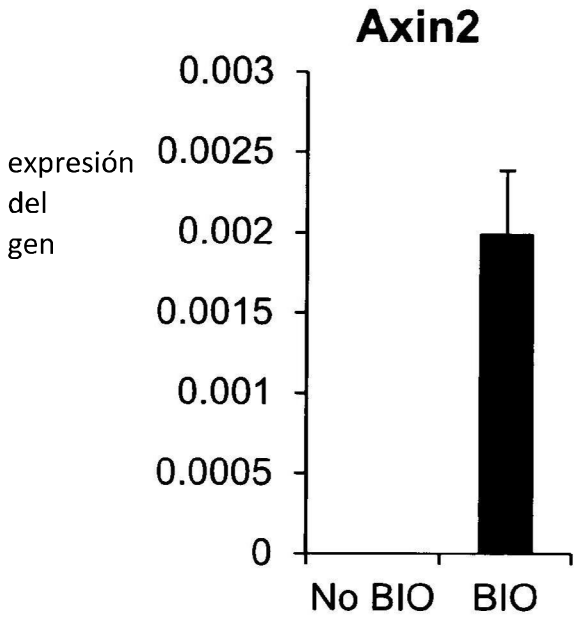


Fig. 12D



Fig. 12E

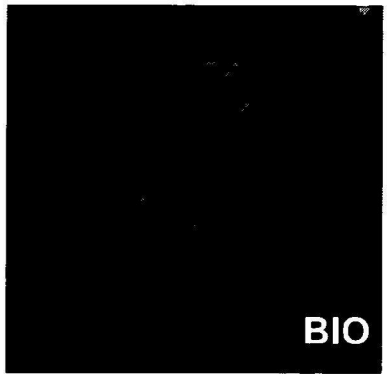


Fig. 12F

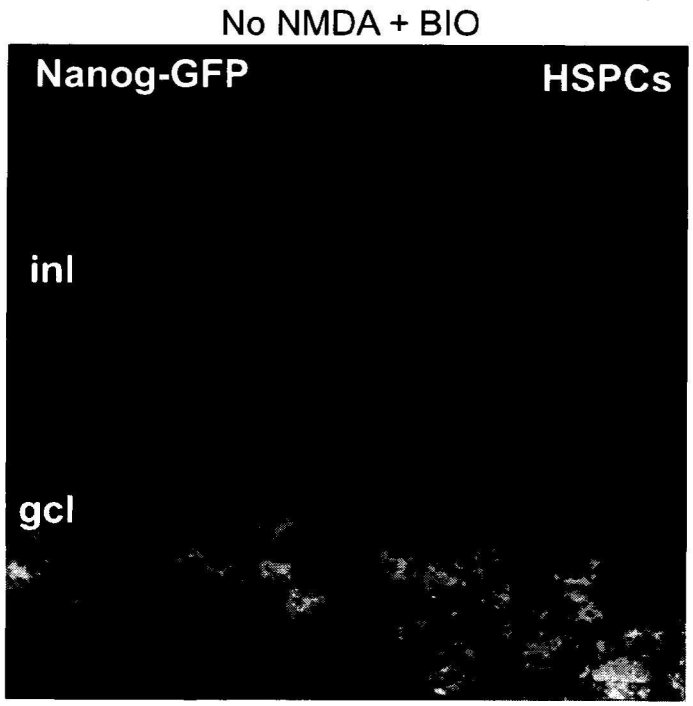


Fig. 12G

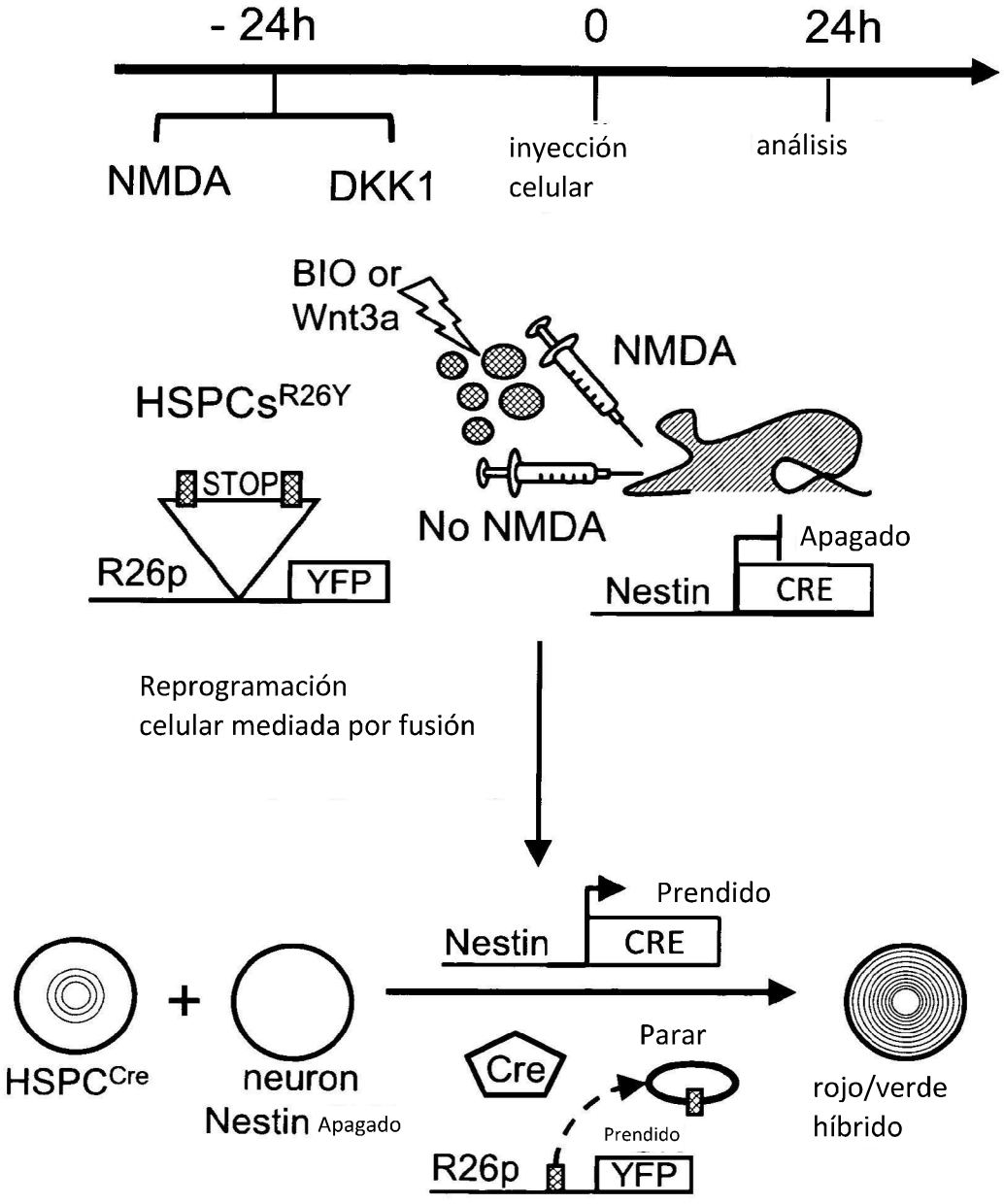

- 24h
0
24h
NMDA
DKK1
inyección celular
análisis
BIO or Wnt3a
NMDA
HSPCsR26Y
STOP
R26p
YFP
No NMDA
Apagado
Nestin
CRE
Reprogramación celular mediada por fusión
Prendido
Nestin
CRE
HSPCCre
neuron
Nestin Apagado
Cre
Parar
Prendido
R26p
YFP
rojo/verde híbrido

Fig. 13A

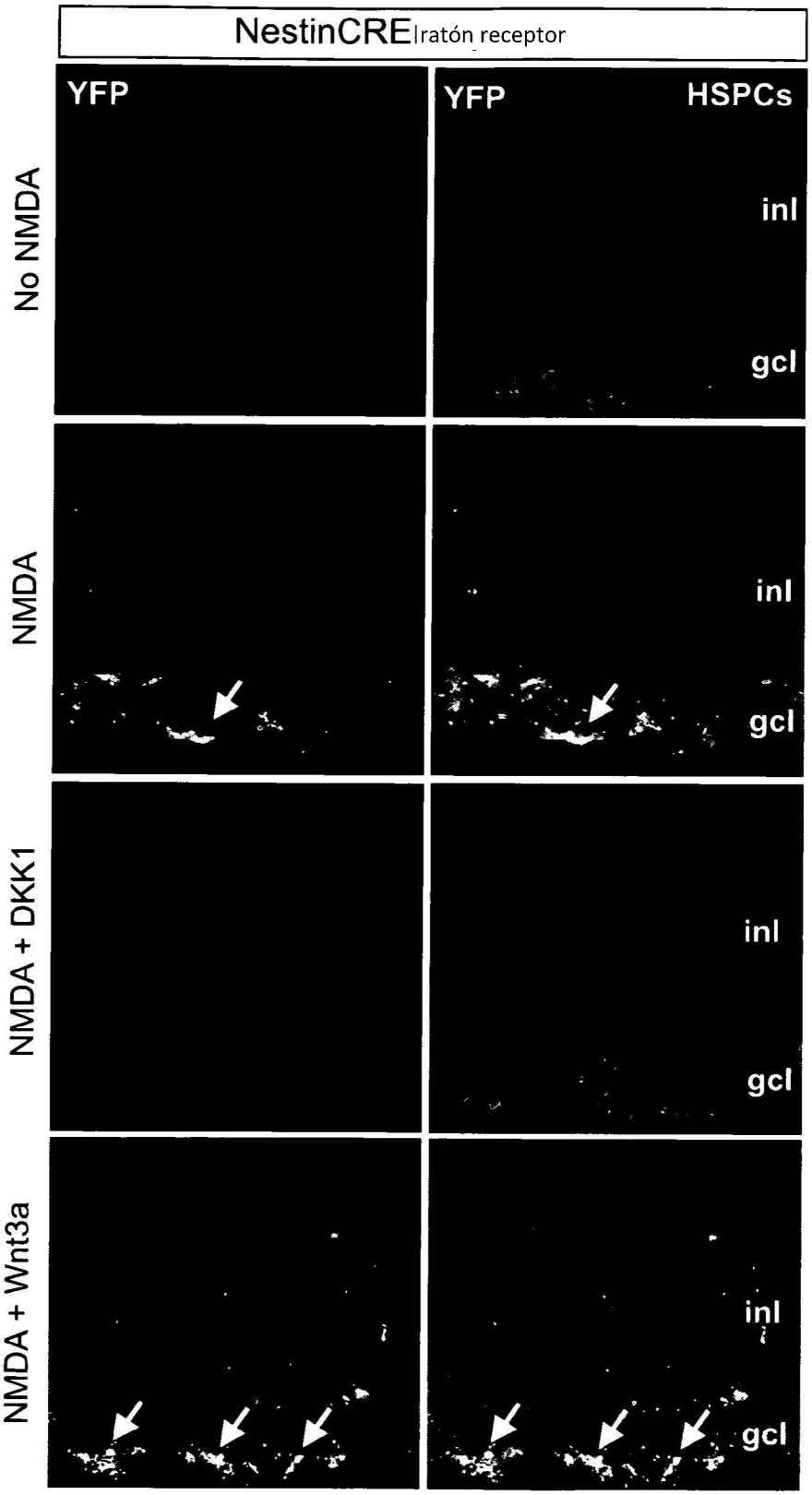

NestinCRE ratón receptor
YFP
YFP
HSPCs
inl
gcl
No NMDA
NMDA
NMDA + DKK1
NMDA + Wnt3a

Fig. 13B

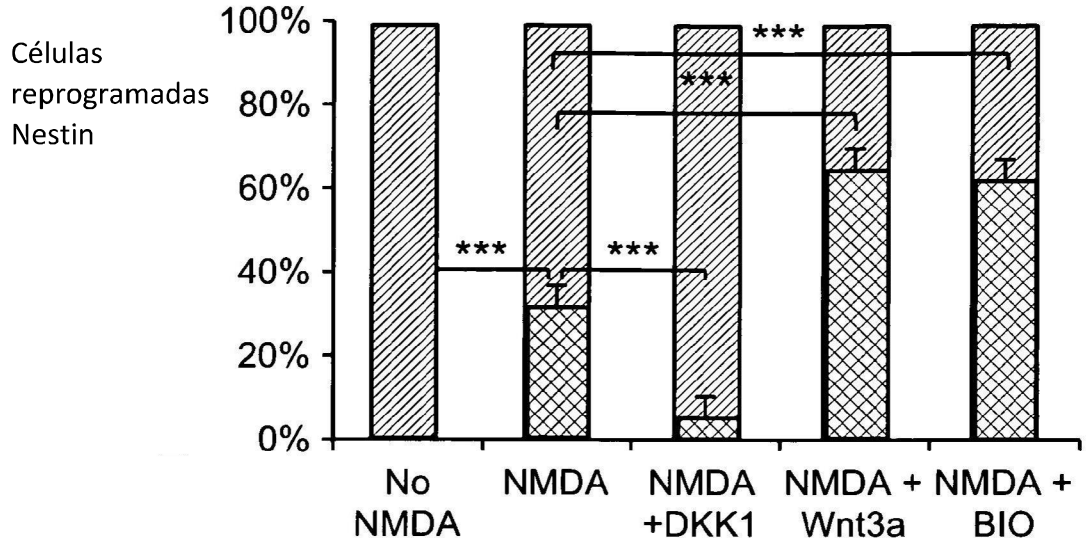


Fig. 13C

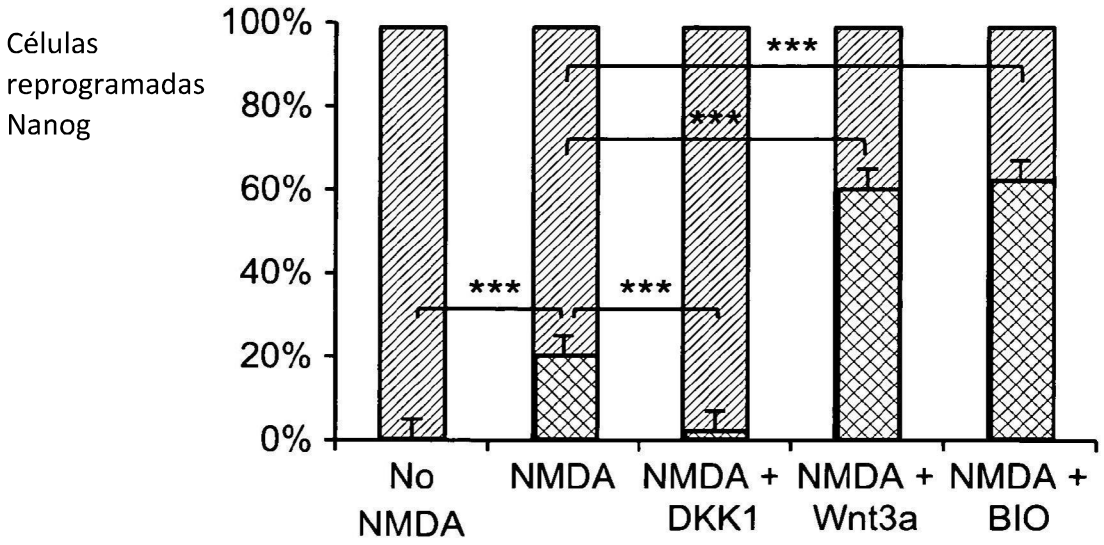


Fig. 13D

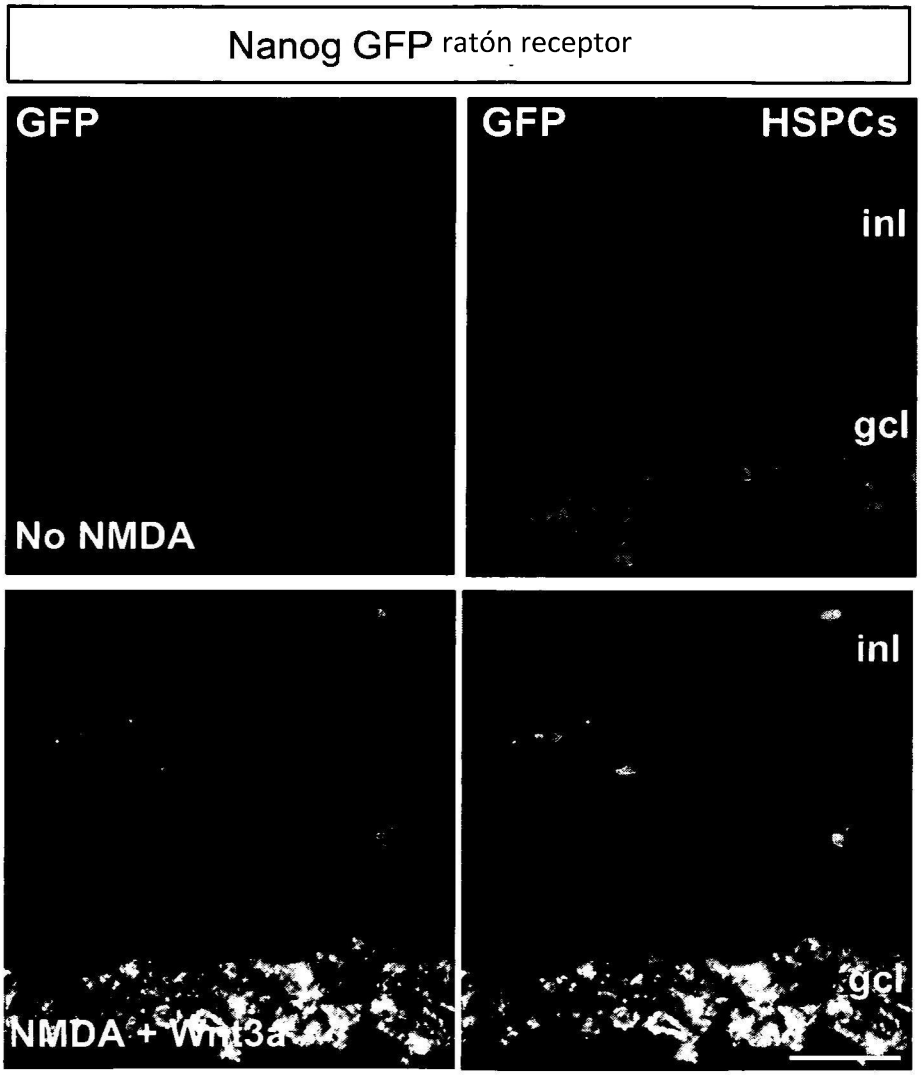

Nanog GFP ratón receptor
GFP
GFP
HSPCs
inl
gcl
No NMDA
inl
gcl
NMDA + Wnt3a

Fig. 13E

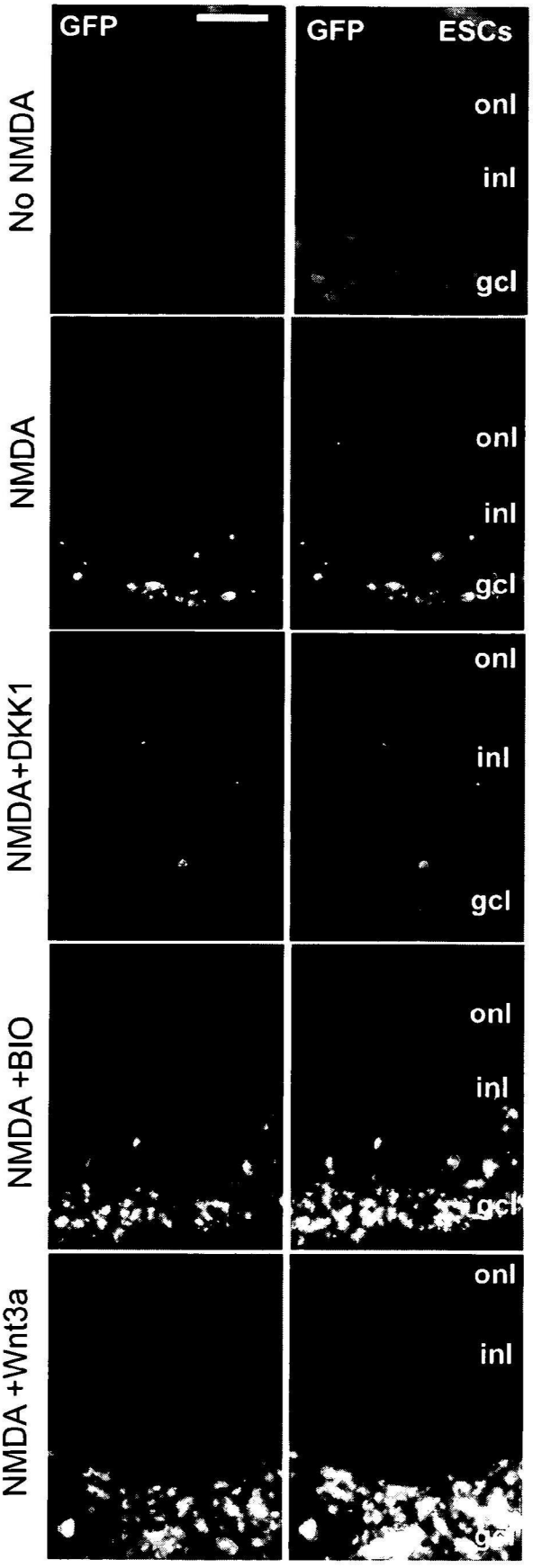

GFP
GFP
ESCs
No NMDA
NMDA
NMDA+DKK1
NMDA +BIO
NMDA +Wnt3a
onl
inl
gcl

Fig. 14A

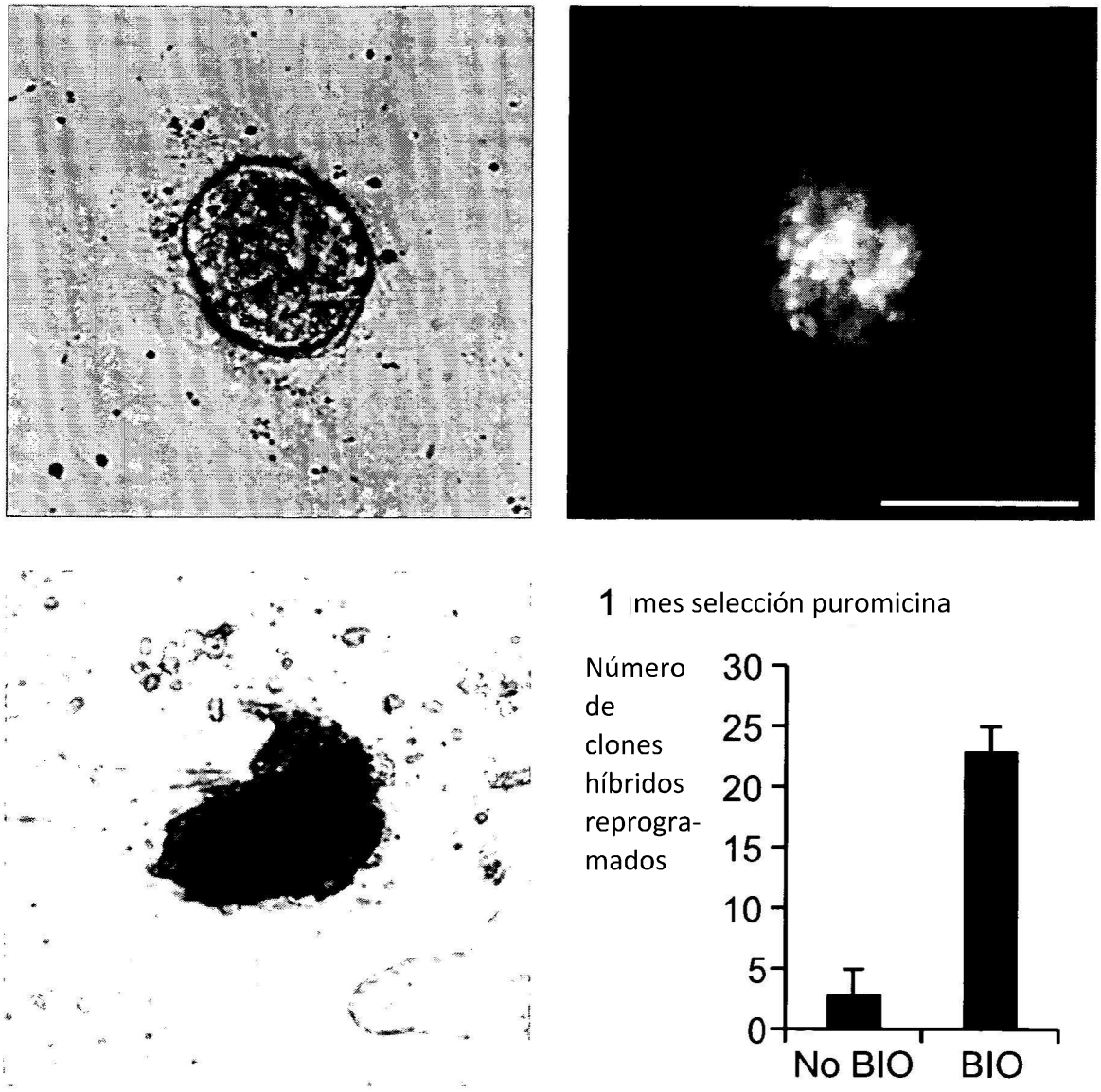

1 mes selección puromicina
Número de clones híbridos reprogra-mados
30
25
20
15
10
5
0
No BIO
BIO

Fig. 14B

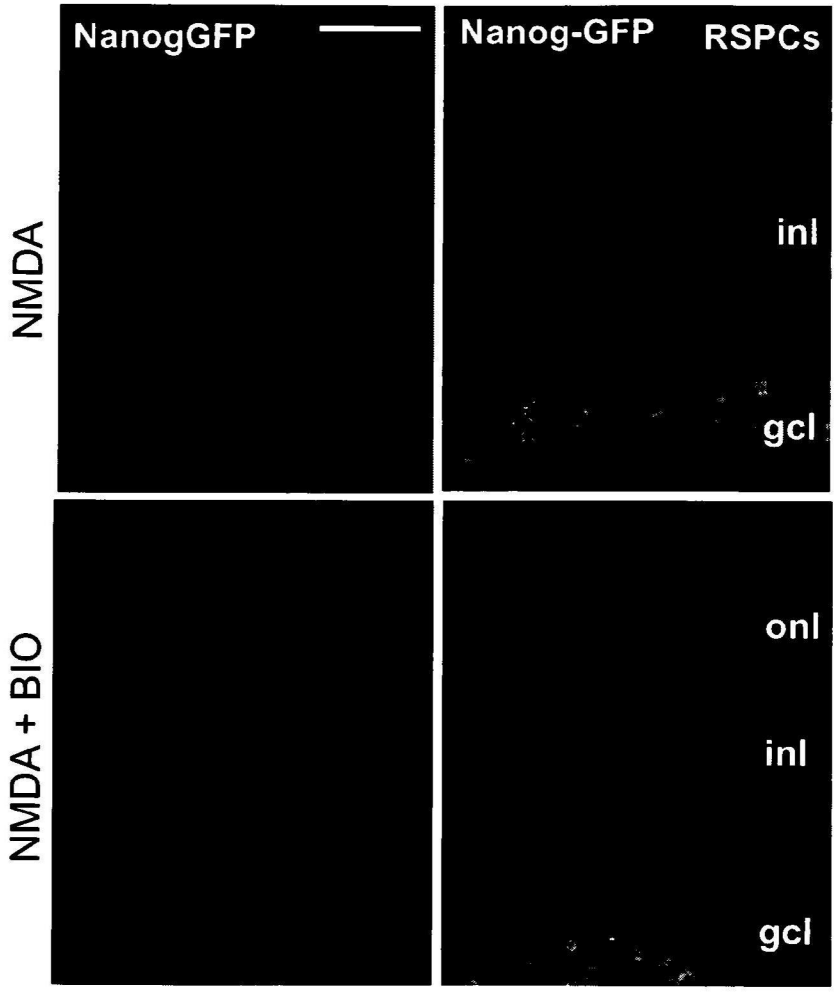


Fig. 14C

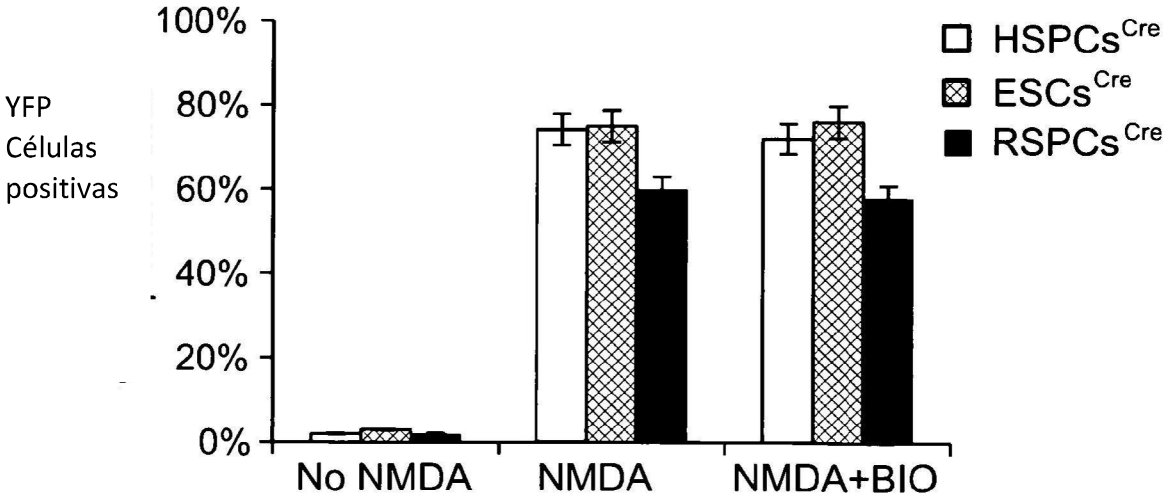


Fig. 14D

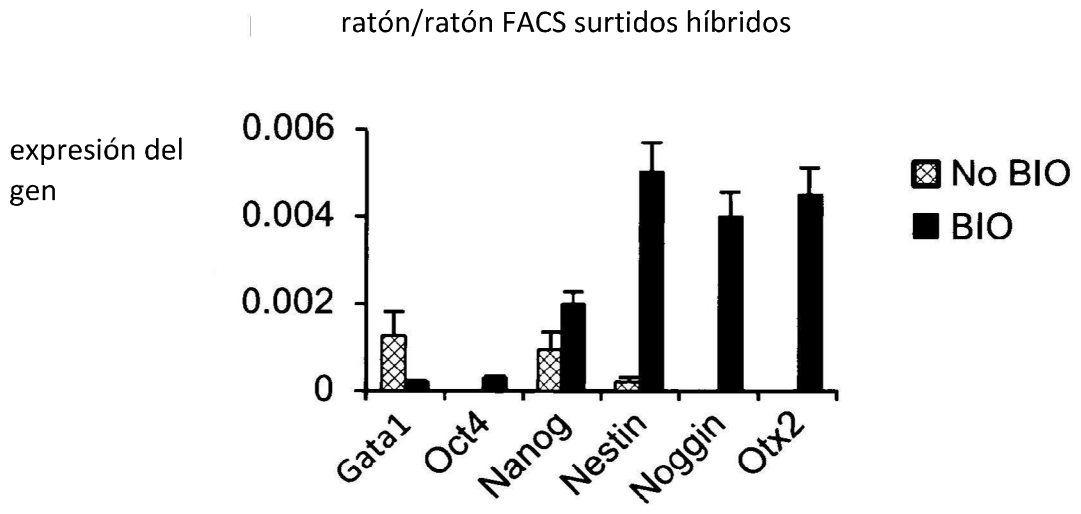

ratón/ratón FACS surtidos híbridos
expresión del gen
0.006
0.004
0.002
0
Gata1
Oct4
Nanog
Nestin
Noggin
Otx2
No BIO
BIO

Fig. 15A

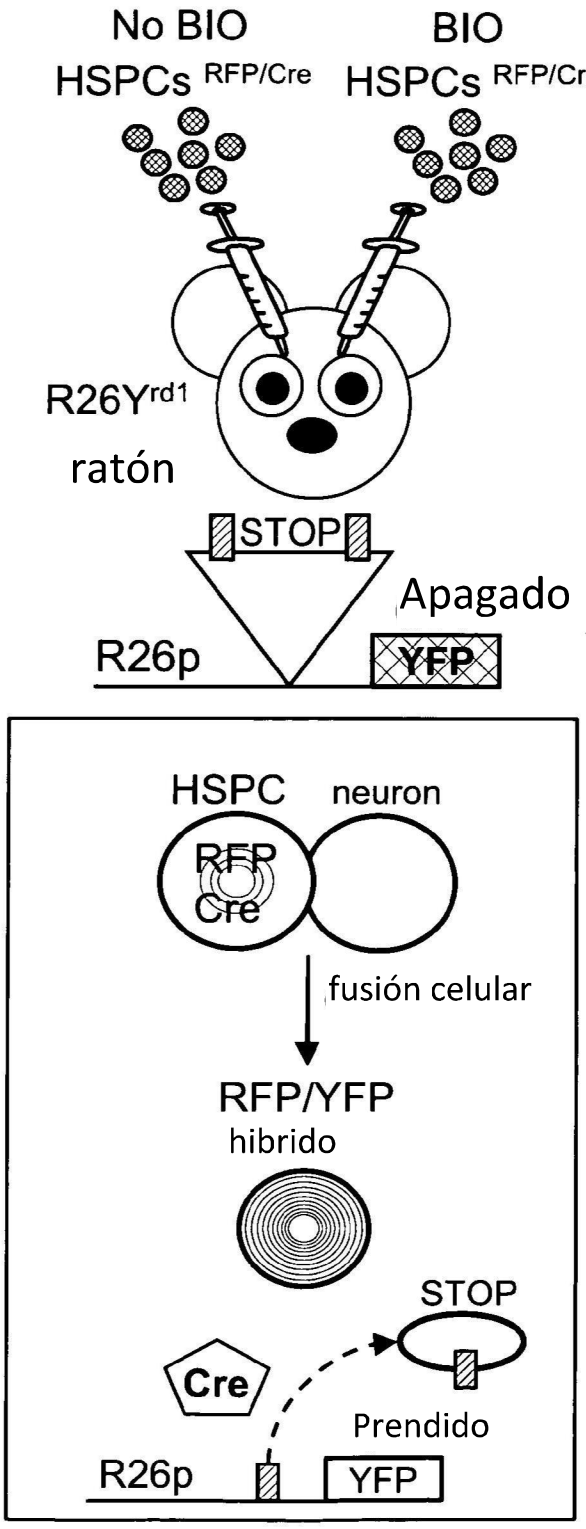

No BIO
HSPCs RFP/Cre
BIO
HSPCs RFP/Cre
R26Y^rd1
ratón
STOP
Apagado
R26p
YFP
HSPC
neuron
RFP
Cre
fusión celular
RFP/YFP
hibrido
STOP
Cre
Prendido
R26p
YFP

Fig. 1A

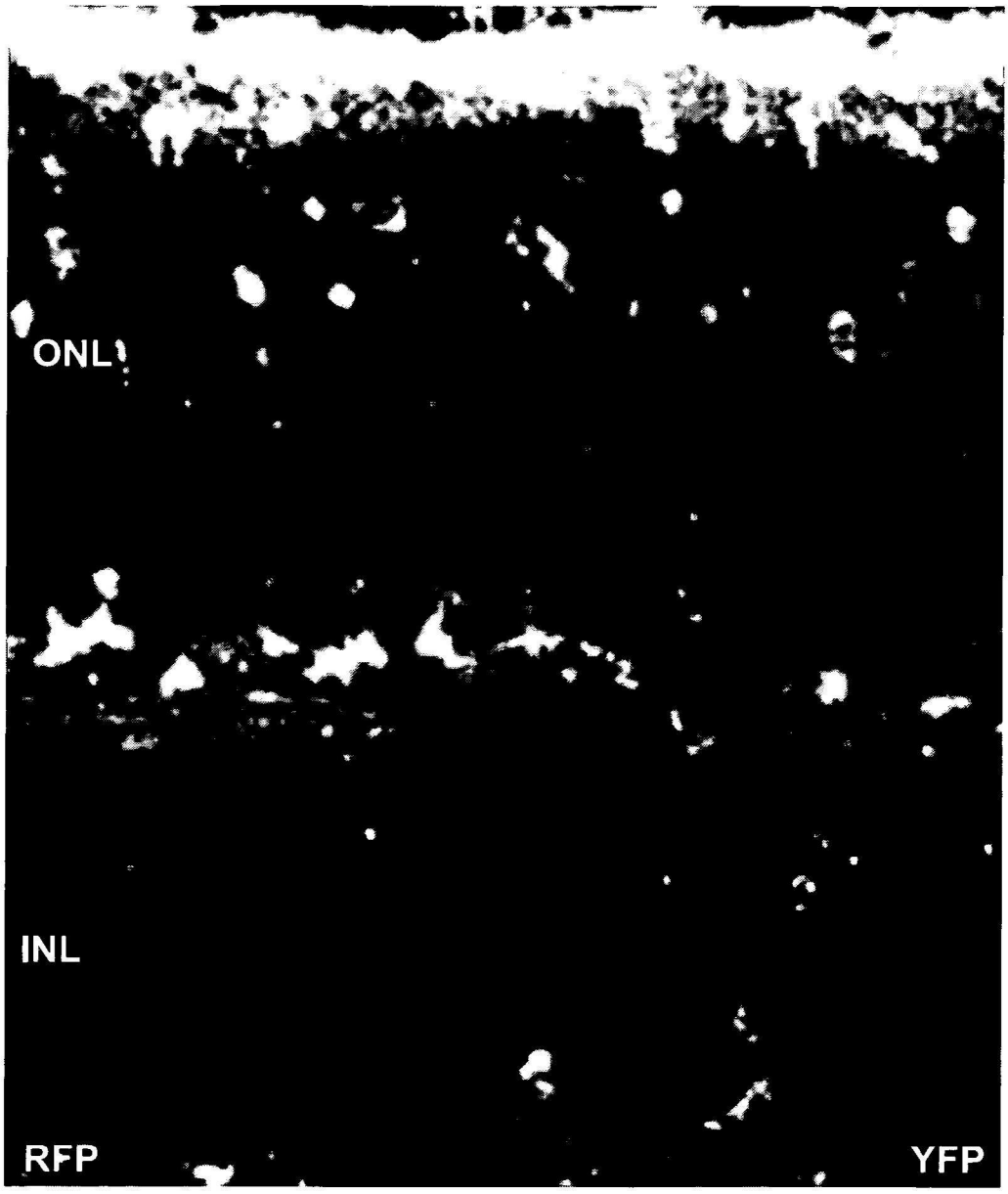


Fig.1B

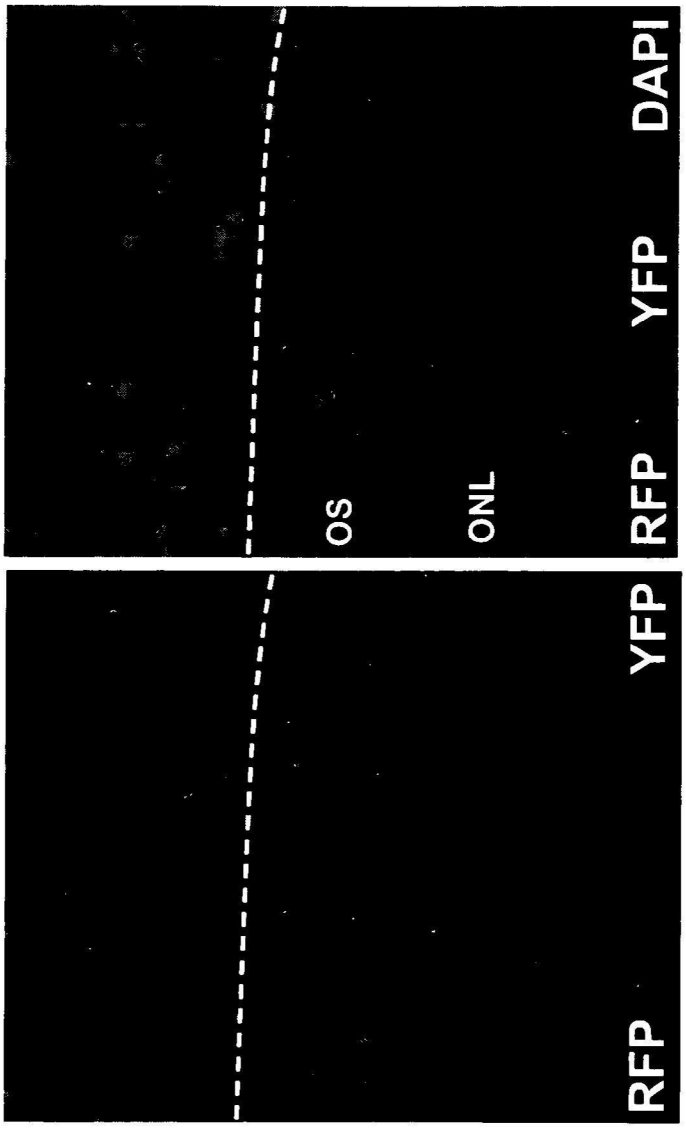


Fig.1E

Fig.1D

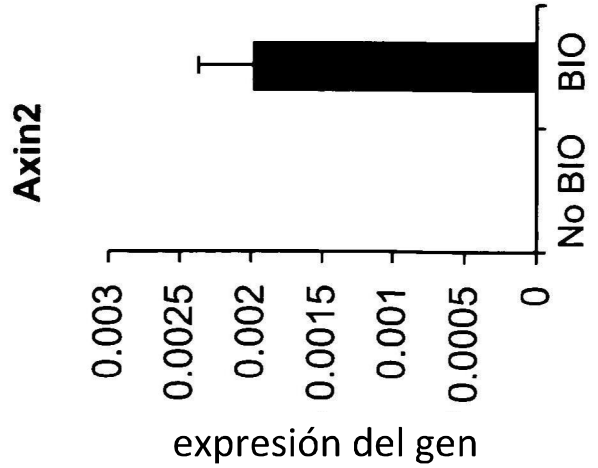


Fig.1C

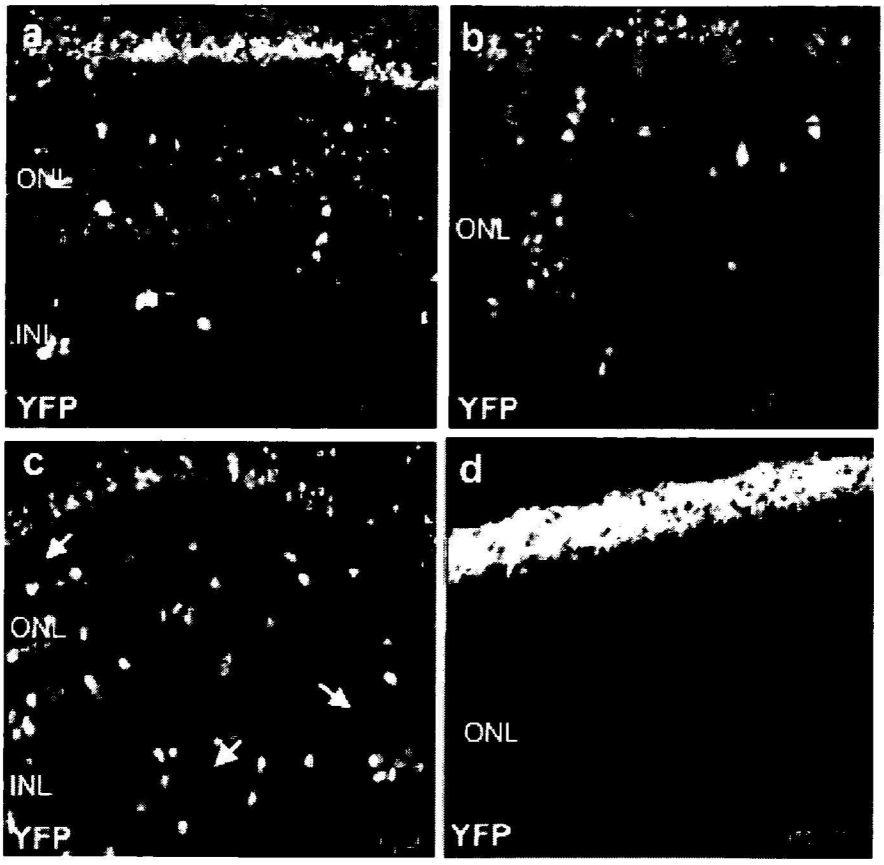


Fig. 2

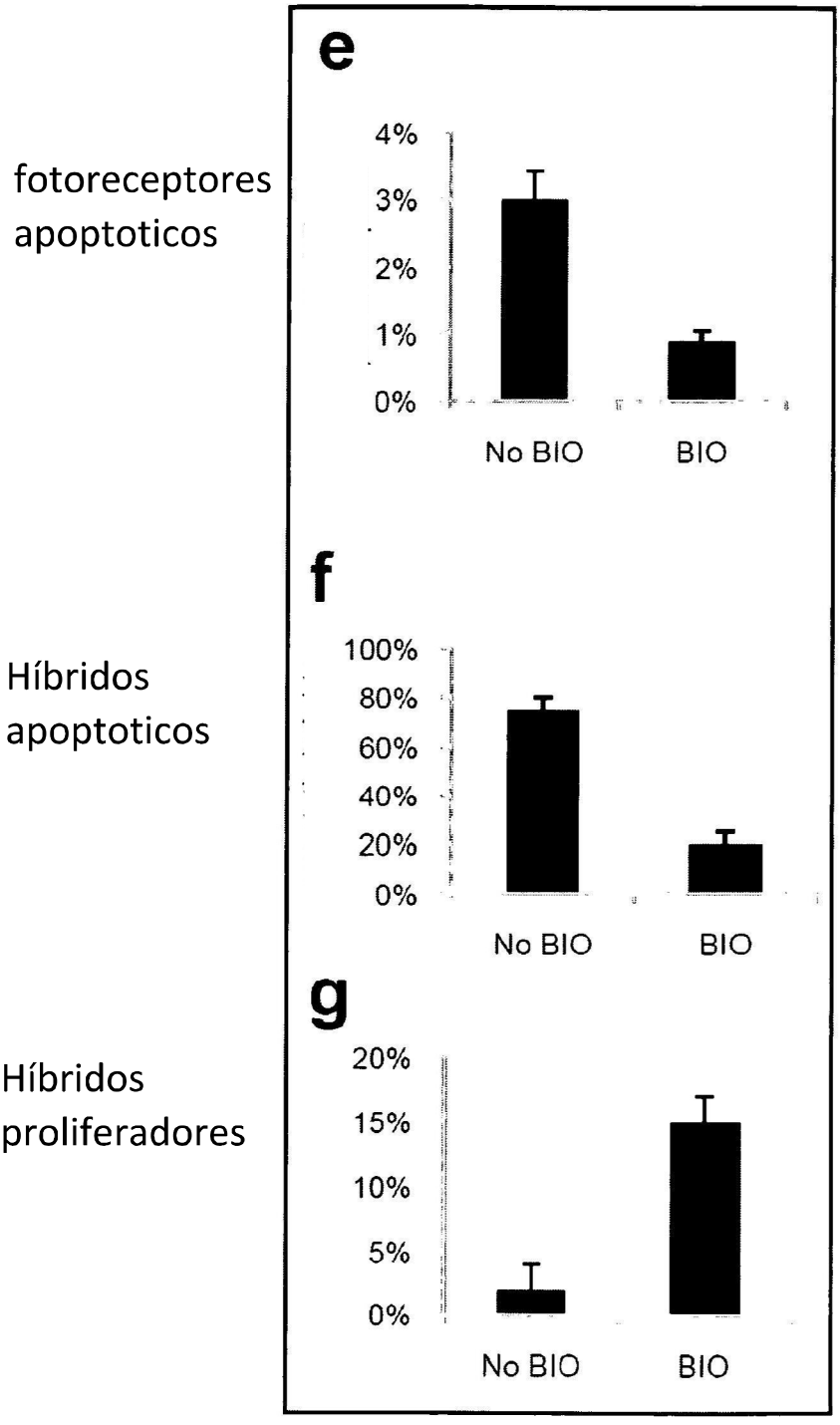

fotoreceptores apoptoticos
e
4%
3%
2%
1%
0%
No BIO
BIO
Híbridos apoptoticos
f
100%
80%
60%
40%
20%
0%
No BIO
BIO
Híbridos proliferadores
g
20%
15%
10%
5%
0%
No BIO
BIO

Fig. 2

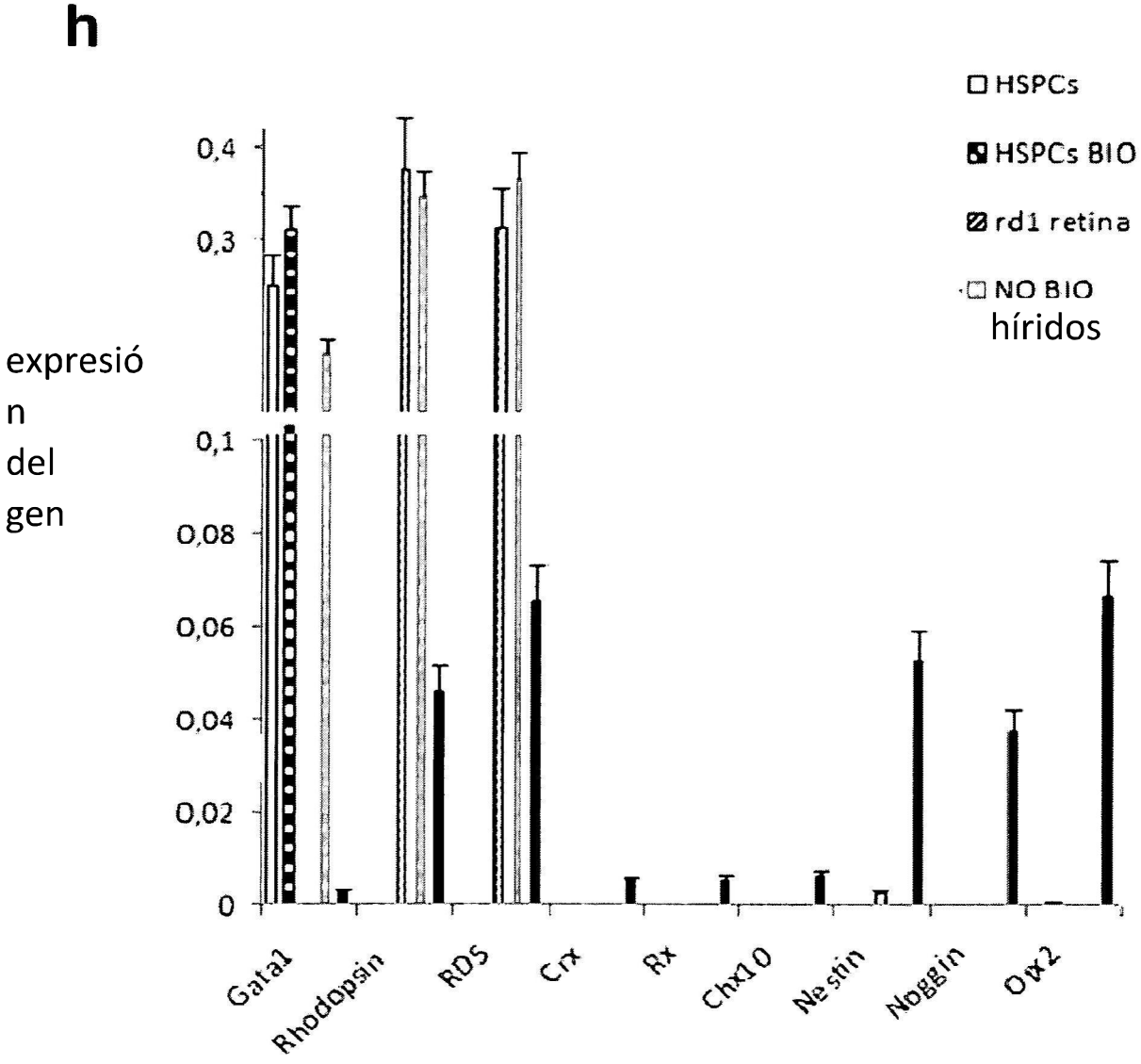

h
HSPCs
HSPCs BIO
rd1 retina
NO BIO
híridos
expresión del gen
0,4
0,3
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
Gata1
Rhodopsin
RDS
Crx
Rx
Chx10
Nestin
Noggin
Otx2

Fig. 2

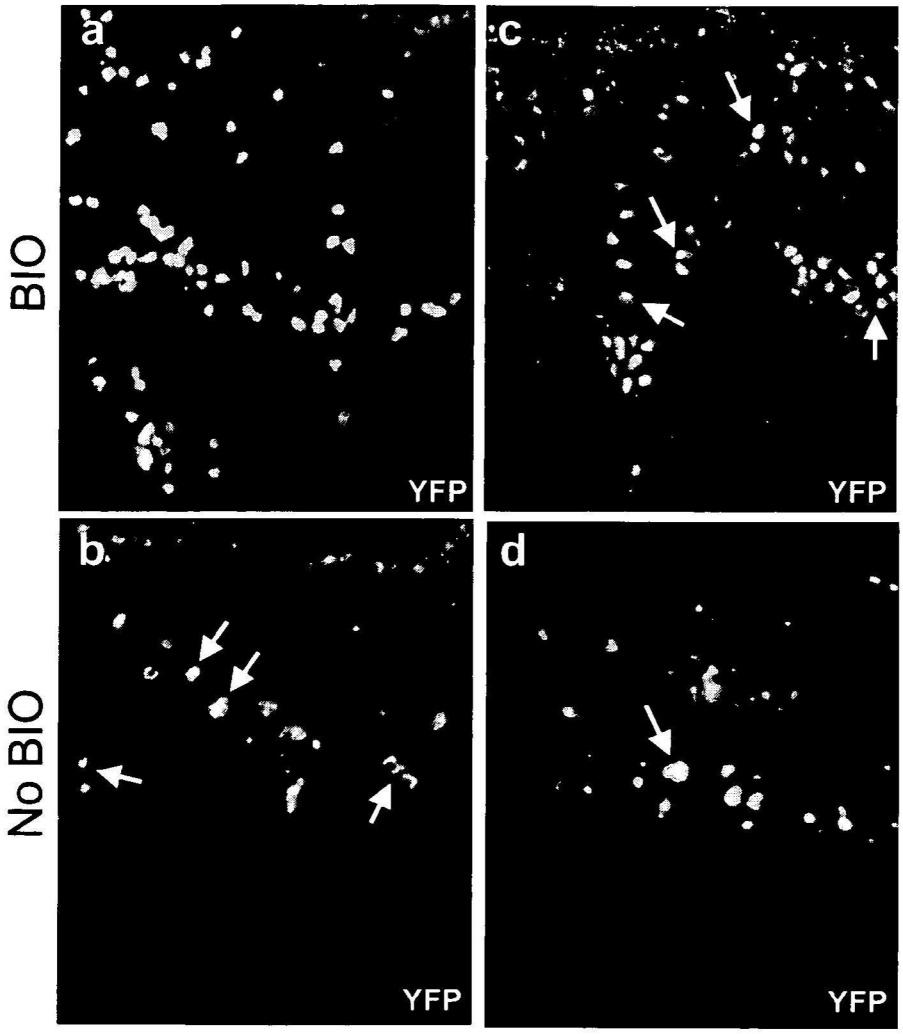


Fig. 3

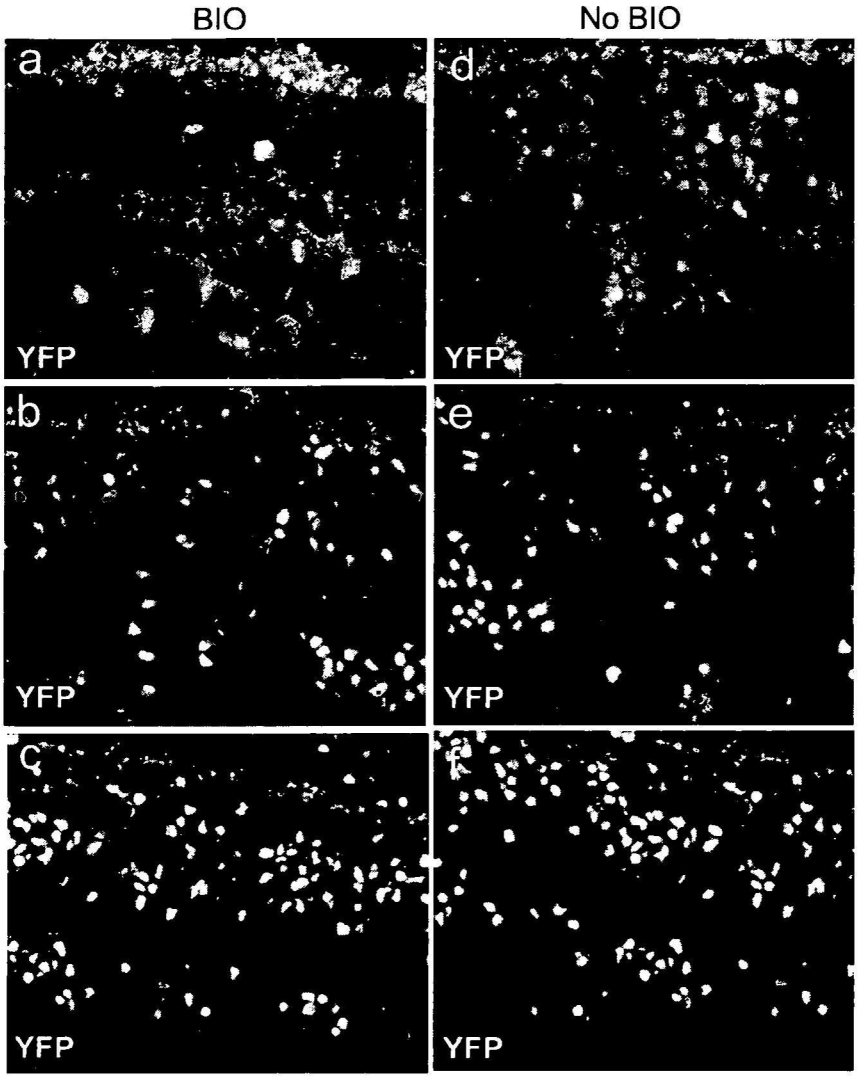


Fig. 4

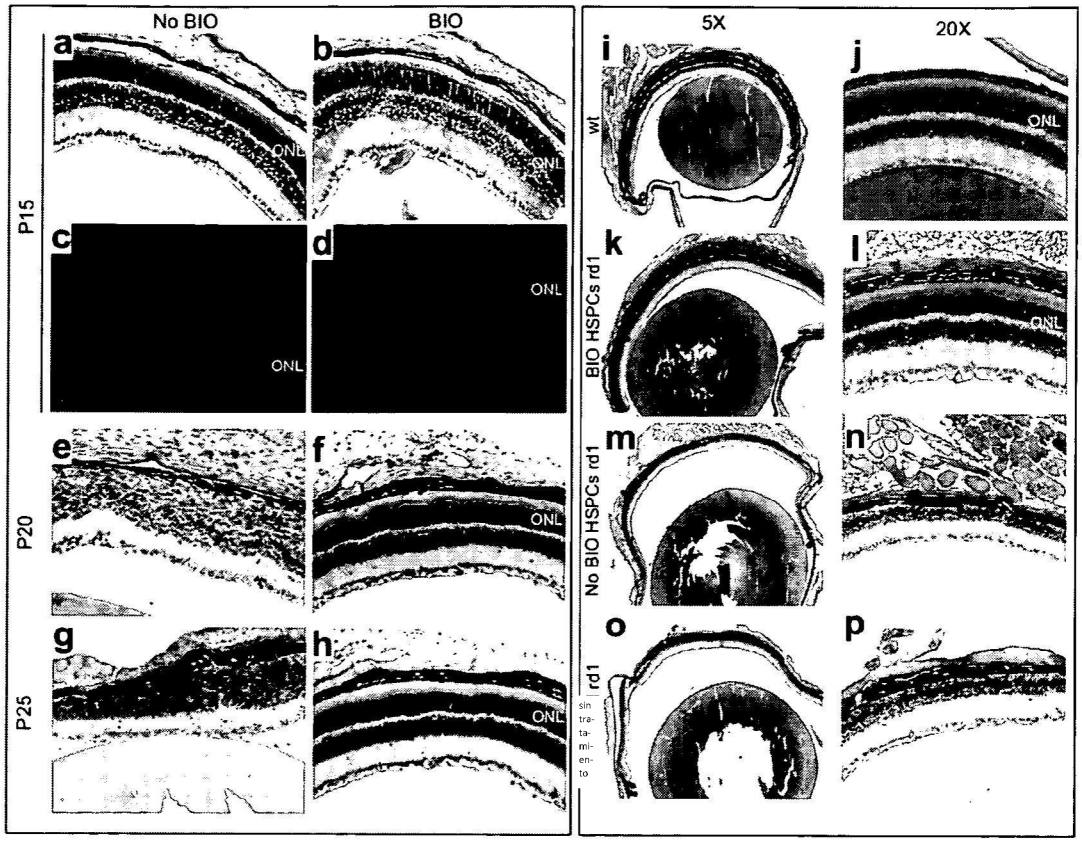

No BIO
BIO
5X
20X
P15
P20
P25
wt
BIO HSPCs rd1
No BIO HSPCs rd1
rd1
sin tratamiento
ONL

Fig. 5

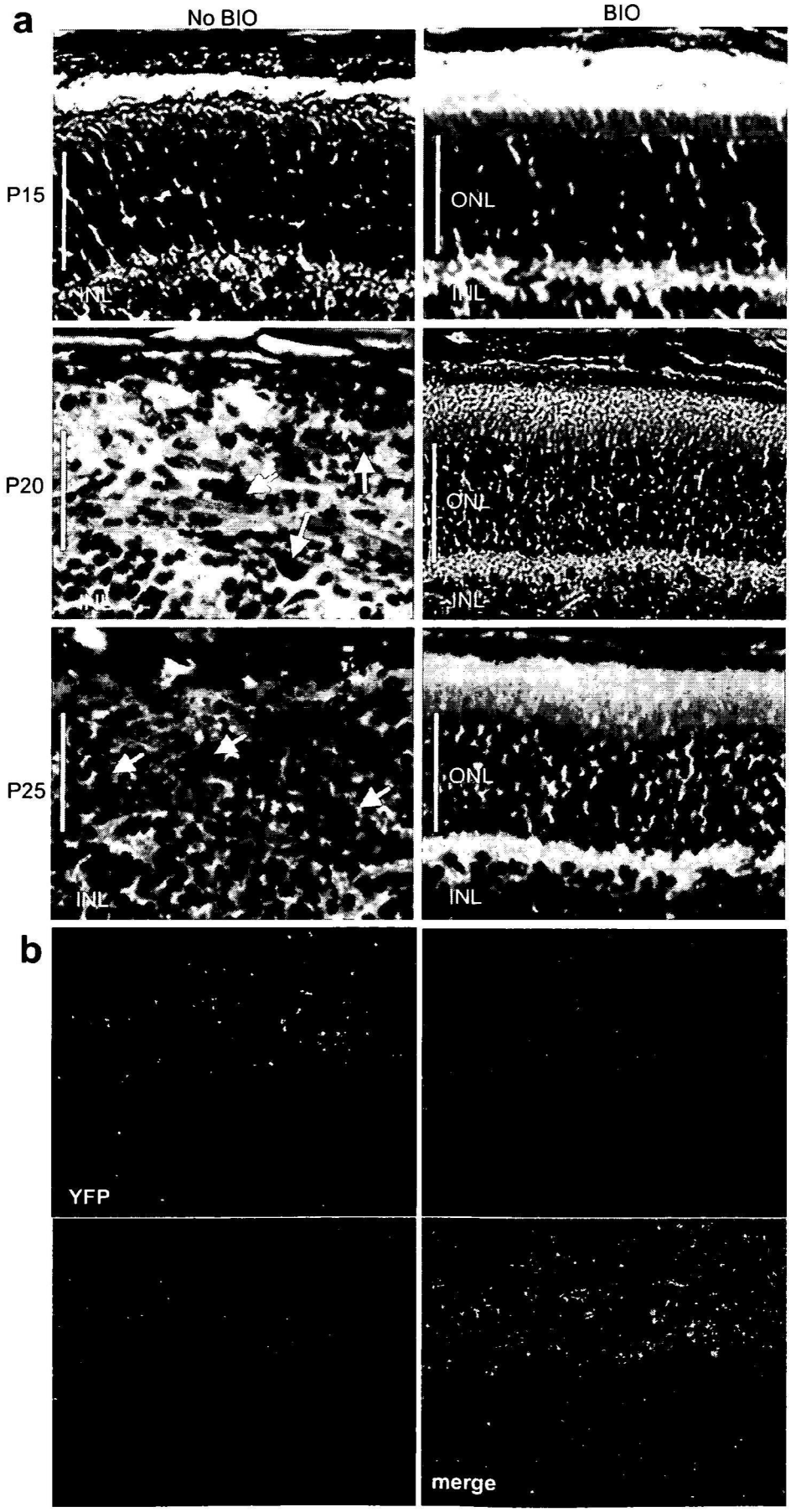


Fig. 6

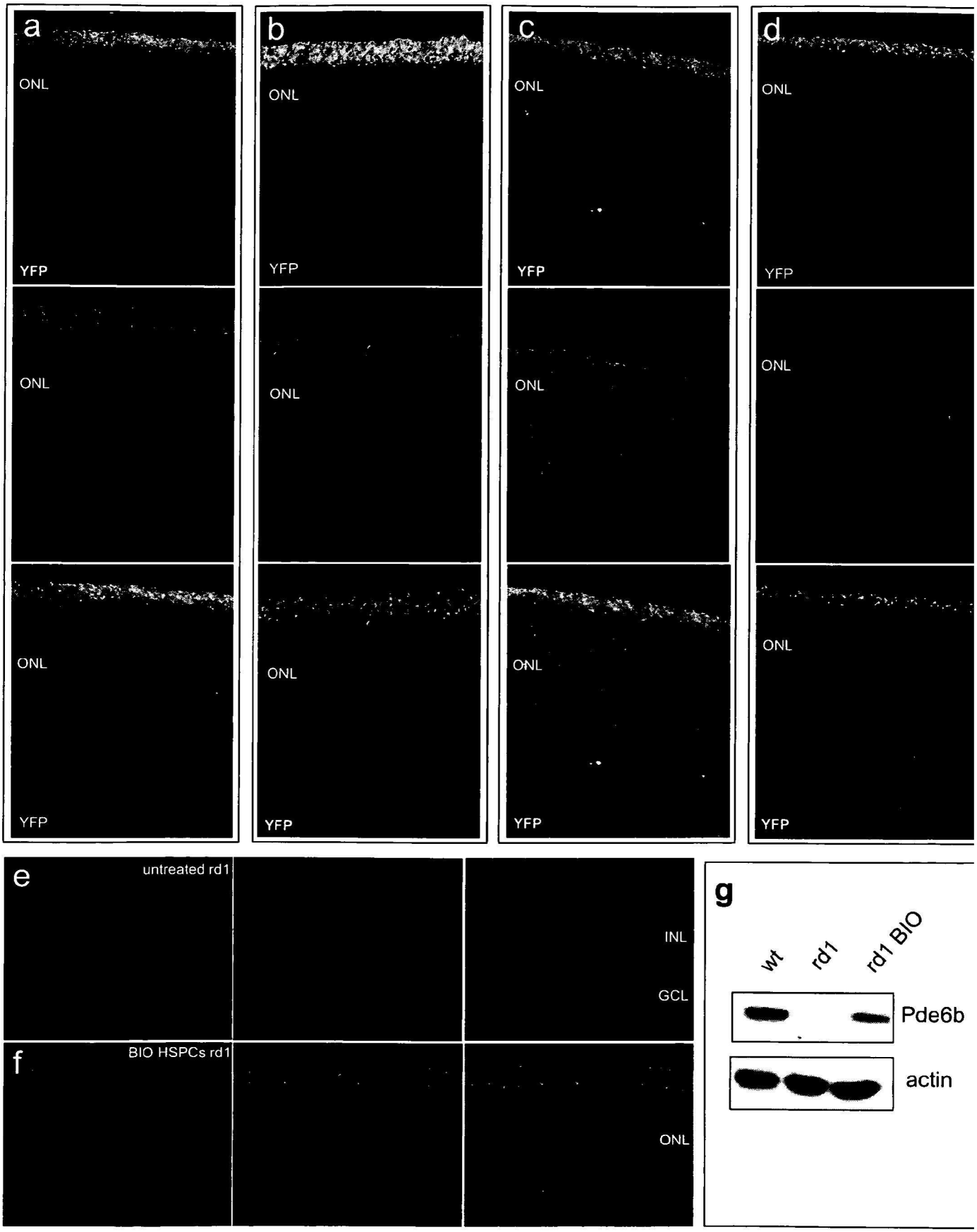

a
b
c
d
ONL
YFP
e
untreated rd1
INL
GCL
f
BIO HSPCs rd1
ONL
g
wt
rd1
rd1 BIO
Pde6b
actin

Fig.7

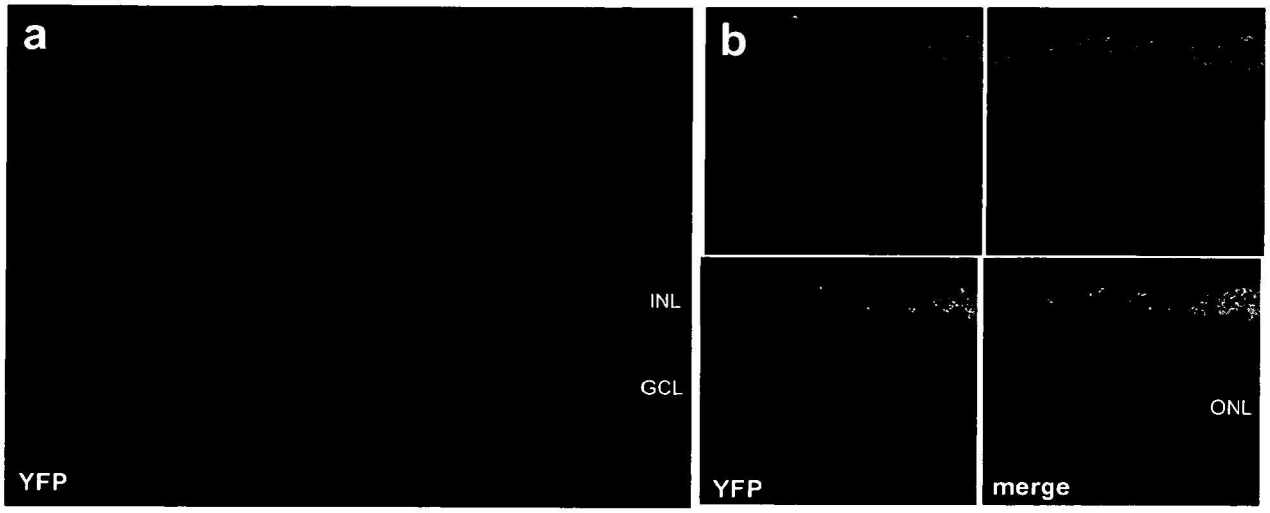


Fig. 8

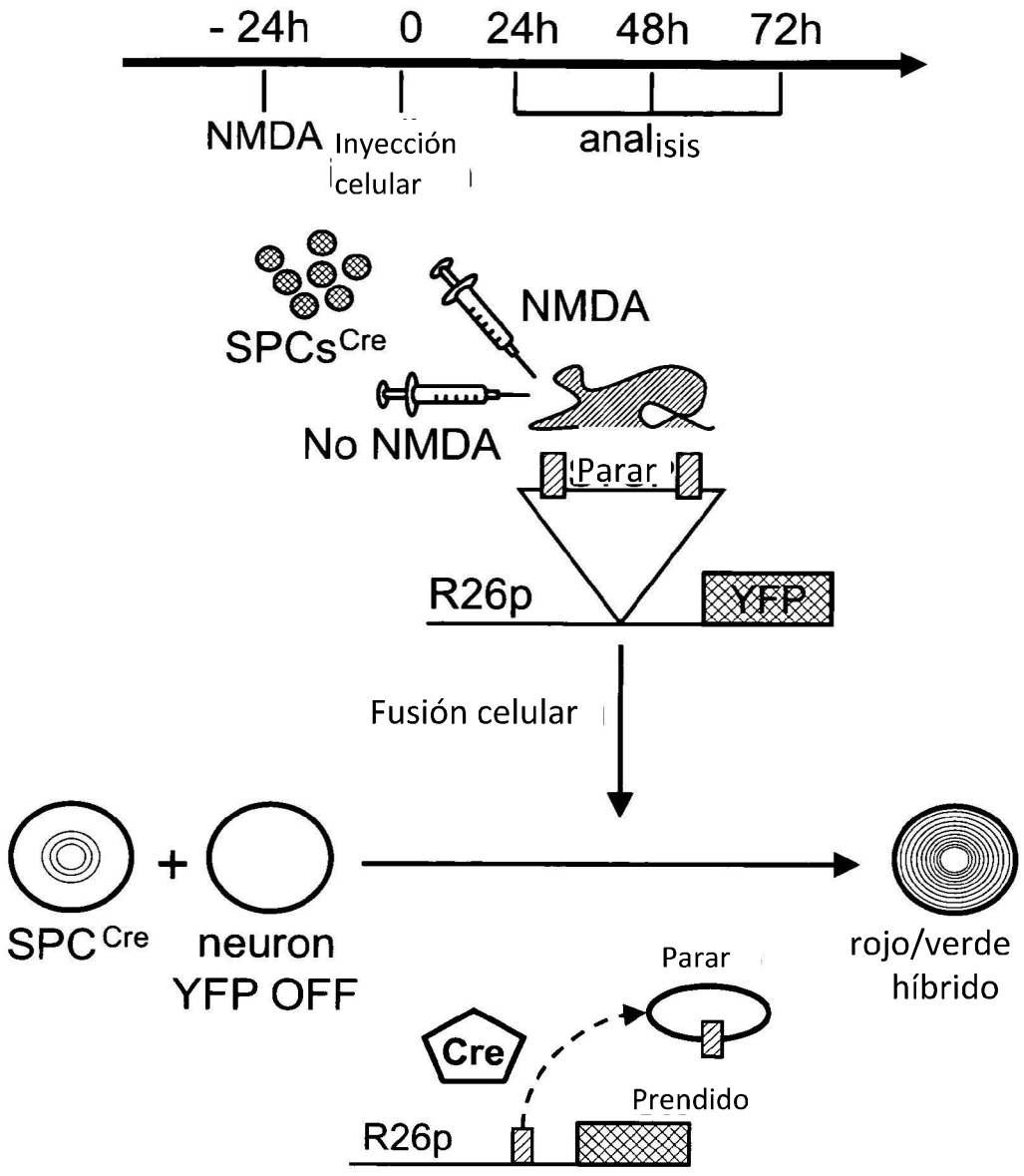

- 24h
0
24h
48h
72h
NMDA
Inyección celular
analisis
SPCs Cre
NMDA
No NMDA
Parar
R26p
YFP
Fusión celular
SPC Cre
neuron YFP OFF
rojo/verde híbrido
Parar
Cre
Prendido
R26p

Fig. 9A

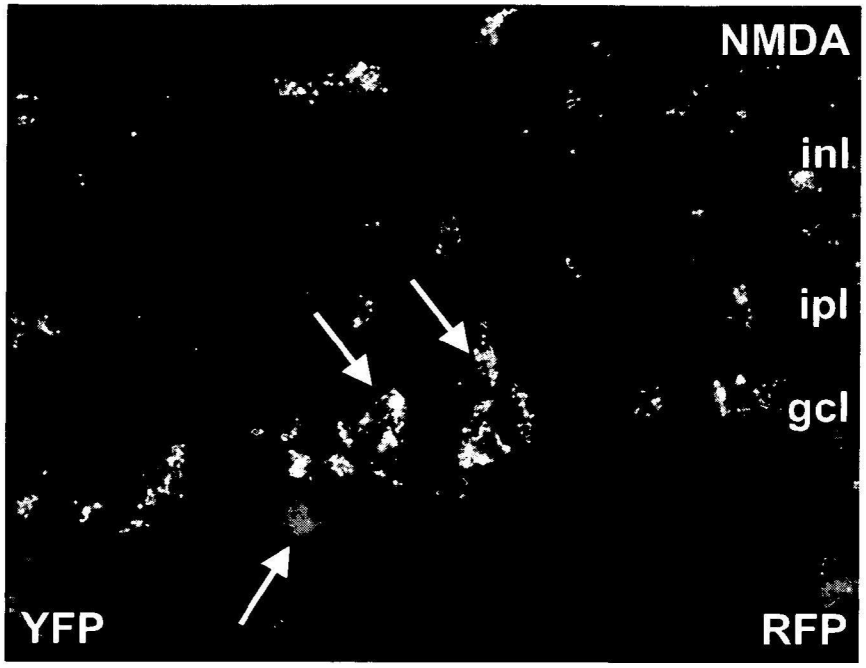


Fig. 9B

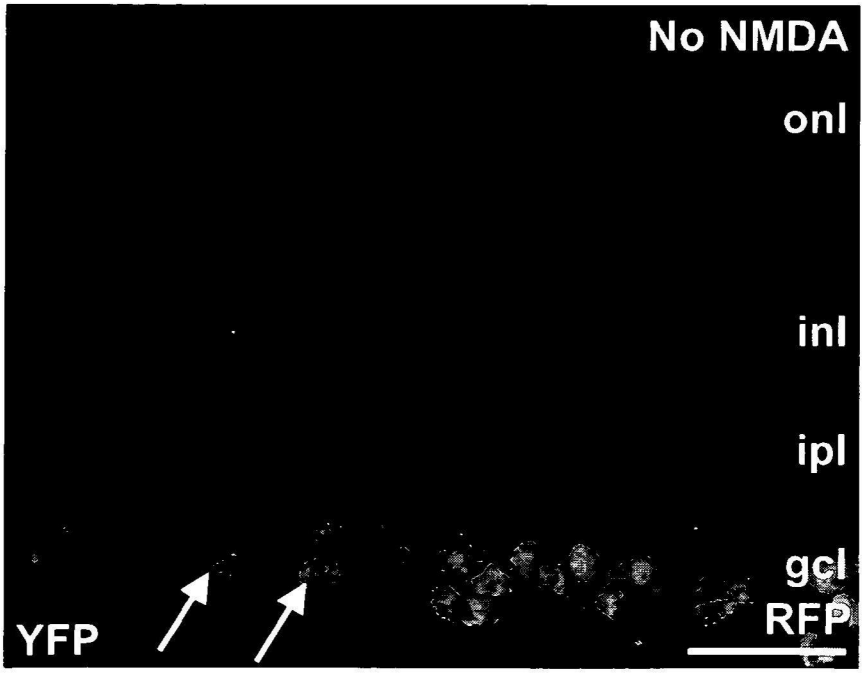


Fig. 9C

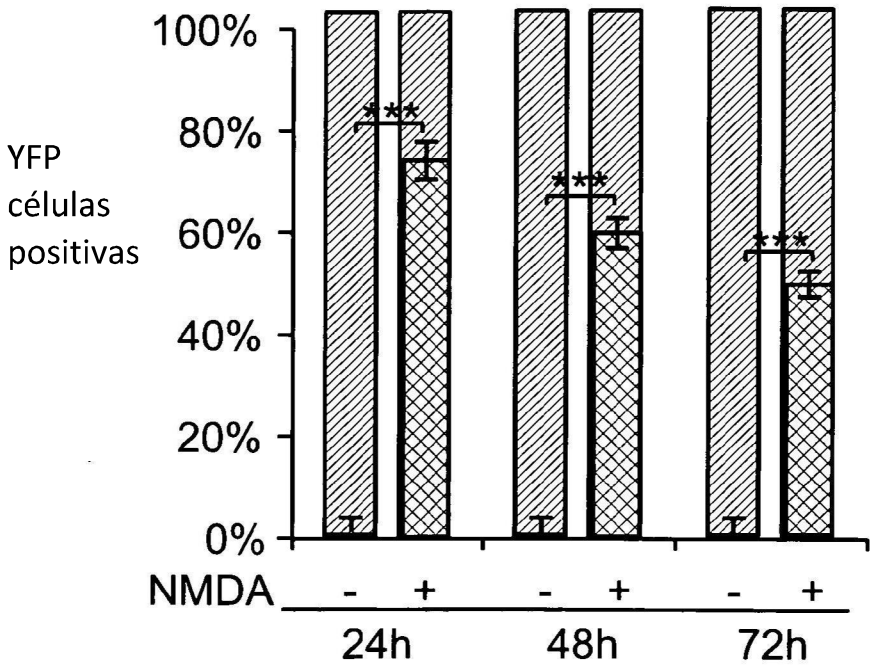


Fig. 9D

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEGENERACIÓN RETINIANA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere al campo de la terapia basada en células o regenerativa para enfermedades oftálmicas. En particular, la invención proporciona métodos de tratamiento de enfermedades de degeneración retiniana mediante la administración de células, teniendo dichas células propiedades de células madre o células progenitoras, a la retina y la reprogramación de células de la retina, tales como neuronas de la retina o células gliales de la retina, mediada por la fusión celular de dichas células con dichas células de la retina, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La retina es un tejido especializado sensible a la luz en la parte posterior del ojo que contiene células fotorreceptoras (bastones y conos) y neuronas conectadas a una red neuronal para el procesamiento de la información visual. Los bastones funcionan en condiciones de baja iluminación mientras que los conos son responsables de la visión en color y de todas las tareas visuales que requieren alta resolución (por ejemplo, la lectura). Los bastones están ubicados en su mayor parte lejos del centro del ojo en la periferia retiniana. La mayor concentración de conos se encuentra en el centro de la retina, la mácula, que es necesaria para la agudeza visual. Para soportar sus funciones metabólicas, la retina depende de células del epitelio pigmentario de la retina adyacente (RPE).

La degeneración retiniana es el deterioro de la retina producido por la muerte progresiva y eventual de las células de la retina o del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Hay varios motivos para la degeneración retiniana, incluyendo oclusión arterial o venosa, retinopatía diabética, fibroplasia retrolenticular/retinopatía del prematuro, o enfermedad (habitualmente hereditaria). Éstas pueden presentarse en muchas formas diferentes tales como visión afectada, ceguera nocturna, desprendimiento de retina, sensibilidad a la luz, visión en túnel, y pérdida de visión periférica hasta pérdida de visión total. La degeneración retiniana se encuentra en muchas formas diferentes de

enfermedades retinianas incluyendo retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética, cataratas, y glaucoma.

La retinitis pigmentosa (RP) es la degeneración retiniana más común con una prevalencia de aproximadamente 1 en 3.000 a 1 en 5.000 individuos, afectando aproximadamente a 1,5 millones de personas en todo el mundo. La RP es una familia heterogénea de trastornos heredados de la retina caracterizada por degeneración progresiva de los fotorreceptores con la posterior degeneración del RPE. Es la degeneración retiniana heredada más común y está caracterizada por depósitos de pigmentos predominantemente en la retina periférica y por una conservación relativa de la retina central. Las manifestaciones típicas se presentan entre la adolescencia y la etapa adulta temprana y conducen a pérdida visual devastadora con una alta probabilidad. En la mayoría de los casos de RP, hay degeneración primaria de bastones fotorreceptores, con degeneración secundaria de conos. La RP es una enfermedad de larga duración que evoluciona habitualmente durante varias décadas, presentándose inicialmente como ceguera nocturna, y más tarde como afectación visual en condiciones diurnas. Actualmente, no existe terapia que detenga la evolución de degeneración retiniana o que restaure la visión. Hay pocas opciones de tratamiento tales como evitar la luz y/o el uso de dispositivos de ayuda para corregir la visión deficiente para ralentizar la progresión de la RP. Algunos médicos también consideran la vitamina A como una posible opción de tratamiento para ralentizar la progresión de la RP.

Se ha investigado ampliamente el tratamiento eficaz para la degeneración retiniana. El campo de la terapia basada en células madre ofrece un gran potencial para el tratamiento de enfermedades degenerativas retinianas ya que muchos estudios en modelos animales sugieren que las células madre tienen capacidad para regenerar neuronas retinianas y fotorreceptores perdidos y mejorar la visión. Hasta la fecha, estas células incluyen células progenitoras de la retina, células madre embrionarias, células madre derivadas de médula ósea, y células madre pluripotentes inducidas.

Las células progenitoras de la retina (RPC) se derivan de retinas fetales o neonatales, y comprenden una población de células inmaduras que es responsable de la generación de todas las células de la retina durante el desarrollo embrionario. Las RPC pueden proliferar y generar nuevas neuronas y células de soporte retinianas especializadas *in vitro*, y también pueden migrar a todas las capas retinianas y

desarrollar características morfológicas de diversos tipos de células de la retina *in vivo* (MacLaren *et al.*, 2006, Nature 444:203-7). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los trasplantes de RPC son un posible tratamiento para las enfermedades degenerativas retinianas.

Las células madre embrionarias (ESCs) se derivan de la masa celular interna de embriones en estadio de blastocisto, con capacidades de auto-renovación, así como la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células adultas, incluyendo progenitores de fotorreceptores, fotorreceptores, o RPE en ratones y seres humanos (Lamba *et al.*, 2006, PNAS USA 103:12769-74; Osakada *et al.*, 2008, Nat Biotechnol 26:215–224). Lamba *et al.* demostraron que el trasplante de células de la retina derivadas de ESCs humanas en el espacio subrretiniano de ratones adultos Crx($^{-/-}$) promovió la diferenciación de células de la retina derivadas de hESCs en fotorreceptores funcionales, y el procedimiento mejoró las respuestas a la luz en estos animales (Lamba *et al.*, 2009, Cell Stem Cell 4:73-9). Aunque las ESCs son prometedoras en terapias de sustitución de retina, quedan por considerar problemas éticos y de rechazo inmunitario, y las ESCs también se han asociado con formación de teratoma.

La médula ósea alberga al menos dos poblaciones de células madre distintas: células madre mesenquimales (MSCs) y células madre hematopoyéticas (HSCs). Las MSCs pueden inducirse en células que expresan marcadores específicos de linaje de fotorreceptor *in vitro* usando activina A, taurina y factor de crecimiento epidérmico (Kicic *et al.*, 2003, J Neurosci 23:7742-9). Además, un modelo animal *in vivo* demostró que MSCs inyectadas en el espacio subrretiniano puede ralentizar la degeneración de células de la retina e integrarse en la retina y diferenciarse en fotorreceptores en ratas Royal College of Surgeons (RCS) (Kicic *et al.*, 2003, J Neurosci 23:7742-9; Inoue *et al.*, 2007, Exp Eye Res 85:234-41).

Otani *et al.* han notificado que células madre hematopoyéticas (HSCs) de linaje negativo (Lin$^-$) inyectadas por vía intravítrea pueden mejorar la degeneración retiniana en ratones *rd1* y *rd10* (Otani *et al.*, 2004, J Clin Invest 114:755-7; documentos US 2008/0317721; US 2010/0303768). Sin embargo, las retinas sometidas a trasplante estaban formadas casi exclusivamente de conos, y las respuestas de electrorretinograma fueron gravemente anómalas y comparables a las de los animales no tratados. Hubo una limitación porque las HSCs Lin$^-$ inyectadas por vía intravítrea se incorporaron

eficazmente a la retina sólo durante un estado de desarrollo postnatal temprano, pero no en ratones adultos, dirigiéndose sólo a astrocitos activados que se observan en ratones neonatales o en un modelo inducido de lesión en el adulto (Otani *et al.*, 2002, Nat Med 8:1004-10; Otani *et al.*, 2004, J Clin Invest 114:755-7; Sasahara *et al.*, 2004, Am J Pathol 172:1693-703).

Las células madre pluripotentes inducidas (iPS) derivadas de tejidos adultos son células similares a ESCs pluripotentes reprogramadas *in vitro* a partir de células somáticas diferenciadas de manera terminal mediante transducción retroviral de cuatro factores de transcripción: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Se ha notificado que las iPS humanas tienen un potencial similar al de ESCs para imitar la retinogénesis normal (Meyer *et al.*, 2009, PNAS USA 106:16698-703). Sin embargo, los problemas principales incluyen reducir el riesgo de integraciones virales y expresión de oncogenes para la generación de iPS. Estas limitaciones pueden vencerse usando métodos alternativos para obtener iPS tales como activación de rutas de señalización, incluyendo las rutas de señalización Wnt/β-catenina, MAPK/ERK, TGF-β y PI3K/AKT (documento 2009/101084; Sanges & Cosma, 2010, Int J Dev Biol 54:1575-87).

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un método eficaz para tratar enfermedades degenerativas retinianas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los inventores han encontrado ahora que puede lograrse la regeneración retiniana mediante la implantación de células, teniendo dichas células propiedades de células madre o células progenitoras, en la retina de un sujeto que se fusionan con células de la retina (o "células retinianas"), tales como neuronas de la retina (o "neuronas retinianas"), por ejemplo, bastones, etc., o células gliales de la retina (o "células gliales retinianas"), para formar células híbridas que reactivan marcadores de precursores neuronales, proliferan, se desdiferencian y finalmente se diferencian en neuronas retinianas diferenciadas de manera terminal de interés, por ejemplo, células fotorreceptoras, células ganglionares, etc., que pueden regenerar el tejido retiniano dañado. La activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es esencial para inducir la desdiferenciación de dichas células híbridas y la rediferenciación final en las neuronas retinianas de interés. En una realización, la activación de la ruta de

señalización Wnt/β-catenina se proporciona, al menos parcialmente, por las células implantadas (que se han tratado con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y/o que sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina), mientras que en otra realización, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se consigue, únicamente, bien como resultado de administrar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, al sujeto que va a tratarse o bien como consecuencia de un daño o lesión en la retina, como ocurre, por ejemplo, en enfermedades de degeneración retiniana (por ejemplo, retinitis pigmentosa). Las neuronas retinianas recién formadas regeneran completamente la retina en los mamíferos sometidos a trasplante, con alguna mejora de la visión funcional. El análisis histológico muestra que dichas retinas regeneradas son indistinguibles de retinas de mamíferos de tipo natural dos meses tras el trasplante. Estos datos muestran que la regeneración mediada por fusión celular es un proceso muy eficaz en la retina de mamíferos, y que puede desencadenarse por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en las células trasplantadas, y que la reprogramación *in vivo* de neuronas retinianas diferenciadas de manera terminal es un posible mecanismo de regeneración tisular. En consecuencia, estas enseñanzas pueden aplicarse para tratar enfermedades en las que la retina se degenera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Controles de fusión celular. (a) Representación esquemática del plan experimental. La fusión celular *in vivo* entre $HSPCs^{RFP/Cre}$ con neuronas retinianas de ratones LoxP-STOP-LoxP-YFP (R26Y) conduce a escisión de un codón de terminación flanqueado por LoxP en las neuronas retinianas, y a su vez, a expresión de YFP. Los híbridos resultantes expresan tanto RFP como YFP. (b) Micrografías de fluorescencia representativas de retinas de $R26Y^{rd1}$ 24 h tras el trasplante subretiniano de $HSPCs^{CRE/RFP}$ tratadas con BIO. Las células positivas para YFP representan híbridos derivados de fusión celular de HSPCs con células de la retina $R26Y^{rd1}$. (c) El análisis mediante RT-PCR del gen diana axina 2 muestra activación de señalización de β-catenina en HSPCs tratadas con BIO. (d-e) Micrografías de fluorescencia representativas de retinas de R26Y de tipo natural p10 24 h tras el trasplante

subretiniano de HSPCs$^{CRE/RFP}$ tratadas con BIO. No se detectaron células positivas para YFP (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI en (e). Las líneas discontinuas muestran la parte final del tejido retiniano. OS: segmento externo; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna.

Figura 2. Las HSPCs trasplantadas se fusionan e inducen desdiferenciación de células de la retina de ratón *rd1* con la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. (a-d) Micrografías de fluorescencia representativas de retinas de ratón R26Y^{rd1} 24 h tras el trasplante subretiniano de HSPCs$^{CRE/RFP}$. Se detectaron híbridos dobles positivos para RFP/YFP (rojo/verde) tras la fusión celular de HSPCs (rojo) con células de la retina de *rd1* en la ONL, y algunos en la INL. Estos híbridos positivos para YFP (YFP, verde) también son positivos para marcadores para células de bastones (rodopsina; rojo en b) y de Müller (glutamina sintetasa; rojo en c), pero no para conos (d). (e-g) Cuantificación de híbridos de fotorreceptores apoptóticos (e) y apoptóticos (f) y en proliferación (g) 24 h tras el trasplante de HSPCs^{CRE} no tratadas con BIO (No BIO) y tratadas con BIO (BIO) en ojos R26Y^{rd1} p10. Los números se calcularon como el porcentaje de fotorreceptores positivos para TUNEL con respecto a núcleos de fotorreceptores totales (e) o como el porcentaje de células positivas para anexina V (f) o Ki67 (g) con respecto al número total de células híbridas positivas para YFP. (h) PCR en tiempo real de genes (tal como se indica) expresadas en las HSPCs y las células de la retina e híbridas (tal como se indica). ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna.

Figura 3. Análisis de proliferación y muerte celular de híbridos desdiferenciados. Tinción de inmunofluorescencia representativa de anexina V (a, b) y Ki67 (c, d) en cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} analizados 24 h tras el trasplante en p10 con HSPCs^{CRE} tratadas con BIO (BIO; a, c) o HSPCs^{CRE} no tratadas (No BIO; b, d). La fluorescencia de YFP (verde) localiza los híbridos obtenidos tras la fusión. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Las flechas amarillas indican híbridos apoptóticos (b) o en proliferación (c-d).

Figura 4. Análisis por inmunofluorescencia de expresión de marcadores de precursores en híbridos desdiferenciados. Tinción de inmunofluorescencia representativa de nestina (a, d, rojo), nogina (b, e, rojo) y Otx2 (c, f, rojo) en cortes de

retina de ratones R26Y^{rd1} 24 h tras el trasplante en p10 de HSPCs^{CRE} tratadas con BIO (BIO; a-c) o células no tratadas (No BIO; d-f). Los híbridos de YFP (verde) obtenidos tras la fusión fueron positivos para estos marcadores sólo tras el tratamiento con BIO (a-c, flechas amarillas).

Figura 5. Análisis histológico a lo largo del tiempo de regeneración retiniana en ratones *rd1*. (a-h) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL (c, d; rojo) representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sometidos a trasplante en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas (a, c, e, g) o tratadas con BIO (b, d, f, h) y analizados 5 (p15; a-d), 10 (p20; e, f) y 15 días (p25; g, h) tras el trasplante. (i-p) Tinción con H&E representativa de ratones de tipo natural (i, j) y *rd1* (k-p) sin trasplante (i, j, o, p) o sometidos a trasplante en p10 (k-n) con HSPCs (m-n) no tratadas (m, n) o tratadas con BIO (k-l), analizados todos en p60. Ampliación: 20× a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o. ONL: capa nuclear externa.

Figura 6. Análisis histológico a lo largo del tiempo de ojos de R26Y^{rd1} sometidos a trasplante (a-h) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL (c, d; rojo) representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} transplantados en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas (a, c, e, g) o tratadas con BIO (b, d, f, h) y analizados 5 (p15; a-d), 10 (p20; e, f) y 15 días (p25; g, h) tras el trasplante. (i-p) Tinción con H&E representativa de ratones de tipo natural (i, j) y *rd1* (k-p) sin trasplante (i, j, o, p) o transplantados en p10 (k-n) con HSPCs (m-n) no tratadas (m, n) o tratadas con BIO (k-l), analizados todos en p60. Ampliación: 20×, a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna.

Figura 7. Análisis de diferenciación de híbridos en p60. (a-f) Tinción de inmunofluorescencia representativa de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sin trasplante (e) y sometidos a trasplante en p10 de HSPCs tratadas con BIO (a-d, f) y analizados en p60. (a-d) los híbridos positivos para YFP (verde) son positivos para rodopsina (a, rojo) pero no para la opsina de los conos (b, rojo), glutamina sintetasa (c, rojo), y CD31 (d, rojo). Imágenes inferiores: fusiones de rojo y verde, con núcleos también contrateñidos con DAPI (azul). (e-f) rodopsina (rojo), Pde6b (magenta) y núcleos contrateñidos con DAPI (azul). (g) Inmunotransferencia de tipo Western la expresión de la proteína Pde6b en la retina de ratones de tipo natural (wt) y R26Y^{rd1} o bien no tratados (rd1 NT) o bien

sometidos a trasplante de HSPCs tratadas con BIO (rd1 BIO), analizadas todas en p60. Los lisados de proteína totales se normalizaron con anticuerpo anti-β-actina. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares.

Figura 8. Los híbridos positivos para YFP expresan *PDE6B*. (a) Tinción de inmunofluorescencia representativa de rodopsina (rojo) en corte de retina de ratones R26Y^{rd1} 2 meses tras el trasplante en p10 de HSPCs^{CRE} no tratadas. No se detectaron ni híbridos de YFP (verde) ni fotorreceptores positivos para rodopsina (rojo). Los núcleos se contratiñeron con DAPI. (b) Cortes de retina representativos de ratones R26Y^{rd1} sometidos a trasplante en p10 de HSPCs^{CRE} tratadas con BIO y analizados en p60. Los híbridos positivos para YFP (verde) son positivos tanto para rodopsina (rojo) como para Pde6b (magenta). Los núcleos en imágenes fusionadas se contratiñeron con DAPI (azul). ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares.

Figura 9. Fusión celular dependiente de daño *in vivo*. **(A)** Representación esquemática del plan experimental de fusión celular. La fusión celular *in vivo* entre SPC^{Cre} marcadas con rojo con neuronas retinianas de ratones LoxP-STOP-LoxP-YFP (R26Y) conduce a escisión de un codón de terminación flanqueado por LoxP en las neuronas retinianas, y a su vez, a expresión de YFP. Los híbridos resultantes expresan YFP y también se marcan en rojo. **(B, C)** Fotomicrografías confocales de retinas de R26Y dañadas con NMDA (B) o sanas (C) de ratones sometidos a trasplante de HSPCs$^{RFP/Cre}$. Los ratones se sacrificaron 24 h tras el daño tisular. Se detectaron híbridos dobles positivos para RFP (rojo) y YFP (verde) derivados de fusión celular en presencia de daño por NMDA (B, NMDA), pero no en el ojo no dañado (C, sin NMDA). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). **ONL:** capa nuclear externa; **INL:** capa nuclear interna; **GCL:** capa de células ganglionares. Barra de escala: 50 μm. (**D)** Cuantificación de híbridos formados 24 h tras el trasplante celular, como porcentajes de células positivas para YFP en las HSPCs$^{Cre/RFP}$ rojas totales localizados en los campos ópticos. Se analizaron cortes de ojos dañados por NMDA no dañados (sin NMDA). Los datos son medias ± e.e.m.; n = 90 (tres campos retinianos diferentes de 10 cortes en serie de retina diferentes, para cada ojo. Se analizaron tres ojos diferentes). ***P <0,001. **(E-G):** Análisis inmunohistoquímico de parejas celulares de fusión retiniana. Se

detectaron híbridos de YFP también positivos para marcadores de células ganglionares (E, Thy1.1, rojo), amacrinas (F, sintaxina, rojo) o negativos para marcadores de células de Müller (G, GS, rojo) 12 h tras el trasplante de $HSPCs^{Cre}$ en ojos dañados por NMDA. Las flechas amarillas indican células positivas tanto para YFP como para tinción de marcador. Barra de escala: 10 μm.

Figura 10. Análisis de acontecimientos de fusión celular. **(A)** Tinción con H&E (izquierda) y representación esquemática del tejido retiniano. **(B)** Tinción TUNEL (verde) en cortes de ojos de ratones R26Y sacrificados 48 h tras inyección de NMDA. **(C)** El tratamiento con NMDA en ratones R26Y no activa la expresión de YFP (verde) en neuronas retinianas. **(D)** Se realizó trasplante de células al menos en 3 ojos diferentes por cada experimento. Entonces, se examinó un total de diez cortes en serie de cada uno de los ojos en tres regiones diferentes para cada corte. Se contó el número de células positivas para marcador inmunorreactivo, de células positivas para YFP o de células positivas para GFP dentro de tres áreas (campos ópticos 40X) de la retina en cortes individuales. La razón entre estos últimos números y el número total de células marcadas de rojo (DiD) o células positivas para RFP en los mismos campos dio como resultado el porcentaje de células positivas. Los campos 40X (rectángulos rojos) se eligieron en áreas incluyendo la GCL y la INL del tejido retiniano**. (E)** Se realizó el análisis de citometría de flujo de células tetraploides con un contenido en 4C de ADN en las células totales aisladas de retinas de R26Y dañadas por NMDA sometidas a trasplante de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO. Se detectó la presencia de células tetraploides en una fase G2/M del ciclo celular cuando se activó las células positivas para RFP (híbridos) (gráfico derecho) mientras que no estaban presentes en $HSPCs^{Cre}$ positivas para RFP no fusionadas control (gráfico izquierdo). **(F)** Análisis estadístico de las parejas de fusión retinianas. Los números representan el porcentaje de híbridos de YFP también positivos o bien para marcadores de células ganglionares, amacrinas o de retina de Müller detectados 12 h tras el trasplante de $HSPCs^{Cre}$ en ojos de R26Y dañados por NMDA.

Figura 11. Análisis de acontecimientos de fusión de ESCs y RSPCs. **(A)** Muestras representativas de $DiD\text{-}ESCs^{Cre}$ y $DiD\text{-}RSPCs^{Cre}$ inyectadas o bien en ojos de ratones pretratados durante 24 h con NMDA para inducir daño celular o en ojos sanos

(sin NMDA). En ojos de R26Y 24 h tras la inyección de células (células DiD, rojas), se detecta expresión de YFP (YFP, verde) en los ojos dañados por NMDA (NMDA), pero no en los ojos no dañados (sin NMDA). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 20 μm. (**B)** Cuantificación de células positivas para YFP como porcentaje en relación con el número total de DiD-ESCs^{Cre} y DiD-RSPCs^{Cre} trasplantadas localizadas en los campos ópticos. Se analizaron cortes de ojos no dañados y dañados por NMDA en ratones sacrificados 24 h tras el trasplante. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30 (tres áreas diferentes de 10 cortes en serie de retina diferentes para cada ojo). Valor de P <0,001 (***). **(C)** Se inyectaron NMDA (por vía intravítrea) y BrdU (por vía intraperitoneal) en ratones R26Y; un día después, se inyectaron ESCs no marcadas (por vía intravítrea) y finalmente se realizó tinción con BrdU en cortes de ojo de ratones sacrificados tras 24 h adicionales. Se contaron las células positivas para BrdU totales (flechas rojas) en la GCL en un campo 40X. Los híbridos positivos para YFP nunca fueron positivos para tinción con BrdU (flechas verdes). Los datos son medias ± e.e.m.; n=30.

Figura 12. Análisis de reprogramación de neuronas retinianas tras fusión. **(A)** Se realizó tinción de inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-β-catenina (rojo) en cortes de ojos tratados o bien con NMDA, tanto con NMDA como con DKK1 o bien no tratados como control. Se redujo la expresión y la acumulación nuclear de β-catenina en células de la retina detectadas en ojos dañados por NMDA (flechas rojas) tras el tratamiento con DKK1. Barra de escala: 20 μm. **(B)** Representación esquemática del plan experimental de reprogramación *in vivo*. Se inyectaron SPC marcadas de rojo o bien no tratadas (control) o bien tratadas durante 24 h con BIO en ojos no dañados o dañados por NMDA de ratones receptores Nanog-GFP-Puro. Se analizó la expresión de GFP en híbridos reprogramados un día tras la inyección. **(C**) El tratamiento con NMDA no activa la expresión de GFP (verde) en neuronas retinianas de Nanog-GFP. **(D-F)** El tratamiento con BIO de HSPCs activa la señalización de β-catenina tal como se muestra mediante RT-PCR del gen diana axina 2 (D) o mediante translocación nuclear de β-catenina en células no tratadas (E) o tratadas con BIO (F). **(G)** El trasplante de HSPCs^{RFP} tratadas con BIO (rojo) en ojos de Nanog-GFP sanos no induce reactivación del transgén de Nanog-GFP (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI.

Figura 13. Activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina potencia la reprogramación neuronal tras la fusión celular *in vivo*. **(A)** Representación esquemática del plan experimental de reprogramación *in vivo*. Ratones nestina-CRE recibieron inyección intravítrea de NMDA y DKK1, NMDA solo o PBS como control, un día antes de la inyección de $HSPCs^{R26Y}$. Antes del trasplante, se pretrataron o no $HSPCs^{R26Y}$ con Wnt3a o BIO y se marcaron con colorante rojo DiD. Se analizaron las muestras 24 h tras el trasplante celular. Sólo como consecuencia de la fusión celular y la reprogramación puede inducir Cre, expresada de nuevo en ratones adultos debido a la activación del promotor de nestina, la expresión de YFP en híbridos que mantienen las membranas rojas. (**B**) Sólo en presencia de NMDA sin DKK1 comienzan a expresar las $HSPCs^{R26Y}$ rojas trasplantadas YFP (flechas verdes). Las flechas amarillas indican células dobles positivas para rojo y verde. El pretratamiento con Wnt3a de $HSPCs^{R26Y}$ rojas antes del trasplante aumenta las cantidades de híbridos dobles positivos para rojo/verde. Barra de escala: 50 μm **(C-D)** Análisis estadístico de los números de híbridos dobles positivos para rojo/verde (DiD/YFP) detectados en retinas de nestina-CRE (C) o Nanog GFP (D) tratadas con NMDA, NMDA+DKK1, o no tratadas (sin NMDA), 24 h tras el trasplante de HSPCs no tratadas o de HSPCs tratadas con Wnt3a o con BIO. Se calcularon los porcentajes como el número de células positivas para YFP con respecto al número total de HSPCs rojas detectadas en los campos ópticos. Los datos son medias ± e.e.m.; n=90. ***P <0,001. (E) Fotomicrografías confocales 24 h tras el trasplante de retinas de Nanog-GFP no dañadas (sin NMDA) y de retinas de Nanog-GFP con NMDA sometidas a trasplante de HSPCs pretratadas con Wnt3a (NMDA + Wnt3a).

Figura 14. La activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina potencia la reprogramación neuronal tras la fusión celular *in vivo*. (**A**) Muestras representativas en las que se inyectaron DiD-ESC 24 h tras la inyección de PBS (sin NMDA) o inyección de NMDA en ratones Nanog-GFP-puro. Veinticuatro horas tras la inyección de ESCs, se detecta la expresión de Nanog-GFP (verde) en híbridos de ESC-neurona (rojo y verde) en ojos dañados por NMDA (NMDA) pero no en ojos no tratados (sin NMDA). El pretratamiento con DKK1 (NMDA+DKK1) reduce el número de híbridos positivos para GFP. El pretratamiento con BIO y Wnt3a de ESCs aumentó el número de neuronas reprogramadas positivas para GFP (rojo/verde) con respecto a las ESCs no tratadas (sin

BIO). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Barra de escala: 20 μm. **(B)** Se cultivaron híbridos aislados de ojos de Nanog-GFP dañados por NMDA sometidos a trasplante de ESCs tratadas con BIO (BIO) o no tratadas (No BIO) *in vitro* con selección de puromicina. Se detectó una media de 23 clones positivos para GFP tras un mes de cultivo celular. Los clones también son positivos para tinción con fosfatasa alcalina. **(C)** Las RSPCs trasplantadas (rojo) no reprograman neuronas retinianas dañadas por NMDA en presencia o no de tratamiento con BIO. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). **(D)** Análisis estadístico del porcentaje de híbridos con YFP tras la inyección de o bien $HSPCs^{CRE}$ no tratadas, tratadas con BIO (barras blancas), $ESCs^{Cre}$ (barras grises) o bien $RSPCs^{Cre}$ (barras negras), en ojos de R26Y pretratados (NMDA) o no (sin NMDA) con NMDA.

Figura 15. Caracterización de los híbridos reprogramados. **(A)** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de genes diferentes en híbridos positivos para RFP clasificados por FACS 24 h tras el trasplante $HSPCs^{Cre/RFP}$ tratadas con BIO (barras negras) o no tratadas con BIO (barras grises) en ojos de R26Y dañados por NMDA. **(B)** Fotomicrografías confocales de retinas de R26Y dañadas por NMDA sometidas a trasplante de $HSPCs^{CRE}$ tratadas con BIO y teñidas 24 h después con anticuerpos anti-Oct4, anti-Nanog, anti-nestina, anti cKit o anti Tuj-1. Los híbridos positivos para YFP (verde) también fueron positivos para expresión de Oct4, Nanog y nestina (flechas rojas), sin embargo no fueron positivos para c-Kit o Tuj-1 (flechas verdes). Barra de escala: 50 μm. **(C-D)** Se evaluó la expresión génica específica de especie mediante RT-PCR usando oligonucleótidos específicos de ratón (C) o ser humano (D) en híbridos clasificados por FACS 24 h tras el trasplante de CD34+ HSPCs humanas tratadas con BIO y marcadas con DiD en ojos dañados por NMDA de ratones Nanog-GFP. **(E-J)** A ojos de R26Y dañados por NMDA se inyectaron por vía intravítrea $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO (BIO) o no tratadas (sin BIO) y se analizaron 24 h después. Para evaluar la proliferación (E-G e I) y la muerte celular (F, H y J) de híbridos positivos para YFP (verde), se tiñeron cortes con anticuerpos o bien anti-Ki67 (G e I, rojo) o bien anti-anexina V (H y J). Se evaluó la cantidad de híbridos positivos como el porcentaje de células positivas para Ki67 (E) o anexina V (F) en relación con el número total de híbridos de YFP. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30. Valor de P <0,001 (***). Las flechas amarillas en G y J indicaban híbridos positivos para Ki67 o positivos para

anexina V, respectivamente. Barra de escala: 50 μm. **(K-L)** Se evaluó la expresión de marcadores para ESCs (Oct4, Nanog), mesodermo (Gata4), endodermo (Hand1), neuroectodermo (nestina, nogina y Otx2), HSPCs (c-Kit y Sca1) o neuronas diferenciadas de manera terminal (Tuj-1) en híbridos de YFP formados tras $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO (K) o no tratadas (L) inyectadas en ojos dañados por NMDA de ratones R26Y y sacrificados 24 (barras blancas), 48 (barras grises) y 72 h (barras negras) tras el trasplante celular. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30.

Figura 16. Proliferación y expresión génica en los híbridos. **(A-B)** Análisis mediante RT-PCR de retinas de R26Y dañadas por NMDA no sometidas a trasplante (A) o de HSPCs no tratadas (sin BIO, barras grises) o tratadas con BIO (BIO, barras negras). **(C)** Fotomicrografías confocales de retinas de Nanog-GFP dañadas por NMDA sometidas a trasplante de CD34+ HSPCs humanas marcadas con DiD y tratadas con BIO (rojo). Se detectaron híbridos positivos para YFP (células verde/rojo, flechas amarillas). **(D-E)** Se realizó tinción con Ki67 (D) y anexina V (E) en híbridos reprogramados positivos para YFP obtenidos tras la inyección de ESCs tratadas con BIO o no tratadas en ojos de R26Y dañados por NMDA. Se evaluaron los híbridos positivos como el porcentaje de células positivas en relación con el número total de híbridos de YFP. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30. Valor de P <0,001 (***). **(F)** Se evaluó la expresión de marcadores para mesodermo (Gata4), endodermo (Hand1), neuroectodermo (nestina, nogina y Otx2), neuronas diferenciadas de manera terminal (Tuj-1) o ESCs (Oct4, Nanog) en híbridos de YFP formados tras inyección de $HSPCs^{CRE}$ tratadas con BIO en ojos dañados por NMDA de ratones R26Y sacrificados 24 (barras blancas), 48 (barras grises) y 72 h (barras negras) tras el trasplante celular. Los datos son medias de n=30.

Figura 17. Las retinas dañadas por NMDA pueden regenerarse tras fusión de HSPCs trasplantadas. **(A)** Tinción con H&E que muestra aumento en el grosor de la capa nuclear interna (INL, corchetes) y regeneración de la capa de células ganglionares (GCL, cabezas de flecha) en retina dañada por NMDA un mes tras el trasplante de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO. Las flechas indican pérdida de células ganglionares en las retinas dañadas por NMDA. Barras de escala: 50 mm. **(B-C)** Cuantificación de núcleos ganglionares en la GCL **(B)** y filas nucleares en la INL **(C)** contados en cortes de retina

verticales de retinas dañadas (NMDA) o no dañadas sometidas a trasplante de HSPCs tratadas con BIO (BIO) o no tratadas. Los datos son medias ± e.e.m. (n = 30). ***P < 0,001. **(D)** Se contaron las neuronas en la GCL a lo largo de los ejes nasotemporal (izquierda) y dorsoventral (derecha) y se representaron gráficamente las células por milímetro cuadrado. Se contaron un total de 80 imágenes diferentes que componían la totalidad de la retina para cada muestra. Los datos son medias ± e.e.m. de 3 retinas. *P < 0,01. ON: nervio óptico. **(E)** Se contaron las células totales en la GCL excluyendo las células endoteliales a lo largo de los ejes nasotemporal (izquierda) y dorsoventral (derecha) y se representaron gráficamente como mapas de densidad. El color rojo oscuro corresponde a una densidad celular de 10.000 células /mm^2, tal como se indica en la barra de color.

Figura 18. Potencial de diferenciación a largo plazo de los híbridos obtenidos tras reprogramación mediada por fusión celular. **(A)** Estrategia experimental para identificar híbridos YFP+ un mes tras $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO o no tratadas en retinas de R26Y dañadas por NMDA. **(B)** Se detectaron neuronas YFP+ en montajes planos de retinas de R26Y lesionadas por NMDA un mes tras trasplante de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Barras de escala: 50 μm. En el panel derecho se muestra una ampliación superior de las neuronas YFP+. **(C)** Los híbridos diferenciados YFP+ (verdes) expresaban o bien el marcador de células ganglionares SMI-32 (izquierda, rojo) o bien el marcador de células amacrinas Chat (derecha, rojo). **(D)** Se detectaron axones YFP+ (verde) en nervios ópticos de ojos sometidos a trasplante de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO (BIO-$HSPCs^{Cre}$), pero no de $HSPCs^{Cre}$ no tratadas. En el panel derecho se muestra una ampliación superior de los axones positivos para YFP+ (verde) en los nervios ópticos.

Figura 19. Análisis de eficacia de sustitución de médula ósea y análisis de proliferación de híbridos y apoptosis tras movilización de BM endógena y fusión celular. **(A)** Análisis hemocromocitométrico representativo de ratones un mes después de la sustitución de médula ósea. **(B-C)** Se realizó tinción con Ki67 (B) y anexina V (C) en híbridos reprogramados positivos para YFP obtenidos 24 h tras la inyección de BIO en ojos de R26Y dañados por NMDA de ratones que recibieron sustitución de $BM^{RFP/Cre}$.

Figura 20. Las células derivadas de BM endógenas incluidas en ojos dañados pueden fusionarse con neuronas retinianas. **(A)** Esquema experimental. Ratones R26Y recibieron trasplante de $BM^{RFP/Cre}$ a través de inyección en la vena de la cola tras irradiación subletal. Tras la reconstitución de la BM (1 mes), los ojos derechos recibieron una inyección intravítrea de NMDA, los ojos izquierdos no se inyectaron; los ratones se analizaron 24 h después. Sólo en caso de fusión celular de células de BM incluidas (rojo) y neuronas, se detectaron híbridos dobles positivos para YFP/RFP. **(B-F)** Se detectaron híbridos dobles positivos para YFP/RFP en ojos dañados por NMDA (B-C, NMDA) pero no en sanos (D-E, sin NMDA). (F) Se calculó el porcentaje de híbridos dobles positivos para YFP/RFP con respecto al número total de células RFP detectadas. **(G-K)** Análisis inmunohistoquímico de las parejas de fusión de células de la retina. Los híbridos de YFP (verde) también son positivos para los marcadores de HSPCs, Sca1 (G) y c-Kit (H) y para los marcadores de las células de la retina ganglionares (I, Thy1.1, rojo), amacrinas (J, sintaxina, rojo) y de Müller (K, GS, rojo) 24 h tras el daño por NMDA. Las flechas amarillas indican células dobles positivas. Barra de escala: 50 μm.

Figura 21. La reprogramación mediada por fusión de células de BM endógenas de neuronas retinianas se induce por BIO. **(A)** Esquema experimental. Ratones nestina-Cre recibieron trasplante de BM^{R26Y} a través de inyección en la vena de la cola tras irradiación subletal. Tras la reconstitución de la BM (1 mes), los ojos derechos recibieron una inyección intravítrea de BIO+NMDA, mientras que en los ojos contralaterales se inyectó NMDA solo. Sólo en caso de reprogramación mediada por fusión celular de híbridos entre BMC^{R26Y} incluidas y neuronas, la expresión de Cre mediada por nestina conduce a expresión de YFP. **(B-C)** Sólo tras la inyección de BIO (C), se detectaron híbridos reprogramados positivos para YFP (verde) tras la fusión de células de BM incluidas y neuronas dañadas. En cambio, no se observaron híbridos de YFP (B) en ojos dañados por NMDA sin BIO. **(D-E)** Se evaluaron los porcentajes de híbridos en proliferación (positivos para Ki67, D) o muriendo (positivos para anexina V, E) como el número de células dobles positivas para YFP con respecto a la cantidad total de células con YFP. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30. **(F-I)** Las fotomicrografías confocales de retinas tratadas con NMDA+BIO muestran expresión de proteínas Oct4 (rojo en F-G) y Nanog (rojo en H-I) en híbridos reprogramados de YFP

(verde, véase la fusión en G e I). Se evaluaron los porcentajes de híbridos positivos para Oct4 y Nanog (E) como el número de células dobles positivas para YFP con respecto a la cantidad total de células con YFP. Los datos son medias ± e.e.m.; n=30.

Figura 22. Análisis de macrófagos/monocitos tras trasplante de HSPCs. **(A)** Imagen confocal representativa de retinas dañadas con NMDA en montaje plano 1 mes tras el trasplante de HSPCs no tratadas. Sólo se detectaron algunas células YFP+ (verdes). Barras de escala: 50 μm. **(B)** Nervio óptico recogido 24 h tras el trasplante de $HSPCs^{Cre}$ en ojos de R26Y dañados por NMDA. Barras de escala: 200 μm **(C-F)** Análisis de FACS como porcentajes de híbridos RFP+/YFP+ también positivos para tinción con CD45 **(C-E)** y Mac1 **(D-F)** 24 h **(C, D)** y 2 semanas **(E, F)** tras el trasplante de $HSPCs^{Cre}$/RFP en ojos de R26Y dañados por NMDA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La regeneración retiniana puede lograrse mediante la implantación de algunos tipos de células en la retina de un sujeto, teniendo dichas células propiedades de células madre o células progenitoras tales como células madre hematopoyéticas, células progenitoras y/o células madre mesenquimales. Estas células se fusionan con células de la retina ("células retinianas"), tales como neuronas de la retina ("neuronas retinianas"), por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, y similares, o con células gliales de la retina ("células gliales retinianas"), por ejemplo células de Müller, etc., para formar células híbridas que a su vez se desdiferencian y finalmente se diferencian en neuronas retinianas de interés, por ejemplo, células fotorreceptoras y/o células ganglionares, etc., siendo esencial la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en las células implantadas o en las células híbridas para inducir la desdiferenciación de dichas células híbridas y la rediferenciación final en las neuronas retinianas de interés. En una realización, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se proporciona, al menos parcialmente, por las células implantadas (que se han tratado con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o que sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina), mientras que en otra realización, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se consigue, únicamente, bien como resultado de administrar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o

un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, al sujeto que va a tratarse o bien como consecuencia de un daño o lesión en la retina, como ocurre, por ejemplo, en enfermedades de degeneración retiniana.

Uso de células que tienen propiedades de células madre o células progenitoras para el tratamiento de enfermedades de degeneración retiniana mediante reprogramación, mediada por la activación de la ruta Wnt/β-catenina, de células retinianas fusionadas a dichas células

Tratamiento A

En un aspecto, la invención se refiere a una célula, teniendo dicha célula su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y seleccionándose del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. En otras palabras, según este aspecto, la invención proporciona una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética ("HSC", del inglés *"Hematopoietic Stem Cell"*), una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal ("MSC", del inglés *"Mesenchymal Stem Cell"*), en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dicha células está activada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Por tanto, la invención proporciona una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora y una célula madre mesenquimal, en la que dicha célula se trata con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o es una célula que sobreexpresa un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Como resultado de dichos tratamientos, o manipulación celular para sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, la célula tiene su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y puede usarse en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Para ese fin, la célula así tratada o manipulada se

implanta en el ojo de un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

En otras palabras, este aspecto de la invención se refiere al uso de una célula, teniendo dicha célula su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y seleccionándose del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora y una célula madre mesenquimal, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana; o, alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso de una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora y una célula madre mesenquimal, en el que dicha célula se trata con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o sobreexpresa un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Según el Tratamiento A, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se proporciona, al menos parcialmente, por las células implantadas que tienen su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y seleccionándose del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora y una célula madre mesenquimal. El sujeto que va a tratarse también puede tener activada la ruta de señalización Wnt/β-catenina tras daño o lesión en la retina. En general, la ruta de señalización Wnt/β-catenina se activa cuando se transcriben los genes diana; a modo ilustrativo, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede confirmarse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, analizando la expresión de los genes diana, por ejemplo, axina 2, mediante medios conocidos por el experto en la técnica para analizar la expresión de genes, tales como, por ejemplo, RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa), o mediante detección de traslocación de β-catenina en los núcleos de las células mediante técnicas convencionales, tales como, por ejemplo, mediante inmunotinción, o mediante detección de fosforilación de Dishevelled o la fosforilación de la cola de LRP, etc.

La manera en la que se activa la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede variar. A modo ilustrativo, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética

(HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC) puede lograrse tratando dicha célula con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de tal manera que se activa dicha ruta, o mediante manipulación de la célula para sobreexpresar una proteína o péptido que es un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, tal como se comentará a continuación. Alternativamente, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede lograrse como consecuencia de un daño o lesión en la retina, como ocurre, por ejemplo, en enfermedades de degeneración retiniana o mediante la administración de un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina al sujeto que va a tratarse o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de tal manera que se activa dicha ruta, tal como se comentará a continuación.

El término "célula madre hematopoyética" o "HSC", en plural "HSCs", tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula madre multipotente que da origen a todos los tipos de células sanguíneas a partir de los linajes mieloide (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoide (células T, células B, células NK). Las HSCs son una población heterogénea. Existen tres clases de células madre, que se distinguen por su razón de progenie linfoide con respecto a mieloide (L/M) en la sangre. Las HSCs derivadas de linaje mieloide (My-bi) tienen una razón L/M baja (>0, <3), mientras que las HSCs derivadas de linaje linfoide (Ly-bi) muestran una gran razón (>10). La tercera categoría consiste en las HSCs equilibradas (Bala) para las que $3 \leq L/M \leq 10$. Como células madre, las HSCs se definen por su capacidad para reponer todos los tipos de células sanguíneas (multipotencia) y por su capacidad para autorrenovarse. En referencia al fenotipo, las HSCs se identifican por su pequeño tamaño, la falta de marcadores de linaje (lin), su baja tinción (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 (rodamina DULL, también denominada rolo) o Hoechst 33342, y la presencia de diversos marcadores antigénicos sobre su superficie. En seres humanos, la mayoría de las HSCs son CD34+CD38-CD90+CD45RA-. Sin embargo, no todas las HSCs están cubiertas por dicha combinación que, no obstante, se ha hecho popular. De hecho, incluso en seres humanos, hay HSCs que son CD34-CD38-. En una realización preferida la HSC es una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana.

En una realización particular, la HSC es una HSC a largo plazo (LT-HSC), es decir, una célula madre hematopoyética que puede contribuir a la hematopoyesis durante meses o incluso durante toda la vida y se caracteriza por CD34-, CD38-, SCA-1+, Thy1.1$^{+/low}$, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+.

En otra realización particular, la HSC es una HSC a corto plazo (ST-HSC), es decir, una HSC que tiene una capacidad de reconstitución que se limita a varias semanas y es CD34+, CD38+, SCA-1+, Thy1.1$^{+/low}$, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+, Mac-1 (CD11b)^{low}.

El término “CD34” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de diferenciación presente en ciertas células dentro del cuerpo humano. Es una glicoproteína de la superficie celular y funciona como factor de adhesión célula-célula. También puede mediar la unión de células madre a matriz extracelular de médula ósea o directamente a células del estroma. Las células que expresan CD34 (células CD34+) normalmente se encuentran en el cordón umbilical y la médula ósea como células hematopoyéticas, un subconjunto de células madre mesenquimales, células progenitoras endoteliales, células endoteliales de vasos sanguíneos pero no linfáticos. La secuencia de proteína completa para el CD34 humano tiene el número de registro de UniProt P28906 (26 de julio de 2012).

El término “CD38” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de diferenciación 38, también conocido como ADP cíclico - ribosa hidrolasa. Es una glicoproteína encontrada sobre la superficie de muchas células inmunitarias (glóbulos blancos), incluyendo células CD4+, CD8+, B y linfocitos citolíticos naturales. CD38 también funciona en la adhesión celular, transducción de señales y señalización de calcio. CD38 es una proteína transmembrana de tipo II que funciona como una molécula de señalización y media la adhesión entre linfocitos y células endoteliales. También funciona enzimáticamente en la formación e hidrolización del ADP cíclico – ribosa del segundo mensajero. En el sistema hematopoyético, CD38 se expresa en su nivel más alto en las células plasmáticas. La secuencia de proteína completa para el CD38 humano tiene el número de registro de UniProt P28907 (26 de julio de 2012).

El término “CD90” o Thy-1 tal como se usa en el presente documento se refiere al grupo de diferenciación 90, una proteína de la superficie celular conservada anclada a glicofosfatidilinositol (GPI), altamente N-glicosilada, de 25–37 kDa con un único

dominio de inmunoglobulina de tipo V (el dominio de inmunoglobulina es un tipo de dominio de proteína que consiste en una estructura intercalada de 2 capas de entre 7 y 9 hebras β antiparalelas dispuestas en dos láminas β con una topología de tipo greca), descubierto originalmente como un antígeno de timocitos. La secuencia de proteína completa para el CD90 humano tiene el número de registro de UniProt P04216 (26 de julio de 2012).

El término "CD45" tal como se usa en el presente documento se refiere a una familia que consiste en múltiples miembros que son todos productos de un único gen complejo. Este gen contiene 34 exones y tres exones de los transcritos primarios se empalman alternativamente para generar hasta ocho ARNm maduros diferentes y tras la traducción, ocho productos de proteína diferentes. Estos tres exones generan las isoformas RA, RB y RC. Existen diversas isoformas de CD45: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45R0, CD45R (ABC). La secuencia de proteína completa para el CD45 humano tiene el número de registro de UniProt P08575 (26 de julio de 2012).

El término "SCA-1" se refiere a ataxina 1 cuya función se desconoce. La secuencia de proteína completa para la SCA-1 humana tiene el número de registro de UniProt P54253 (26 de julio de 2012).

El término "c-kit" se refiere a un receptor del factor de crecimiento células madre/mastocitos (SCFR), también conocido como proto-oncogén c-Kit o proteína tirosina cinasa Kit o CD117. Es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen KIT. CD117 es un receptor tirosina cinasa tipo III, que se une al factor de células madre, también conocido como "*steel factor*" (factor de acero) o "ligando c-kit". La secuencia de proteína completa para el c-kit humano tiene el número de registro de UniProt P10721 (26 de julio de 2012).

El término "CD135", tal como se usa en el presente documento se refiere al grupo de diferenciación antígeno 135 (CD135) también conocido como tirosina cinasa 3 de tipo Fms (FLT-3) o tirosina proteína cinasa de tipo receptor. CD135 es un receptor de citocinas expresado sobre la superficie de células progenitoras hematopoyéticas. La secuencia de proteína completa para el CD135 humano tiene el número de registro de UniProt P36888 (26 de julio de 2012).

El término “SLAMF1”, tal como se usa en el presente documento se refiere a molécula de activación de linfocitos de señalización. Es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen SLAMF1. SLAMF1 se ha designado recientemente CD150 (grupo de diferenciación 150). La secuencia de proteína completa para la SLAMF1 humana tiene el número de registro de UniProt Q13291 (26 de julio de 2012).

El término “Mac-1 (CD11b)”, tal como se usa en el presente documento se refiere a una integrina alfa M (ITGAM). Es una subunidad de proteína que forma la molécula heterodimérica integrina alfa-M beta-2 (αMβ2), también conocida como antígeno de macrófago 1 (Mac-1) o receptor de complemento 3 (CR3). ITGAM también se conoce como CR3A, y molécula de grupo de diferenciación 11B (CD11B). La secuencia de proteína completa para la Mac-1 humana tiene el número de registro de UniProt P11215 (26 de julio de 2012).

El término “lin” se refiere a marcadores de linaje, un cóctel convencional de anticuerpos designados para eliminar células hematopoyéticas maduras de una muestra. Esos anticuerpos se dirigen a CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, TER-119 y Gr-1 en ratones y CD3 (linfocitos T), CD14 (monocitos), CD16 (células NK, granulocitos), CD19 (linfocitos B), CD20 (linfocitos B) y CD56 (células NK) en seres humanos.

Una “célula progenitora” se refiere a una célula que se deriva de una célula madre por diferenciación y que puede realizar diferenciación adicional en tipos celulares maduros. Las células progenitoras normalmente tienen una capacidad de proliferación más restringida en comparación con las células madre. En una realización particular, la célula progenitora es una célula progenitora hematopoyética derivada de una HSC por diferenciación durante la progresión desde la HSC hasta células funcionales diferenciadas. La célula progenitora hematopoyética se caracteriza por los marcadores CD34+CD38-CD90-CD45RA-. En una realización preferida, la célula progenitora es una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana.

En una realización particular, la célula progenitora es un progenitor multipotente temprano (MPP temprano) caracterizado por CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135+, Slamf1/CD150-, Mac-1 $(CD11b)^{low}$, $CD4^{low}$.

En otra realización particular, la célula progenitora es un progenitor multipotente tardío (MPP tardío) definido por CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, $CD135^{high}$, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)low, $CD4^{low}$.

En otra realización particular, la célula progenitora es una célula progenitora restringida al linaje (LRP) caracterizada por CD150-CD48+CD244+.

En otra realización particular, la célula progenitora es un progenitor mieloide común (CMP), es decir, una unidad formadora de colonias que genera células mieloides caracterizadas por CD34+CD38+IL3Ra^{low}CD45RA-. En otra realización particular, la célula progenitora es un progenitor de granulocitos-macrófagos (GMP), el precursor para monoblastos y mieloblastos caracterizado por CD34+CD38+IL3Ra-CD45Ra-.

En otra realización particular, la célula progenitora es un progenitor de megacariocitos-eritroide (MEP) caracterizada por CD34+CD38+IL3RA+ CD45RA-.

El término “CD4” tal como se usa en el presente documento se refiere al grupo de diferenciación 4. Es una glicoproteína encontrada sobre la superficie de células inmunitarias tales como células T cooperadoras, monocitos, macrófagos, y células dendríticas. CD4 es un co-receptor que ayuda al receptor de las células T (TCR) con una célula presentadora de antígeno. Usando la parte que se aloja dentro de la célula T, CD4 amplifica la señal generada por el TCR incluyendo una enzima, conocida como tirosina cinasa lck, que es esencial para activar muchas moléculas implicadas en la cascada de señalización de una célula T activada. CD4 también interacciona directamente con las moléculas del MHC de clase II sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno usando su dominio extracelular. La secuencia de proteína completa para el CD4 humano tiene el número de registro de UniProt P01730 (26 de julio de 2012).

El término “CD244” tal como se usa en el presente documento se refiere a la molécula CD244, el receptor de linfocitos citolíticos naturales 2B4. Este gen codifica para un receptor de la superficie celular expresado en linfocitos citolíticos naturales (NK) (y en algunas células T) que median la citolisis no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se cree que la interacción entre las células NK y las células diana a través de este receptor modula la actividad citolítica de las células NK. La secuencia de proteína completa para el CD244 humano tiene el número de registro de UniProt Q9BZW8 (26 de julio de 2012).

El término “IL3RA” tal como se usa en el presente documento se refiere al receptor de interleucina 3, alfa (baja afinidad) (IL3RA), también conocido como CD123 (grupo de diferenciación 123). Es una proteína transmembrana de tipo I de 41,3 kDa y se ha demostrado que IL3RA interacciona con la interleucina 3. La secuencia de proteína completa para el IL3RA humano tiene el número de registro de UniProt P26951 (26 de julio de 2012).

El término “célula madre mesenquimal” o “MSC”, en plural “MSCs”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de estroma multipotente que puede diferenciarse en una variedad de tipos de células, incluyendo: osteoblastos (células de hueso), condrocitos (células de cartílago) y adipocitos (células de grasa). Los marcadores expresados por las células madre mesenquimales incluyen CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y Stro-1 así como las moléculas de adhesión CD106, CD166, y CD29. Entre los marcadores negativos para las MSCs (no expresados) están los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, y las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 así como la molécula de adhesión CD31.

El término “CD105” tal como se usa en el presente documento se refiere a endoglina, una glicoproteína de membrana de tipo I ubicada sobre las superficies celulares y que forma parte del complejo TGF beta - receptor. La secuencia de proteína completa para el CD105 humano tiene el número de registro de UniProt P17813 (26 de julio de 2012).

El término “CD73” tal como se usa en el presente documento se refiere a 5’-nucleotidasa (5’-NT), también conocida como ecto-5’-nucleotidasa o CD73 (grupo de diferenciación 73). Es una enzima que en seres humanos está codificada por el gen NT5E. La secuencia de proteína completa para el CD73 humano tiene el número de registro de UniProt P21589 (26 de julio de 2012).

El término “CD44” se refiere un antígeno. Es una glicoproteína de la superficie celular implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración. La secuencia de proteína completa para el CD44 humano tiene el número de registro de UniProt P16070 (26 de julio de 2012).

El término “CD71”, tal como se usa en el presente documento se refiere a la proteína receptor de transferrina 1 (TfR1) también conocida como (grupo de

diferenciación 71) (CD71). Es una proteína que se requiere para la entrega de hierro desde la transferrina a las células. La secuencia de proteína completa para el CD71 humano tiene el número de registro de UniProt P02786 (26 de julio de 2012).

El término "STRO-1" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína de la superficie celular expresada por las células del estroma de la médula ósea y por precursores eritroides.

El término "CD106" se refiere a una proteína de adhesión de células vasculares 1 también conocida como molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) o grupo de diferenciación 106 (CD106). Es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen VCAM1 y funciona como una molécula de adhesión celular. La secuencia de proteína completa para el CD106 humano tiene el número de registro de UniProt P19320 (26 de julio de 2012).

El término "CD166" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína transmembrana de tipo I de 100-105 kD que es un miembro de la superfamilia de proteínas de inmunoglobulinas. La secuencia de proteína completa para el CD166 humano tiene el número de registro de UniProt Q13740 (26 de julio de 2012).

El término "CD29" tal como se usa en el presente documento se refiere a una integrina beta-1. Es una unidad de integrina asociada con receptores antigénicos muy tardíos. La secuencia de proteína completa para el CD29 humano tiene el número de registro de UniProt P05556 (26 de julio de 2012).

El término "CD14", tal como se usa en el presente documento se refiere al grupo de diferenciación 14 que es un componente del sistema inmunitario innato. La secuencia de proteína completa para el CD14 humano tiene el número de registro de UniProt P08571 (26 de julio de 2012).

El término "CD80" tal como se usa en el presente documento es el grupo de diferenciación 80 (también CD80 y B7-1). Es una proteína encontrada en monocitos y células B activadas que proporciona una señal coestimuladora necesaria para la activación y supervivencia de las células T. La secuencia de proteína completa para el CD80 humano tiene el número de registro de UniProt P33681 (26 de julio de 2012).

El término "CD86" tal como se usa en el presente documento se refiere al grupo de diferenciación 86 (también conocido como CD86 y B7-2). Es una proteína expresada en células presentadoras de antígenos que proporciona señales coestimuladoras

necesarias para la activación y supervivencia de células T. La secuencia de proteína completa para el CD86 humano tiene el número de registro de UniProt P42081 (26 de julio de 2012).

El término “CD40” tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína coestimuladora encontrada en células presentadoras de antígenos y se requiere para su activación. La secuencia de proteína completa para el CD40 humano tiene el número de registro de UniProt P25942 (26 de julio de 2012).

El término “CD31”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de adhesión de plaquetas – células endoteliales (PECAM-1) también conocida como grupo de diferenciación 31 (CD31). Es una proteína que desempeña un papel clave en la eliminación de neutrófilos envejecidos del organismo. La secuencia de proteína completa para el CD31 humano tiene el número de registro de UniProt P16284 (26 de julio de 2012).

La presencia/ausencia de un marcador en una célula puede determinarse, por ejemplo, por medio de citometría de flujo usando métodos y aparatos convencionales. Por ejemplo, puede emplearse un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US) con anticuerpos comercialmente disponibles y siguiendo protocolos conocidos en la técnica. Por tanto, pueden seleccionarse células que emiten una señal para un marcador de superficie celular específico más intensa que el ruido de fondo. La señal de fondo se define como la intensidad de señal producida por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar cada marcador de superficie en el análisis de FACS convencional. Para considerar un marcador positivo, la señal específica observada debe ser un 20%, preferiblemente, un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% o superior más intensa que la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US) y anticuerpos comercialmente disponibles). En caso contrario, la célula se considera negativa para dicho marcador.

En una realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A, teniendo dicha célula su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada, es una HSC. En otra realización particular, dicha célula es una LT-HSC o una ST-HSC.

En otra realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A, teniendo dicha célula su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada, es una célula progenitora. En otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A, teniendo dicha célula su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada, es una MSC.

Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención pueden formar parte de una población de dichas células cuyo uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana constituye un aspecto adicional de la presente invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere además a una población celular que comprende una pluralidad de células, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y seleccionándose del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Así, según este aspecto, la invención proporciona una población celular que comprende una pluralidad de células seleccionadas del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

En otras palabras, la invención se refiere a una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, en la que dichas células se tratan con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o dichas células sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Como resultado de dichos tratamientos, o manipulación celular para sobreexpresar una proteína o péptido que es un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, las células de la

población celular tienen su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Para ese fin, la población celular se implanta en el ojo de un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Expresado de manera alternativa, este aspecto de la invención se refiere al uso de una población celular que comprende una pluralidad de células, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y seleccionándose del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras, MSCs y cualquier combinación de las mismas, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana; o, alternativamente, al uso de una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, en el que dichas células se tratan con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de tal manera que se activa dicha ruta de señalización Wnt/β-catenina, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Las características particulares de dichas HSCs, células progenitoras, y MSCs se han mencionado anteriormente. A continuación se comentarán las características particulares de los tratamientos mencionados anteriormente dirigidos a activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

En una realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende una pluralidad, es decir, más de dos, de HSCs, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dichas HSCs se seleccionan de LT-HSCs, ST-HSCs y combinaciones de las mismas.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende una pluralidad de células progenitoras, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dichas células progenitoras se

seleccionan de MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP, un MEP y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende una pluralidad de MSCs, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada.

En una realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende al menos una HSC y al menos una célula progenitora, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC; en otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende al menos una HSC y al menos una MSC, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende al menos una célula progenitora y al menos una MSC, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A comprende al menos una HSC, al menos una célula progenitora y al menos una MSC, teniendo dichas células su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC; en otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En una realización particular, una población celular que comprende HSCs, células precursoras y MSCs, que puede obtenerse a partir de médula ósea, se identifica

en ocasiones en el presente documento como “HSPC”, es decir, como “células madre hematopoyéticas y progenitoras”. Dicha población de HSPCs puede incluir HSCs, células progenitoras y MSCs en diferentes razones o proporciones. Dicha población de HSPCs puede obtenerse, por ejemplo, a partir de médula ósea, o, alternativamente, mezclando HSCs, células progenitoras y MSCs, en las razones o proporciones deseadas, con el fin de obtener una población de HSPCs. El experto en la técnica entenderá que dicha población celular puede enriquecerse en cualquier tipo de células específicas mediante medios convencionales, por ejemplo, separando un tipo específico de células mediante cualquier técnica adecuada basándose en el uso de parejas de unión para los marcadores de superficie correspondientes. Por tanto, en una realización particular, la población de HSPCs puede enriquecerse en HSCs, o en células progenitoras, o en MSCs. Con el fin de que dicha población celular identificada como HSPCs sea adecuada para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento A, es necesario que las células de dicha población celular tengan su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada.

Para su uso dentro de las enseñanzas de la presente invención, la célula que tiene su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada y que se selecciona del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora y una célula madre mesenquimal, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, o la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, pueden proceder del mismo sujeto, es decir, ser autólogas, con el fin de minimizar el riesgo de rechazos eventuales o reacciones secundarias no deseadas; no obstante, la invención también contempla el uso de células alogénicas, es decir, células procedentes de otro sujeto de la misma especie que el sujeto receptor, en cuyo caso puede recomendarse el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, aunque la retina tiene baja respuesta inmunitaria, y, por tanto, podrían usarse células compatibles procedentes de un sujeto humano diferente siempre que dichas células se seleccionen de HSCs, células progenitoras y MSCs, y se sometan a un tratamiento o manipulación para tener su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada tal como se mencionó anteriormente.

La expresión “ruta de señalización Wnt/β-catenina” se refiere a una red de proteínas que desempeñan una variedad de papeles importantes en el desarrollo

embrionario, la diferenciación celular y la generación de polaridad celular. A menos que se indique lo contrario, se refiere a la ruta de Wnt canónica e incluye una serie de acontecimientos que se producen cuando las proteínas Wnt se unen a receptores de la superficie celular de la familia Frizzled, haciendo que los receptores activen las proteínas de la familia Dishevelled y dando como resultado finalmente un cambio en la cantidad de β-catenina que alcanza el núcleo. Dishevelled (DSH) es un componente clave de un complejo de receptores de Wnt asociados a membrana que, cuando se activa mediante la unión de Wnt, inhibe un segundo complejo de proteínas que incluye axina, glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), y la proteína de poliposis cólica adenomatosa (APC). El complejo axina/GSK-3/APC normalmente promueve la degradación proteolítica de la molécula de señalización intracelular β-catenina. Una vez inhibido este complejo de destrucción de β-catenina, se estabiliza un conjunto de β-cateninas citoplasmáticas, y algunas β-cateninas pueden entrar en el núcleo e interaccionar con factores de transcripción de la familia TCF/LEF para promover la expresión génica específica. Se han asociado varias proteína cinasas y proteína fosfatasas con la capacidad del complejo receptor de Wnt activado por Wnt de la superficie celular para unirse a axina y desensamblar el complejo axina/GSK3. La fosforilación del dominio citoplasmático de LRP por CK1 y GSK3 puede regular la unión de axina a LRP. La actividad proteína cinasa de GSK3 parece ser importante tanto para la formación del complejo Wnt/FRZ/LRP/DSH/axina asociado a membrana como para la función del complejo axina/APC/GSK3/β-catenina. La fosforilación de β-catenina mediante GSK3 conduce a la destrucción de β-catenina.

Un “activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que puede activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina. En general, la ruta de señalización Wnt/β-catenina se activa cuando se transcriben los genes diana; a modo ilustrativo, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede confirmarse analizando la expresión de los genes diana, por ejemplo, axina 2, mediante RT-PCR, o mediante la detección de la translocación de β-catenina en los núcleos de las células mediante, por ejemplo, inmunotinción, o mediante detección de fosforilación de Dishevelled o fosforilación de la cola de LRP, etc. Los activadores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina pueden actuar sobre receptores de membrana de las proteínas de señalización Wnt y sobre las proteínas que comprenden la

cascada de señalización. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de los activadores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina incluyen péptidos o proteínas así como compuestos químicos distintos de péptidos o proteínas (es decir, "fármacos no peptídicos", tales como:

- péptidos o proteínas, por ejemplo, isoformas de la proteína Wnt tales como Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 o Wnt16; β-catenina; una espondina, tal como una R-espondina, etc.; o variantes funcionales de las mismas, tales como, por ejemplo, péptidos o proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 40%, típicamente al menos, un 50%, ventajosamente al menos un 60%, preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 80%, todavía más preferentemente al menos un 90%, a las secuencias de aminoácidos de los péptidos o proteínas mencionados anteriormente y que mantienen la capacidad de activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina; o
- compuestos no peptídicos, por ejemplo, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, o una (hetero)arilpirimidina dada a conocer por Gilbert *et al.*, en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, volumen 20, número 1, 1 de enero de 2010, 366-370.

Ejemplos de isoformas de proteínas Wnt, que pertenecen a la familia de proteínas secretadas Wnt y que actúan como activadores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, incluyen los siguientes u ortólogos de los mismos (referencias de Swiss-prot):

Homo sapiens: Wntl: P04628; Wnt2: P09544; Wnt2b/13: Q93097; Wnt3: P56703; Wnt3a: P56704; Wnt4: P56705; Wnt5a: P41221; Wnt5b: Q9H1J7; Wnt6: Q9Y6F9; Wnt7a: O00755; Wnt7b: P56706; Wnt8a: Q9H1J5; Wnt9a: 014904; Wnt9b: 014905; Wntl0a: Q9GZT5; Wntl0b: 000744; Wntll: 096014; Wnt16: Q9UBV4;

Mus musculus: Wntl: P04426; Wnt2: P21552.1; Wnt2b/13: O70283.2; Wnt3: P17553; Wnt3a: P27467; Wnt4: P22724; Wnt5a: P22725; Wnt5b: P22726; Wnt6: P22727.1; Wnt8a: Q64527; Wnt9a: Q8R5M2; Wnt9b: 035468.2; Wntl0a: P70701; Wntl0b: P48614; Wntll: P48615; Wntl6: Q9QYSl.l;

así como sus isoformas, variantes o fragmentos funcionales, es decir, isoformas, variantes o fragmentos que tienen la capacidad de activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

Ejemplos de β-catenina incluyen los siguientes u ortólogos de los mismos (referencias de Swiss-prot):

Homo sapiens: P35222;

Mus musculus: Q02248;

así como sus isoformas, variantes o fragmentos funcionales, es decir, isoformas, variantes o fragmentos que tienen la capacidad de activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

Las R-espondinas (RSpo) son 4 agonistas secretados del la ruta de señalización Wnt/β-catenin canónica. También se conocen como proteínas ricas en cisteína que contienen un único dominio de tromboespondina (Cristins). Las R-espondinas comparten alrededor de un 40% de identidad de aminoácidos (Lowther, W. et al. (2005) J. Virol. 79:10093; Kim, K.-A. et al. (2006) Cell Cycle 5:23). Todas las R-espondinas contienen dos dominios adyacentes de tipo furina (”furin-like”) ricos en cisteína seguido de un motive de tromboespondina (TSP-1) y una región rica en restos básicos. Tan solo los dominios de tipo furina son necesarios para la estabilización de la β-catenina (Kim, K.-A. et al. (2006) Cell Cycle 5:23; Kazanskaya, O. et al. (2004) Dev. Cell 7:525). La inyección de R-espondina 1 recombinante en ratones provoca la activación de la β-catenina y la proliferación de células epiteliales de la cripta intestinal, y mejora la colitis experimental (Kim, K.-A. et al. (2005) Science 309:1256; Zhao, J. et al. (2007) Gastroenterology 132:1331). La R-espondina 1 (RSPO1) parece regular la ruta de señalización Wnt/β-catenina compitiendo con el antagonista de Wnt DKK-1 para unirse al co-receptor de Wnt, Kremen. Esta competición reduce la internalización del complejo DKK-1/LRP-6/Kremen (Binnerts, M.E. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:147007). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de R-espondinas que actúan como

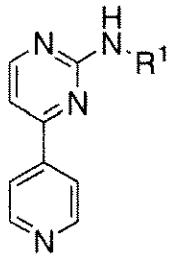
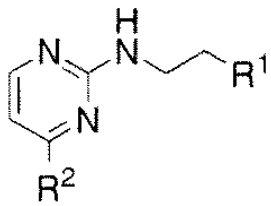
activadoras de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, incluyen los siguientes o sus ortólogos (referencias de Swiss-prot):

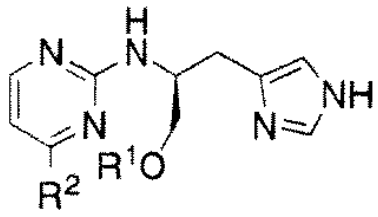
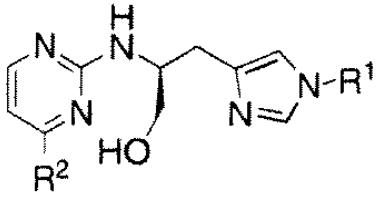
Homo sapiens: R-espondina-1: Q2MKA7; R-espondina-2: Q6UXX9; R-espondina-3: Q9BXY4; R-espondina-4: Q2IOM5, o una isoforma, variante o fragmento funcional de las mismas, es decir, isoformas, variantes o fragmentos que tienen la capacidad de activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina, por ejemplo, una isoforma, variante o fragmento que mantiene sus domiios funcionales.

En una realización particular, la (hetero)arilpirimidina es una (hetero)aril-pirimidina agonista de la ruta de señalización Wnt/β-catenina de fórmula (I), (II), (III) o (IV) [Tabla 1].

Tabla 1

Ejemplos ilustrativos de (hetero)arilpirimidinas agonistas de la ruta de señalización Wnt/β-catenina

Compuesto de fórmula	Fórmula	Definiciones
(I)		R^1 es N-(3-1*H*-imidazol-1-il)propano), N-(2-piridin-4-il)etano), N-(2-piridin-3-il)etano), N-(3-(3,5-dimetil-1*H*-pirazol-1-il)propil), N-(2-(1*H*-indol-3-il)etano), o N-(S)-3-(1*H*-indol-3-il)-2-propan-1-ol amina
(II)		R^1 es CH_2-1*H*-imidazol, 4-piridina, 3-(1*H*-indol), 3-(2-metil-1*H*-indol-5-ol), ó 4-(1*H*-imidazol); y R^2 es 4-(piridin-4-il), 4-(piridin-3-il), 4-(3-nitrofenil), 2-(benzo[b]tiofeno) ó 2-(naftil)

(III)		R^1 es H, etil, metilenciclohexil, 2-fluoro-3-(trifluorometil)bencil o prop-2-inil; y R^2 es 2-(benzo[b]tiofeno) ó 2-(naftil)
(IV)		R^1 es 3,5-difluorobencil, prop-2-inil, 2-acetamida or 3-propanitrilo; y R^2 es 2-(benzo[b]tiofeno) ó 2-(naftil)

Un "inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que puede activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina inhibiendo o bloqueando un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, es decir, un compuesto que reprime, bloquea o silencia la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de represores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina incluyen glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), proteína relacionada con Frizzled secretada 1 (SFRP1) y similares.

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de inhibidores de SFRP1 incluyen 5-(fenilsulfonil)-N-(4-piperidinil)-2-(trifluorometil)bencenosulfonamida (WAY-316606).

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de inhibidores de GSK-3 incluyen: sales de litio (por ejemplo, cloruro de litio), 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO), 6-bromoindirubin-3'-acetoxima (BIO-acetoxima, 6-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etil-amino}-nicotino-nitrilo (CHIR99021), *N*-[(4-metoxifenil)metil]-*N*'-(5-nitro-2-tiazolil)urea (AR-A014418), 3-(2,4-diclorofenil)-4-(1-metil-1*H*-indol-3-il)-1*H*-pirrol-2,5-diona (SB-216763), 5-bencilamino-3-oxo-2,3-dihidro-1,2,4-tiadiazol (TDZD-20), 3-[(3-cloro-4-hidroxifenil)amino]-4-(2-nitro-fenil)-1*H*-pirrol-2,5-diona (SB415286), etc., o análogos o derivados funcionales de los mismos, es decir, compuestos que contienen grupos funcionales que producen el compuesto de interés cuando se administran a un sujeto.

Los expertos en la técnica conocen ejemplos adicionales de inhibidores de GSK-3. Se describen ejemplos, por ejemplo, en los documentos WO 99/65897 y WO 03/074072 y las referencias citadas en los mismos. Por ejemplo, se dan a conocer diversos compuestos inhibidores de GSK-3 en los documentos US 2005/0054663, US 2002/0156087, WO 02/20495 y WO 99/65897 (compuestos basados en pirimidina y piridina); los documentos US 2003/0008866, US 2001/0044436 y WO01/44246 (compuestos basados en biciclos); el documento US 2001/0034051 (compuestos basados en pirazina); y el documento WO 98/36528 (compuestos basados en purina). Los compuestos inhibidores de GSK-3 adicionales incluyen los dados a conocer en el documento WO 02/22598 (compuestos basados en quinolinona), el documento US 2004/0077707 (compuestos basados en pirrol); el documento US 2004/0138273 (compuestos carbocíclicos); el documento US 2005/0004152 (compuestos de tiazol); y el documento US 2004/0034037 (compuestos de heteroarilo). Los compuestos inhibidores de GSK-3 adicionales incluyen inhibidores de GSK-3 β selectivos de maleimida macrocíclicos desarrollados por Johnson & Johnson y descritos, por ejemplo, en Kuo *et al.* (2003) J Med Chem 46(19):4021-31, siendo un ejemplo particular 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-decahidro-9,4:24,29-dimeto-1H-dipirido(2,3-n:3′,2′-t)pirrolo(3,4-q)-(1,4,7,10,13,22)tetraoxadiazaciclotetracosina-1,3(2H)-diona. Además, los derivados de aminopirimidina sustituidos CHIR 98014 (N6-[2-[[4-(2,4-diclorofenil)-5-(1H-imidazol-1-il)-2-pirimidinil]amino]etil]-3-nitro-6-piridindiamina) y CHIR 99021 (6-{2-[4-(2,4-dicloro-fenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino]-etilamino}-nicotinonitrilo) inhiben potencialmente la GSK-3 humana. Además, varios otros inhibidores de GSK-3 que pueden ser útiles en la presente invención están comercialmente disponibles de Calbiochem®, por ejemplo: 5-metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina, 4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona (TDZD8), 2-tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol, 3-(1-(3-hidroxi-propil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il]-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona, etc. Dentro del alcance de la invención se incluyen los análogos o derivados funcionales de los compuestos mencionados anteriormente.

Para una revisión de compuestos que pueden activar la ruta de señalización Wnt/β-catenina véase Chen *et al*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010, Barker *et al.*, Nat Rev Drug Discov. 2006 y Meijer *et al*, Trends Pharmacol Sci. 2004.

En una realización particular, el compuesto usado para tratar una célula seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, de tal manera que se activa la ruta de señalización Wnt/β-catenina de la misma, se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, o variantes o fragmentos funciones de las mismas, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina tal como, por ejemplo, una (hetero)arilpirimidina de fórmula (I), (II), (III) ó (IV) [Tabla 1], un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, dicha isoforma de la proteína Wnt se selecciona del grupo que consiste en Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16 y combinaciones de las mismas, o sus variantes o fragmentos funcionales. En otra realización particular, dicho compuesto activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es β-catenina o una variante o fragmento funcional de la misma. En otra realización particular, dicho compuesto activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es una R-espondina tal como R-espondina-1, R-espondina-2, R-espondina-3, R-espondina-4, o una isoforma, variante o fragmento funcional de la misma.

En otra realización particular, el inhibidor de SFRP1 es WAY-316606. En otra realización particular, el inhibidor de GSK-3 se selecciona del grupo que consiste en una sal de litio, preferiblemente, cloruro de litio, BIO, BIO-acetoxima, CHIR99021, AR-A014418, SB-216763, TDZD-20, SB415286 y cualquier combinación de los mismos.

En una realización preferida, el activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en Wnt3a, β-catenina, R-espondina-1 y una combinación de los mismos. En otra realización preferida, el inhibidor del represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en BIO, CHIR99021 y una combinación de los mismos.

En una realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, sola o en una población celular que comprende una pluralidad de dichas células, seleccionándose la célula del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, es una célula

tratada con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina de tal manera que se activa dicha ruta. Según esta realización, una célula, o una pluralidad de células, seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, se pone en contacto, por ejemplo, se cultiva o se incuba, con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. La cantidad de dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede variar dentro de un intervalo; no obstante, preferiblemente, el activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se añadirá en una cantidad adecuada, es decir, en una cantidad que permite obtener una cantidad específica de β-catenina acumulada en el núcleo de las células. A modo ilustrativo, en una realización particular, puede usarse un intervalo de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml de Wnt3a para tratar dichas células en condiciones de cultivo específicas adecuadas. La cantidad de activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina que permite obtener una cantidad específica de β-catenina acumulada en las células y traslocada en el núcleo de las células con la cual se observa reprogramación mediada por fusión celular puede determinarse por el experto en la técnica mediante ensayos convencionales, por ejemplo, poniendo la célula en contacto con un activador de la ruta Wnt/β-catenina, a diferentes concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo antes del trasplante de las células así tratadas a un animal y después analizando si se produce reprogramación mediada por fusión celular, por ejemplo, detectando y/o determinando la expresión de marcadores de células no diferenciadas, por ejemplo, nanog, Oct4, nestina, Otx2, nogina, SSEA-1, etc. En una realización particular, las células se tratan con Wnt3a como activador de la ruta Wnt/β-catenina, en una cantidad adecuada de aproximadamente 100-300 ng/µl durante 24 h antes del trasplante de las células tratadas.

En otra realización particular, la célula, sola o en una población celular que comprende una pluralidad de dichas células, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, es una célula tratada con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina de tal manera que se activa dicha ruta. Según esta realización, una célula seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, se pone en contacto, por ejemplo, se cultiva o se incuba, con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-

catenina. La cantidad de dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede variar dentro de un intervalo; no obstante, preferiblemente, el inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se añadirá en una cantidad adecuada, es decir, en una cantidad que permite obtener una cantidad específica de β-catenina acumulada en el núcleo de las células. A modo ilustrativo, en una realización particular, puede usarse un intervalo de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 3 μM de BIO para tratar dichas células en una condición de cultivo específica (véase a continuación). La cantidad de inhibidor de represor de la ruta Wnt/β-catenina que permite obtener una cantidad específica de β-catenina acumulada en las células y traslocada en el núcleo de las células con la cual se observa reprogramación mediada por fusión celular puede determinarse por el experto en la técnica por medio de un ensayo tal como el mencionado en el Ejemplo 1. En resumen, dicho ensayo comprende poner la célula en contacto con un inhibidor de un represor de la ruta Wnt/β-catenina, a diferentes concentraciones y durante diferentes periodos de tiempo antes del trasplante de las células así tratadas en un animal y después analizar si se produce reprogramación mediada por fusión celular, por ejemplo, detectando y/o determinando la expresión de marcadores de células no diferenciadas, por ejemplo, nanog, Oct4, nestina, Otx2, nogina, SSEA-1, etc. En una realización particular, las células se tratan con BIO como inhibidor de un represor de la ruta Wnt/β-catenina (GSK-3), en una cantidad adecuada de aproximadamente 1-3 μM durante 24 h antes del trasplante de las células tratadas.

En otra realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, que puede estar presente en una población celular tal como se mencionó anteriormente, es una célula que sobreexpresa un activador de la ruta Wnt/β-catenina.

Tal como se usa en el presente documento, una “célula que sobreexpresa un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina” es una célula, tal como una célula seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, que se ha manipulado genéticamente para sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, en la que dicho activador de la ruta de señalización

Wnt/β-catenina es un péptido o proteína. En una realización particular, dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es una isoforma de la proteína Wnt tal como Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16 o una variante o fragmento funcional de la misma. En otra realización particular, dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es β-catenina o una variante o fragmento funcional de la misma. En otra realización particular, dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es una R-espondina tal como R-espondina-1, R-espondina-2, R-espondina-3, R-espondina-4, o una isoforma, variante o fragmento funcional de la misma. En una realización, el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina está comprendida en un casete de expresión, y dicho polinucleótido está operativamente unido a (es decir, bajo el control de) una secuencia de control de la expresión de dicho polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Las secuencias de control de la expresión son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, cuando sea apropiado, la traducción de una proteína, e incluyen secuencias de promotor, secuencias que codifican para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosoma (RBS) y/o secuencias de terminador de la transcripción. En una realización particular, dicha secuencia de control de la expresión es funcional en células eucariotas, tales como células de mamífero, preferiblemente células humanas, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus humano (hCMV), la combinación del elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV) y promotor de beta-actina de pollo (CAG), el promotor del factor de iniciación de la traducción eucariota (eIF), etc.

Ventajosamente, dicho casete de expresión comprende además un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permite la selección de la célula huésped transformada con dicho casete de expresión. Los ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que pueden estar presentes en el casete de expresión de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a compuestos tóxicos, genes que expresan marcadores fluorescentes y generalmente todos aquellos genes que permiten seleccionar las células transformadas genéticamente. El constructo génico puede insertarse en un vector adecuado. La elección del vector dependerá de la célula

huésped en la que se introducirá posteriormente. A modo de ilustración, el vector en el que se introduce el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula huésped, o bien se integra o bien no se integra en el genoma de dicha célula. Dicho vector puede obtenerse mediante métodos convencionales conocidos por expertos en la técnica [Sambrook y Russell, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 2001 vol 1-3]. En una realización particular, dicho vector recombinante es un vector que es útil para transformar células de animales, preferiblemente células de mamífero. Dicho vector puede usarse para transformar, transfectar o infectar células tales como células seleccionadas del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras y MSCs. Pueden obtenerse células transformadas, transfectadas o infectadas mediante métodos convencionales conocidos por expertos en la técnica [Sambrok y Russell, (2001), citado anteriormente].

Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, seleccionadas del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora y una MSC, preferiblemente células aisladas, pueden usarse para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células específicas pueden aislarse a la vista de sus marcadores tal como se mencionó anteriormente. Pueden transferirse células aisladas a recipientes de cultivo tisular estériles, o bien sin recubrir o bien recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (nativo, desnaturalizado o reticulado), gelatina, fibronectina y otras proteínas de la matriz extracelular. Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo adecuado (dependiendo de la naturaleza de las células) que puede sustentar el crecimiento de dichas células tales como, por ejemplo, DMEM (alto o bajo contenido en glucosa), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio 17 de Dulbecco modificado por Iscove, DMEM/F12, RPMI 1640, etc. Si es necesario, el medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluyendo, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS); suero equino (ES); suero humano (HS); beta-mercaptoetanol (BME o 2-ME), preferiblemente a aproximadamente el 0,001% (v/v); uno o más factores de

crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF), factor de células madre (SCF) y eritropoyetina; citocinas tales como interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), tirosina cinasa 3 de tipo FMS (Flt3); aminoácidos, incluyendo L-valina; y uno o más agentes antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomicina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, o bien solos o bien en combinación. Las células pueden sembrarse en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular.

Los expertos en la técnica conocen bien métodos para la selección del medio de cultivo, la preparación de medio y las técnicas de cultivo celular más apropiados y se describen en una variedad de fuentes, incluyendo Doile *et al.*, (eds.), 1995, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston.

Tal como se muestra en el Ejemplo 1, las células, o la población celular, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, trasplantadas en el espacio subrretiniano de ratones rd1 en el día posnatal 10 (p10) se fusionan con bastones y células de Müller, formando así híbridos que se desdiferencian y finalmente se rediferencian en neuronas retinianas, por ejemplo células fotorreceptoras tales como bastones, células ganglionares, etc. En este caso, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en las células trasplantadas parece ser esencial para inducir la desdiferenciación de híbridos recién formados que finalmente se rediferencian en neuronas retinianas recién formadas. Además, las células fotorreceptoras recién formadas regeneran completamente la retina en los ratones sometidos a trasplante, con mejora de la visión funcional. Estos datos demuestran que la regeneración mediada por fusión celular es un proceso muy eficaz en la retina de mamíferos, y que puede activarse mediante la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. La retinitis pigmentosa (RP) es una enfermedad muy grave para la cual no hay ningún tratamiento actualmente disponible. Sin embargo, la regeneración retiniana mediante trasplante de las células o población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención constituye

un enfoque para la mejora de la visión en pacientes afectados por RP o incluso por una variedad de enfermedades de degeneración retiniana.

Las células o la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención pueden usarse como una terapia celular para tratar una enfermedad de degeneración retiniana ya que, una vez trasplantadas en una ubicación diana en el ojo, dichas células se fusionan con células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, proporcionando así células híbridas que se diferencian en uno o más fenotipos. Según la invención, el tratamiento de la enfermedad de degeneración retiniana se produce mediante reprogramación de las células retinianas mediada por la fusión celular de dicha célula con dichas células retinianas, por ejemplo, neuronas retinianas y/o células gliales retinianas. La reprogramación, en general, puede considerarse el paso de una célula de un estado diferenciado (o célula diferenciada, es decir, una célula especializada para una función específica, tal como una célula de corazón, hígado, etc., que no puede generar otros tipos de células) a un estado no diferenciado (o célula madre no diferenciada, es decir, una célula no especializada para ninguna función específica que conserva el potencial de dar lugar a células especializadas), tanto a nivel del estado embrionario como del estado progenitor; pero reprogramar también puede considerarse el paso de un estado diferenciado a otro estado diferenciado (por ejemplo, un fibroblasto que se convierte en una neurona sin volver a un estado precursor/embrionario, o una neurona retiniana que se convierte en otra neurona retiniana sin volver a un estado precursor/embrionario). En esta descripción, "reprogramar" se refiere sólo a la desdiferenciación de una célula somática que va seguida por la diferenciación de las células híbridas previamente formadas como resultado de la fusión celular entre una célula (por ejemplo, una HSC, una célula progenitora o una MSC) y una célula somática (por ejemplo, una neurona retiniana o una célula glial retiniana).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fusión celular" se refiere una fusión célula-célula que se produce de manera espontánea o mediada por agentes exógenos. La fusión célula-célula regula muchos procesos del desarrollo así como el destino celular y la diferenciación celular. Las células somáticas pueden fusionarse espontáneamente con células madre, y los clones híbridos resultantes tienen un fenotipo de tipo célula madre. Las características de célula madre de las células

madre son dominantes sobre los rasgos de las células somáticas y permiten la reprogramación del núcleo de la célula somática. Por tanto, la fusión célula-célula es una manera de forzar el destino de una célula, y en el caso de la fusión con células, tales como HSCs, células progenitoras o MSCs, este mecanismo induce la reprogramación celular, es decir, la desdiferenciación de las células somáticas. Los inventores han mostrado que la reprogramación mediada por fusión de una célula somática se ve enormemente potenciada por la activación dependiente del tiempo de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Tras la unión de Wnt a sus receptores o la inhibición de GSK-3, como componente del complejo de destrucción, se estabiliza la β-catenina y se trasloca al núcleo, en el que activa varios genes diana.

Tal como se usa en el presente documento, el término "neurona retiniana" se refiere a las neuronas que forman parte de la retina. La retina es un tejido sensible a la luz que reviste la superficie interior del ojo. Es una estructura en capas con varias capas de neuronas interconectadas mediante sinapsis. Las únicas neuronas que son directamente sensibles a la luz son las células fotorreceptoras. Son principalmente de dos tipos: bastones y conos. Los bastones funcionan principalmente en luz tenue y proporcionan visión en blanco y negro, mientras que los conos soportan la visión durante el día y la percepción del color. Un tercer tipo, mucho menos frecuente, de fotorreceptor, la célula ganglionar fotosensible, es importante para respuestas de reflexión a la luz del día brillante. Las señales neuronales de los bastones y los conos experimentan un procesamiento por otras neuronas de la retina. La emisión adopta la forma de potenciales de acción en células ganglionares de la retina cuyos axones forman el nervio óptico. Las neuronas retinianas incluyen además células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes, células ganglionares, entre otras. Además de esas células hay células gliales en la retina tales como las células de Müller (Müller glía), que son las células gliales principales de la retina y actúan como células de soporte, astrocitos y células de la microglía (Webvision – The Organization of the Retina and Visual System, Part II, Capítulo titulado "Glial cells of the Retina", por Helga Kolb, de fecha 31 de julio de 2012).

En una realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas, tales como bastones y similares, y células gliales retinianas tales como células de Müller, etc., que se fusionan con las células o la población celular para su uso

en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, por ejemplo, HSPCs tratadas con BIO (Ejemplo 1). En otra realización particular, las neuronas retinianas comprenden células ganglionares y/o células amacrinas que se fusionan con las HSPCs trasplantadas (Ejemplo 2). En otra realización particular se contempla la fusión de células seleccionadas del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras, MSCs y cualquier combinación de las mismas, incluyendo las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, o una población de las mismas, por ejemplo, HSPCs, con células proliferantes endógenas (por ejemplo, RSPCs).

Las neuronas retinianas finales que pueden obtenerse tras la reprogramación de las neuronas retinianas fusionadas pueden variar, por ejemplo, células fotorreceptoras, células ganglionares, interneuronas, etc. En una realización particular, se reprograman neuronas retinianas fusionadas (por ejemplo, bastones) y células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller) principalmente para dar bastones (Ejemplo 1), mientras que en otra realización particular se reprograman neuronas retinianas fusionadas (por ejemplo, células ganglionares y/o células amacrinas) para dar células ganglionares e interneuronas (Ejemplo 2).

Aunque los inventores no desean limitarse a ninguna teoría, se cree que las neuronas retinianas reprogramadas pueden ser del mismo tipo (o diferentes) del de la neurona retiniana fusionada a la célula o población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, por ejemplo, puede reprogramarse un bastón para obtener un bastón u otro tipo de neurona retiniana tal como, por ejemplo, una célula ganglionar, una célula amacrina, etc.; puede reprogramarse una célula ganglionar para obtener una célula ganglionar u otro tipo de neurona retiniana tal como, por ejemplo, un bastón, una célula amacrina, etc.; puede reprogramarse una célula amacrina para obtener una célula amacrina u otro tipo de neurona retiniana tal como, por ejemplo, un bastón, una célula ganglionar, etc. Además, una célula glial retiniana, tal como una célula de Müller, tras fusión con una célula o con una población de células para su empleo en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, puede ser reprogramada a una neurona retiniana tal como un bastón, u otro tipo de neurona retiniana tal como, por ejemplo, una célula ganglionar, una célula amacrina, etc. De hecho, el Ejemplo 1 muestra la fusión de

HSPCs tanto con bastones como con células de Müller y la diferenciación de las células híbridas sólo en bastones.

En una realización particular, el tratamiento de dicha enfermedad de degeneración retiniana comprende la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.) y/o células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.), mediada mediante fusión celular de dicha célula o población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención con dichas células retinianas y diferenciación de las células híbridas resultantes en neuronas retinianas tales como células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones, etc.), células ganglionares células amacrinas, etc. En otra realización particular, el tratamiento de dicha enfermedad de degeneración retiniana comprende la reprogramación de neuronas retinianas mediada mediante fusión celular de dicha célula o población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención con dichas neuronas retinianas y diferenciación de las células híbridas resultantes en el mismo tipo, o diferente, de neuronas retinianas, por ejemplo, células fotorreceptoras, tales como bastones, etc., células ganglionares, células amacrinas, etc.

En una realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.) y células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.).

Una “enfermedad de degeneración retiniana”, tal como se define en el presente documento, es una enfermedad asociada con un deterioro de la retina provocado por la muerte progresiva y eventual de las células del tejido retiniano. El término “enfermedad de degeneración retiniana” también incluye causas indirectas de degeneración retiniana, es decir, condiciones degenerativas retinianas derivadas de otras patologías primarias, tales como cataratas, diabetes, glaucoma, etc. En una realización particular, dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que comprende retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis

congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, etc., así como estados degenerativos retinianos derivados de otras patologías primarias, tales como cataratas, diabetes, glaucoma, etc. En una realización particular, dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma. En otra realización particular, dicha enfermedad de degeneración retiniana es degeneración macular relacionada con la edad que se presenta en dos formas: "seca" que resulta de la atrofia de la capa epitelial de pigmento retiniana por debajo de la retina, lo que provoca pérdida de visión mediante pérdida de fotorreceptores (bastones y conos) en la parte central del ojo; y "húmeda" que provoca pérdida de visión debida a un crecimiento de vasos sanguíneos anómalo (neovascularización coroidal) en la capa coriocapilar, a través de la membrana de Bruch, conduciendo finalmente a fuga de sangre y proteínas por debajo de la mácula, provocando eventualmente un daño irreversible a los fotorreceptores y una rápida pérdida de la visión. En una realización más particular, dicha enfermedad de degeneración retiniana es RP, una familia heterogénea de trastornos retinianos heredados caracterizada por una degeneración progresiva de los fotorreceptores con posterior degeneración de RPE, que se caracteriza por depósitos de pigmento predominantemente en la retina periférica y por una conservación relativa de la retina central. En la mayoría de los casos de RP, hay degeneración primaria de bastones fotorreceptores, con degeneración secundaria de conos.

En el contexto de la presente invención, "tratamiento de enfermedad de degeneración retiniana" significa la administración de las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, o una población de dichas células, o una composición farmacéutica que comprende dichas células o una composición farmacéutica que comprende células distintas de las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención (véase el Tratamiento B a continuación) para prevenir o tratar la aparición de síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas de una enfermedad de degeneración retiniana, para aliviar sus síntomas o para detener o inhibir su desarrollo y progresión tal como, por ejemplo, la aparición de ceguera. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para retrasar la aparición de la enfermedad o para prevenir la

manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos o un tratamiento terapéutico para eliminar o aliviar los síntomas tras la manifestación de la enfermedad.

La supervivencia de células trasplantadas en un sujeto vivo puede determinarse mediante el uso de una variedad de técnicas de exploración, por ejemplo, exploración por tomografía axial computerizada (TAC o TC), obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) o exploraciones por tomografía por emisión de positrones (TEP). Alternativamente, la determinación de la supervivencia del trasplante también puede realizarse post-mortem extirpando el tejido y examinándolo visualmente o mediante un microscopio. Examinar la restauración de la función ocular que estaba dañada o enferma puede evaluar la integración funcional de células trasplantadas en el tejido ocular de un sujeto. Por ejemplo, la eficacia en el tratamiento de enfermedades de la degeneración retiniana puede determinarse mediante la mejora de la agudeza visual y evaluación para detectar anomalías y clasificar fotografías de fondo a color estereoscópicas (Age-Related Eye Disease Study Research Group, NEI5 NIH, AREDS Report No. 8, 2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436).

Para la administración a un sujeto, las células o la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención pueden formularse en una composición, preparación o formulación farmacéutica, usando portadores farmacéuticamente aceptables, cuyas características particulares se comentarán a continuación en la sección titulada “Composición farmacéutica”.

Tratamiento B

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dicha célula con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. En otras palabras, según este aspecto, la invención proporciona una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal

(MSC), para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante reprogramación, mediada por la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de una célula retiniana, tal como una neurona retiniana y/o una célula glial retiniana, por fusión de dicha célula con dicha célula retiniana tras contacto de dicha célula con dicha células retiniana en el ojo de un sujeto.

Alternativamente, en otras palabras, este aspecto de la invención se refiere al uso de una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora, una célula madre mesenquimal, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dicha célula con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

Las características particulares de la célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética, una célula progenitora, una célula madre mesenquimal, y la enfermedad de degeneración retiniana que va a tratarse se han comentado anteriormente en relación con el Tratamiento A anterior, cuyas características particulares se incorporan en el presente documento.

En una realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.) y células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.).

Al contrario que el Tratamiento A anterior, en el Tratamiento B no es necesario que la célula (HSC, célula progenitora o MSC) que va a implantarse tenga su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada en el momento en el que se implanta la célula en el ojo porque dicha ruta puede activarse de manera endógena o mediante la administración de un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, tal como se comentará a continuación. Por tanto, según el Tratamiento B, no es necesario tratar la célula (HSC, célula progenitora o MSC), antes de su implantación en el ojo, con un activador de la

ruta de señalización Wnt/β-catenina o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o que sobreexprese un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, pero lo que se necesita es que se produzca la regeneración retiniana mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dicha célula con dichas neuronas retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. En este caso, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede ser endógena, es decir, puede lograrse por el sujeto al que van a administrarse (implantarse o trasplantarse) las células como consecuencia de un daño o lesión en la retina (que puede producirse en enfermedades de degeneración retiniana) o mediante la administración de un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Varios ensayos realizados por los inventores han mostrado que tras la activación endógena de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se observa reprogramación de las células híbridas formadas tras el daño (Ejemplo 2). Por otro lado, la inclusión de células de médula ósea (BMC) endógenas tras el daño en el ojo y la activación ectópica de la ruta de señalización Wnt/β-catenina es suficiente para observar la reprogramación de las células híbridas (Ejemplo 2). Por tanto, en una realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B (es decir, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dicha célula con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta Wnt/β-catenina) es una BMC (c-kit+, sca-1+) procedente de la médula ósea (BM) incluida al interior del ojo y se trata el ojo con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina con el fin de obtener la regeneración del tejido retiniano.

Los efectos de la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, así como ejemplos ilustrativos, no limitativos, de activadores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina e inhibidores de represores de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se han comentado en relación con el Tratamiento A anterior, cuyas características particulares se incorporan en el presente documento.

El Ejemplo 2 muestra que tras la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, pueden reprogramarse transitoriamente *in vivo* neuronas retinianas de ratón de vuelta a un estado precursor tras la fusión espontánea con células trasplantadas (por ejemplo, HSPCs o ESCs). Las células híbridas recién formadas reactivan marcadores de precursores neuronales (por ejemplo, las HSPCs y ESCs reprograman las neuronas retinianas de vuelta a la expresión de nanog y nestina). Además, dichas células híbridas pueden proliferar, diferenciarse a lo largo de un linaje neuroectodérmico (en el caso de células híbridas formadas por HSPCs y neuronas retinianas), y finalmente en neuronas retinianas diferenciadas de manera terminal (por ejemplo, células fotorreceptoras), que pueden regenerar el tejido retiniano dañado; alternativamente, células híbridas formadas por ESCs y neuronas retinianas también pueden proliferar y diferenciarse, además de en el linaje neuroectodérmico, en linajes endodérmico y ectodérmico que pueden dar como resultado la formación de un teratoma. Tras el daño retiniano y la inducción de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en el ojo, también se produce reprogramación mediada por fusión celular tras la movilización endógena de células de la médula ósea en los ojos. Estos datos muestran que la reprogramación *in vivo* de neuronas retinianas diferenciadas de manera terminal es un mecanismo posible de regeneración tisular.

En una realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B es una HSC. En otra realización particular, dicha célula es una LT-HSC o una ST-HSC.

En otra realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B es una célula progenitora. En otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B es una MSC.

Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B pueden formar parte de una población de dichas células cuyo uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana constituye un aspecto adicional de la presente invención.

Por tanto, la invención se refiere además a una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una

célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B.

En otras palabras, la invención se refiere a una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dicha célula con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Con ese fin se implanta la población celular en el ojo de un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana. Por tanto, según este aspecto, la invención proporciona una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC, y cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante reprogramación, mediada por activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de una célula retiniana, tal como una neurona retiniana y/o una célula glial retiniana, por fusión de dicha célula con dicha célula retiniana tras contacto de dicha célula con dicha células retiniana en el ojo de un sujeto.

Expresado de manera alternativa, este aspecto de la invención se refiere al uso de una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras, MSCs y cualquier combinación de las mismas, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina; o, alternativamente, al uso de una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad de

degeneración retiniana, mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

Las características particulares de dichas HSCs, células progenitoras y MSCs se mencionaron anteriormente.

En una realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.) y células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.).

En una realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende una pluralidad de, es decir, más de dos, HSCs. En una realización particular, dichas HSCs se seleccionan de LT-HSCs, ST-HSCs y combinaciones de las mismas.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende una pluralidad de células progenitoras. En una realización particular, dichas células progenitoras se seleccionan de un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP, MEP y combinaciones de las mismas.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende una pluralidad de MSC.

En una realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende al menos una HSC y al menos una célula progenitora. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC; en otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende al

menos una HSC y al menos una MSC. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende al menos una célula progenitora y al menos una MSC. En una realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En otra realización particular, la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B comprende al menos una HSC, al menos una célula progenitora y al menos una MSC. En una realización particular, dicha célula HSC es una LT-HSC o una ST-HSC; en otra realización particular, dicha célula progenitora es un MPP temprano, un MPP tardío, un LRP, un CMP, un GMP o un MEP.

En una realización particular, una población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según el Tratamiento B es la composición celular identificada como "HSPC", es decir, una población celular que comprende HSCs, células progenitoras y MSCs; dicha población celular puede obtenerse, por ejemplo, a partir de médula ósea, o, alternativamente, mezclando HSCs, células progenitoras y MSCs, en las razones o proporciones deseadas, con el fin de obtener una población de HSPCs. Por tanto, dicha población de HSPCs puede incluir HSCs, células progenitoras y MSCs en diferentes razones o proporciones. El experto en la técnica entenderá que dicha población celular puede enriquecerse en cualquier tipo de células específicas mediante medios convencionales, por ejemplo, separando un tipo específico de células mediante cualquier técnica adecuada basándose en el uso de parejas de unión para los marcadores de superficie correspondientes. Por tanto, en una realización particular, la población de HSPCs puede enriquecerse en HSCs, o en células progenitoras, o incluso en MSCs.

Composiciones

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición celular, denominada a continuación en el presente documento "composición celular de la invención", en la que al menos el 50% de las células de dicha composición celular se seleccionan del grupo

que consiste en células madre hematopoyéticas (HSCs), células progenitoras, células madre mesenquimales (MSCs) y cualquier combinación de las mismas y en la que dichas células tienen su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada, o en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, o, en la que dichas células se han tratado con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y/o en donde dichas células sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

En una realización particular, la composición celular de la invención es una composición en la que al menos el 60%, preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 80%, todavía más preferiblemente el 90%, aún más preferiblemente el 95%, e incluso más preferiblemente el 100% de las células son HSCs, células progenitoras y/o MSCs, en cualquier razón, que tienen su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada (como resultado, por ejemplo, de haberse tratado con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o mediante manipulación para sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina). La composición celular de la invención comprende además un medio; dicho medio debe ser compatible con las células contenidas en dicha composición; los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de medios que pueden estar presentes en la composición celular de la invención incluyen disoluciones isotónicas opcionalmente complementadas con suero; medios de cultivo celular o, alternativamente, un medio de soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso.

Composiciones farmacéuticas

Las células y la población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A y B de la presente invención pueden administrarse en una composición, preparación o formulación farmacéutica, usando portadores farmacéuticamente aceptables.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, denominada a continuación en el presente documento “composición farmacéutica de la invención”, seleccionada del grupo que consiste en:

1) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética

(HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en la que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, y un portador farmacéuticamente aceptable, y

2) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y un portador farmacéuticamente aceptable.

Con el fin de que las HSCs, células progenitoras y/o MSCs tengan su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada [composición farmacéutica de la invención 1)], dichas HSCs, células progenitoras y/o MSCs se tratan con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y/o se manipulan con el fin de sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

La composición farmacéutica de la invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Tal como se usa en el presente documento, el término “portador” incluye vehículos, medios o excipientes, mediante lo cual pueden administrarse las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención. Obviamente, dicho portador debe ser compatible con dichas células. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquier portador fisiológicamente compatible, por ejemplo, disoluciones isotónicas (por ejemplo, solución salina estéril de NaCl al 0,9%, solución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de Ringer-lactato, etc.) opcionalmente complementadas con suero, preferiblemente con suero autólogo; medios de cultivo celular (por ejemplo, DMEM, etc.); etc.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender componentes auxiliares con los que estarán familiarizados los biólogos o químicos médicos, por ejemplo, un agente antioxidante adecuado para la administración ocular (por ejemplo,

EDTA, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, mercaptopropionil-glicina, N-acetil-cisteína, beta-mercaptoetilamina, glutatión y especies similares, ácido ascórbico y sus sales o sulfito o metabisulfito de sodio, etc.), un agente tamponante para mantener el pH a un pH adecuado para minimizar la irritación del ojo (por ejemplo, para inyección intraocular o intravítrea directa, las composiciones farmacéuticas deben estar a pH de 7,2 a 7,5, alternativamente a pH de 7,3-7,4), un agente de tonicidad adecuado para la administración al ojo (por ejemplo, cloruro de sodio para preparar composiciones aproximadamente isotónicas con solución salina al 0,9%), un agente potenciador de la viscosidad (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc.), etc. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede contener un conservante (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, clorobutanol, acetato o nitrato fenilmercúrico, timerosal, metil o propilparabenos, etc.). Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención las conocen generalmente los expertos en la técnica y se usan normalmente en la preparación de composiciones celulares. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, de E.W. Martin.

Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención pueden administrarse solas (por ejemplo, como poblaciones sustancialmente homogéneas) o como mezclas con otras células, por ejemplo, neuronas, células madre neuronales, células madre de la retina, células progenitoras oculares, células madre epiteliales de la retina o la córnea y/u otras células madre multipotentes o pluripotentes. Cuando las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención se administran con otras células, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con las otras células (o bien antes o bien después de las otras células). Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse juntas durante un periodo de tiempo antes de la administración.

Las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención pueden administrarse con al

menos un agente farmacéutico, tal como, por ejemplo, factores de crecimiento, factores tróficos, medio condicionado, u otros principios activos, tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos, antioxidantes, factores neurotróficos o fármacos neurorregenerativos o neuroprotectores tal como se conoce en la técnica, o bien juntos en una única composición farmacéutica, o bien en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (o bien antes o bien después de la administración de los otros agentes); se espera que el uso de dichos agentes aumente la eficacia de la regeneración celular o disminuya la degeneración celular.

Los ejemplos de dichos otros agentes o componentes que pueden administrarse con las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención incluyen, pero no se limitan a: (1) otros fármacos neuroprotectores o neurobeneficiosos; (2) componentes de la matriz extracelular seleccionados, tales como uno o más tipos de colágeno conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos (alternativamente, las células pueden modificarse mediante ingeniería genética para expresar y producir factores de crecimiento); (3) agentes antiapoptóticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), mimeticuerpo de EPO, trombopoyetina, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF)-I, IGF-II, factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de caspasa); (4) compuestos antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de MAP cinasa p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, pemirolast, tranilast, Remicade, sirolimús, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como, por ejemplo, tepoxalina, tolmetina y suprofeno; (5) agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como inhibidores de calcineurina, inhibidores de mTOR, antiproliferativos, corticosteroides y diversos anticuerpos; (6) antioxidantes tales como probucol, vitaminas C y E, coenzima Q- 10, glutatión, L-cisteína, N- acetilcisteína, etc.; y (7) anestésicos locales, por nombrar unos pocos.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse normalmente como composiciones líquidas o fluidas, semisólidos (por ejemplo, geles o hidrogeles), espumas o sólidos porosos (por ejemplo, matrices poliméricas, materiales compuestos, derivados de fosfato de calcio y similares, según sea apropiado para la modificación por ingeniería del tejido oftálmico) o partículas para la encapsulación de células de origen

natural o sintético para permitir una mejor administración de las células o una función y supervivencia superior. En una realización particular, las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención pueden administrarse en dispositivos semisólidos o sólidos adecuados para su implantación quirúrgica; o pueden administrarse con un portador líquido (por ejemplo, para inyectarse en el sujeto receptor). Por tanto, dichas células pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse o administrarse de otro modo directa o indirectamente en el sitio de molestia o daño ocular. Cuando se administran células en dispositivos semisólidos o sólidos, la implantación quirúrgica en una ubicación precisa en el cuerpo es normalmente un medio adecuado de administración. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas líquidas o fluidas pueden administrarse en una ubicación más general en el ojo (por ejemplo, por vía intraocular).

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse al ojo de un sujeto en necesidad de tratamiento (paciente) de uno o más de varios modos de administración conocidos en la técnica. En una realización la composición farmacéutica se implanta o se administra a la retina o zona circundante por medio de inyección intraocular o intravítrea periódica, o bajo la retina. Además, de manera ideal las células se administrarán sólo una vez en la aparición temprana de la enfermedad, sin embargo si hay una reversión del fenotipo puede ser posible realizar administraciones adicionales durante la vida del sujeto. Tal como entenderá un experto en la técnica, algunas veces la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio en el que se desea el beneficio puede ser ventajosa. Por tanto, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al tejido u órgano deseado puede lograrse mediante administración directa (por ejemplo, mediante inyección, etc.) por medio de inserción de un dispositivo adecuado, por ejemplo, una cánula adecuada, o mediante otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.

Pueden diseñarse composiciones farmacéuticas para inyección para una administración de un único uso y no contienen conservantes. Las disoluciones inyectables pueden tener una isotonicidad equivalente a una disolución de cloruro de sodio al 0,9% (osmolalidad de 290-300 miliosmoles). Esto puede lograrse mediante la adición de cloruro de sodio o excipientes tales como agentes tamponantes y antioxidantes, tal como se indicó anteriormente.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al sujeto se llevará a cabo mediante medios convencionales, por ejemplo, dicha composición farmacéutica puede administrarse a dicho sujeto a través de la vía intravítrea usando dispositivos adecuados tales como jeringas, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará usando equipo, aparatos y dispositivos adecuados para administrar composiciones celulares conocidos por el experto en la técnica.

Las formas farmacéuticas y regímenes para administrar las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se desarrollan según la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado del sujeto, por ejemplo, la naturaleza y el grado del estado degenerativo retiniano, edad, sexo, peso corporal y estado médico general, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. Por tanto, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que va a administrarse a un sujeto se determinará mediante estas consideraciones tal como se conoce en la técnica.

No obstante, en general, la composición farmacéutica de la invención (o cualquiera de las otras composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento) contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención, preferiblemente una población sustancialmente homogénea de dichas células para proporcionar el efecto terapéutico deseado. En el sentido usado en esta descripción, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención que puede producir el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, regenerar total o parcialmente la retina y/o mejorar la visión funcional, y similares) y generalmente se determinará, entre otros factores, por las características de dichas propias células y el efecto terapéutico deseado. Generalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz de dichas células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las características del propio sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma farmacéutica, etc. Con este

fin, la dosis mencionada en esta invención sólo debe tenerse en cuenta como directriz para el experto en la técnica, quien debe ajustar esta dosis dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra en una dosis que contiene entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención por ojo, preferiblemente entre aproximadamente 10^6 y 10^8 células por ojo. La dosis de dichas células puede repetirse dependiendo del estado y la evolución del sujeto en intervalos temporales de días, semanas o meses, que deben establecerse por el especialista en cada caso.

En algunas ocasiones, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un sujeto antes de iniciar la terapia celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria frente a las células trasplantadas se conocen en la técnica. Como alternativa, las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Kits

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit, denominado a continuación en el presente documento "kit de la invención", seleccionado del grupo que consiste en:

1) un kit que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en el que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, e instrucciones para el uso de los componentes del kit, y
2) un kit que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en combinación con un activador de la

ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, e instrucciones para el uso de los componentes del kit.

Con el fin de que las HSCs, células progenitoras y/o MSCs tengan su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada [kit de la invención 1)], dichas HSCs, células progenitoras y/o MSCs se tratan con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y/o se manipulan con el fin de sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

El kit de la invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

Las características de las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según los Tratamientos A o B de la invención, la composición farmacéutica de la invención y la enfermedad de degeneración retiniana que va a tratarse se han mencionado anteriormente y se incorporan en el presente documento.

Métodos de tratamiento

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad de degeneración retiniana (es decir, un paciente), que comprende administrar a dicho sujeto que necesita tratamiento una célula o una población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, una composición farmacéutica de la invención, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de degeneración retiniana, en el que dicho tratamiento de la enfermedad de degeneración retiniana se produce mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta Wnt/β-catenina.

Las características particulares de las células para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la invención, las composiciones farmacéuticas de la invención, las enfermedades de degeneración retiniana que van a

tratarse y la cantidad eficaz para tratar dichas enfermedades se han mencionado anteriormente y se incorporan en el presente documento.

En una realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.). En otra realización particular, las células retinianas comprenden neuronas retinianas (por ejemplo, bastones, células ganglionares, células amacrinas, etc.) y células gliales retinianas (por ejemplo, células de Müller, etc.).

En una realización particular, el método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad de degeneración retiniana comprende la administración de una composición farmacéutica de la invención 1), es decir, una composición farmacéutica que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, en el que dichas células tienen su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada, y un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de degeneración retiniana, en el que dicho tratamiento de la enfermedad de degeneración retiniana se produce mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta Wnt/β-catenina.

Con el fin de que las HSCs, células progenitoras y/o MSCs tengan su ruta de señalización Wnt/β-catenina activada [kit de la invención 1)], dichas HSCs, células progenitoras y/o MSCs se tratan con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y/o se manipulan con el fin de sobreexpresar un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad de degeneración retiniana (es decir, un paciente), que comprende administrar a dicho sujeto que necesita tratamiento una célula seleccionada del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras y MSCs, o una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en HSCs, células progenitoras, MSCs y cualquier combinación de las mismas,

o una composición farmacéutica que comprende dicha célula o población celular, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de degeneración retiniana, en el que dicho tratamiento de la enfermedad de degeneración retiniana se produce mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta Wnt/β-catenina.

En una realización particular, el método anterior para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad de degeneración retiniana comprende la administración de una composición farmacéutica, composición que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una HSC, una célula progenitora, una MSC y cualquier combinación de las mismas, junto con, opcionalmente, un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y un portador farmacéuticamente aceptable, preparada a partir de células distintas de las células de la invención, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de degeneración retiniana, en el que dicho tratamiento de la enfermedad de degeneración retiniana se produce mediante la reprogramación de células retinianas, tales como neuronas retinianas y/o células gliales retinianas, mediada por fusión celular de dichas células con dichas células retinianas, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta Wnt/β-catenina.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no se limita, por los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

La fusión de células madre hematopoyéticas desencadena la regeneración retiniana en un modelo de ratón de retinitis pigmentosa

1. Métodos

Preparación celular

Se aislaron HSPCs de linaje negativo a partir de médula ósea total de ratones Cre-RFP (ratones que expresaban de manera estable CRE y proteína fluorescente roja

[RFP]; proporcionados por Jackson Laboratories) usando kits de depleción celular por linaje (Miltenyi Biotech). Se trataron o bien con BIO 1 μM o bien con PBS y con tamoxifeno 1 μM durante 24 h antes del trasplante.

Animales

Ratones R26Y^{rd1} (ratones que llevan el transgén R26Lox-Stop-Lox-YFP y homocigotos para la mutación rd1) [Srinivas *et al.*, BMC Dev Biol 1, 4 (2001)].

Trasplante

Se trasplantó un intervalo de 10^5-10^6 células en ratones previamente anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina: metomidina (80 mg/kg: 1,0 mg/kg, i.p.), se levantó cuidadosamente el párpado del ojo, se realizó una pequeña incisión debajo de la ora serrata y se inyectaron de 1 a 5 μl de una disolución que contenía una suspensión de células en PBS en el vítreo o en el espacio subrretiniano. Se mantuvo la capilaridad en el ojo durante aproximadamente 3 segundos para evitar el reflujo.

Clasificación de híbridos mediante FACS

Para el análisis de la expresión génica, 24 h tras el trasplante de células se aislaron tejidos retinianos de ratón y se disgregaron en tripsina, mediante trituración mecánica. Se usó un clasificador celular FACS para aislar las células híbridas positivas para rojo y para verde. Se extrajo ARN total usando microkits de aislamiento de ARN (Qiagen), según el protocolo del fabricante. Se sometió el ARN a transcripción inversa con SuperScript III (Invitrogen) y se realizaron reacciones de qRT-PCR usando Platinum SYBR green qPCix-UDG (Invitrogen) en una máquina de PCR en tiempo real ABI Prism 7000. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y las diferencias de entrada de ADNc se compensaron mediante normalización con respecto a la expresión de GAPDH. Los cebadores usados en el análisis de qRT-PCR se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Cebadores específicos de ratón para qRT-PCR

Especie/Gen	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:
Gata1	SuperArray Bioscience Corporation [n.º de catálogo PPM24651A-200]	
Rodopsina	Dir GTAGATGACCGGGTTATAGATGGA	1
	Inv GCAGAGAAGGAAGTCACCCGC	2
RDS	Dir CGGGACTGGTTCGAGATTC	3
	Inv ATCCACGTTGCTCTTGCTGC	4
Crx	Dir ATCCGCAGAGCGTCCACT	5
	Inv CCCATACTCAAGTGCCCCTA	6
Rx	Dir GTTCGGGTCCAGGTATGGTT	7
	Inv GCGAGGAGGGGAGAATCCTG	8
Chx10	Dir ATCCGCAGAGCGTCCACT	9
	Inv CGGTCACTGGAGGAAACATC	10
Nestina	Dir TGGAAGTGGCTACA	11
	Inv TCAGCTTGGGGTCAGG	12
Nogina	Dir CTTGGATGGCTTACACACCA	13
	Inv TGTGGTCACAGACCTTCTGC	14
Otx2	Dir GAGCTCAGTCGCCACCTCTACT	15
	Inv CCGCATTGGACGTTAGAAAAG	16

[Dir: Directo; Inv: Inverso]

Ensayo TUNEL

Se detectaron núcleos apoptóticos mediante el kit de marcaje de extremos cortados terminales por dUTP mediado por TdT (TUNEL, fluoresceína; Roche Diagnostics, Monza, Italia) según los protocolos del productor.

Tinción con H&E

En resumen, se tiñeron cortes de tejido con Histo•Perfect™ H&E Staining Kit™. (Fabricante: BBC Biochemical) según los protocolos del productor.

Tratamiento de muestras

Se fijaron tejidos mediante inmersión en paraformaldehído al 4% durante la noche, y luego se incrustaron en compuesto OCT (Tissue-Tek). Se procesaron cortes en serie horizontales de 10 mm de grosor para su análisis. Para la inmunotinción con fluoresceína, los anticuerpos primarios usados fueron: anti-nestina (1:300, Abcam), anti-Otx2 (1:200, Abcam), anti-nogina (1:200, Abcam), anti-Thy1,1 (1:100, Abcam), anti-sintaxina (1:50, Sigma), anti-glutamina sintetasa (Sigma, 1:100) anti-anexina V (1:200, Abcam) y anti-Ki67 (Sigma, 1,100). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpos anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados con Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 o Alexa Fluor 633 (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen).

Análisis estadístico

Se contaron los números de células inmunorreactivas o positivas para YFP dentro de tres zonas retinianas diferentes (campo 40×) en cortes individuales. Se examinó un total de 10 cortes en serie para cada ojo, de al menos tres ratones diferentes. Para el análisis estadístico, se expresaron los datos como medias ± EEM, combinados de al menos tres experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado.

2. Resultados

La retinitis pigmentosa es un trastorno de ceguera devastador que surge de diferentes mutaciones en más de 100 genes conocidos [Wright *et al.* Nat Rev Genet 11, 273-284, doi:nrg2717 [pii]10,1038/nrg2717 (2010)]. Los ratones Rd1 llevan una mutación recesiva espontánea en el gen de PDE6B que codifica para la subunidad β de fosfodiesterasa 3',5'-cíclica específica de GMP cíclico. Esta mutación de pérdida de función da como resultado la acumulación de GMP cíclico y Ca^{2+} en los bastones, lo que a su vez conduce a la muerte de células fotorreceptoras [Doonan *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 3530-3538, doi:46/10/3530 [pii]10,1167/iovs.05-0248 (2005)]. Los ratones Rd1 son homocigotos para esta mutación, y representan un modelo grave para la progresión rápida de esta enfermedad degenerativa.

Las HSPCs son células multipotentes que pueden dar lugar a todos los tipos de células sanguíneas. Además, se ha propuesto que conservan cierta plasticidad con algún

grado de potencial regenerativo para tejidos diferentes, incluyendo para el SNC [Alvarez-Dolado, M. Front Biosci 12, 1-12 (2007)].

Se ha mostrado que la activación de la ruta Wnt/β-catenina promueve la proliferación y la desdiferenciación de las células de Müller (Müller glía) en diferentes modelos de ratón de degeneración retiniana, lo que sugiere una posible contribución de esta ruta en la modulación de la plasticidad del SNC [Osakada, F. *et al.* J Neurosci 27, 4210-4219 (2007)]. De hecho, los inventores notificaron recientemente que la activación periódica de la ruta Wnt/β-catenina mediante Wnt3a o mediante el inhibidor de GSK-3 BIO en células madre embrionarias (ESC) potencia fuertemente la reprogramación de células precursoras neuronales tras la fusión celular [Lluis *et al.* Cell Stem Cell 3, 493-507 (2008)]. Por tanto, los inventores se preguntaron si la fusión de HSPCs con neuronas retinianas junto con una activación transitoria de la ruta Wnt/β-catenina en HSPCs trasplantadas podía ser un mecanismo para la regeneración retiniana y la mejora de la visión funcional en ratones rd1.

Por tanto, los inventores trasplantaron $HSPCs^{CRE/RFP}$ Lin^- (aisladas de ratones donantes que expresaban de manera estable CRE y proteína fluorescente roja [RFP]) por vía subretiniana en los ojos de ratones $R26Y^{rd1}$ de día posnatal 10 (p10) (que llevaban el transgén R26Lox-Stop-Lox-YFP y homocigotos para la mutación rd1) y se sacrificaron los ratones 24 h después. Se esperaba observar células híbridas dobles positivas para RFP y proteína fluorescente amarilla (YFP) en caso de fusión celular (Figura 1a). De hecho, se observó un número muy alto de híbridos (positivos para RFP/YFP) en la capa nuclear externa (ONL) de la retina, y parte de la capa nuclear interna (INL) (Figura 2a).

Los inventores mostraron anteriormente que el inhibidor de GSK-3 BIO no aumenta la eficacia de fusión de ESCs con células progenitoras neuronales *in vitro* [Lluis *et al.* (2008) citado anteriormente]. De manera similar, en este caso se observaron niveles comparables de híbridos en la ONL cuando los inventores trasplantaron $HSPCs^{CRE,RFP}$ pretratadas con BIO durante 24 h (denominadas a continuación en el presente documento BIO-HSPCs), para activar la ruta Wnt/β-catenina (Figuras 1b y 1c). Esto descartó un papel de BIO en la modulación de la eficacia de fusión *in vivo*. En cambio, no se observó ningún acontecimiento de fusión tras trasplantes subretinianos en

ratones R26Y de tipo natural control en p10 (Figuras 1d y 1e), lo que muestra que el daño celular genético desencadena la fusión entre neuronas retinianas y HSPCs.

Entonces se trasplantaron $HSPCs^{CRE}$ (no positivas para RFP) por vía subretiniana en ratones $R26Y^{rd1}$ para identificar las parejas retinianas de fusión celular. Estas HSPCs se fusionaron específicamente con bastones en la ONL (células dobles positivas para rodopsina/YPF) (Figura 2b) y con células de Müller (células dobles positivas para glutamina sintetasa/YFP) (Figura 2c). Sin embargo, nunca se observó la fusión entre estas HSPCs y conos (Figura 2d).

La neurodegeneración en ratones rd1 ya es evidente en p10 ya que los fotorreceptores (en primer lugar los bastones, y después, como consecuencia, los conos) experimentan apoptosis y degeneración; en p20 ya han desaparecido casi completamente. Resulta interesante que el número de fotorreceptores apoptóticos disminuyó sustancialmente tras el trasplante de BIO-HSPCs, lo que sugirió que la muerte celular de bastones ya se retrasaba o se detenía a las 24 h tras el trasplante (Figura 2e). Además, en los híbridos positivos para YFP que se derivaban de la fusión de las $BIO\text{-}HSPCs^{CRE,RFP}$ tratadas con BIO con neuronas retinianas (es decir, los BIO-híbridos), había niveles bajos de apoptosis (20%, de células positivas para YFP totales) y una alta tasa de proliferación (16%). En cambio, en los híbridos formados entre $HSPCs^{CRE,RFP}$ no tratadas con BIO y neuronas retinianas (es decir, no-BIO-híbridos), había altos niveles de muerte celular (75%) y una baja tasa de proliferación (2%) (Figuras 2f, 2g y Figura 3).

Para caracterizar los híbridos YFP/RFP, se clasificaron mediante FACS a partir de las retinas trasplantadas y se analizaron para determinar la expresión de varios marcadores retinianos y neuronales de precursores, mediante análisis de qRT-PCR (Figura 2h). Los precursores neuronales nestina, nogina y Otx2 estaban claramente activados en los BIO-híbridos (híbridos formados con HSPCs tratadas con BIO), con una baja activación de los marcadores de precursor de fotorreceptor Crx, Rx y Chx10. Además, la rodopsina y la periferina (rds), que se expresan en fotorreceptores diferenciados de manera terminal, y GATA-1, un marcador de HSPCs, estaban fuertemente regulados por disminución en los BIO-híbridos. En cambio, en los no-BIO-híbridos (híbridos formados con HSPCs no tratadas con BIO), no había reactivación de marcadores de células precursoras o silenciamiento de genes de linaje (Figura 2h).

Entonces se analizó la expresión de proteínas en cortes. En este caso, los BIO-híbridos tenían una expresión activada de nestina, nogina y Otx2; en cambio, en los no-BIO-híbridos, no había casi activación de estos marcadores (Figura 4). Estos datos muestran por tanto la inducción de un proceso de desdiferenciación en los BIO-híbridos.

En conclusión, los BIO-híbridos derivados de la fusión de las HSPCs tratadas con BIO con neuronas retinianas no entran en apoptosis, sino que en vez de eso experimentan proliferación celular y desdiferenciación que reactiva diferentes marcadores neuronales de precursores retinianos. En cambio, los híbridos derivados de HSPCs no tratadas con BIO no proliferan, y tampoco se desdiferencian; en vez de eso, experimentan apoptosis.

A continuación, para investigar si estos BIO-híbridos pueden regenerar el tejido retiniano, los inventores realizaron un experimento a lo largo del tiempo. Se trasplantaron BIO-HSPCs$^{RFP/CRE}$ y BIO-HSPCs$^{RFP/CRE}$ por vía retiniana en p10 en diferentes grupos de ratones R26Y^{rd1}, y se realizaron TUNEL y tinción con H&E en cortes retinianos tras 5 (p15), 10 (p20) y 15 (p25) días, y tras 2 meses (p60). Aunque los fotorreceptores todavía estaban claramente presentes en p15 en cortes retinianos de ojos que recibieron trasplante tanto de BIO-HSPC como de no-BIO-HSPC, tal como se muestra mediante la estructura normal de la ONL (Figura 5a, 5b y 6a), las viabilidades de las neuronas retinianas fueron muy diferentes. En p15, hubo una apoptosis muy extendida en la capa fotorreceptora en cortes de los ojos sometidos a trasplante de no-BIO-HSPCs (Figuras 5c y 6a); en cambio, la muerte celular estaba casi ausente en p15 en la ONL de retinas sometidas a trasplante de BIO-HSPCs (Figuras 5d y 6a). De manera notable, en los puntos de tiempo posteriores (p20 y p25), la capa fotorreceptora en ojos sometidos a trasplante de BIO-HSPCs mantuvo su estructura normal (Figuras 5f, 5h y 6a), mientras que los núcleos de bastones y conos estaban ausentes en la ONL de ojos sometidos a trasplante de no-BIO-HSPCs. En su lugar, se observaron algunas capas nucleares aberrantes de células, que expresaban pigmento y que sólo eran positivas para el marcador de epitelio pigmentario de la retina, Rpe65 y para RFP (Figuras 5e, 5f, 5g, 6a y 6b).

Finalmente, a los 2 meses tras el trasplante, las retinas de los ratones rd1 sometidos a trasplante de BIO-HSPCs todavía no podían distinguirse de las retinas de tipo natural a lo largo de todo el tejido (Figuras 5i, 5j, 5k y 5l), con 10 filas de núcleos

fotorreceptores y estructuras de segmentos externo e interno normales. Por otro lado, la histología de retinas sometidas a trasplante de no-BIO-HSPCs era comparable a las de ojos rd1 no sometidos a trasplante, con capas fotorreceptoras completamente degeneradas (Figuras 5m, 5n, 5o y 5p).

Por tanto, puede concluirse que las BIO-HSPCs trasplantadas conservaron completamente la capa fotorreceptora en las retinas de ratones rd1 al menos hasta dos meses tras su trasplante. Esto sugerirá o bien un bloqueo en el mecanismo de degeneración o bien una activación de un proceso de regeneración. En cambio, el trasplante de BIO-HSPCs no mejoró el fenotipo de ratón rd1, aunque las células trasplantadas conservaran un potencial moderado para transdiferenciarse en células del epitelio pigmentario de la retina.

Para investigar la diferenciación de los híbridos a largo plazo, se sometieron ratones $R26Y^{rd1}$ en p10 a trasplante de BIO-$HSPCs^{CRE}$ o no-BIO-$HSPCs^{CRE}$ y se analizaron de nuevo dos meses tras el trasplante. En este caso, hubo una capa completa de células positivas para YFP en las retinas de ratones rd1 sometidos a trasplante de BIO-HSPCs (Figura 7a).

La tinción por inmunofluorescencia mostró que los híbridos de YFP se diferenciaron en bastones, pero no en conos, ya que eran positivos para la tinción para rodopsina (Figura 7a) pero no para la opsina de conos (Figura 7b). Además no se encontraron células híbridas de YPF que también eran positivas para el marcador glutamina sintetasa de células de Müller o para el marcador CD31 de células endoteliales, excluyendo por tanto la diferenciación de los híbridos en células de Müller o en vasos retinianos (Figuras 7c y 7d). En cambio, con las células trasplantadas no-BIO-HSPCs, casi no se encontraron híbridos positivos para YFP dos meses tras su trasplante porque los híbridos no sobrevivieron durante este periodo de tiempo (Figura 8a). Por tanto, puede concluirse que los BIO-híbridos se diferencian específicamente en bastones, y como consecuencia los conos pueden sobrevivir. En total, la expresión de YFP en todos los bastones indica claramente que los híbridos recién formados sustituyen a los fotorreceptores mutados rd1, regenerando así el tejido retiniano.

Para evaluar adicionalmente la diferenciación de híbridos en bastones y para determinar si este proceso de regeneración mediado por fusión puede mejorar la mutación de ratones rd1, se analizó la expresión de PDE6B, que no se expresa en

ratones rd1. De manera notable, los bastones dobles positivos para YFP/rodopsina también fueron positivos para la expresión de PDE6B, tal como también se confirmó mediante inmunotransferencia de tipo Western de extractos totales de retina sometida a trasplante (Figura 7g). Estos resultados indican que los BIO-híbridos pueden generar bastones de tipo natural, y así pueden regenerar la retina (Figuras 7e, 7f y 8b); dado que los bastones rd1 no pueden expresar PDE6B de tipo natural, la mutación se complementó por el genoma de HSPCs en los híbridos,

A continuación, para determinar si los bastones regenerados también eran electrofisiológicamente funcionales, los inventores realizaron pruebas de electrorretinograma con ratones rd1 1 mes tras el trasplante de BIO-HSPCs o no-BIO-HSPCs. Debe observarse que se registraron ondas tanto A como B en condiciones escotópicas y fotópicas en 4 ratones de 8 sometidos a trasplante de BIO-HSPCs, con una amplitud Δ del orden de 150 μV de promedio (no mostrado) lo que indica que los bastones regenerados experimentaron hiperpolarización de la membrana celular en respuesta a un estímulo luminoso, y que podían transmitir las señales eléctricas a las interneuronas, tal como se indica por la respuesta de onda B. La regeneración retiniana en análisis histológico confirmó la mejora funcional (no mostrado). Además, se analizó la agudeza visual de un grupo de ratones rd1 tratados de entre 2,0 y 2,5 meses de edad con la prueba del optómetro. En los ratones rd1 sometidos a trasplante de BIO-HSPCs, el número de movimientos de seguimiento con la cabeza, que mide la respuesta automática de los animales cuando detectan una diana en movimiento [Abdeljalil *et al.* Vision Res 45, 1439-1446, doi:S0042-6989(05)00005-2 [pii]10,1016/j.visres. 2004,12,015 (2005)] fue significativamente superior al medido en los ratones rd1 no sometidos a trasplante y sometidos a trasplante de no-BIO-HSPCs (no mostrado). Esto demostró una respuesta visual tras el estímulo en ratones rd1 sometidos a trasplante de BIO-HSPCs.

3. Discusión

Se han emprendido algunos intentos para mejorar la función de degeneración retiniana usando células madre derivadas de médula ósea (BMSCs). Se ha notificado que HSPCs Lin^- inyectadas por vía intravítrea en ojos de ratones rd1 pueden prevenir la degeneración vascular retiniana, un fenotipo de enfermedad secundaria, lo que entonces

retrasó la degeneración de conos retinianos. Sin embargo, las retinas sometidas a trasplante estaban formadas casi únicamente por conos, y las respuestas de electrorretinograma eran intensamente anómalas y comparables con animales no tratados [Otani *et al.* J Clin Invest 114, 765-774, doi:10,1172/JCI21686 (2004)]. Investigaciones adicionales referentes a los mecanismos de función retiniana mejorada tras el trasplante de BMSCs se han basado en el papel de BMSCs para promover un aumento de angiogénesis, o una disminución de inflamación, o incluso efectos antiapoptóticos, lo que puede retrasar la degeneración retiniana y por tanto ser beneficioso debido a una progresión ralentizada de la enfermedad. Además, se ha mostrado la transdiferenciación de BMSCs trasplantadas en epitelio pigmentario de la retina, lo que puede sustentar la supervivencia de fotorreceptores, en modelos de ratón de lesión ocular aguda [Siqueira *et al.* Arq Bras Oftalmol 73, 474-479, doi:S0004-27492010000500019 [pii] (2010)]. Sin embargo, todos estos enfoques siguen estando lejos de ser terapéuticamente eficaces ya que no se ha visto que mejoren significativamente la regeneración de tejido retiniano.

Además, se ha notificado que BMSCs trasplantadas de manera sistémica se fusionan con células residentes en diferentes tejidos, tales como corazón, músculo esquelético, hígado y cerebro [Terada *et al.* Nature 416, 542-545 (2002); Alvarez-Dolado *et al.* Nature 425, 968-973 (2003); Piquer-Gil *et al.* J Cereb Blood Flow Metab 29, 480-485 (2009)]. Sin embargo, se considera que estos acontecimientos de fusión son muy poco frecuentes, lo que naturalmente fomenta cierto escepticismo en cuanto a su relevancia fisiológica [Wurmser & Gage. Nature 416, 485-487 (2002)]. En este caso, los inventores han demostrado claramente que si no se activa la ruta de señalización Wnt/β-catenina, los híbridos experimentan apoptosis y por tanto no pueden detectarse en fases tardías. La mayoría de estas HSPCs trasplantadas no se fusionan, y en vez de eso mueren; sin embargo, algunas pueden transdiferenciarse en células del epitelio pigmentario de la retina, que son de origen mesenquimatoso. Esta transdiferenciación puede proporcionar cierta ralentización de la degeneración, pero no puede mejorar el fenotipo.

En cambio, la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina induce el genoma de HSPCs en los híbridos para activar el gen de PDE6B; en este estado se instruyó a los propios híbridos que se diferenciaran en bastones, pasando por un estado

desdiferenciado transitorio. No pudieron detectarse heterocariones, aunque no puede descartarse formalmente que hubiera algunos presentes. Sin embargo, los fotorreceptores regenerados coexpresaron PDE6B y YFP, lo que indicó que los genomas de las neuronas retinianas y de las HSPCs trasplantadas se mezclaron en las mismas células. Queda por determinar si una reducción de la mitosis o un mecanismo de mitosis multipolar tal como se notificó anteriormente durante la regeneración hepática puede reducir la ploidía de los fotorreceptores regenerados, o si se toleran copias de genomas dobles en los bastones recién formados, lo que finalmente conserva la degeneración de conos. De hecho, se han identificado neuronas tetraploides en cerebro de ratón y de ser humano [Wurmser & Gage citado anteriormente].

Se han emprendido diversos intentos de terapia génica para tratar mutaciones individuales de retinitis pigmentosa; sin embargo, un enfoque de terapia celular independiente de la mutación puede ser mucho más eficaz y práctico que crear terapias génicas individuales para tratar cada mutación génica individual. Estos datos proporcionan una auténtica esperanza para el tratamiento de pacientes con retinitis pigmentosa así como enfermedades de degeneración retiniana adicionales.

EJEMPLO 2

La señalización de Wnt/β-catenina desencadena la reprogramación de neuronas en la retina de ratón

Este ejemplo se realizó para analizar si puede inducirse la reprogramación de células somáticas en tejidos en mamíferos. Los resultados obtenidos muestran que tras la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, las neuronas retinianas de ratón pueden reprogramarse transitoriamente *in vivo* de vuelta a un estado precursor tras la fusión espontánea con células madre hematopoyéticas y progenitoras (HSPCs) trasplantadas. Además, se ha mostrado que el daño retiniano es esencial para la formación de híbridos celulares *in vivo*. Los híbridos recién formados reactivan marcadores de precursores neuronales, Oct4 y nanog; además, pueden proliferar. Los híbridos se limitan pronto a la diferenciación a lo largo de un linaje neuroectodérmico, y finalmente en neuronas diferenciadas de manera terminal, que pueden regenerar el tejido retiniano dañado. Tras el daño retiniano y la inducción de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en el ojo, también se produce reprogramación mediada por fusión

celular tras la movilización endógena de células de la médula ósea en los ojos. Estos datos muestran que la reprogramación *in vivo* de neuronas retinianas diferenciadas de manera terminal es un mecanismo posible de regeneración tisular.

1. Procedimientos experimentales

Tratamientos y cuidado de los animales

Todos los procedimientos con ratones se realizaron según la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión, y con las directrices institucionales para la investigación con animales. Todos los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con acceso a comida y agua a voluntad.

Daño retiniano y tratamiento con BrdU

Se anestesiaron ratones de 3 meses de edad mediante inyección de ketamina: metomidina (80 mg/kg: 1,0 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)). Para inducir el daño retiniano, se trataron los animales por vía intravítrea con 2 μl de N-metil-D-aspartato 20 mM (NMDA) (total de 40 nmol; Sigma) durante 24 h [Timmers *et al.*, Mol Vis **7**, 131-137 (2001)]. Los ojos de control recibieron 2 μl de PBS. Para los ensayos de incorporación de BrdU, los ratones recibieron una administración de BrdU intraperitoneal (i.p.) de 50 mg/kg de peso corporal.

Preparación de células madre y trasplante

Se aislaron células madre retinianas y progenitoras (RSPCs) del margen ciliar de ratones Cre adultos tal como se describió anteriormente [Sanges *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 103, 17366-17371 (2006)]. Se aislaron HSPCs de linaje negativo (HSPCs Lin^-) a partir de BM total de ratones Cre, Cre-RFP o R26Y usando kits de depleción celular por linaje (Miltenyi Biotech). Se adquirieron HSPCs $CD34^+$ humanas de StemCell Technologies. Se pretrataron las células con tamoxifeno 1 μM durante 24 h para inducir la traslocación nuclear de Cre recombinasa, y se marcaron con Vybrant DiD (5 μl/ml) (Invitrogen) antes del trasplante, si era necesario.

Para obtener $ESCs^{Cre}$, se sometieron 5 $\times 10^6$ ESCs a electroporesis con el vector que llevaba Cre recombinasa (CAGG-Cre), usando kits de nucleofactor de ES (Amaxa).

Se dejaron las células madre (SC) sin tratar o se pretrataron con 100 ng/ml de Wnt3a o BIO 1 μM, durante 24 h, y finalmente se inyectaron 5 $\times 10^5$ células por vía intravítrea en los ojos de los ratones anestesiados. Se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical, y se extirparon los glóbulos oculares para análisis histológicos.

Aislamiento de híbridos para expresión génica y análisis de tetraploides

Veinticuatro horas tras el trasplante celular se aisló el tejido retiniano de ratones tratados y se disgregó en tripsina mediante trituración mecánica.

Para analizar el contenido en tetraploides de los híbridos, se sedimentaron las células, se lavaron dos veces con 1x PBS y se fijaron durante 2 h en hielo con etanol al 70%. Tras la fijación, se lavaron las células dos veces con 1x PBS y se incubaron con 25 μg/ml de yoduro de propidio y 25 μg/ml de ARNasa A (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron muestras mediante citometría de flujo en un instrumento FACSCanto (Becton Dickinson). Se realizó una discriminación de dobletes actuando sobre el ancho de pulso frente a área de pulso del canal de PI. Se analizaron muestras con el software FlowJo (Tree Star, Inc).

Para el análisis de la expresión génica, se usó una máquina de clasificación BD FACSAria II (Becton Dickinson) para aislar las células híbridas positivas para rojo y para verde. Se extrajo ARN total usando microkits de aislamiento de ARN (Qiagen), según el protocolo del fabricante. Se sometió el ARN eluído a transcripción inversa con SuperScript III (Invitrogen) y se realizaron reacciones de qRT-PCR usando Platinum SYBR green qPCix-UDG (Invitrogen) en una máquina de PCR en tiempo real ABI Prism 7000, según las recomendaciones del fabricante. Los oligómeros específicos de la especie usados se indican en la Tabla 3. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y las diferencias de entrada de ADNc se "compensaron" normalizando con respecto a la expresión de GAPDH.

Tabla 3

Cebadores específicos de ser humano y de ratón para qRT-PCR

Cebadores específicos de ser humano para qRT-PCR

Especie/Gen	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:
hOct4	Dir TCGAGAACCGAGTGAGAGGC	17
	Inv CACACTCGGACCACATCCTTC	18
hnanog	Dir CCAACATCCTGAACCTCAGCTAC	19
	Inv GCCTTCTGCGTCACACCATT	20
hnestina	Dir TGTGGCCCAGAGGCTTCTC	21
	Inv CAGGGCTGGTGAGCTTGG	22
hOtx2	Dir ACCCCTCCGTGGGCTACCC	23
	Inv CAGTGCCACCTCCTCAGGC	24
hnogina	Dir AGCACGAGCGCTTACTGAAG	25
	Inv AAGCTGCGGAGGAAGTTACA	26
hCD34	Dir GTTGTCAAGACTCATGAACCCA	27
	Inv ACTCGGTGCGTCTCTCTAGG	28

Cebadores específicos de ratón para qRT-PCR

Especie/Gen	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:
mOct4	Dir CGTGGAGACTTTGCAGCCTG	29
	Inv GCTTGGCAAACTGTTCTAGCTCCT	30
mnanog	Dir GCGCATTTTAGCACCCCACA	31
	Inv GTTCTAAGTCCTAGGTTTGC	32
mnestina	Dir TGGAAGTGGCTACA	11
	Inv TCAGCTTGGGGTCAGG	12
mOtx2	Dir GAGCTCAGTCGCCACCTCTACT	15
	Inv CCGCATTGGACGTTAGAAAAG	16
mnogina	Dir CTTGGATGGCTTACACACCA	13
	Inv TGTGGTCACAGACCTTCTGC	14
mCD34	Dir CTGGTACTTCCAGGGATGCT	33
	Inv TGGGTAGCTCTCTGCCTGAT	34

[Dir: Directo; Inv: Inverso]

Se adquirieron cebadores de Gata1 en SuperArray Bioscience Corporation [número de catálogo PPM24651A-200]

Remplazo de médula ósea (BM)

Se realizó un trasplante de BM tal como se notificó anteriormente con pequeñas modificaciones. Se reconstituyó la BM de ratones receptores R26Y o nestina-Cre de 4 a 6 semanas de edad con células de BM de las tibias y los fémures de ratones transgénicos RFP/CRE o R26Y respectivamente. Se inyectaron células de BM ($1x10^7$ células) por vía intravenosa en los receptores 3 horas tras la irradiación con rayos γ (9 Gy). Se protegieron los ojos de los receptores con pantallas de plomo para evitar daño inducido por radiación (retinopatía por radiación). Cuatro semanas tras el trasplante, se extrajo la sangre periférica de ratones quiméricos de la vena de la cola, y se evaluó la BM reconstituida.

Fijación, corte e inmunohistoquímica

Se fijaron los tejidos mediante inmersión en paraformaldehído al 4% durante la noche, y después se incrustaron en compuesto de OCT (Tissue-Tek). Se procesaron cortes en serie horizontales de 10 μm de grosor para la inmunohistoquímica, y se realizó la visualización de fluorescencia de nanog-GFP y Rosa26-YFP mediante microscopía fluorescente.

Para la inmunotinción con fluoresceína, los anticuerpos primarios usados fueron: anti-nanog (1:200, R&D), anti-Oct4 (1:100, AbCam), anti-nestina (1:300, Abcam), anti-GATA4 (1:500, Abcam), anti-Otx2 (1:200, Abcam), anti-nogina (1:200, Abcam), anti-Hand1 (1:400, Abcam), anti-Tuj-1 (1:100, Abcam), anti-Thy1,1 (1:100, Abcam), anti-sintaxina (1:50, Sigma), anti-glutamina sintetasa (Sigma, 1:100) anti-anexina V (1:200, Abcam), anti-Ki67 (Sigma, 1,100) y anti-BrdU (1:300, Sigma). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpos anti-IgG de ratón y anti-IgG de conejo conjugados con Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 o Alexa Fluor 633 (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen).

Se evaluaron los porcentajes de células positivas para GFP y YFP mediante contratinción de los cortes de tejido con DAPI (Vectashield, Vector Laboratories,

Burlingame, CA, EE.UU.), y se fotografiaron usando o bien un microscopio Axioplan (Zeiss) o bien un sistema de microscopio confocal por láser Leica.

Cultivo in vitro de híbridos reprogramados

Se inyectaron ESCs o HSPCs tratadas con BIO o no tratadas con BIO en los ojos de ratones nanog-GFP-puro dañados por NMDA. Veinticuatro horas tras el trasplante, se aisló el tejido retiniano y se trató con tripsina durante 30 min a 37ºC. Entonces se resuspendieron las células como suspensiones de una única célula en medios de cultivo de ES usando una pipeta Pasteur de orificio tratado con fuego, y se sembraron sobre placas recubiertas con gelatina a una concentración de 3×10^5 células/9,6 cm^2. Para seleccionar los clones reprogramados, se añadió puromicina al medio de cultivo tras 72 h. Se contaron clones positivos para GFP y se fotografiaron tras un mes de cultivo. Se tiñeron los clones con fosfatasa alcalina (AP) tras 1 mes de cultivo, tal como se describió anteriormente [Lluis *et al.*, Cell Stem Cell 3, 493-507 (2008)].

Preparación de nervios ópticos y retinas en montaje plano, y recuento de células ganglionares

Se prepararon montajes planos de retina tal como se describió anteriormente. En resumen, se practicaron hemisecciones en ojos a lo largo de ora serrata, y se separaron las retinas del epitelio pigmentario y se montaron con el lado de células ganglionares hacia arriba, en Isopore 3 mm (Millipore). Entonces se fijaron las retinas en paraformaldehído al 4% durante 20 min., se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, y se trataron para inmunotinción tal como se describió anteriormente. Se disecaron los nervios ópticos de los ojos y se montaron directamente en cortes usando Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Se contaron las células totales en la capa de células ganglionares tal como se describió anteriormente (Jakobs *et al.*, (2005). J Cell Biol 171:313-315) con pequeñas modificaciones. Se contratiñeron las retinas en montaje plano con DAPI y se tomaron fotos de estudio a 20X en un microscopio confocal (Leica SP5) centrándose en la GCL. Cubrir la totalidad de la retina requirió aproximadamente 80 imágenes. Se contaron los núcleos celulares usando el software Fiji y se representaron gráficamente como células/milímetro^2. Se obtuvo un mapa de densidad bidimensional mediante una rutina

escrita en Matlab y se ensamblaron fotografías de la totalidad de la retina en montaje a partir de fotografías individuales en Photoshop 9.

Análisis estadístico

Se contaron los números de células inmunorreactivas o positivas para nanog-GFP e YFP dentro de tres zonas retinianas diferentes (campo 40×) en cortes individuales. Se examinó un total de diez cortes en serie para cada ojo, de al menos tres ratones diferentes. Para el análisis estadístico, se expresaron los datos como medias ± EEM, combinados de al menos tres experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Los experimentos se realizaron usando al menos tres ratones diferentes. Se examinaron las diferencias usando la prueba de la t de Student para datos independientes.

2. Resultados

La lesión inducida por NMDA desencadena la fusión entre neuronas retinianas y células madre

Aunque puede inducirse la reprogramación de células somáticas mediada por fusión celular en cultivo, quedaba por observar si pueden reprogramarse células diferenciadas de manera terminal mediante fusión celular dentro de tejidos de vertebrados adultos.

Por tanto, los inventores determinaron en primer lugar si las SPC podían fusionarse con neuronas retinianas *in vivo*. Para ello, los inventores usaron ratones transgénicos que llevaban YFP flanqueada por sitios de loxP bajo el control del promotor Rosa26 expresado de manera ubicua como receptores (es decir con un alelo LoxP-STOP-LoxP-YFP [R26Y]) [Srinivas *et al.*, BMC Dev Biol 1, 4 (2001)]. Se trasplantaron diferentes SPC que expresaban de manera estable Cre recombinasa y marcadas en rojo en los ojos de ratones receptores mediante inyección intravítrea (5×10^5 células/ojo). Específicamente, los inventores usaron $HSPCs^{Cre/RFP}$ de linaje

negativo (Lin^-) aisladas de ratones donantes transgénicos dobles para CRE-RFP, $RSPCs^{Cre}$ marcadas con tinte 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD) aisladas del margen ciliar de ojos de ratones transgénicos Cre [Sanges *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 103, 17366-17371 (2006)] y $ESCs^{Cre}$ marcadas con DiD generadas por los inventores. Se sacrificaron los ratones en diferentes momentos tras la inyección de SPC. Si se había producido fusión celular entre las SPC^{Cre} inyectadas y las neuronas retinianas LoxP-STOP-LoxP-YFP (R26Y), podía esperarse detectar expresión de YFP en cortes retinianos, debido a la escisión del codón de terminación por Cre (Figura 9A).

En primer lugar, los inventores sometieron a prueba si el daño de tejido retiniano provocado por inyecciones intravítreas de NMDA en ratones R26Y podía inducir fusión celular. NMDA provocó apoptosis de neuronas en la INL y la GCL de la retina (Figuras 10A y 10B), tal como se mostró anteriormente [Osakada *et al.*, J Neurosci 27, 4210-4219 (2007)]; sin embargo, NMDA no potenció la expresión estocástica del transgén de YFP en estos ratones R26Y (Figura 10C). Entonces, los inventores indujeron daño por NMDA en el ojo derecho de ratones R26Y y dejaron el ojo contralateral sin dañar como control; 24 h después se trasplantaron $HSPCs^{Cre/RFP}$ en ambos ojos. Finalmente se sacrificaron los ratones 24, 48 ó 72 h tras el trasplante (Figura 9A).

Ya 24 h tras el trasplante, hasta el 70% de las $HSPCs^{Cre/RFP}$ inyectadas que se detectaron en el campo óptico se habían fusionado con células de la retina, dando por tanto lugar a híbridos positivos para YFP (Figuras 9B, 9D y 10D). Resulta interesante que las células trasplantadas se integraron en el tejido retiniano y atravesaron la GCL, alcanzando incluso la INL (Figura 9B, NMDA). En cambio, no hubo híbridos positivos para YFP en los ojos controlaterales, no dañados; además, las $HSPCs^{Cre/RFP}$ trasplantadas permanecieron en el límite de la GCL y no se integraron en el tejido retiniano (Figuras 9C y 9D, sin NMDA). Se observaron resultados similares en cortes retinianos de ratones sacrificados 48 y 72 h tras el trasplante (Figura 9D). También se analizó la presencia de células tetraploides mediante citometría de flujo. Núcleos con contenido de ADN de 4C eran claramente evidentes en los híbridos presentes en las retinas de ratones R26Y sometidos a trasplante de $HSPCs^{Cre/RFP}$ (Figura 10C).

Estos datos demostraron que la lesión era necesaria para inducir la migración de HSPCs trasplantadas al interior del tejido retiniano y su fusión con neuronas retinianas.

La localización de los híbridos (células positivas para YFP) en el tejido retiniano sugirió que las células trasplantadas se fusionaban con células ganglionares (que localizan sus núcleos en la GCL) y células amacrinas (que se localizan a través de la INL y la capa plaxiforme interna (IPL)) (Figura 10A); debe observarse que éstas son las células de la retina específicamente dañada tras el tratamiento con NMDA [Osakada *et al.* (2007), citado anteriormente]. Por tanto, para confirmar cuál de las células de la retina se fusionaba con las HSPCs, los inventores analizaron la expresión de diferentes marcadores de células de la retina en los híbridos positivos para YFP 12 h tras el trasplante de $HSPCs^{Cre/RFP}$ Lin^- en ojos R26Y dañados por NMDA. Los híbridos YFP eran o bien positivos para el marcador de células ganglionares thy1,1 en la GCL (Figura 9E), o bien para el marcador de células amacrinas sintaxina en la IPL (Figura 9F). No se observó colocalización con el marcador de células de Müller glutamina sintetasa (Figura 9G). El 60% de los híbridos positivos para YFP fueron positivos para thy1,1, mientras que el 22% fueron positivos para sintaxina (Figuras 10F y 10F), lo que indica que la mayoría de los híbridos se formaron entre células ganglionares y HSPCs, con alguna fusión con células amacrinas. En el 18% restante de los híbridos positivos para YFP, las parejas de fusión no estaban claras; de hecho, también podría haber habido regulación por disminución de thy1,1 y/o sintaxina en los híbridos recién formados.

A continuación los inventores realizaron experimentos similares inyectando $ESCs^{Cre}$ marcadas con DiD y DiD-$RSPCs^{Cre}$ en ojos no dañados y dañados por NMDA de los ratones R26Y. Con ambos tipos de células, hasta el 70% de las células inyectadas detectadas en el campo óptico se fusionaron con neuronas retinianas (Figuras 11A, 11B y 10D). Estas células también se fusionaron con células ganglionares y células amacrinas de la retina tal como se demuestra mediante la localización de la señal de YFP en la GCL y la IPL y mediante la colocalización de las señales de YFP y de thy1,1 o sintaxina (Figuras 11A, 11B y datos no mostrados).

Para confirmar adicionalmente que las SPC inyectadas realmente se fusionan con neuronas retinianas pos-mitóticas, se analizó el potencial proliferativo de células de la retina antes del acontecimiento de fusión. Los inventores inyectaron simultáneamente análogo de timidina 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) por vía intraperitoneal y NMDA en los ojos de ratones R26Y; después, tras 24 h se inyectaron $ESCs^{Cre}$ y, finalmente, se sacrificaron los ratones 24 h tras este trasplante. No se observaron células positivas para

BrdU (flechas rojas) que también fueran positivas para YFP (flechas verdes), excluyendo por tanto la fusión de ESCs con células proliferantes (Figura 11C). Las células positivas para BrdU encontradas junto a la GCL (Figura 11C, flechas rojas) eran probablemente células de la microglia que se habían incluido en la retina tras el daño [Davies *et al.*, Mol Vis 12, 467-477].

En conjunto, estos datos demuestran que las HSPCs, ESCs y RSPCs pueden fusionarse espontáneamente con neuronas retinianas *in vivo* tras el daño celular.

La ruta de señalización Wnt/β-catenina desencadena la reprogramación de neuronas retinianas *in vivo*

La ruta de señalización Wnt/β-catenina se activa tras el daño por NMDA dando como resultado un aumento de la expresión de β-catenina, que se acumula en las células (véase la Figura 12A y Osakada *et al.* (2007) citado anteriormente). Por tanto, los inventores sometieron a prueba si la activación endógena de la ruta Wnt/β-catenina podía mediar la reprogramación tras la fusión celular *in vivo*.

Para esto, se usaron dos modelos de ratón diferentes como ratones receptores: ratones nestina-CRE (ratones transgénicos que expresaban el gen de la Cre recombinasa bajo el control del promotor de nestina en precursores neuronales) [Tronche *et al.*, Nat Genet 23, 99-103 (1999); Okita *et al.*, Nature 448, 313-317 (2007)] y nanog-GFP-Puro (ratones transgénicos que expresaban genes de GFP-puromicina bajo el control del promotor de nanog en el embrión [Okita *et al.*, Nature 448, 313-317 (2007)], lo que permitió investigar la reprogramación en los estados de precursor neuronal y embrionario, respectivamente. Se inyectaron $HSPCs^{R26Y}$ marcadas con DiD y $HSPCs^{RFP}$ en los ojos de los ratones nestina-CRE y nanog-GFP-puro, respectivamente. Se inyectó NMDA por vía intravítrea en un ojo de un grupo de ratones, mientras que el ojo contralateral permaneció sin dañarse como control. Resulta importante en este caso que no se detectó ninguna expresión del transgén de nanog-GFP (Figura 12C) o nestina-Cre (datos no mostrados) tras el tratamiento con NMDA en las células ganglionares y amacrinas. Tras 24 h, se inyectaron HSPCs tanto en los ojos no tratados como en los tratados con NMDA, y se sacrificaron los ratones tras 24 h adicionales. En el caso de reprogramación de las neuronas retinianas, en estos modelos de ratón podía esperarse encontrar células dobles positivas para rojo/verde (Figura 13A y Figura 12B). No se

observaron células positivas para verde tras la inyección de HSPCs en los ojos no dañados (Figuras 13B, 13C, 13D y 13E, sin NMDA). En cambio, aproximadamente el 30% y el 20% de las células rojas totales también eran verdes cuando se inyectaron HSPCs en los ojos dañados por NMDA de ratones nestina-CRE y nanog-GFP-puro, respectivamente (Figuras 13B, 13C, 13D y 13E, NMDA; y 10C), lo que indica que hasta el 30% de los híbridos estaban realmente reprogramados, ya que habían reactivado los promotores de nanog y nestina en el genoma de la neurona.

Para evaluar el papel de la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina endógena en la reprogramación de neuronas retinianas, en ambos de estos modelos de ratón, también se inyectó DKK1 inmediatamente tras la inyección de NMDA; DKK1 es un inhibidor de la ruta Wnt/β-catenina [Osakada *et al.* (2007) citado anteriormente, Figura 12A]. Se trasplantaron HSPCs tras 24 h, y se sacrificaron los ratones 24 h después. Las inyecciones de DKK1 bloquearon casi completamente la reprogramación de los híbridos de neurona–HSPCs (Figuras 13B, 13C y 13D, NMDA+DKK1), lo que demostró que la activación endógena y dependiente del daño de la ruta Wnt/β-catenina desencadena la reprogramación de neuronas retinianas tras su fusión con HSPCs.

A continuación, los inventores trataron de analizar si la reprogramación de neuronas retinianas aumentaba tras el trasplante de HSPCs en las que se había activado previamente la ruta de señalización Wnt/β-catenina mediante el inhibidor de GSK-3 BIO o mediante tratamiento con Wnt3a antes de la inyección (Figuras 12D, 12E y 12F). Sorprendentemente, 24 h tras el trasplante de HSPCs pretratadas con BIO o pretratadas con Wnt3a en ojos dañados por NMDA de los ratones nestina-CRE y nanog-GFP, hubo un sorprendente aumento en el número de híbridos reprogramados (positivos para verde) con respecto a los observados en ojos dañados por NMDA que recibieron HSPCs sin tratar (Figuras 13B y 13E; NMDA+BIO, NMDA+Wnt3a). También se observaron resultados similares en ratones sacrificados 48 h y 72 h tras el trasplante celular (datos no mostrados). Debe observarse que tras la inyección de HSPCs tratadas con BIO en ojos no dañados, no se expresaron los transgenes ni de nanog-GFP-puro (Figura 12G) ni de nestina-CRE (datos no mostrados), confirmando que el daño tisular es necesario para la reprogramación de neuronas retinianas mediada por fusión celular espontánea.

Para evaluar la eficacia de esta reprogramación *in vivo*, los inventores contaron las células reprogramadas positivas para verde con respecto a la población total de

HSPCs rojas detectadas en el campo óptico (Figura 10C). En las retinas dañadas, hasta el 65% de HSPCs tanto pretratadas con BIO como pretratadas con Wnt3a reprogramaron las neuronas retinianas tras la fusión, conduciendo a la formación de híbridos de HSPC-neurona dobles positivos en ambos de estos modelos de ratón (Figuras 13C y 13D).

Dado que era sorprendente observar la reprogramación en el estado embrionario tras la fusión de HSPCs con neuronas diferenciadas de manera terminal, se investigó la activación del transgén de nanog-GFP tras el trasplante de ESCs y RSPCs en ojos lesionados por NMDA.

Tal como podía esperarse, en el caso del trasplante de ESCs, también se observó la reprogramación de las neuronas retinianas, que también dependía de la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina endógena. Las células positivas para GFP también aumentaron sorprendentemente cuando se pretrataron las ESCs con BIO o con Wnt3a antes de trasplantarse (Figura 14A). Para confirmar la reprogramación de híbridos de ESC-neurona retiniana, los inventores cultivaron híbridos positivos para GFP clasificados mediante FACS a partir de retinas dañadas por NMDA de ratones nanog-GFP-puro sometidos a trasplante de ESCs tratadas con BIO o no tratadas. Se hicieron crecer colonias positivas para GFP reprogramadas en cultivo y también fueron resistentes a la selección con puromicina y positivas a la tinción con fosfatasa alcalina (AP) (Figura 14B).

En cambio, no se observaron acontecimientos de reprogramación tras la inyección de RSPCs en los ojos lesionados por NMDA de los ratones nanog-GFP, incluso en el caso de pretratamiento con BIO de RSPCs trasplantadas (Figura 14C). Resulta interesante que sólo se observaron unas pocas células positivas para YFP tras el trasplante de $RSPCs^{R26Y}$ tratadas con BIO en ojos dañados por NMDA de ratones nestina-CRE (no mostrados).

Finalmente, también se descartó un efecto de BIO en la potenciación de acontecimientos de fusión *in vivo*. El pretratamiento con BIO no potenció la eficacia de fusión de las HSPCs, ESCs o RSPCs inyectadas en los ojos dañados por NMDA de los ratones R26Y (Figura 14D).

En conclusión, en este caso se ha mostrado que la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina desencadena la reprogramación de neuronas retinianas de

vuelta a un estado de precursor embrionario/neuronal, y que esto se produce tras la fusión célula-célula dependiente del daño de HSPCs y ESCs, pero no de RSPCs.

Para caracterizar mejor los híbridos reprogramados, además de considerar la reactivación de transgenes de nestina-CRE y nanog-GFP, se analizó el perfil de expresión de genes precursores y embrionarios *in vivo* en los híbridos recién formados. Entonces se inyectaron $HSPCs^{Cre/RFP}$ tratadas con BIO (BIO-$HSPCs^{Cre/RFP}$) o no tratadas (no-BIO-$HSPCs^{Cre/RFP}$) en ojos dañados por NMDA de ratones R26Y, y 24 h después se clasificaron las células híbridas de las retinas mediante FACS. Se analizó la expresión de marcadores mediante PCR en tiempo real. En los BIO-híbridos (híbridos formados con HSPCs tratadas con BIO) Oct4, nanog, nestina, nogina y Otx2 estaban regulados por incremento (Figura 15A); de hecho, no se detectó expresión de estos genes en las retinas lesionadas por NMDA no sometidas a trasplante, ni en las HSPCs, con la excepción de nanog en las HSPCs (Figuras 16A y 16B). En cambio, Gata1, que es un gen específico de HSPCs, estaba regulado por disminución en los BIO-híbridos (Figura 15A). Ninguno de los marcadores de precursores volvieron a expresarse (o se expresaron escasamente en el caso de nanog y nestina) en no-BIO-híbridos, en los que la expresión de Gata1 era comparable a la observada en las HSPCs (Figura 15A y Figura 16B).

También se confirmó la expresión de proteínas Oct4, nanog y nestina en los BIO-híbridos mediante sus señales de inmunotinción fusionadas con los híbridos positivos para YFP en cortes (Figura 15B).

Sin embargo, para demostrar claramente que la nueva expresión de marcadores embrionarios y de progenitores resultaba de la reprogramación del genoma de la neurona y no del genoma de las HSPCs inyectadas, se analizaron híbridos entre especies. Para esto, los inventores trasplantaron HSPCs humanas $CD34^+$ marcadas con DiD y tratadas con BIO en ojos dañados de ratones nanog-GFP. Se confirmó la reprogramación de las neuronas retinianas en cortes tras la fusión de las HSPCs humanas (Figura 16C). Resulta interesante que todos de Oct4, nanog, nestina, nogina y Otx2 se expresaron (según se analizó con oligonucleótidos específicos de ratón; véase la Tabla 3) a partir del genoma de neuronas de ratón reprogramadas en los híbridos clasificados (Figura 15C). Además, en el genoma humano, la expresión de Oct4,

nestina, Otx2 y nogina estaba activada, mientras que CD34 estaba regulado por disminución (Figura 15D).

En conjunto, puede concluirse que la reprogramación, mediada por fusión con HSPCs, de neuronas retinianas, controlada por la ruta de señalización Wnt/β-catenina, puede producirse *in vivo*.

Las neuronas reprogramadas pueden proliferar y diferenciarse *in vivo*

A continuación se investigó el potencial proliferativo de las neuronas reprogramadas. Por tanto, se inyectaron $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO y no tratadas en los ojos dañados por NMDA de un grupo de ratones R26Y y se analizaron cortes retinianos 24 h después.

Sorprendentemente, el 8% de los híbridos reprogramados positivos para YFP (tras la inyección de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO) experimentaron proliferación (Figuras 15E y 15G, doble positivo para Ki67/YFP); estas células no estaban limitadas a un destino apoptótico, ya que sólo aproximadamente el 5% de los híbridos eran positivos para la tinción con anexina-V (Figuras 15F y 15H). Por el contrario, la inyección de $HSPCs^{CRE}$ no tratadas con BIO condujo a la formación de híbridos no proliferativos (Figuras 15E y 15I; negativos para la tinción con Ki67) que experimentaron apoptosis, ya que hasta el 30% de los híbridos positivos para YFP eran positivos para la tinción con anexina-V (Figuras 15F y 15J, doble positivo para anexina-V/YFP). Se obtuvieron resultados similares 72 h tras el trasplante de ESCs tratadas con BIO o no tratadas con BIO (Figuras 16D y 16E). En conjunto, estos datos muestran que los híbridos formados entre HSPCs o ESCs y neuronas retinianas experimentan apoptosis, pero si la ruta Wnt/β-catenina está activada en las HSPCs trasplantadas, las neuronas pueden reprogramarse, sobrevivir y volver a entrar en el ciclo celular.

Los inventores analizaron entonces el potencial de diferenciación *in vivo* de las neuronas retinianas reprogramadas en las retinas dañadas por NMDA de los ratones R26Y en los que se inyectaron $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO y no tratadas con BIO. Se sacrificaron los ratones 24, 48 y 72 h tras el trasplante. Se determinaron los porcentajes de híbridos positivos para YFP para cada marcador a partir de cortes retinianos (Figura 10C). De manera notable, 24 h tras la inyección de las HSPCs tratadas con BIO, las neuronas reprogramadas (positivas para YFP) ya volvían a expresar nestina, nogina y

Otx2, y esta expresión se mantuvo en los puntos de tiempo posteriores analizados (48, 72 h). Por el contrario, el marcador de diferenciación terminal neuronal Tuj-1 se silenció progresivamente. Además Sca1 y c-kit estaban fuertemente regulados por disminución en estos híbridos. Oct4 y nanog también se expresaban altamente a las 24 y 48 h, aunque su expresión disminuyó a las 72 h (Figuras 15B y 15K). En cambio, un bajo número de híbridos positivos para YFP obtenidos tras la fusión con HSPCs no tratadas con BIO reactivaron nestina, nogina y Otx2, y en vez de eso mantuvieron la expresión de Tuj-1, Sca-1 y c-kit en la mayoría de los híbridos. También se expresaron Oct4 y nanog, aunque sólo a las 24 h y en muy pocos híbridos en los puntos de tiempo posteriores (48, 72 h) (Figura 15L), GATA4, un marcador de mesodermo, y Hand1, un marcador de endodermo, nunca se expresaron en los híbridos (Figuras 15K y 15L). En conclusión, los BIO-híbridos se reprogramaron y tendieron a diferenciarse en el linaje neuroectodérmico. En cambio, los no-BIO-híbridos se reprogramaron escasamente, y por tanto no experimentaron diferenciación neuroectodérmica.

Un análisis de diferenciación similar, realizado tras la inyección de $ESCs^{Cre}$ tratadas con BIO en retinas de R26Y dañadas, mostró un retraso en el potencial de diferenciación neuroectodérmica de los híbridos resultantes (ya que nestina, nogina y Otx2 se expresaban más a las 72 h tras la inyección de ESCs mientras que Oct4 y nanog se expresaban altamente desde 24 hasta 72 h) y la expresión positiva de Gata4 y Hand1. Estos resultados indican que los híbridos de ESC-neurona son más pluripotentes y pueden diferenciarse en el linaje neuroectodérmico pero también en los linajes de mesodermo y endodermo (Figura 16F).

Finalmente, los inventores investigaron si los BIO-híbridos que se limitaron a un destino de diferenciación neuronal podían diferenciarse de manera terminal en neuronas retinianas y por tanto regenerar la retina dañada. Para esto, a un grupo de ojos dañados por NMDA de ratones R26Y se les inyectaron $HSPCs^{Cre/RFP}$ tratadas con BIO o no tratadas con BIO y se sacrificaron 2 semanas después. De manera notable, sólo se observaron neuronas YFP/RFP en la GCL y en la INL tras el trasplante de HSPCs tratadas con BIO. Estas células eran positivas para los marcadores para thy1,1 y sintaxina, indicando claramente que los híbridos se diferenciaban en neuronas ganglionares y amacrinas. Por el contrario, no se detectaron híbridos YFP/RFP 2 semanas tras el trasplante de HSPCs no tratadas, ya que experimentan muerte celular al

poco tiempo. A continuación, se analizó la histología de la retina sometida a trasplante. Sorprendentemente, se observó que el número de filas nucleares en la GCL y en la INL de las retinas sometidas a trasplante con las HSPCs tratadas con BIO aumentó sustancialmente con respecto a aquellas con las HSPCs no tratadas con BIO y retinas no sometidas a trasplante. Sus números fueron comparables a aquellos en la retina de tipo natural (Figuras 17A, 17B y 17C). Estos datos indican claramente que los híbridos de HSPCs-neurona reprogramados pueden diferenciarse en neuronas retinianas y regenerar la retina dañada. Por tanto, puede concluirse que la reprogramación mediada por fusión celular puede desencadenar la regeneración de tejido retiniano.

Los híbridos reprogramados pueden regenerarse en retina lesionada

Tras haber comprobado que los híbridos reprogramados pueden proliferar y diferenciarse hacia linaje neuroectodérmico, el objetivo fue evaluar la diferenciación y su potencial regenerativo a largo plazo. Entonces, se pretrataron $HSPCs^{Cre}$ con BIO para activar la señalización de Wnt y se trasplantaron en los ojos de R26Y dañados por NMDA. En paralelo, se trasplantaron $HSPCs^{Cre}$ no dañadas como control. Se sacrificaron los ratones 4 semanas después (Figura 18A).

El análisis de retinas en montaje plano sometidas a trasplante de $HSPCs^{Cre}$ tratadas con BIO mostró un alto número de híbridos YFP+ (Figura 18B) que eran positivos para la expresión de marcadores de neuronas ganglionares (SMI-32) y amacrinas (Chat) (Figura 18C). Entonces también se analizaron los nervios ópticos 24 h y un mes tras el trasplante. Resulta notable que en los nervios ópticos tras un mes se observaron axones YFP+, probablemente derivados de proyecciones de neuronas ganglionares regeneradas (Figura 18D). En cambio, las retinas sometidas a trasplante de $HSPCs^{Cre}$ no tratadas mostraron muy pocos híbridos YFP+ (Figura 22A) y no se encontró ningún axón YFP+ a lo largo de los nervios ópticos (Figura 18D, HSPCs no trat.). Resulta interesante que no se observó ningún axón YFP+ en los nervios ópticos 24 h tras el trasplante de HSPCs tratadas con BIO (Figura 22B), lo que indica que las neuronas ganglionares recién generadas proyectan sus axones cierto tiempo después del trasplante, probablemente durante el proceso de regeneración (Figura 18D).

El tratamiento con NMDA induce la inclusión de macrófagos en el ojo (Sasahara *et al.*, *Am J Pathol* **172**, 1693-1703 (2008)). De hecho, tal como se esperaba, en retinas

recogidas 24 h tras el trasplante, un porcentaje de los híbridos YFP+ fueron positivos para marcadores CD45 y Mac1 de monocitos/macrófagos, lo que sugiere fagocitosis de algunas HSPCs^{Cre}/RFP trasplantadas por macrófagos endógenos que llevan el alelo R26Y o fagocitosis de algunos de los propios híbridos YFP+ (Figuras 22C y 22D). Resulta interesante que este porcentaje ya estaba drásticamente reducido en retinas recogidas 2 semanas tras el trasplante (Figuras 22E 22F). Este resultado indica claramente que aunque algunos híbridos pueden fagocitarse poco después del trasplante, un porcentaje de los mismos puede sobrevivir y regenerar las retinas.

A continuación, se analizó la aparición de regeneración de núcleos celulares en cortes verticales. Resulta interesante que el número de núcleos neuronales en la capa de células ganglionares (Figuras 17A y 17B, GCL), y el número de filas nucleares en la capa nuclear interna (Figuras 17A y 17C, INL) de retinas sometidas a trasplante de HSPCs tratadas con BIO (BIO-HSPCs) era comparable con retinas de tipo natural y estaba sustancialmente aumentado con respecto a retinas no sometidas a trasplante o retinas sometidas a trasplante de HSPCs no tratadas (Figuras 17A, 17B y 17C). Esto indica claramente una regeneración retiniana. También se investigó la densidad nuclear de las neuronas ganglionares en la totalidad de las retinas en montaje plano contando el número total de núcleos ganglionares en la totalidad de las retinas recogidas un mes tras el trasplante. Resulta notable que había un aumento significativo del número de núcleos en retinas sometidas a trasplante de HSPCs^{Cre} tratadas con BIO, con respecto a las retinas no sometidas a trasplante (Figura 17D). Sin embargo, las neuronas ganglionares recién generadas no estaban uniformemente distribuidas, tal como se muestra por los mapas de densidad nuclear, lo que indica una regeneración retiniana no homogénea (Figura 17E).

Estos datos demuestran claramente que si se activa la señalización de Wnt, puede lograrse una regeneración parcial de células de la retina tras un daño por NMDA tras la fusión de HSPCs trasplantadas.

La reprogramación mediada por fusión con BMC endógenas de neuronas retinianas se produce *in vivo* tras el daño

Se ha notificado que las BMC endógenas pueden incluirse en el ojo tras el daño por NMDA [Sasahara *et al.*, Am J Pathol 172, 1693-1703 (2008)]; sin embargo, sigue

sin conocerse su papel. Por tanto, los inventores investigaron si las BMC endógenas también pueden fusionarse con y reprogramar neuronas retinianas tras el daño por NMDA. Para esto, se trasplantaron en la vena de la cola BMC de ratones RFP-CRE donantes (ratones transgénicos que expresaban RFP y CRE, ambos bajo el control del promotor de β-actina expresado de manera ubicua (Long *et al.*, (2005). BMC Biotechnol 5, 20; Srinivas *et al.* (2001) citado anteriormente)) en ratones receptores R26Y irradiados de manera subletal, sustituyendo así su BM por $BM^{Cre/RFP}$. Se analizó la repoblación de la BM con células de origen de donante según la expresión de RFP en células sanguíneas y mediante análisis hemocitométrico (Figura 19A). Un mes tras el trasplante, se inyectó NMDA por vía intravítrea en un ojo de cada grupo de ratones quiméricos, y después 24 h más tarde se sacrificaron los ratones (Figura 20A). Resulta interesante que se encontró que tras el daño por NMDA, el 50% de las células positivas para RFP también eran positivas para YFP, lo que indica la fusión de BMC endógenas incluidas en los ojos (Figuras 20B, 20C y 20F, NMDA, y Figura 10D). En cambio, no se encontraron células positivas para RFP/YFP en cortes de ojos en los que no se inyectó NMDA (Figuras 20D, 20E y 20F, sin NMDA). Estos resultados demuestran claramente que se produce fusión celular entre las BMC incluidas en los ojos y las neuronas retinianas.

Los inventores analizaron entonces la identidad de estas células híbridas que se obtuvieron tras la fusión celular endógena. Se observó que 12 h tras el daño por NMDA, las células positivas para YFP en los cortes retinianos también eran positivas para los marcadores celulares Sca1, Ckit, Thy1,1, sintaxina y GS, indicando claramente que se incluyeron HSPCs de la BM y se fusionaron con células ganglionares, amacrinas y de Müller (Figuras 20G, 20H, 20I, 20J y 20K).

A continuación los inventores investigaron si podía producirse la reprogramación tras la inclusión de BMC y fusión con neuronas retinianas; con este objetivo, se trasplantaron BMC^{R26Y} en un grupo de ratones nestina-CRE irradiados de manera subletal para generar ratones quiméricos. La reactivación del transgén de nestina-CRE y la consecuente expresión de YFP permitió identificar acontecimientos de reprogramación tras la inclusión de BMC en el ojo. Un mes después, se inyectaron NMDA y BIO sólo en un ojo de los ratones quiméricos, que se sacrificaron 24 h después (Figura 21A). Se observaron células positivas para YFP tras la inyección de

BIO en la GCL e INL de ojo dañado por NMDA, pero no en los ojos contralaterales dañados por NMDA no tratados (en los que no se inyectó BIO) (Figuras 21B y 21C). Esto indica claramente que las neuronas retinianas se habían fusionado con BMC incluidas y se reprogramaron debido a la reactivación del promotor de nestina. Aproximadamente el 8% de estos híbridos positivos para YFP eran positivos para la expresión de Ki67, y sólo el 1% eran positivos para anexina-V, lo que indicó que algunos de los híbridos estaban dividiéndose y muy pocos eran apoptóticos (Figuras 21D, 19B y 19C). Sorprendentemente, el 50% de estos híbridos positivos para YFP también eran positivos para la expresión de Oct4 (Figuras 21E, 21F y 21G), y el 70% para nanog (Figuras 21E, 21H y 21I), confirmando que también se produjo reprogramación de las neuronas retinianas tras la movilización de las BMC en los ojos.

En conclusión, puede producirse activación endógena de la reprogramación mediada por fusión con BMC de neuronas retinianas en el ojo si la ruta Wnt/β-catenina está activada.

3. Discusión

En este caso se ha demostrado que la ruta de señalización Wnt/β-catenina canónica media la reprogramación de neuronas retinianas *in vivo*. Además, se ha mostrado que puede producirse fusión celular espontánea en la retina de ratón tras la lesión y que una proporción de híbridos de fusión proliferan si se reprograman mediante actividad Wnt. Además, también se ha mostrado que si no se reprograman, los híbridos de neurona-SPC experimentan apoptosis. Sorprendentemente, los híbridos reprogramados pueden regenerar el tejido retiniano dañado. Finalmente, se ha mostrado claramente que tras la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en el ojo, las células derivadas de BM que se incluyen en la retina lesionada pueden fusionarse con, y reprogramar, las neuronas retinianas tras la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. En conjunto, puede concluirse que la reprogramación mediada por fusión celular puede ser un mecanismo endógeno de reparación de daños.

Las SPC adultas muestran un alto grado de plasticidad y pluripotencia, y pueden contribuir a un amplio espectro de células diferenciadas. Las BMC trasplantadas pueden fusionarse y adquirir la identidad de células hepáticas, neuronas de Purkinje, células

renales, células epiteliales y más. Esta plasticidad se ha atribuido o bien a la transdiferenciación o bien a mecanismos de fusión célula-célula.

Sin embargo, hasta ahora los acontecimientos de fusión celular se han considerado muy poco frecuentes, y por tanto nunca se ha investigado claramente la identidad de célula de los híbridos "recién formados". En este caso, los inventores han demostrado que se produce fusión célula-célula y que puede visualizarse como un acontecimiento muy relevante poco después del trasplante de HSPCs en un ojo dañado. Esto también es cierto tras la movilización de células positivas para c-kit/sca-1 desde la BM al interior de retinas dañadas. En estudios anteriores, los números de híbridos derivados de la fusión de BMC se han subestimado enormemente; de hecho, en este caso se ha encontrado que a menos que se reprogramen estos híbridos recién formados, experimentan muerte celular, y por tanto mucho tiempo después del trasplante no pueden detectarse.

Las HSPCs se fusionan con alta eficacia con neuronas ganglionares y amacrinas; los híbridos "recién formados" resultantes son entidades celulares novedosas, que si se proporciona un estímulo de señalización de Wnt, pueden inicialmente reprogramarse de manera transitoria y pueden proliferar y entonces convertirse en neuronas diferenciadas de manera terminal. Resulta notable que se encontró expresión de nanog y Oct4, y al mismo tiempo, expresión de marcadores neuronales de precursor nestina, nogina y Otx2 en estos híbridos. La expresión de nanog y Oct4 es una evidencia clara de la reprogramación de vuelta al estado embrionario; sin embargo, este estado es transitorio, al menos en el caso de la fusión entre HSPCs y neuronas retinianas. Los híbridos se limitan muy pronto a linaje neuroectodérmico, y de hecho, 72 h tras el trasplante, Oct4 y nanog estaban claramente regulados por disminución. Finalmente, en dos semanas, los híbridos se convierten en neuronas diferenciadas de manera terminal y regeneran la GCL y la INL en el tejido retiniano. Resulta interesante que también se observó una regeneración funcional completa de fotorreceptores en un modelo de ratón de retinitis pigmentosa (RP) tras la reprogramación mediada por fusión celular de neuronas retinianas tras el trasplante de HSPCs con la ruta Wnt/β-catenina activada (Ejemplo 1).

Estas observaciones condujeron a anticipar que Oct4 y nanog no son sólo genes de células madre que se expresan en embriones, sino que también tienen un papel funcional en el tejido adulto durante procesos de regeneración mediada por fusión

celular. La expresión de estos genes en adultos plantea controversia [Shin *et al.*, Mol Cells 29, 533-538 (2010); Kucia *et al.*, J Physiol Pharmacol 57 Sup. 5, 5-18 (2006)]; sin embargo, podría suceder que su expresión no se haya apreciado claramente en algunas circunstancias, probablemente debido a su naturaleza muy transitoria.

Las ESCs también tienen una gran plasticidad, y en este caso los inventores pudieron identificar acontecimientos de desdiferenciación *in vivo*; es decir, híbridos reprogramados que expresan nanog tras la fusión de neuronas retinianas con ESCs. Los híbridos de ESC-neurona retiniana son probablemente más pluripotentes que los híbridos derivados de HSPCs. Pueden formar clones en cultivo y expresar marcadores de tres linajes diferentes; además, forman teratoma *in vivo* (datos no mostrados). En cambio, *in vitro*, los inventores no pudieron aislar clones de híbridos de HSPC-neurona retiniana, lo que indica claramente su reprogramación transitoria y rápida limitación a la diferenciación de linaje neuroectodérmico. Resulta interesante que no se observó la reprogramación de neuronas retinianas hasta la expresión de nanog tras fusión de RSPCs, lo que indica un grado inferior de plasticidad en estas células con respecto a HSPCs.

Durante mucho tiempo se ha pensado que la diferenciación es un mecanismo de una dirección; la posibilidad de inducir la reprogramación de células somáticas ha derogado completamente esta opinión. Sin embargo, hasta la fecha, se ha considerado que la desdiferenciación de neuronas es relativamente difícil. En este caso, se ha demostrado que las neuronas pueden de hecho cambiar su estado de desarrollo en un organismo vivo mientras siguen residiendo en su propio tejido. Sin embargo, cando se fusionan con HSPCs, mantienen la memoria de su identidad neuronal, ya que estos híbridos "recién formados" finalmente se diferencian en neuronas. Esta no es una observación trivial, ya que los investigadores normalmente fuerzan *in vitro* células reprogramadas para propagarse con un fenotipo desdiferenciado; de hecho, incluso las ESCs, en principio, no existen en el embrión. Las células pluripotentes, tales como las células reprogramadas, deben experimentar rápidamente un cambio de destino *in vivo*, que dependerá de las diferentes señales tisulares, y deben limitarse a avanzar hacia un destino de diferenciación específico. Una memoria de identidad de linaje que no se borró durante el proceso de reprogramación puede ser beneficiosa, para dirigir la trayectoria de diferenciación correcta *in vivo*. Resulta interesante que se ha mostrado

que las SC pluripotentes inducidas (iPSC) conservan memoria epigenética de sus células somáticas de origen [Polo *et al.*, Nat Biotechnol 28, 848-855 (2010); Kim *et al.*, Nature 467, 285-290 (2010)]. En este caso, en el modelo usado en el presente documento, la transición de un destino celular a otro no es directa, sino que pasa a través de la nueva expresión transitoria de genes precursores; pasando así por un precursor de desarrollo menos diferenciado, intermedio.

La señalización de Wnt controla la regeneración de tejidos en respuesta al daño en eucariotas inferiores [Lengfeld *et al.*, Dev Biol 330, 186-199 (2009)]. La regeneración de la aleta de la cola del pez cebra y las extremidades de *Xenopus* requiere la activación de la señalización de Wnt/β-catenina; asimismo para la regeneración tisular en planarias [De Robertis, Sci Signal 3, pe21 (2010)]. Resulta interesante que en la retina de pollo recién nacido y de peces, se han asociado la regulación por disminución de marcadores específicos de células de Müller, tales como glutamina sintetasa, y la activación de marcadores de progenitores, tales como Pax6 y Chx10, con un potencial regenerativo de estas células. Sin embargo, la activación exógena de la señalización de Wnt es necesaria para inducir la desdiferenciación de células de Müller en la retina de ratón. Por tanto, la actividad regenerativa de la señalización de Wnt que está presente en eucariotas inferiores puede haberse perdido durante la evolución.

Aunque todos estos estudios destacan el importante papel de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en el proceso de regeneración, los mecanismos biológicos que constituyen la base de esta regeneración todavía se desconocen en gran parte hasta la fecha; en este caso, se muestra que al menos en la retina de ratón, puede producirse regeneración mediante reprogramación mediada por fusión celular. Por otro lado, se encontró una regeneración no homogénea de las retinas sometidas a trasplante, lo que indica que pueden usarse otros factores, tales como factores de crecimiento nerviosos por ejemplo, para potenciar el proceso. Además, no puede excluirse que además de generar nuevas neuronas y por tanto regenerar auténticamente el tejido retiniano, también puede haberse inducido un retraso de la degeneración neuronal.

Además, este proceso puede inducirse tras la inclusión de BMC en el ojo. Resulta interesante que se observaron algunas BMC incluidas fusionadas con células de Müller tras el daño. Por tanto, puede suceder que la desdiferenciación de células de

Müller, notificada anteriormente [Osakada *et al.*, (2007) citado anteriormente], se deba a acontecimientos de fusión con BMC incluidas.

Esta reprogramación *in vivo* endógena puede ser un mecanismo de reparación de daños, y daños menores, tales como daño por luz o daño mecánico, pueden repararse mediante reprogramación mediada por fusión celular tras la inclusión de BMCs. También es posible que la reprogramación mediada por Wnt sea un mecanismo de protección tras la fusión celular *in vivo*. Los híbridos que no se reprograman experimentan muerte celular mediada por apoptosis. En vez de eso, los híbridos sometidos a reprogramación mediada por Wnt pueden sobrevivir y pueden proliferar.

Sin embargo, aunque otros intentos de regenerar completamente retinas de ratón dañadas tras la activación ectópica de la señalización de Wnt en el ojo no han tenido éxito [Osakada *et al.*, (2007) citado anteriormente], en este caso se ha demostrado que además de la activación de la señalización de Wnt, la reprogramación mediada por fusión celular también es esencial en el proceso de regeneración. Por tanto, estrategias para aumentar la inclusión de BMC en los ojos junto con la activación de la señalización de Wnt pueden ser terapéuticamente relevantes para regenerar el tejido retiniano dañado.

Los ensayos muestran que se detectó la expresión de transgenes de RFP y YFP derivados del genoma de las dos parejas de fusión diferentes dos semanas tras la fusión celular, lo que indica la contribución de ambos genomas en los híbridos. Además, se observó proliferación de los híbridos reprogramados, una indicación de que eran células mononucleadas y sincariones auténticos. Se han observado heterocariones estables con fusión de células de Purkinje con células derivadas de BM, y sus números aumentaron enormemente tras la inflamación [Johansson *et al.*, Nat Cell Biol 10, 575-583 (2008)]. Además, recientemente, también se han encontrado heterocariones en retinas de tipo natural [Morillo *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 107, 109-114 (2010)]. Sin embargo, los inventores nunca detectaron heterocariones en la retina de los ojos sometidos a inyección, aunque no puede excluirse formalmente su presencia.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que se observaron consecuencias perjudiciales cuando se observó un aumento de resistencia a la apoptosis tras la fusión de SC cancerosas con células somáticas, tales como resistencia a múltiples fármacos de un tumor en desarrollo (Lu & Kang. Cancer Res 69, 8536-8539 (2009)]. Además, la

fusión celular, y por tanto las células poliploides, también pueden surgir durante estados patológicos, y con frecuencia la inestabilidad genética en estas células puede conducir a aneuploidía y al desarrollo de cánceres. Por tanto, los datos proporcionados por la presente invención también pueden ser importantes en el futuro para seguir un camino diferente; es decir, para estudiar la fusión de SC cancerosas con células somáticas durante el desarrollo tumoral.

La reprogramación es un proceso gradual y lento, con genes específicos de linaje silenciados, mientras que se inducen genes endógenos asociados con la pluripotencia. En conjunto, el proceso es muy ineficaz, debido a las diferentes barreras genéticas y epigenéticas [Sanges & Cosma. Int J Dev Biol 54, 1575-1587 (2010)]. De hecho, las pre-iPS (células parcialmente reprogramadas) muestran una remodelación epigenética incompleta y una hipermetilación del ADN persistente, entre otras características. Pueden convertirse en células iPS mediante inhibición global de la metilación del DNA. Los inventores mostraron recientemente que la deleción de Tcf3, que es un represor de genes diana de β-catenina, mitigan las modificaciones en el epigenoma durante la reprogramación, facilitando así la derivación de células iPS *in vitro* [Lluis *et al.*, (2011) en prensa]. Esto también puede tener lugar durante la fusión celular *in vivo*: el epigenoma de SPC puede remodelarse activamente, y transcribirse algunos agentes de reprogramación, lo que puede cambiar el epigenoma neuronal en los híbridos en trans.

En conclusión, puede determinarse que la reprogramación mediada por fusión celular controlada mediante la señalización de Wnt es un proceso fisiológico *in vivo*, que puede contribuir a la regeneración/reparación celular en tejidos normales.

REIVINDICACIONES

1. Una célula madre mesenquimal (MSC) o una población celular que comprende una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dicha célula está activada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana mediante la implantación directa de dichas células en el ojo de un sujeto en necesidad de tratamiento.

2. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 1, en la que dichas células son células tratadas con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o son células que sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

3. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 2, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de fórmula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

4. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 2, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

5. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

6. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 5, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

7. Una célula madre mesenquimal (MSC) o una población celular que comprende una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana mediante la implantación directa de dichas células en el ojo de un sujeto en necesidad de tratamiento antes de la reprogramación de una célula retinal mediante fusión de dichas células con dicha célula retinal, en donde dicha reprogramación está mediada por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

8. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 7, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

9. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 8, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de fórmula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

10. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 8, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

11. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

12. Célula o población celular para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 11, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

13. Una composición celular, en la que al menos el 50% de las células de dicha composición celular son células madre mesenquimales (MSCs) o células madre hematopoyéticas (HSCs), células progenitoras y células madre mesenquimales (MSCs), y en la que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada.

14. Una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en:
    1) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula madre mesenquimal (MSC) o una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), en la que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, y un portador farmacéuticamente aceptable, y
    2) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula madre mesenquimal (MSC) o una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, y un portador farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana mediante la implantación directa de dicha composición en el ojo de un sujeto en necesidad de tratamiento.

16. Una composición farmacéutica según la reivindicación 15, en la que dicha composición es administrada mediante inyección intraocular, intravitreal o subretinal.

17. Un kit seleccionado del grupo que consiste en:
    1) un kit que comprende al menos una célula madre mesenquimal (MSC) o una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), en donde la ruta de señalización Wnt/β-

catenina de dichas células está activada, e instrucciones para el uso de los componentes del kit, y

2) un kit que comprende al menos una célula madre mesenquimal (MSC) o una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora y una célula madre mesenquimal (MSC), en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, e instrucciones para el uso de los componentes del kit.

18. Un kit según la reivindicación 17, para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

19. Kit para uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 18, en el que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

20. Kit para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 18, en el que dicha enfermedad de degeneración deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
14 February 2013 (14.02.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/020945 A9

(51) International Patent Classification:
C12N 5/0793 (2010.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
A61K 35/28 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/065327

(22) International Filing Date:
6 August 2012 (06.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11176713.3 5 August 2011 (05.08.2011) EP

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **COSMA, Maria Pia** [IT/ES]; Carrer Fernando Poo, 16; 2-3, E-08005 Barcelona (ES). **SANGES, Daniela** [IT/ES]; C/ Gombau, 12, E-08003 Barcelona (ES).

(74) Agent: **ALCONADA RODRIGUEZ, Agustin**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*
— *with information concerning authorization of rectification of an obvious mistake under Rule 91.3 (b) (Rule 48.2(i))*

(48) Date of publication of this corrected version:
4 April 2013

(15) Information about Correction:
see Notice of 4 April 2013

WO 2013/020945 A9

(54) Title: METHODS OF TREATMENT OF RETINAL DEGENERATION DISEASES

(57) Abstract: The methods comprise administering cells having properties of stem cells or progenitor cells, to the retina and reprogramming of retinal cells mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway.

METHODS OF TREATMENT OF RETINAL DEGENERATION DISEASES

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the field of cell-based or regenerative therapy for ophthalmic diseases. In particular, the invention provides methods of treatment of retinal degeneration diseases by administering cells, said cells having properties of stem cells or progenitor cells, to the retina and reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The retina is a specialized light-sensitive tissue at the back of the eye that contains photoreceptor cells (rods and cones) and neurons connected to a neural network for the processing of visual information. The rods function in conditions of low illumination whereas cones are responsible for color vision and all visual tasks that require high resolution (e.g., reading). The rods are mostly located away from the center of the eye in the retinal periphery. The highest concentration of cones is found at the center of the retina, the macula, which is necessary for visual acuity. For support of its metabolic functions, the retina is dependent on cells of the adjacent retinal pigment epithelium (RPE).

Retinal degeneration is the deterioration of the retina caused by the progressive and eventual death of the retinal or retinal pigment ephitelium (RPE) cells. There are several reasons for retinal degeneration, including artery or vein occlusion, diabetic retinopathy, retrolental fibroplasia/retinopathy of prematurity, or disease (usually hereditary). These may present in many different ways such as impaired vision, night blindness, retinal detachment, light sensitivity, tunnel vision, and loss of peripheral vision to total loss of vision. Retinal degeneration is found in many different forms of retinal diseases including retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy, cataracts, and glaucoma.

Retinitis pigmentosa (RP) is the most common retinal degeneration with a prevalence of approximately 1 in 3,000 to 1 in 5,000 individuals, affecting

approximately 1.5 million people worldwide. RP is a heterogeneous family of inherited retinal disorders characterized by progressive degeneration of the photoreceptors with subsequent degeneration of RPE. It is the most common inherited retinal degeneration and is characterized by pigment deposits predominantly in the peripheral retina and by a relative sparing of the central retina. The typical manifestations are present between adolescence and early adulthood and lead to devastating visual loss with a high probability. In most of the cases of RP, there is primary degeneration of photoreceptor rods, with secondary degeneration of cones. RP is a long-lasting disease that usually evolves over several decades, initially presented as night blindness, and later in life as visual impairment in diurnal conditions. Currently, there is no therapy that stops the evolution of retinal degeneration or restores vision. There are few treatment options such as light avoidance and/or the use of low-vision aids to slow down the progression of RP. Some practitioners also consider vitamin A as a possible treatment option to slow down the progression of RP.

Effective treatment for retinal degeneration has been widely investigated. The field of stem cell-based therapy holds great potential for the treatment of retinal degenerative diseases as many studies in animal models suggest that stem cells have the capacity to regenerate lost photoreceptors and retinal neurons and improve vision. To date, these cells include retinal progenitor cells, embryonic stem cells, bone marrow-derived stem cells, and induced pluripotent stem cells.

Retinal progenitor cells (RPCs) are derived from fetal or neonatal retinas, and comprise an immature cell population that is responsible for generation of all retinal cells during embryonic development. RPCs can proliferate and generate new neurons and specialized retinal support cells in vitro, and can also migrate into all retinal layers and develop morphological characteristics of various retinal cell types *in vivo* (MacLaren *et al.*, 2006, Nature 444:203-7). These results support the hypothesis that RPCs transplants are a potential treatment for retinal degenerative diseases.

Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass of blastocyst-stage embryos, with self-renewal capabilities as well as the ability to differentiate into all adult cell types, including photoreceptor progenitors, photoreceptor, or RPE in mice and humans (Lamba *et al.*, 2006, PNAS USA 103:12769-74; Osakada *et al.*, 2008, Nat Biotechnol 26:215–224). Lamba *et al.* showed that transplantation of retinal cells

derived from human ESCs into the subretinal space of adult Crx($^{-/-}$) mice promoted the differentiation of hESCs-derived retinal cells into functional photoreceptors, and the procedure improved light responses in these animals (Lamba *et al.*, 2009, Cell Stem Cell 4:73-9). Although ESCs are promising in retinal replacement therapies, there remain ethical and immune rejection issues to be considered, and ESCs have also been associated with teratoma formation.

The bone marrow harbors at least two distinct stem cell populations: mesenchymal stem cells (MSCs) and hematopoietic stem cells (HSCs). MSCs can be induced into cells expressing photoreceptor lineage-specific markers *in vitro* using activin A, taurine, and epidermal growth factor (Kicic *et al.*, 2003, J Neurosci 23:7742-9). In addition, an *in vivo* animal model demonstrated that MSC injected into the subretinal space can slow down retinal cell degeneration and integrate into the retina and differentiate into photoreceptors in Royal College of Surgeons (RCS) rats (Kicic *et al.*, 2003, J Neurosci 23:7742-9; Inoue *et al.*, 2007, Exp Eye Res 85:234-41).

Otani *et al.* have reported that intravitreally injected, lineage-negative (Lin$^-$) hematopoietic stem cells (HSCs) can rescue retinal degeneration in *rd1* and *rd10* mice (Otani *et al.*, 2004, J Clin Invest 114:755-7; US 2008/0317721; US 2010/0303768). However, the transplanted retinas were formed of nearly only cones, and the electroretinogram responses were severely abnormal and comparable to untreated animals. There was a limitation in that intravitreally injected Lin$^-$ HSCs were effectively incorporated into the retina only during an early, postnatal developmental stage but not in adult mice, only targeting activated astrocytes that are observed in neonatal mice or in an injury induced model in the adult (Otani *et al.*, 2002, Nat Med 8:1004-10; Otani *et al.*, 2004, J Clin Invest 114:755-7; Sasahara *et al.*, 2004, Am J Pathol 172:1693-703).

Induced pluripotent stem cells (iPS) derived from adult tissues are pluripotent ESC-like cells reprogrammed *in vitro* from terminally differentiated somatic cell by retroviral transduction of four transcription factors: Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc. It has been reported that human iPS have a similar potential of ESCs to mimic normal retinogenesis (Meyer *et al.*, 2009, PNAS USA 106:16698-703). However, major issues include reducing the risk of viral integrations and oncogene expression for generation of iPS. These limitation may be overcome using alternative methods to obtain iPS such as activation of signalling pathways, including the Wnt/β-catenin, MAPK/ERK, TGF-β

and PI3K/AKT ssignalling pathways (WO 2009/101084; Sanges & Cosma, 2010, Int J Dev Biol 54:1575-87).

Therefore, there is the need to provide an effective method for treating retinal degenerative diseases.

SUMMARY OF THE INVENTION

Inventors have now found that retinal regeneration can be achieved by implanting cells, said cells having properties of stem cells or progenitor cells, into the retina of a subject which fuse with retinal cells, such as retinal neurons, e,g., rods, etc., or retinal glial cells, e.g., Müller cells, to form hybrid cells which reactivate neuronal precursor markers, proliferate, de-differentiate and finally differentiate into terminally differentiated retinal neurons of interest, e.g., photoreceptor cells, ganglion cells, etc., which can regenerate the damaged retinal tissue. The activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is essential to induce de-differentiation of said hybrid cells and final re-differentiation in the retinal neurons of interest. In an embodiment, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is, at least partially, provided by the implanted cells (which have been treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator), whereas in another embodiment, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is only provided as a result of administering a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, to the subject to be treated or as a consequence of a retinal damage or injury, as occurs in, for example, retinal degeneration diseases (e.g., Retinitis Pigmentosa). The newborn retinal neurons fully regenerate the retina in the transplanted mammalian, with some rescue of functional vision. Histological analysis shows that said regenerated retinas are indistinguishable from retinas of wild-type mammalians two months after transplantation. These data show that cell fusion-mediated regeneration is a very efficient process in mammalian retina, and that it can be triggered by activation of Wnt/β-catenin signalling pathway in the transplanted cells, and that *in vivo* reprogramming of terminally differentiated retinal neurons is a possible mechanism of tissue regeneration. Consequently, these teachings can be applied to treat diseases wherein retina is degenerated.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Cell fusion controls. (a) Schematic representation of the experiment plan. *In-vivo* cell fusion between $HSPCs^{RFP/Cre}$ with retinal neurons of LoxP-STOP-LoxP-YFP mice (R26Y) leads to excision of a floxed stop codon in the retinal neurons, and in turn, to expression of YFP. The resulting hybrids express both RFP and YFP. (b) Representative fluorescence micrographs of $R26Y^{rd1}$ retinas 24 h after subretinal transplantation of BIO-treated $HSPCs^{CRE/RFP}$. YFP positive cells represent hybrids derived from cell fusion of HSPCs with $R26Y^{rd1}$ retinal cells. (c) RT-PCR analysis of the target gene Axin2 shows β-catenin signalling activation in BIO-treated HSPCs. (d-e) Representative fluorescence micrographs of p10 wild-type R26Y retinas 24 h after subretinal transplantation of BIO-treated $HSPCs^{CRE/RFP}$. No YFP-positive cells (green) were detected. Nuclei were counterstained with DAPI in (e). Dotted lines show the final part of the retinal tissue. OS: outer segment; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer.

Figure 2. Transplanted HSPCs fuse and induce de-differentiation of *rd1*mouse retinal cells upon Wnt/β-catenin signalling pathway activation. (a-d) Representative fluorescence micrographs of $R26Y^{rd1}$mouse retinas 24h after subretinal transplantation of $HSPCs^{CRE/RFP}$. Double-positive RFP/YFP (red/green) hybrids following cell fusion of HSPCs (red) with *rd1* retinal cells were detected in the ONL, and a few in the INL. These YFP-positive hybrids (YFP, green) are also positive for markers to rod (rhodopsin; red in b) and Müller (glutamine synthetase; red in c) cells, but not to cones (d). (e-g) Quantification of apoptotic photoreceptors (e) and apoptotic (f) and proliferating (g) hybrids 24h after transplantation of non-BIO-treated (No BIO) and BIO-treated (BIO) $HSPCs^{CRE}$ in p10 $R26Y^{rd1}$ eyes. Numbers were calculated as the percentage of TUNEL positive photoreceptors with respect to total photoreceptor nuclei (e) or as the percentage of Annexin V (f) or Ki67 (g) positive cells with respect to the total numbers of YFP positive hybrid cells. (h) Real-time PCR of genes (as indicated) expressed in the HSPCs and retinal and hybrid cells (as indicated). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer.

Figure 3. Proliferation and cell-death analysis of de-differentiated hybrids. Representative immunofluorescence staining of Annexin V (a, b) and Ki67 (c, d) on retinal sections of R26Y^{rd1} mice analysed 24 h after transplantation at p10 with BIO-treated HSPCs^{CRE} (BIO; a, c) or non-treated HSPCs^{CRE} (No BIO; b, d). YFP fluorescence (green) localises hybrids obtained after fusion. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Yellow arrows indicate apoptotic (b) or proliferating hybrids (c-d).

Figure 4. Immunofluorescence analysis of expression of precursor markers in de-differentiated hybrids. Representative immunofluorescence staining of Nestin (a, d, red), Noggin (b, e, red) and Otx2 (c, f, red) in retinal sections from R26Y^{rd1} mice 24 h after transplantation at p10 of BIO-treated HSPCs^{CRE} (BIO; a-c) or untreated cells (No BIO; d-f). YFP hybrids (green) obtained after fusion were positive for these markers only following BIO-treatment (a-c, yellow arrows).

Figure 5. Histological analysis time course of retinal regeneration in *rd1* mice. (a-h) Representative H&E staining (a, b, e-h) and TUNEL staining (c, d; red) of retinal sections of R26Y^{rd1} mice transplanted at p10 with untreated (a, c, e, g) or BIO-treated (b, d, f, h) HSPCs$^{RFP/}$CRE and analysed 5 (p15; a-d), 10 (p20; e, f) and 15 days (p25; g, h) after transplantation. (i-p) Representative H&E staining of wild-type (i, j) and *rd1* mice (k-p) without transplantation (i, j, o, p) or transplanted at p10 (k-n) with untreated (m, n) or BIO-treated (k-l) HSPCs (m-n), all analysed at p60. Magnification: 20× a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o. ONL: outer nuclear layer.

Figure 6. Histological analysis time course of transplanted R26Y^{rd1}eyes. (a) Representative H&E staining and TUNEL staining of retinal sections of R26Y^{rd1} mice transplanted at p10 with untreated or BIO-treated HSPCs$^{RFP/CRE}$ and analysed 5 (p15), 10 (p20) and 15 days (p25) after transplantation.(b) Representative immuno staining of retinas of R26Y^{rd1} mice transplanted with no Bio-treated HSPCs$^{RFP/CRE}$. ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer.

Figure 7. Analysis of hybrid differentiation at p60. (a-f) Representative immunofluorescence staining of retinal sections of R26Y^{rd1} mice without

transplantation (e) and transplanted at p10 with BIO-treated HSPCs (a-d, f) and analysed at p60. (a-d) YFP-positive hybrids (green) are positive for rhodopsin (a, red) but not for cone opsin (b, red), glutamine synthetase (c, red), and CD31 (d, red). Bottom images: merges of red and green, with nuclei also counterstained with DAPI (blue). (e-f) Rhodopsin (red), Pde6b (magenta) and counterstained nuclei with DAPI (blue). (g) Western blotting of Pde6b protein expression in the retina of wild-type (wt) and $R26Y^{rd1}$ mice either untreated (rd1 NT) or transplanted with BIO-treated HSPCs (rd1 BIO), all analysed at p60. Total protein lysates were normalized with an anti-β-actin antibody. ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer.

Figure 8. YFP positive hybrids express *PDE6B*. (a) Representative immunofluorescence staining of rhodopsin (red) in retinal section from $R26Y^{rd1}$ mice 2 months after transplantation at p10 of untreated $HSPCs^{CRE}$ cells. Neither YFP hybrids (green) nor rhodopsin (red) positive photoreceptors were detected. Nuclei were counterstained with DAPI. (b) Representative retinal sections of $R26Y^{rd1}$ mice transplanted at p10 with BIO-treated $HSPCs^{CRE}$ and analysed at p60. YFP positive hybrids (green) are positive to both rhodopsin (red) and Pde6b (magenta). Nuclei in merged images were counterstained with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer.

Figure 9. Damage-dependent cell fusion *in-vivo*. **(A)** Schematic representation of cell fusion experimental plan. *In-vivo* cell fusion between red –labelled $SPCs^{Cre}$ with retinal neurons of LoxP-STOP-LoxP-YFP mice (R26Y) leads to excision of a floxed stop codon in the retinal neurons, and in turn, to expression of YFP. The resulting hybrids express YFP and are also labelled in red. **(B, C)** Confocal photomicrographs of R26Y NMDA-damaged (B) or healthy retinas (C) of mice transplanted with $HSPCs^{RFP/Cre}$. The mice were sacrificed 24 h after tissue damage. Double-positive RFP (red) and YFP (green) hybrids derived from cell fusion are detected in the presence of NMDA damage (B, NMDA), but not in the non-damaged eye (C, No NMDA). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **onl:** outer nuclear layer; **inl:** inner nuclear layer; **gcl:** ganglion cell layer. Scale bar: 50 μm. **(D)** Quantification of hybrids formed 24 h after cell transplantation, as percentages of YFP-positive cells on the total red $HSPCs^{Cre/RFP}$ localised in the optical fields. Sections of NMDA-damaged and non-

damaged (No NMDA) eyes were analysed. Data are means ±s.e.m.; n = 90 (three different retinal fields of 10 different retinal serial sections, for each eye. Three different eyes were analysed). ***P <0.001. **(E-G):** Immunohistochemical analysis of the retinal fusion cell partners. YFP hybrids also positive for ganglion (E, Thy1.1, red), amacrine (F, sintaxin, red) or negative for Müller (G, GS, red) cell markers are detected 12 h after transplantation of $HSPCs^{Cre}$ in NMDA-damaged eyes. Yellow arrows indicate cells positive to both YFP and marker staining. Scale bar: 10 μm.

Figure 10. Analysis of cell fusion events. **(A)** H&E staining (left) and schematic representation of the retinal tissue. **(B)** TUNEL staining (green) on sections of R26Y mice eyes sacrificed 48h after NMDA injection. **(C)** NMDA treatment in R26Y mice does not activate YFP expression (green) in retinal neurons. **(D)** Cell transplantation was performed at least in 3 different eyes for each experiment. Then, a total of ten serial sections from each of the eyes were examined in three different regions for each section. The number of immunoreactive marker positive, of YFP-positive or GFP- positive cells within three areas (40X optical fields) of the retina was counted in individual sections. The ratio between the latter numbers and the total number of red-labelled (DiD) cells or RFP positive cells in the same fields resulted in the percentage of positive cells. The 40X fields (red rectangles) were chosen in areas including the gcl and the inl of the retinal tissue**. (E)** Flow cytometry analysis of tetraploid cells with a 4C content of DNA was performed on total cells isolated from NMDA-damaged R26Y retinas transplanted with $BIO\text{-}HSPC^{Cre}$. The presence of tetraploid cells in a G2/M phase of the cell cycle was detected when gating on the RFP positive cells (hybrids) (right graph) while were not in control unfused RFP $HSPCs^{Cre}$ (left graph). **(F)** Statistical analysis of the retinal fusion partners. Numbers represent the percentage of YFP hybrids also positive either for a ganglion, amacrine or Müller retinal cell markers detected 12 h after transplantation of $HSPCs^{Cre}$ in NMDA-damaged R26Y eyes.

Figure 11. Analysis of ESC and RSPC fusion events. **(A)** Representative samples of $DiD\text{-}ESCs^{Cre}$ and $DiD\text{-}RSPCs^{Cre}$ injected either into mice eyes pre-treated for 24 h with NMDA to induce cellular damage, or in healthy eyes (No NMDA). In R26Y eyes 24 h after cells injection (DiD cells, red), YFP expression (YFP, green) is detected in the NMDA-damaged eyes (NMDA), but not in the non-damaged eye (No

NMDA). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm. **(B)** Quantification of YFP-positive cells as percentage relative to the total number of transplanted DiD- $ESCs^{Cre}$ and DiD-$RSPCs^{Cre}$ localized in the optical fields. Sections of NMDA-damaged and non-damaged eyes were analysed in mice sacrificed 24h after transplantation. Data are means ±s.e.m.; n=30 (three different areas of 10 different retinal serial sections for each eye). P value <0.001 (***). **(C)** NMDA (intravitreal) and BrdU (intraperitoneal) were injected in R26Y mice; one day later, unlabelled ESCs were injected (intravitreal) and finally BrdU staining was performed on eye sections of mice sacrificed after further 24 h. Total BrdU positive cells (red arrows) were counted in the gcl in a 40X field. YFP positive hybrids were never positive to BrdU staining (green arrows). Data are means ±s.e.m.; n=30.

Figure 12. Analysis of reprogramming of retinal neurons after fusion. **(A)** Immunofluorescence staining using an anti β-catenin antibody (red) was performed on sections from eyes treated either with NMDA, with both NMDA and DKK1 or untreated as control. The expression and nuclear accumulation of β-catenin in retinal cells detected in NMDA-damaged eyes (red arrows) is reduced after treatment with DKK1. Scale bar: 20μm. **(B)** Schematic representation of *in-vivo* reprogramming experimental plan. Red-labelled SPCs either non-treated (control), or treated for 24 h with BIO were injected in NMDA-damaged or undamaged eyes of Nanog-GFP-Puro recipient mice. The expression of GFP in reprogrammed hybrids was analysed one day after injection. **(C)** NMDA treatment does not activate GFP expression (green) in Nanog-GFP retinal neurons. **(D-F)** BIO treatment of HSPCs activates β-catenin signalling as shown by RT-PCR of the target gene Axin2 (D) or by nuclear translocation of β-catenin in untreated (E) or BIO-treated (F) cells. **(G)** Transplantation of BIO-treated $HSPCs^{RFP}$ (red) in healthy Nanog-GFP eyes does not induce reactivation of the Nanog-GFP transgene (green). Nuclei were counterstained with DAPI.

Figure 13. Activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway enhances neuron reprogramming after cellfusion *in-vivo*. **(A)** Schematic representation of *in-vivo* reprogramming experimental plan. Nestin-CRE mice received intravitreal injection of both NMDA and DKK1, NMDA alone, or PBS as control, one day before $HSPCs^{R26Y}$ injection. Before transplantation, $HSPCs^{R26Y}$ were pre-treated or not with Wnt3a or BIO

and labelled with DiD red dye. Samples were analysed 24 h after cell transplantation. Only as a consequence of cell fusion and reprogramming can the Cre, re-expressed in adult mice due to the activation of the Nestin promoter, induce expression of YFP in hybrids that retain the red membranes. (**B**) Only in the presence of NMDA without DKK1 do transplanted red $HSPCs^{R26Y}$ start to express YFP (green arrows). Yellow arrows indicate double-positive red and green cells. Wnt3a pre-treatment of red $HSPCs^{R26Y}$ before transplantation increases the amounts of double-positive red/green hybrids. Scale bar: 50 μm **(C-D)** Statistical analysis of the numbers of double red/green (DiD/YFP)-positive hybrids detected in Nestin-CRE (C) or Nanog GFP (D) retinas treated with NMDA, NMDA+DKK1, or untreated (No NMDA), 24 h after transplantation of untreated HSPCs or of Wnt3a- or BIO-treated HSPCs. Percentages were calculated as the number of YFP-positive cells with respect to the total number of red HSPCs detected in the optical fields. Data are means ±s.e.m.; n=90. ***P <0.001. (E) Confocal photomicrographs 24h after transplantation of undamaged (No NMDA) Nanog-GFP retinas and of NMDA Nanog-GFP retinas transplanted with HSPCs pre-treated with Wnt3a (NMDA + Wnt3a).

Figure 14. Activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway enhances neuron reprogramming after cell fusion *in vivo*. (**A**) Representative samples where DiD-ESCs were injected 24h after PBS injection (No NMDA) or NMDA injection in Nanog-GFP-puro mice. Twenty-four hours after ESC injection, Nanog-GFP expression (green) is detected in ESC-neuron hybrids (red and green) in NMDA-damaged (NMDA) but not in non-treated eyes (No NMDA). Pre-treatment with DKK1 (NMDA+DKK1) reduces the number of GFP-positive hybrids. BIO and Wnt3a pre-treatment of ESCs augmented the number of GFP-positive reprogrammed neurons (red/green) with respect to the non-treated ESCs (No BIO). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μm. **(B)** Hybrids isolated from NMDA-damaged Nanog-GFP eyes transplanted with BIO-treated (BIO) or untreated (No BIO) ESCs where cultured *in vitro* under puromycin selection. A mean of 23 GFP-positive clones where detected after one month of cell culturing. Clones are also positive to the alkaline phosphatase staining. **(C)** Transplanted RSPCs (red) do not reprogram NMDA-damaged retinal neurons in presence or not of BIO treatment. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **(D)** Statistical analysis of the percentage of YFP- hybrids after injection of either untreated

or BIO-treated HSPCs^{Cre} (white bars), ESCs^{Cre} (gray bars) or RSPCs^{Cre} (black bars), in R26Y eyes pre-treated (NMDA) or not (No NMDA) with NMDA.

Figure 15. Characterisation of the reprogrammed hybrids. **(A)** RT-PCR analysis of the expression of different genes in RFP positive hybrids sorted by FACS 24 h after transplantation of BIO (black bars) or non-BIO-treated (grey bars) HSPCs$^{Cre/RFP}$ in R26Y NMDA-damaged eyes. **(B)** Confocal photomicrographs of NMDA-damaged R26Y retinas transplanted with BIO-treated HSPCs^{Cre} and stained 24 h later with anti-Oct4, anti-Nanog, anti-Nestin, anti cKit or anti Tuj-1 antibodies. YFP positive hybrids (green) were also positive to Oct4, Nanog and Nestin (red, arrows) expression, however they were not positive to c-Kit or Tuj-1 (green, arrows). Scale bar: 50 μm. **(C-D)** Species-specific gene expression was evaluated by RT-PCR using mouse (C) or human (D) specific oligos in hybrids FACS-sorted 24h after transplantation of BIO-treated and DiD labelled human CD34+ HSPCs in NMDA-damaged eyes of Nanog-GFP mice. **(E-J)** NMDA-damaged R26Y eyes were intravitreally injected with BIO treated (BIO) or untreated (No BIO) HSPCs^{Cre} and analyzed 24h later. To evaluate proliferation (E-G and I) and cell death (F, H and J) of YFP positive hybrids (green), sections were stained either with anti-Ki67 (G and I, red) or anti-Annexin V (H and J) antibodies. The amount of positive hybrids was evaluated as the percentage of Ki67 (E) or Annexin V (F) positive cells relative to the total number of YFP hybrids. Data are means ±s.e.m.; n=30. P value <0.001 (***). Yellow arrows in G and J indicated Ki67 positive or Annexin V positive hybrids respectively. Scale bar: 50 μm. **(K-L)** The expression of markers for ESCs (Oct4, Nanog), mesoderm (Gata4), endoderm (Hand1), neuroectoderm (Nestin, Noggin and Otx2), HSPCs (c-Kit and Sca1) or terminally differentiated neurons (Tuj-1) were evaluated in YFP hybrids formed after BIO-treated (K) or non-treated (L) HSPCs^{Cre} injected into NMDA-damaged eyes of R26Y mice and sacrificed 24 (white bars), 48 (grey bars) and 72 h (black bars) after cell transplantation. Data are means ±s.e.m.; n=30.

Figure 16. Proliferation and gene expression in the hybrids. **(A-B)** RT-PCR analysis of untransplanted NMDA-damaged R26Y retinas (A) or of untreated (No BIO, grey bars) or BIO-treated (BIO, black bars) HSPCs cells. **(C)** Confocal photomicrographs of NMDA-damaged Nanog-GFP retinas transplanted with DiD-

labelled and BIO-treated human CD34+ HSPCs (red). YFP positive hybrids (green/red cells, yellow arrows) were detected. **(D-E)** Ki67 (D) and Annexin V (E) staining were performed on YFP-positive reprogrammed hybrids obtained after injection of BIO-treated or untreated ESCs in NMDA-damaged R26Y eyes. Positive hybrids were evaluated as the percentage of positive cells relative to the total number of YFP hybrids. Data are means ±s.e.m.; n=30. P value <0.001 (***). **(F)** The expression of markers for mesoderm (Gata4), endoderm (Hand1), neuroectoderm (Nestin, Noggin and Otx2), terminally differentiated neurons (Tuj-1) or ESCs (Oct4, Nanog) were evaluated in YFP hybrids formed after BIO-treated $HSPCs^{Cre}$ injection into NMDA-damaged eyes of R26Y mice sacrificed 24 (white bars), 48 (grey bars) and 72h (black bars) after cell transplantation. Data are means of n=30.

Figure 17. NMDA-damaged retinas can be regenerated after fusion of transplanted HSPCs. **(A)** H&E staining showing increase in thickness of the inner nuclear layer (inl, brackets) and regeneration of the ganglion cell layer (gcl, arrowheads) in NMDA-damaged retina one month after BIO-$HSPCs^{Cre}$ transplantation. Arrows indicated ganglion cell loss in the NMDA-damaged retinas. Scale bars: 50 mm. **(B-C)** Quantification of ganglion nuclei in the gcl **(B)** and nuclear rows in the inl **(C)** as counted in vertical retinal sections of damaged (NMDA) or undamaged retinas transplanted with BIO-treated (BIO) or untreated HSPCs. Data are means ±s.e.m. (n = 30). ***P < 0.001. **(D)** Neurons in the gcl were counted along nasotemporal (left) and dorsoventral (right) axes and graphed cells per millimeter squared. A total of 80 different images composing the whole retina were counted for each sample. Data are means ±s.e.m. from 3 retinas. *P < 0.01. ON: optic nerve. **(E)** Total cells in the gcl excluding endothelial cells were counted along nasotemporal (left) and dorsoventral (right) axes and graphed as density maps. Dark red corresponds to a cell density of 10,000 cells/mm^2, as indicated in the color bar.

Figure 18. Long-term differentiation potential of the hybrids obtained after cell fusion-mediated reprogramming. **(A)** Experimental strategy to identify YFP+ hybrids one month after BIO-treated or untreated $HSPCs^{Cre}$ in NMDA-damaged R26Y retinas. **(B)** YFP+ neurons were detected in NMDA-injured R26Y retinal flat mounts one month after BIO-$HSPCs^{Cre}$ transplantation. Nuclei were counterstained with DAPI (blue).

Scale bars: 50 μm. A higher magnification of the YFP+ neurons is shown in the right panel. **(C)** YFP+ differentiated hybrids (green) expressed either the ganglion cell marker SMI-32 (left, red) or the amacrine cell marker Chat (right, red). **(D)** YFP+ axons (green) were detected in optic nerves from eyes transplanted with BIO-HSPCs^{Cre}, but not with untreated- HSPCs^{Cre}. A higher magnification of the YFP+ positive axons (green) in the optic nerve is shown in the right panel.

Figure 19. Analysis of bone marrow replacement efficiency and analysis of hybrid proliferation and apoptosis after endogenous BM mobilization and cell fusion.**(A)** Representative haemochromocytometric analysis of mice one month after bone marrow replacement. **(B-C)** Ki67 (B) and Annexin V (C) staining were performed on YFP-positive reprogrammed hybrids obtained 24h after injection of BIO in NMDA-damaged R26Y eyes from mice that received BM$^{RFP/Cre}$ replacement.

Figure 20. Endogenous BM-derived cells recruited in damaged eyes can fuse with retinal neurons. **(A)** Experimental scheme. R26Y mice received BM$^{RFP/Cre}$ transplantation via tail vein injection after sub-lethal irradiation. After BM reconstitution (1 month), right eyes received an intravitreal injection of NMDA, left eyes were not injected; the mice were analyzed 24 h later. Only in case of cell fusion of recruited-BM cells (red) and neurons, YFP/RFP double positive hybrids are detected. **(B-F)** Double positive YFP/RFP hybrids were detected in NMDA-damaged (B-C, NMDA) but not in healthy (D-E, No NMDA) eyes. (F) The percentage of YFP/RFP double positive hybrids with respect to the total number of detected RFP cells was calculated. **(G-K)** Immunohystochemical analysis of the retinal cell-fusion partners. YFP hybrids (green) are also positive for Sca1 (G) and c-Kit (H) HSPCs markers and for ganglion (I, Thy1.1, red), amacrine (J, syntaxin, red) and Müller (K, GS, red) retinal cell markers 24 h after NMDA damage. Yellow arrows indicate double positive cells. Scale bar: 50 μm.

Figure 21. Endogenous BM cell fusion-mediated reprogramming of retinal neurons is induced by BIO. **(A)** Experimental scheme. Nestin-Cre mice received BM^{R26Y} transplantation via tail vein injection after sub-lethal irradiation. After BM reconstitution (1 month), right eyes received an intravitreal injection of BIO+NMDA, while the contralateral eyes were injected with NMDA alone. Only in case of cell

fusion-mediated reprogramming of hybrids between recruited-BMCs^{R26Y} and neurons, Nestin-mediated Cre expression leads to expression of the YFP. **(B-C)** Only after BIO injection (C), YFP positive reprogrammed hybrids (green) after fusion of recruited BM-cells and damaged neurons were detected. In contrast no YFP hybrids (B) were seen in NMDA-damaged eyes without BIO. **(D-E)** Percentages of proliferating (Ki67 positive, D) or dying (AnnexinV positive, E) hybrids were evaluated as the number of YFP double positive cells with the respect to the total amount of YFP cells. Data are means ±s.e.m.; n=30. **(F-I)** Confocal photomicrographs of NMDA+BIO treated retinas show expression of Oct4 (red in F-G) and Nanog (red in H-I) proteins in YFP-reprogrammed hybrids (green, see merge in G and I). Percentages of Oct4 and Nanog positive hybrids (E) were evaluated as the number of YFP double positive cells with the respect to the total amount of YFP cells. Data are means ±s.e.m.; n=30.

Figure 22. Macrophage/monocyte analysis after HSPCs transplantation. **(A)** Representative confocal image of flat-mounted NMDA-damaged retinas 1 month after transplantation of untreated HSPCs. Only few YFP+ cells (green) were detected. Scale bars: 50 μm. **(B)** Optic nerve harvested 24 h after transplantation of HSPCs^{Cre} in NMDA-damaged R26Y eyes. Scale bars: 200 μm **(C-F)** FACS analysis as percentages of RFP+/YFP+ hybrids also positive for CD45 **(C-E)** and Mac1 **(D-F)** staining 24 h **(C, D)** and 2 weeks **(E, F)** after transplantation of HSPCs$^{Cre/RFP}$ in NMDA-damaged R26Y eyes.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Retinal regeneration can be achieved by implanting some types of cells into the retina of a subject, said cells having properties of stem cells or progenitor cells such as hematopoietic stem cells, progenitor cells and/or mesenchymal stem cells. These cells fuse with retinal cells such as retinal neurons, e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, and the like, or with retinal glial cells, e.g., Müller cells, to form hybrid cells which in turn de-differentiate and finally differentiate in retinal neurons of interest, e.g., photoreceptor cells and/or ganglion cells, etc., wherein activation of Wnt/β-catenin signalling pathway in the implanted cells or in the hybrid cells is essential to induce de-differentiation of said hybrid cells and final re-differentiation in the retinal neurons of interest. In an embodiment, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is, at least partially, provided by the implanted cells (which have been treated with a Wnt/β-

catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator), whereas in another embodiment, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is only provided as a result of administering a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, to the subject to be treated or as a consequence of a retinal damage or injury, as occurs in, for example, retinal degeneration diseases.

Use of cells having properties of stem cells or progenitor cells for treatment of retinal degeneration diseases by reprogramming, mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway, of retinal cells fused to said cells

Treatment A

In an aspect, the invention relates to a cell, said cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, for use in the treatment of a retinal degeneration disease. In other words, according to this aspect, the invention provides a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

Thus, the invention provides a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, wherein said cell is treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or it is a cell that overexpresses a Wnt/β-catenin signalling pathway activator for use in the treatment of a retinal degeneration disease. As a result of said treatments, or cell manipulation to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, the cell has its Wnt/β-catenin signalling pathway activated and can be used in the treatment of a retinal degeneration disease. To that end the cell so treated or manipulated is implanted in the eye of a subject in need of treatment of a retinal degeneration disease.

In other words, this aspect of the invention relates to the use of a cell, said cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease; or, alternatively, this aspect of the invention relates to the use of a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, wherein said cell is treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or overexpresses a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease.

According to Treatment A, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is, at least partially, provided by the implanted cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell. . The subject to be treated may also have activated the Wnt/β-catenin signalling pathway after retinal damage or injury.In general, the Wnt/β-catenin signalling pathway is activated when the target genes are transcribed; by illustrative, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway may be confirmed by conventional techniques, for example, by analyzing the expression of the target genes, e.g., Axin2, by means known by the skilled person in the art to analyze the expression of genes, such as, for example, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), or by detection of β-catenin translocation in the nuclei of the cells by conventional techniques, such as, for example, by immunostaining, or by detecting the phosphorylation of Dishevelled or the phosphorylation of the LRP tail, etc.

The manner in which the Wnt/β-catenin signalling pathway is activated can vary. By illustrative, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway in a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC) can be achieved by treating said cell with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, in such a way that said pathway is activated, or by manipulating the cell to overexpress a protein or peptide which is a Wnt/β-catenin

signalling pathway activator, as it will be discussed below. Alternatively, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway can be achieved as a consequence of a retinal damage or injury, as occurs in, for example, retinal degeneration diseases or by administering a Wnt/β-catenin signalling pathway activator to the subject to be treated or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, in such a way that said pathway is activated, as it will be discussed below.

The term "Hematopoietic stem cell" or "HSC", in plural "HSCs", as used herein refers to a multipotent stem cell that gives rise to all the blood cell types from the myeloid (monocytes and macrophages, neutrophils, basophils, eosinophils, erythrocytes, megakaryocytes/platelets, dendritic cells), and lymphoid lineages (T-cells, B-cells, NK-cells). HSCs are a heterogeneous population. Three classes of stem cells exist, distinguished by their ratio of lymphoid to myeloid progeny (L/M) in blood. Myeloid-biased (My-bi) HSCs have low L/M ratio (>0, <3), whereas lymphoid-biased (Ly-bi) HSCs show a large ratio (>10). The third category consists of the balanced (Bala) HSCs for which $3 \leq L/M \leq 10$. As stem cells, HSCs are defined by their ability to replenish all blood cell types (multipotency) and their ability to self-renew. In reference to phenotype, HSCs are identified by their small size, lack of lineage (lin) markers, low staining (side population) with vital dyes such as rhodamine 123 (rhodamine DULL, also called rholo) or Hoechst 33342, and presence of various antigenic markers on their surface. In humans, the majority of HSCs are CD34+CD38-CD90+CD45RA-. However, not all HSCs are covered by said combination that, nonetheless, has become popular. In fact, even in humans, there are HSCs that are CD34-CD38-. In a preferred embodiment the HSC is a mammalian cell, preferably a human cell.

In a particular embodiment the HSC is a long-term HSC (LT-HSC), i.e., a hematopoietic stem cell which is capable of contributing to hematopoiesis for months or even a lifetime and it is characterized by CD34-, CD38-, SCA-1+, Thy1.1+/low, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+.

In another particular embodiment the HSC is a short-term HSC (ST-HSC), i.e., a HSC which has a reconstitution ability that is limited to several weeks and it is CD34+, CD38+, SCA-1+, Thy1.1+/low, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+, Mac-1 (CD11b)low.

The term "CD34" as used herein refers to a cluster of differentiation present on certain cells within the human body. It is a cell surface glycoprotein and functions as a cell-cell adhesion factor. It may also mediate the attachment of stem cells to bone marrow extracellular matrix or directly to stromal cells. Cells expressing CD34 (CD34+ cell) are normally found in the umbilical cord and bone marrow as hematopoietic cells, a subset of mesenchymal stem cells, endothelial progenitor cells, endothelial cells of blood vessels but not lymphatics. The complete protein sequence for human CD34 has the UniProt accession number P28906 (July 26, 2012).

The term "CD38" as used herein refers to a cluster of differentiation 38, also known as cyclic ADP ribose hydrolase is a glycoprotein found on the surface of many immune cells (white blood cells), including CD4+, CD8+, B and natural killer cells. CD38 also functions in cell adhesion, signal transduction and calcium signalling. CD38 is a type II transmembrane protein that functions as a signalling molecule and mediates the adhesion between lymphocytes and endothelial cells. It also functions enzymatically in the formation and hydrolyzation of the second messenger cyclic ADP ribose. In the hematopoietic system, CD38 is most highly expressed on plasma cells. The complete protein sequence for human CD38 has the UniProt accession number P28907 (July 26, 2012).

The term "CD90" or Thy-1 as used herein refers to Cluster of Differentiation 90, a 25–37 kDa heavily N-glycosylated, glycophosphatidylinositol (GPI) anchored conserved cell surface protein with a single V-like immunoglobulin domain (The immunoglobulin domain is a type of protein domain that consists of a 2-layer sandwich of between 7 and 9 antiparallel β-strands arranged in two β-sheets with a Greek key topology), originally discovered as a thymocyte antigen. The complete protein sequence for human CD90 has the UniProt accession number P04216 (July 26, 2012).

The term "CD45" as used herein refers to family consisting of multiple members that are all products of a single complex gene. This gene contains 34 exons and three exons of the primary transcripts are alternatively spliced to generate up to eight different mature mRNAs and after translation eight different protein products. These three exons generate the RA, RB and RC isoforms. Various isoforms of CD45 exist: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45R0, CD45R (ABC). The

complete protein.sequence for human CD45 has the UniProt accession number P08575 (July 26, 2012).

The term "SCA-1" refers to ataxin 1 which function is unknown. The complete protein sequence for human SCA-1 has the UniProt accession number P54253 (July 26, 2012).

The term "c-kit" refers to a Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR), also known as proto-oncogene c-Kit or tyrosine-protein kinase Kit or CD117, is a protein that in humans is encoded by the KIT gene. CD117 is a receptor tyrosine kinase type III, which binds to stem cell factor, also known as "steel factor" or "c-kit ligand". The complete protein sequence for human c-kit has the UniProt accession number P10721 (July 26, 2012).

The term "CD135", as used herein refers to Cluster of differentiation antigen 135 (CD135) also known as Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) or receptor-type tyrosine-protein kinase.CD135 is a cytokine receptor expressed on the surface of hematopoietic progenitor cells. The complete protein sequence for human CD135 has the UniProt accession number P36888 (July 26, 2012).

The term "SLAMF1", as used herein refers to signalling lymphocytic activation molecule is a protein that in humans is encoded by the SLAMF1 gene. SLAMF1 has also recently has been designated CD150 (cluster of differentiation 150). The complete protein sequence for human SLAMF1 has the UniProt accession number Q13291 (July 26, 2012).

The term "Mac-1 (CD11b)", as used herein refers to a Integrin alpha M (ITGAM) is one protein subunit that forms the heterodimeric integrin alpha-M beta-2 ($\alpha M\beta 2$) molecule, also known as macrophage-1 antigen (Mac-1) or complement receptor 3 (CR3). ITGAM is also known as CR3A, and cluster of differentiation molecule 11B (CD11B). The complete protein sequence for human Mac-1 has the UniProt accession number P11215 (July 26, 2012).

The term "lin" refers to lineage markers, a standard cocktail of antibodies designed to remove mature hematopoietic cells from a sample. Those antibodies are targeted to CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, TER-119, and Gr-1 in mice and CD3 (T lymphocytes), CD14 (Monocytes), CD16 (NK cells, granulocytes), CD19 (B lymphocytes), CD20 (B lymphocytes), and CD56 (NK cells) in humans.

A "progenitor cell" refers to a cell that is derived from a stem cell by differentiation and is capable of further differentiation to more mature cell types. Progenitor cells typically have more restricted proliferation capacity as compared to stem cells. In a particular embodiment, the progenitor cell is a hematopoietic progenitor cell derived from a HSC by differentiation during the progression from HSCs to differentiated functional cells. The hematopoietic progenitor cell is characterized by the markers CD34+CD38-CD90-CD45RA-. In a preferred embodiment the progenitor cell is a mammalian cell, preferably a human cell.

In a particular embodiment the progenitor cell is an Early Multipotent Progenitor (Early MPP) characterized by CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135+, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)low, CD4low.

In another particular embodiment the progenitor cell is a Late Multipotent Progenitor (Late MPP) defined by CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135high, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)low, CD4low.

In another particular embodiment the progenitor cell is a Lineage-restricted Progenitor (LRP) cell characterized by CD150-CD48+CD244+.

In another particular embodiment the progenitor cell is a Common Myeloid Progenitor (CMP), i.e., a colony forming unit that generates myeloid cells characterized by CD34+CD38+IL3Ra^{low}CD45RA-, In another particular embodiment the progenitor cell is a Granulocyte-Macrophage Progenitor (GMP), the precursor for monoblasts and myeloblasts characterized by CD34+CD38+IL3Ra-CD45Ra-.

In another particular embodiment, the progenitor cell is a Megakaryocyte-Erythroid Progenitor (MEP) characterized by CD34+CD38+IL3RA+ CD45RA-.

The term "CD4" as used herein refers to cluster of differentiation 4. It is a glycoprotein found on the surface of immune cells such as T helper cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells. CD4 is a co-receptor that assists the T cell receptor (TCR) with an antigen-presenting cell. Using its portion that resides inside the T cell, CD4 amplifies the signal generated by the TCR by recruiting an enzyme, known as the tyrosine kinase lck, which is essential for activating many molecules involved in the signalling cascade of an activated T cell. CD4 also interacts directly with MHC class II molecules on the surface of the antigen-presenting cell using its extracellular domain.

The complete protein sequence for human CD4 has the UniProt accession number P01730 (July 26, 2012).

The term "CD244" as used herein refers to CD244 molecule, natural killer cell receptor 2B4. This gene encodes a cell surface receptor expressed on natural killer (NK) cells (and some T cells) that mediate non-major histocompatibility complex (MHC) restricted killing. The interaction between NK-cell and target cells via this receptor is thought to modulate NK-cell cytolytic activity. The complete protein sequence for human CD244 has the UniProt accession number Q9BZW8 (July 26, 2012).

The term "IL3RA" as used herein refers to Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity) (IL3RA), also known as CD123 (Cluster of Differentiation 123), is a type I transmembrane protein of 41.3 Kda and IL3RA has been shown to interact with Interleukin 3. The complete protein sequence for human IL3RA has the UniProt accession number P26951 (July 26, 2012).

The term "Mesenchymal stem cell" or "MSC", in plural "MSCs", as used herein, refers to a multipotent stromal cell that can differentiate into a variety of cell types, including: osteoblasts (bone cells), chondrocytes (cartilage cells), and adipocytes (fat cells). Markers expressed by mesenchymal stem cells include CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 and Stro-1 as well as the adhesion molecules CD106, CD166, and CD29. Among negative markers for MSCs (not expressed) are hematopoietic markers CD45, CD34, CD14, and the costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 as well as the adhesion molecule CD31.

The term "CD105" as used herein refers to endoglin, a type I membrane glycoprotein located on cell surfaces and is part of the TGF beta receptor complex. The complete protein sequence for human CD105 has the UniProt accession number P17813 (July 26, 2012).

The term "CD73" as used herein refers to 5'-nucleotidase (5'-NT), also known as ecto-5'-nucleotidase or CD73 (Cluster of Differentiation 73), is an enzyme that in humans is encoded by the NT5E gene. The complete protein sequence for human CD73 has the UniProt accession number P21589 (July 26, 2012).

The term "CD44" refers to antigen is a cell-surface glycoprotein involved in cell–cell interactions, cell adhesion and migration. The complete protein sequence for human CD44 has the UniProt accession number P16070 (July 26, 2012).

The term "CD71", as used herein refers to Transferrin receptor protein 1 (TfR1) also known as (Cluster of Differentiation 71) (CD71) is a protein that is required for iron delivery from transferrin to cells. The complete protein sequence for human CD71 has the UniProt accession number P02786 (July 26, 2012).

The term "STRO-1" as used herein refers to a cell surface protein expressed by bone marrow stromal cells and erythroid precursors.

The term "CD106" refers to a Vascular cell adhesion protein 1 also known as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) or cluster of differentiation 106 (CD106) is a protein that in humans is encoded by the VCAM1 gene and functions as a cell adhesion molecule. The complete protein sequence for human CD106 has the UniProt accession number P19320 (July 26, 2012).

The term "CD166" as used herein, refers to a 100-105 kD typeI transmembrane glycoprotein that is a member of the immunoglobulin superfamily of proteins. The complete protein sequence for human CD166 has the UniProt accession number Q13740 (July 26, 2012).

The term "CD29" as used herein refers to a integrin beta-1 is an integrin unit associated with very late antigen receptors. The complete protein sequence for human CD29 has the UniProt accession number P05556 (July 26, 2012).

The term "CD14", as used herein refers to cluster of differentiation 14 which is a component of the innate immune system. The complete protein sequence for human CD14 has the UniProt accession number P08571 (July 26, 2012).

The term "CD80" as used herein Cluster of Differentiation 80 (also CD80 and B7-1) is a protein found on activated B cells and monocytes that provides a costimulatory signal necessary for T cell activation and survival. The complete protein sequence for human CD80 has the UniProt accession number P33681 (July 26, 2012).

The term "CD86" as used herein refers to Cluster of Differentiation 86 (also known as CD86 and B7-2) is a protein expressed on antigen-presenting cells that provides costimulatory signals necessary for T cell activation and survival. The complete protein sequence for human CD86 has the UniProt accession number P42081 (July 26, 2012).

The term "CD40" as used herein refers to a costimulatory protein found on antigen presenting cells and is required for their activation. The complete protein sequence for human CD40 has the UniProt accession number P25942 (July 26, 2012).

The term "CD31", as used herein, refers to a Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) also known as cluster of differentiation 31 (CD31) is a protein that plays a key role in removing aged neutrophils from the body. The complete protein sequence for human CD31 has the UniProt accession number P16284 (July 26, 2012).

The presence/absence of a marker in a cell can be determined, for example, by means of flow cytometry using conventional methods and apparatuses. For instance, a BD LSR II Flow Cytometer (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US) with commercially available antibodies and following protocols known in the art may be employed. Thus, cells emitting a signal for a specific cell surface marker more intense than the background noise can be selected. The background signal is defined as the signal intensity given by a non-specific antibody of the same isotype as the specific antibody used to detect each surface marker in the conventional FACS analysis. In order for a marker to be considered positive, the observed specific signal must be 20%, preferably, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% or above more intense than the background signal using conventional methods and apparatuses (e.g. by using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences Corp., Franklin Lakes, NJ, US) and commercially available antibodies). Otherwise the cell is considered negative for said marker.

In a particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A, said cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated, is a HSC. In another particular embodiment, said cell is a LT-HSC or a ST-HSC.

In another particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A, said cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated, is a progenitor cell. In another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A, said cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated, is a MSC.

The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention may be forming part of a population of said cells which use in the treatment of a retinal degeneration disease constitutes an additional aspect of the present invention.

Thus, in other aspect, the invention further relates to a cell population comprising a plurality of cells, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC) and any combination thereof, for use in the treatment of a retinal degeneration disease. Thus, according to this aspect, the invention provides a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

In other words, the invention relates to a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any combination thereof, wherein said cell are treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or said cells overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, for use in the treatment of a retinal degeneration disease. As a result of said treatments, or cell manipulation to overexpress a protein or peptide which is a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, the cells of the cell population have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated and can be used in the treatment of a retinal degeneration disease. To that end the cell population is implanted in the eye of a subject in need of treatment of a retinal degeneration disease.

Alternatively drafted this aspect of the invention relates to the use of a cell population comprising a plurality of cells, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells, MSCs and any combination thereof, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease; or, alternatively, to the use of a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any

combination thereof, wherein said cells are treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, in such a way that said Wnt/β-catenin signalling pathway is activated, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease.

The particulars of said HSCs, progenitor cells, and MSCs have been previously mentioned. The particulars of the above mentioned treatments aimed to activate the Wnt/β-catenin signalling pathway will be discussed below.

In a particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises a plurality, i.e., more than two, of HSCs, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said HSCs are selected from LT-HSC, ST-HSC and combinations thereof.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises a plurality of progenitor cells, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said progenitor cells are selected from Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP, MEP and combinations thereof.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises a plurality of MSCs, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated.

In a particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises at least one HSC and at least one progenitor cell, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC; in another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises at least one HSC and at least one MSC, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises at least one progenitor cell and at least one MSC, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A comprises at least one HSC, at least one progenitor cell and at least one MSC, said cells having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC; in another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In a particular embodiment, a cell population comprising HSCs, precursor cells and MSCs, obtainable from bone marrow, is identified sometimes herein as "HSPC", i.e., as "hematopoietic stem and progenitor cells". Said cell population HSPC may include HSC, progenitor cells and MSCs in different ratios or proportions. Said HSPC cell population can be obtained, for example, from bone marrow, or, alternatively, by mixing HSCs, progenitor cells and MSCs, in the desired ratios or proportions, in order to obtain a HSPC cell population. The skilled person in the art will understand that said cell population may be enriched in any type of specific cells by conventional means, for example, by separating a specific type of cells by any suitable technique based on the use of binding pairs for the corresponding surface markers. Thus, in a particular embodiment, the HSPC cell population may be enriched in HSCs, or in progenitor cells, or in MSCs. In order that said cell population identified as HSPC is suitable for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment A, it is necessary that the cells of said cell population have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated.

For use within the teachings of the present invention, the cell having its Wnt/β-catenin signalling pathway activated and being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, or the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, may be from the same subject, i.e., autologous, in order to minimize the risk

of eventual rejections or undesired side reactions; nevertheless, the invention also contemplates the use of allogeneic cells, i.e., cells from other subject of the same species as that of the recipient subject in which case the use of systemic or local immunosuppressive agents may be recommended, although the retina has low immune response, and, therefore, compatible cells from a different human subject could be used provided that said cells are selected from HSCs, progenitor cells, and MSCs and subjected to a treatment or manipulation to have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated as mentioned above.

The expression "Wnt/β-catenin signalling pathway" refers to a network of proteins that play a variety of important roles in embryonic development, cell differentiation, and cell polarity generation. Unless otherwise indicated, it refers to the canonical Wnt pathway and includes a series of events that occur when Wnt proteins bind to cell-surface receptors of the Frizzled family, causing the receptors to activate Dishevelled family proteins and ultimately resulting in a change in the amount of β-catenin that reaches the nucleus. Dishevelled (DSH) is a key component of a membrane-associated Wnt receptor complex, which, when activated by Wnt binding, inhibits a second complex of proteins that includes axin, glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), and the protein adenomatous polyposis coli (APC). The axin/GSK-3/APC complex normally promotes the proteolytic degradation of the β-catenin intracellular signalling molecule. After this β-catenin destruction complex is inhibited, a pool of cytoplasmic β-catenin stabilizes, and some β-catenin, is able to enter the nucleus and interact with TCF/LEF family transcription factors to promote specific gene expression. Several protein kinases and protein phosphatases have been associated with the ability of the cell surface Wnt-activated Wnt receptor complex to bind axin and disassemble the axin/GSK3 complex. Phosphorylation of the cytoplasmic domain of LRP by CK1 and GSK3 can regulate axin binding to LRP. The protein kinase activity of GSK3 appears to be important for both the formation of the membrane-associated Wnt/FRZ/LRP/DSH/Axin complex and the function of the Axin/APC/GSK3/β-catenin complex. Phosphorylation of β-catenin by GSK3 leads to the destruction of β-catenin.

A "Wnt/β-catenin signalling pathway activator", as used herein, refers to a molecule capable of activating the Wnt/β-catenin signalling pathway. In general, the Wnt/β-catenin signalling pathway is activated when the target genes are transcribed; by

illustrative, activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway may be confirmed by analyzing the expression of the target genes, e.g., Axin2, by RT-PCR, or by detection of β-catenin translocation in the nuclei of the cells by, e.g., immunostaining, or by detecting the phosphorylation of Dishevelled or the phosphorylation of the LRP tail, etc. Wnt/β-catenin signalling pathway activators may act on membrane receptors of Wnt signalling proteins and on the proteins that comprise the signalling cascade. Illustrative, non-limiting examples of Wnt/β-catenin signalling pathway activators include peptides or proteins as well as chemical compounds other than peptides or proteins (i.e., non-peptide drugs", such as :

- peptides or proteins, for example, Wnt protein isoforms such as Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 or Wnt16; β-catenin; a spondin, such as a R-spondin, etc.; or functional variants thereof, e.g., peptides or proteins that have an amino acid sequence that is at least 40%, typically at least 50%, advantageously at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80%, still more preferably at least 90% identical to the amino acid sequences of the previously mentioned peptides or proteins and that maintain the ability to activate the Wnt/β-catenin signalling pathway; or
- non-peptide compounds, for example, 2-(4-acetylphenylazo)-2-(3,3-dimethyl-3,4-dihydro-2H-isoquinolin-1-ylidene)-acetamide (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-yloxy)-9-(1,1'-biphenyl-4-yl)methyl)-9*H*-purin-6-ylamino]-3-phenyl-propan-1-ol (QS11), deoxycholic acid (DCA), 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine, or an (hetero)arylpyrimidine disclosed by Gilbert et al., in Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 20, Issue 1, 1 January 2010, 366-370.

Examples of Wnt protein isoforms, which belong to the Wnt secreted proteins family and act as activators of the Wnt/β-catenin signalling pathway, include the following or orthologues thereof (Swiss-prot references):

Homo sapiens: Wntl: P04628; Wnt2: P09544; Wnt2b/13: Q93097; Wnt3: P56703; Wnt3a: P56704; Wnt4: P56705; Wnt5a: P41221; Wnt5b: Q9H1J7; Wnt6: Q9Y6F9; Wnt7a: O00755; Wnt7b: P56706; Wnt8a:

Q9H1J5; Wnt9a: 014904; Wnt9b: 014905; Wntl0a: Q9GZT5; Wntl0b: 000744; Wntll: 096014; Wnt16: Q9UBV4;

Mus musculus: Wntl: P04426; Wnt2: P21552.1; Wnt2b/13: O70283.2; Wnt3: P17553; Wnt3a: P27467; Wnt4: P22724; Wnt5a: P22725; Wnt5b: P22726; Wnt6: P22727.1; Wnt8a: Q64527; Wnt9a: Q8R5M2; Wnt9b: 035468.2; Wntl0a: P70701; Wntl0b: P48614; Wntll: P48615; Wntl6: Q9QYSl.l;

as well as a functional isoform, variant or fragment thereof, i.e., an isoform, variant or fragment thereof having the ability to activate the Wnt/β-catenin signalling pathway.

Examples of β-catenin include the following or orthologues thereof (Swiss-prot references):

Homo sapiens: P35222;

Mus musculus: Q02248;

as well as a functional isoform, variant or fragment thereof, i.e., an isoform, variant or fragment thereof having the ability to activate the Wnt/β-catenin signalling pathway.

The R-Spondins (RSpo) are 4 secreted agonists of the canonical Wnt/β-catenin signalling pathway. Also known as cysteine-rich and single thrombospondin domain containing proteins (Cristins), R-Spondins share around 40% amino acid identity (Lowther, W. et al. (2005) J. Virol. 79:10093; Kim, K.-A. et al. (2006) Cell Cycle 5:23). All the R-Spondins contain two adjacent cysteine-rich furin-like domains followed by a thrombospondin (TSP-1) motif and a region rich in basic residues. Only the furin-like domains are needed for β-catenin stabilization (Kim, K.-A. et al. (2006) Cell Cycle 5:23; Kazanskaya, O. et al. (2004) Dev. Cell 7:525). Injection of recombinant R-Spondin 1 in mice causes activation of β-catenin and proliferation of intestinal crypt epithelial cells, and ameliorates experimental colitis (Kim, K.-A. et al. (2005) Science 309:1256; Zhao, J. et al. (2007) Gastroenterology 132:1331). R-Spondin 1 (RSPO1) appears to regulate Wnt/β-catenin by competing with the Wnt antagonist DKK-1 for binding to the Wnt co-receptor, Kremen. This competition reduces internalization of DKK-1/LRP-6/Kremen complexes (Binnerts, M.E. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:147007). Illustrative, non-limitative, examples of R-Spondins which act as

activators of the Wnt/β-catenin signalling pathway, include the following or orthologues thereof (Swiss-prot references):

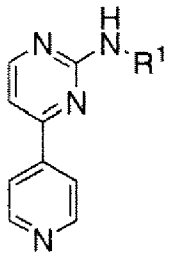
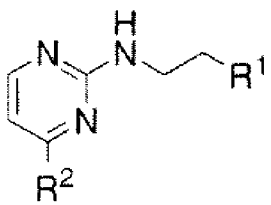
Homo sapiens: R-spondin-1: Q2MKA7; R-spondin-2: Q6UXX9; R-spondin-3: Q9BXY4; R-spondin-4: Q2IOM5, or a functional isoform, variant or fragment thereof, i.e., an isoform, variant or fragment thereof having the ability to activate the Wnt/β-catenin signalling pathway, for example, an isoform, variant or fragment thereof that maintain their functional domains.

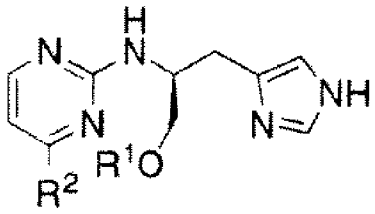
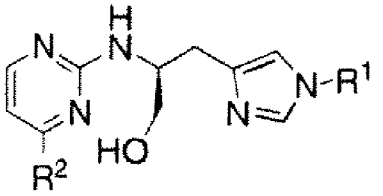
Illustrative, non-limitative, examples of said (hetero)arylpyrimidines include the compounds of formula (I)-(IV) below.

In a particular embodiment, the (hetero)arylpyrimidine is an (hetero)aryl-pyrimidine agonist of the Wnt/β-catenin signalling pathway of formula (I), (II), (III) or (IV) [Table 1].

Table 1

Illustrative examples of (hetero)arylpyrimidines agonists of the Wnt/β-catenin signalling pathway

Compound of formula	Formula	Definitions
(I)		R^1 is N-(3-1*H*-imidazol-1-yl)propane), N-(2-pyridin-4-yl)ethane), N-(2-pyridin-3-yl)ethane), N-(3-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)propyl), N-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethane), or N-(S)-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-propan-1-ol amine
(II)		R^1 is CH_2-1*H*-imidazole, 4-pyridine, 3-(1*H*-indole), 3-(2-methyl-1*H*-indol-5-ol), or 4-(1*H*-imidazole); and R^2 is 4-(pyridin-4-yl), 4-(pyridin-3-yl), 4-(3-nitrophenyl), 2-(benzo[b]thiophene) or 2-(naphthyl)

(III)		R^1 is H, ethyl, methylenecyclohexyl, 2-fluoro-3-(trifluoromethyl)benzyl or prop-2-ynyl; and R^2 is 2-(benzo[b]thiophene) or 2-(naphthyl)
(IV)		R^1 is 3,5-difluorobenzyl, prop-2-ynyl, 2-acetamide or 3-propanitrile; and R^2 is 2-(benzo[b]thiophene) or 2-(naphthyl)

An "inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor", as used herein, refers to a molecule capable of activating the Wnt/β-catenin signalling pathway by inhibiting or blocking a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, i.e., a compound which represses, blocks or silences the activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. Illustrative, non-limitative, examples of Wnt/β-catenin signalling pathway repressors include glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), and the like.

Illustrative, non-limitative, examples of inhibitors of SFRP1 include 5-(phenylsulfonyl)-N-(4-piperidinyl)-2-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide (WAY-316606).

- Illustrative, non-limitative, examples of inhibitors of GSK-3 include:lithium salts (e.g., lithium chloride), 6-bromoindirubin-3□oxime (BIO), 6-bromoindirubin-3□acetoxime (BIO-acetoxime), 6-{2-[4-(2,4-dichloro-phenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-ethyl-amino}-nicotino-nitrile (CHIR99021), *N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]-*N*'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea (AR-A014418), 3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (SB-216763), 5-benzylamino-3-oxo-2,3-dihydro-1,2,4-thiadiazole (TDZD-20), 3-[(3-chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitro-phenyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (SB415286), etc., or functional analogs or derivatives thereof, i.e., compounds which contain functional groups which render the compound of interest when administered to a subject.

Further examples of GSK-3 inhibitors are known to those skilled in the art. Examples are described in, for example, WO 99/65897 and WO 03/074072 and references cited therein. For example, various GSK-3 inhibitor compounds are disclosed in US 2005/0054663, US 2002/0156087, WO 02/20495 and WO 99/65897 (pyrimidine and pyridine based compounds); US 2003/0008866, US 2001/0044436 and WO01/44246 (bicyclic based compounds); US 2001/0034051 (pyrazine based compounds); and WO 98/36528 (purine based compounds). Further GSK-3 inhibitor compounds include those disclosed in WO 02/22598 (quinolinone based compounds), US 2004/0077707 (pyrrole based compounds); US 2004/0138273 (carbocyclic compounds); US 2005/0004152 (thiazole compounds); and US 2004/0034037 (heteroaryl compounds). Further GSK-3 inhibitor compounds include macrocyclic maleimide selective GSK-3 β inhibitors developed by Johnson & Johnson and described in, for example, *Kuo et al.* (2003) *J Med Chem* **46**(19):4021-31, a particular example being 10,11,13,14,16,17,19,20,22,23-Decahydro-9,4:24,29-dimetho-1H -dipyrido (2,3-n:3′,2′-t) pyrrolo (3,4-q)-(1,4,7,10,13,22) tetraoxadiazacyclotetracosine-1,3 (2H)-dione. Further, substituted aminopyrimidine derivatives CHIR 98014 (6-pyridinediamine, N6-[2-[[4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(1H-imidazol-1-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]-3-nitro-) and CHIR 99021 (6-{2-[4-(2,4-dichloro-phenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)-pyrimidin-2-ylamino]-ethylamino}-nicotinonitrile) inhibit human GSK-3 potently. Also, a number of other GSK-3 inhibitors which may be useful in the present invention are commercially available from Calbiochem®, for example: 5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-(2-phenylquinazolin-4-yl)amine, 4-benzyl-2-methyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione (TDZD8), 2-thio(3-iodobenzyl)-5-(1-pyridyl)-[1,3,4]-oxadiazole, 3-(1-(3-hydroxy-propyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl]-4-pyrazin-2-yl-pyrrole-2,5-dione, etc. Included within the scope of the invention are the functional analogs or derivatives of the above mentioned compounds.

For a review of compounds capable of activating the Wnt/β-catenin signalling pathway see Chen et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010, Barker et al., Nat Rev Drug Discov. 2006 and Meijer et al, Trends Pharmacol Sci. 2004.

In a particular embodiment, the compound used for treating a cell selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any combination thereof, in such a way that the Wnt/β-catenin signalling pathway thereof is activated is selected

from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, or functional variants or fragments thereof, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)-benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine such as, for example, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I); (II), (III) or (IV) [Table 1], a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and any combinations thereof. In a particular embodiment, said Wnt protein isoform is selected from the group consisting of Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, and combinations thereof, or functional variants or fragments thereof. In another particular embodiment, said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is β-catenin or a functional variant or fragment thereof. In another particular embodiment, said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is a R-spondin such as R-spondin-1, R-spondin-2, R-spondin-3, R-spondin-4, or a functional isoform, variant or fragment thereof.

In another particular embodiment, the SFRP1 inhibitor is WAY-316606. In another particular embodiment, the GSK-3 inhibitor is selected from the group consisting of a lithium salt, preferably, lithium chloride, BIO, BIO-acetoxime, CHIR99021, AR-A014418, SB-216763, TDZD-20, SB415286, and any combination thereof.

In a preferred embodiment, the Wnt/β-catenin signalling pathway activator is selected from the group consisting of Wnt3a, β-catenin, R-spondin-1, and a combination thereof. In another preferred embodiment, the inhibitor of the Wnt β-catenin signalling pathway repressor is selected from the group consisting of BIO, CHIR99021, and a combination thereof.

In a particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, alone or in a cell population comprising a plurality of said cells, the cell being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, is a cell treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator in such a way that said pathway is activated. According to this embodiment, a cell, or a plurality of cells, selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, is contacted, e.g., cultured or incubated, with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator. The amount of said Wnt/β-catenin signalling pathway activator may vary within a range; nevertheless, preferably, the Wnt/β-catenin

signalling pathway activator will be added in a suitable amount, i.e., in an amount which allows to obtain a specific amount of β-catenin accumulated in the nucleus of the cells. By illustrative, in a particular embodiment, a range of about 100 to about 300ng/ml of Wnt3a may be used to treat said cells under suitable specific culture conditions. The amount of Wnt/β-catenin signalling pathway activator which allows to obtain a specific amount of β-catenin accumulated in the cells and translocated in the nucleus of the cells with which cell fusion-mediated reprogramming is observed can be determined by the skilled person in the art by conventional assays, for example, by contacting the cell with a Wnt/β-catenin pathway activator, at different concentrations and during different periods of time before transplantation of the so treated cells into an animal and then analyzing if cell fusion-mediated reprogramming occurs, for example, by detecting and/or determining the expression of undifferentiated cells markers, e.g., Nanog, Oct4, Nestin, Otx2, Noggin, SSEA-1, etc. In a particular embodiment, the cells are treated with Wnt3a as Wnt/β-catenin pathway activator, in a suitable amount of about 100-300 ng/µl for 24 h before transplantation of the treated cells.

In another particular embodiment, the cell, alone or in cell population comprising a plurality of said cells, for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, is a cell treated with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor in such a way that said pathway is activated. According to this embodiment, a cell selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, is contacted, e.g., cultured or incubated, with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor. The amount of said inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor may vary within a range; nevertheless, preferably, the inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor will be added in a suitable amount, i.e., in an amount which allows to obtain a specific amount of β-catenin accumulated in the nucleus of the cells. By illustrative, in a particular embodiment, a range of about 1 to about 3 µM of BIO may be used to treat said cells in a specific culture condition (see below). The amount of inhibitor of Wnt/β-catenin pathway repressor which allows to obtain a specific amount of β-catenin accumulated in the cells and translocated in the nucleus of the cells with which cell fusion-mediated reprogramming is observed can be determined by the skilled person in the art by means

of an assay as that mentioned in Example 1. Briefly, said assay comprises contacting the cell with an inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor, at different concentrations and during different periods of time before transplantation of the so treated cells into an animal and then analyzing if cell fusion-mediated reprogramming occurs, for example, by detecting and/or determining the expression of undifferentiated cells markers, e.g., Nanog, Oct4, Nestin, Otx2, Noggin, SSEA-1, etc. In a particular embodiment, the cells are treated with BIO as an inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor (GSK-3), in a suitable amount of about 1-3 μM for 24 h before transplantation of the treated cells.

In another particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, which may be present in a cell population as mentioned above, is a cell that overexpresses a Wnt/β-catenin pathway activator.

As used herein, a "cell that overexpresses a Wnt/β-catenin signalling pathway activator" is a cell, such as a cell selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, that has been genetically manipulated to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, wherein said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is a peptide or protein. In a particular embodiment, said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is a Wnt protein isoform such as Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, or a functional variant or fragment thereof. In another particular embodiment, said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is β-catenin or a functional variant or fragment thereof.. In another particular embodiment, said Wnt/β-catenin signalling pathway activator is a R-spondin such as R-spondin-1, R-spondin-2, R-spondin-3, R-spondin-4, or a functional isoform, variant or fragment thereof. In an embodiment, the polynucleotide comprising the nucleotide sequence encoding the Wnt/β-catenin signalling pathway activator is comprised in an expression cassette, and said polynucleotide is operatively bound to (i.e., under the control of) an expression control sequence of said polynucleotide comprising the nucleotide sequence encoding the Wnt/β-catenin signalling pathway activator. Expression control sequences are sequences that control and regulate transcription and, where appropriate, translation of a protein, and include promoter sequences, sequences encoding transcriptional regulators, ribosome binding sequences (RBS) and/or transcription terminator

sequences. In a particular embodiment, said expression control sequence is functional in eukaryotic cells, such as mammalian cells, preferably human cells, for example, the human cytomegalovirus (hCMV) promoter, the combination of the cytomegalovirus (CMV) early enhancer element and chicken beta-actin promoter (CAG), the eukaryotic translation initiation factor (eIF) promoter, etc.

Advantageously, said expression cassette further comprises a marker or gene encoding a motive or for a phenotype allowing the selection of the host cell transformed with said expression cassette. Illustrative examples of said markers that could be present in the expression cassette of the invention include antibiotic-resistant genes, toxic compound-resistant genes, fluorescent marker-expressing genes, and generally all those genes that allow selecting the genetically transformed cells. The gene construct can be inserted in a suitable vector. The choice of the vector will depend on the host cell where it will subsequently be introduced. By way of illustration, the vector in which the polynucleotide comprising the nucleotide sequence encoding the Wnt/β-catenin signalling pathway activator is introduced can be a plasmid or a vector which, when introduced in a host cell, either becomes integrated or not in the genome of said cell. Said vector can be obtained by conventional methods known by persons skilled in the art [Sambrook and Russell, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 2001 Vol 1-3]. In a particular embodiment, said recombinant vector is a vector that is useful for transforming animal cells, preferably mammalian cells. Said vector can be used to transform, transfect or infect cells such as cells selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells and MSCs. Transformed, transfected or infected cells can be obtained by conventional methods known by persons skilled in the art [Sambrok and Russell, (2001), cited *supra*].

The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell and a MSC, preferably isolated cells, may be used to initiate, or seed, cell cultures. The specific cells may be isolated in view of their markers as it has been previously mentioned. Isolated cells may be transferred to sterile tissue culture vessels, either uncoated or coated with extracellular matrix or ligands such as laminin, collagen (native, denatured or crosslinked), gelatin, fibronectin, and other extracellular matrix proteins. The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to

the invention may be cultured in any suitable culture medium (depending on the nature of the cells) capable of sustaining growth of said cells such as, for example, DMEM (high or low glucose), advanced DMEM, DMEM/MCDB 201, Eagle's basal medium, Ham's F10 medium (F10), Ham's F-12 medium (F12), Iscove's modified Dulbecco's - 17 medium, DMEM/F12, RPMI 1640, etc. If necessary, the culture medium may be supplemented with one or more components including, for example, fetal bovine serum (FBS); equine serum (ES); human serum (HS); beta-mercaptoethanol (BME or 2-ME), preferably about 0.001% (v/v); one or more growth factors, for example, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), leukocyte inhibitory factor (LIF), stem cell factor (SCF) and erythropoietin; cytokines as interleukin-3 (IL-3), interleukin-6 (IL-6), FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3); amino acids, including L-valine; and one or more antibiotic and/or antimycotic agents to control microbial contamination, such as, for example, penicillin G. streptomycin sulfate, amphotericin B, gentamicin, and nystatin, either alone or in combination. The cells may be seeded in culture vessels at a density to allow cell growth.

Methods for the selection of the most appropriate culture medium, medium preparation, and cell culture techniques are well known in the art and are described in a variety of sources, including Doyle et al., (eds.), 1995, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley &Sons, Chichester; and Ho and Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston.

As it is shown in Example 1, the cells, or the cell population, for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, transplanted into the subretinal space of *rd1* mice at postnatal day 10 (p10) fuse with rods and Müller cells, thus forming hybrids which de-differentiate and finally re-differentiate in retinal neurons, for example photoreceptor cells such as rods, etc., ganglion cells, etc. In this case, the activation of Wnt/β-catenin signalling pathway in the transplanted cells appears to be essential to induce de-differentiation of newly formed hybrids that finally re-differentiate in newborn retinal neurons. Further, the newborn photoreceptor cells fully regenerate the retina in the transplanted mice, with rescue of functional vision. These data demonstrate that cell fusion-mediated regeneration is a very efficient process in mammalian retina, and that it can be triggered by activation of Wnt/β-catenin

signalling pathway. Retinitis Pigmentosa (RP) is a very severe disease for which no treatment is currently available. However, retinal regeneration through transplantation of the cells or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention constitutes an approach for the rescue of vision in subjects affected by RP or even by a variety of retinal degeneration diseases.

The cells or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention can be used as a cell therapy for treating a retinal degeneration disease since, once transplanted into a target location in the eye, said cells fuse with retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, thus providing hybrid cells which differentiate into one or more phenotypes. According to the invention, the treatment of the retinal degeneration disease occurs by reprogramming of retinal cells mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, e.g., retinal neurons and/or retinal glial cells. Reprogramming, in general, can be referred to the passage of a cell from the differentiated state (or differentiated cell – i.e., a cell specialized for a specific function, such as a heart, liver, etc., that cannot generate other types of cells) to an undifferentiated state (or undifferentiated stem cell - i.e., a cell not specialized for a specific function that retains the potential to give rise to specialized cells), both at level of embryonic state or progenitor state; but also reprogramming can be referred to the passage from one differentiated state to another differentiated state (for example, a fibroblast that becomes a neuron without going back to a precursor/embryonic state, or a retinal neuron that becomes another retinal neuron without going back to a precursor/embryonic state). In this description, "reprogramming" refers only to the de-differentiation of a somatic cell which is followed by differentiation of the hybrid cells previously formed as a result of the cell fusion between a cell (e.g., a HSC, a progenitor cell or a MSC) and a somatic cell (e.g., a retinal neuron or a retinal glial cell).

As used herein, the expression "cell fusion" relates to cell-cell fusion that occurs spontaneously or mediated by exogenous agents. Cell-cell fusion regulates many developmental processes as well as cell fate and cell differentiation. Somatic cells can fuse spontaneously with stem cells, and the resulting hybrid clones have a stem cell-like phenotype. The stem cell features of stem cells are dominant over the somatic cell traits and allow the reprogramming of the somatic cell nucleus. Thus, cell-cell fusion is a way

to force the fate of a cell, and in the case of fusion with cells, such as HSCs, progenitor cells or MSCs, this mechanism induces cellular reprogramming, that is, dedifferentiation of somatic cells. The inventors have shown that fusion-mediated reprogramming of a somatic cell is greatly enhanced by time-dependent activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. After Wnt binding to its receptors or inhibition of GSK-3, as a component of the destruction complex, β-catenin is stabilized and translocates into the nucleus, where it activates several target genes.

As used herein, the term "retinal neuron" refers to the neurons which form part of the retina. The retina is a light-sensitive tissue lining the inner surface of the eye. It is a layered structure with several layers of neurons interconnected by synapses. The only neurons that are directly sensitive to light are the photoreceptor cells. These are mainly of two types: rods and cones. Rods function mainly in dim light and provide black-and-white vision, while cones support daytime vision and the perception of colour. A third, much rarer type of photoreceptor, the photosensitive ganglion cell, is important for reflexive responses to bright daylight. Neural signals from the rods and cones undergo processing by other neurons of the retina. The output takes the form of action potentials in retinal ganglion cells whose axons form the optic nerve. The retinal neurons further include horizontal cells, bipolar cells, amacrine cells, interplexiform cells, ganglion cells, among others. In addition to said cells there are glial cells in the retina such as Müller cells (Müller glia), which are the main glial cell of the retina and act as supporting cells, astrocytes and microglial cells (Webvision – The Organization of the Retina and Visual System, Part II, Chapter entitled "Glial cells of the Retina", by Helga Kolb, dated July 31, 2012).

In a particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons such as rods and the like and retinal glial cells such as Müller cells, etc., which fuse with the cells or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, e.g., BIO-treated HSPCs (Example 1). In another particular embodiment, the retinal neurons comprise ganglion cells and/or amacrine cells which fuse with the transplanted HSPCs (Example 2). In another particular embodiment it is contemplated the fusion of cells selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells, MSCs and any combination thereof, including the the cells for use in the treatment

of a retinal degeneration disease according to the invention, or a population thereof, e.g., HSPCs, with endogenous proliferating cells (e.g., RSPCs).

The final retinal neurons which may obtained after reprogramming of the fused retinal neurons may vary, for example, photoreceptor cells, ganglion cells, interneurons, etc. In a particular embodiment, fused retinal neurons (e.g., rods) and retinal glial cells (e.g., Müller cells) are reprogrammed to mainly rods (Example 1), whereas in another particular embodiment fused retinal neurons (e.g., ganglion cells and/or amacrine cells) are reprogrammed to ganglion cells and interneurons (Example 2).

Although the inventors wish not to be bound by any theory, it is believed that the reprogrammed retinal neurons may be of the same type (or different) as that of the retinal neuron fused to the cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, e.g., a rod may be reprogrammed to a rod or to another type of retinal neuron such as, e.g., a ganglion cell, an amacrine cell, etc.; a ganglion cell may be reprogrammed to a ganglion cell or to another type of retinal neuron such as, e.g., a rod, an amacrine cell, etc.; an amacrine cell may be reprogrammed to an amacrine cell or to another type of retinal neuron such as, e.g., a rod, a ganglion cell, etc. Further, a retinal glial cell, such as a Müller cell, after fusion with a cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, may be reprogrammed to a retinal neuron such as a rod, or to another type of retinal neuron such as, e.g., a ganglion cell, an amacrine cell, etc. Indeed, Example 1 shows fusion of HSPCs with rods and the differentiation of the hybrid cells only into rods.

In a particular embodiment, the treatment of said retinal degeneration disease comprises reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.) and/or retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.) mediated by cell fusion of said cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention with said retinal cells and differentiation of the resulting hybrid cells to retinal neurons such as photoreceptor cells (e.g., rods, etc.), ganglion cells, amacrine cells, etc. In another particular embodiment, the treatment of said retinal degeneration disease comprises reprogramming of retinal neurons mediated by cell fusion of said cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention with said retinal neurons and

differentiation of the resulting hybrid cells to the same or different type of retinal neurons for example photoreceptor cells, such as rods, etc., ganglion cells, amacrine cells, etc.

In a particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.) and retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.).

A "retinal degeneration disease", as defined herein, is a disease associated with deterioration of the retina caused by the progressive and eventual death of the cells of the retinal tissue. The term "retinal degeneration disease" also includes indirect causes of retinal degeneration, i.e., retinal degenerative conditions derived from other primary pathologies, such as cataracts, diabetes, glaucoma, etc. In a particular embodiment, said retinal degeneration disease is selected from the group comprising retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, etc., as well as retinal degenerative conditions derived from other primary pathologies, such as cataracts, diabetes, glaucoma, etc. In a particular embodiment, said retinal degeneration disease derives from cataracts, diabetes or glaucoma. In another particular embodiment, said retinal degeneration disease is age-related macular degeneration that is presented in two forms: "dry" that results from atrophy to the retinal pigment epithelial layer below the retina, which causes vision loss through loss of photoreceptors (rods and cones) in the central part of the eye; and "wet" that causes vision loss due to abnormal blood vessel growth (choroidal neovascularization) in the choriocapillaris, through Bruch's membrane, ultimately leading to blood and protein leakage below the macula, eventually causing irreversible damage to the photoreceptors and rapid vision loss. In a more particular embodiment, said retinal degeneration disease is RP, a heterogeneous family of inherited retinal disorders characterized by progressive degeneration of the photoreceptors with subsequent degeneration of RPE, which is characterized by pigment deposits

predominantly in the peripheral retina and by a relative sparing of the central retina. In most of the cases of RP, there is primary degeneration of photoreceptor rods, with secondary degeneration of cones.

In the context of the present invention, "treatment of retinal degeneration disease" means the administration of the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, or a population of said cells, or a pharmaceutical composition comprising said cells or a pharmaceutical composition comprising cells other than the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention (see Treatment B below) to prevent or treat the onset of symptoms, complications or biochemical indications of a retinal degeneration disease, to alleviate its symptoms or to stop or inhibit its development and progression such as, for example, the onset of blindness. The treatment can be a prophylactic treatment to delay the onset of the disease or to prevent the manifestation of its clinical or subclinical symptoms or a therapeutic treatment to eliminate or alleviate the symptoms after the manifestation of the disease.

Survival of transplanted cells in a living subject may be determined through the use of a variety of scanning techniques, e.g., computerized axial tomography (CAT or CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) or positron emission tomography (PET) scans. Alternatively, determination of transplant survival may also be done post mortem by removing the tissue and examining it visually or through a microscope. Examining restoration of the ocular function that was damaged or diseased can assess functional integration of transplanted cells into ocular tissue of a subject. For example, effectiveness in the treatment of retinal degeneration diseases may be determined by improvement of visual acuity and evaluation for abnormalities and grading of stereoscopic color fundus photographs (Age-Related Eye Disease Study Research Group, NEI5 NIH, AREDS Report No. 8, 2001, Arch. Ophthalmol. 119: 1417-1436).

For the administration to a subject, the cells or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention may be formulated in a pharmaceutical composition, preparation or formulation, using pharmaceutically acceptable carriers, which particulars will be discussed below under section entitled "Pharmaceutical composition".

Treatment B

In another aspect, the invention relates to a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell, for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. In other words, according to this aspect, the invention provides a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming, mediated by the Wnt/β-catenin signalling pathway, of a retinal cell, such as a retinal neuron and/or a retinal glial cell, by fusion of said cell with said retinal cell upon contact of said cell with said retinal cell in the eye of a subject.

Alternatively, in other words, this aspect of the invention relates to the use of a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, a mesenchymal stem cell, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway.

The particulars of the cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell, a progenitor cell, a mesenchymal stem cell, and the retinal degeneration disease to be treated have been previously discussed in connection with above Treatment A, whose particulars are hereby incorporated.

In a particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.) and retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.).

In contrast to above Treatment A, in Treatment B it is not necessary that the cell (HSC, progenitor cell or MSC) to be implanted has its Wnt/β-catenin signalling

pathway activated at the time of the cell is implanted into the eye because said pathway may be endogenously activated or by administration of a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, as it will be discussed below. Thus, according to Treatment B, it is not necessary that the cell (HSC, progenitor cell or MSC) is treated, prior to its implantation into the eye, with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor or that overexpresses a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, but what is necessary is that retinal regeneration occurs by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. In this case, the activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway may be endogenous, i.e., it can be achieved by the subject to which the cells are to be administered (implanted or transplanted) as a consequence of a damage, lesion or injury in the retina (what may occur in retinal degeneration diseases) or by administration of a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor. Several assays performed by the inventors have shown that after endogenous activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway reprogramming of the hybrid cells formed after damage is observed (Example 2). On the other hand, recruitment of endogenous bone marrow cells (BMCs) after damage in the eye and ectopic activation of Wnt/β-catenin signalling pathway is sufficient to observe reprogramming of the hybrid cells (Example 2). Therefore, in a particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B (i.e., by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway) is a BMC (c-kit+, sca-1+) recruited from the bone marrow (BM) into the eye and the eye is treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator in order to obtain regeneration of the retinal tissue.

The effects of the activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway, as well as illustrative, non-limitative, examples of Wnt/β-catenin signalling pathway activators and inhibitors of Wnt/β-catenin signalling pathway repressors have been discussed in connection with above Treatment A, whose particulars are hereby incorporated.

Example 2 shows that upon activation of Wnt/β-catenin signalling pathway, mouse retinal neurons can be transiently reprogrammed *in vivo* back to a precursor stage after spontaneous fusion with transplanted cells (e.g., HSPCs, or ESCs). Newly formed hybrid cells reactivate neuronal precursor markers (e.g., HSPCs and ESCs reprogramme retinal neurons back to Nanog and Nestin expression). Further, said hybrid cells can proliferate, differentiate along a neuro-ectodermal lineage (in the case of hybrid cells formed by HSPCs and retinal neurons), and finally into terminally differentiated retinal neurons (e.g., photoreceptor cells), which can regenerate the damaged retinal tissue; alternatively, hybrid cells formed by ESCs and retinal neurons can also proliferate and differentiate, in addition to the neuroectodermal lineage, in endoderm and ectoderm lineages what may result in formation of a teratoma. Following retinal damage and induction of Wnt/β-catenin signalling pathway in the eye, cell-fusion-mediated reprogramming also occurs after endogenous mobilisation of bone marrow cells in the eyes. These data show that *in-vivo* reprogramming of terminally differentiated retinal neurons is a possible mechanism of tissue regeneration.

In a particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B, is a HSC. In another particular embodiment, said cell is a LT-HSC or a ST-HSC.

In another particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B, is a progenitor cell. In another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B, is a MSC.

The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B may be forming part of a population of said cells which use in the treatment of a retinal degeneration disease constitutes an additional aspect of the present invention.

Thus, the invention further relates to a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC) and any combination thereof, for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B.

In other words, the invention relates to a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any combination thereof, for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cell with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. To that end the cell population is implanted in the eye of a subject in need of treatment of a retinal degeneration disease. Thus, according to this aspect, the invention provides a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any combination thereof, for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming, mediated by the Wnt/β-catenin signalling pathway, of a retinal cell, such as a retinal neuron and/or a retinal glial cell, by fusion of said cell with said retinal cell upon contact of said cell with said retinal cell in the eye of a subject.

Alternatively drafted this aspect of the invention relates to the use of a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells, MSCs and any combination thereof, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. or, alternatively, to the use of a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC and any combination thereof, in the manufacture of a pharmaceutical composition for the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway.

The particulars of said HSCs, progenitor cells, and MSCs have been previously mentioned.

In a particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.). In another particular embodiment,

the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.) and retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.).

In a particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises a plurality, i.e., more than two, of HSCs. In a particular embodiment, said HSCs are selected from LT-HSC, ST-HSC and combinations thereof.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises a plurality of progenitor cells. In a particular embodiment, said progenitor cells are selected from Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP, MEP and combinations thereof.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises a plurality of MSCs.

In a particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises at least one HSC and at least one progenitor cell. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC; in another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises at least one HSC and at least one MSC. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises at least one progenitor cell and at least one MSC. In a particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In another particular embodiment, the cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B comprises at least one HSC, at least one progenitor cell and at least one MSC. In a particular embodiment, said HSC cell is a LT-HSC or a ST-HSC; in another particular embodiment, said progenitor cell is an Early MPP, a Late MPP, a LRP, a CMP, a GMP or a MEP.

In a particular embodiment, a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatment B is the cell composition identified as “HSPC”, i.e., a cell population comprising HSCs, progenitor cells and MSCs; said cell

population can be obtained, for example, from bone marrow, or, alternatively, by mixing HSCs, progenitor cells and MSCs, in the desired ratios or proportions, in order to obtain a HSPC cell population. Thus, said cell population HSPC may include HSC, progenitor cells and MSCs in different ratios or proportions. The skilled person in the art will understand that said cell population may be enriched in any type of specific cells by conventional means, for example, by separating a specific type of cells by any suitable technique based on the use of binding pairs for the corresponding surface markers. Thus, in a particular embodiment, the HSPC cell population may be enriched in HSCs, or in progenitor cells, or even in MSCs.

Compositions

In another aspect, the invention relates to a cell composition, hereinafter referred to as "cell composition of the invention", wherein at least 50% of the cells of said cell composition are selected from the group consisting of hematopoietic stem cells (HSCs), progenitor cells, mesenchymal stem cells (MSCs) and any combination thereof and wherein said cells have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated, or wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, or, wherein said cells have been treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or wherein said cells overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

In a particular embodiment, the cell composition of the invention is a composition wherein at least 60%, preferably 70%, more preferably 80%, still more preferably 90%, yet more preferably 95%, and even more preferably 100% of the cells are HSCs, progenitor cells, and/or MSCs, in any ratio, having their Wnt/β-catenin signalling pathway activated (as a result, for example, of having been treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, or by manipulation to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator). The cell composition of the invention further comprises a medium; said medium must be compatible with the cells contained in said composition; illustrative, non-limitative examples of media which can be present in the cell composition of the invention include isotonic solutions optionally supplemented with

serum; cell culture media or, alternatively, a solid, semisolid, gelatinous or viscous support medium.

Pharmaceutical compositions

The cells and cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A and B of the present invention may be administered in a pharmaceutical composition, preparation, or formulation, by using pharmaceutically acceptable carriers.

Thus, in an aspect, the invention relates to a pharmaceutical composition, hereinafter referred to as "pharmaceutical composition of the invention", selected from the group consisting of:

1) a pharmaceutical composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, and a pharmaceutically acceptable carrier, and

2) a pharmaceutical composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In order that the HSCs, progenitor cells, and/or MSCs have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated [pharmaceutical composition of the invention 1)], said HSCs, progenitor cells and/or MSCs are treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or are manipulated in order to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

The pharmaceutical composition of the invention can be used in the treatment of a retinal degeneration disease.

As used herein, the term "carrier" includes vehicles, media or excipients, whereby the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to

Treatments A or B of the invention can be administered. Obviously, said carrier must be compatible with said cells. Illustrative, non-limiting examples of suitable pharmaceutically acceptable carriers include any physiologically compatible carrier, for example, isotonic solutions (e.g., 0.9% NaCl sterile saline solution, phosphate buffered saline (PBS) solution, Ringer-lactate solution, etc.) optionally supplemented with serum, preferably with autologous serum; cell culture media (e.g., DMEM, etc.); etc.

The pharmaceutical composition of the invention may comprise auxiliary components as would be familiar to medicinal chemists or biologists, for example, an antioxidant agent suitable for ocular administration (e.g., EDTA, sodium sulfite, sodium metabisulfite, mercaptopropionyl glycine, N-acetyl cysteine, beta- mercaptoethylamine, glutathione and similar species, ascorbic acid and its salts or sulfite or sodium metabisulfite, etc.), a buffering agent to maintain the pH at a suitable pH to minimize irritation of the eye (e.g., for direct intravitreal or intraocular injection, the pharmaceutical compositions should be at pH 7.2 to 7.5, alternatively at pH 7.3-7.4), a tonicity agent suitable for administration to the eye (e..g., sodium chloride to make compositions approximately isotonic with 0.9% saline solution), a viscosity enhancing agent (e.g., hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, etc.), etc. In some embodiments, the pharmaceutical composition of the invention may contain a preservative (e.g., benzalkonium chloride, benzethonium chloride, chlorobutanol, phenylmercuric acetate or nitrate, thimerosal, methyl or propylp8arabens, etc.). Said pharmaceutically acceptable substances which can be used in the pharmaceutical composition of the invention are generally known by the persons skilled in the art and are normally used in the preparation of cell compositions. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described, for example, in "Remington's Pharmaceutical Sciences", of E.W. Martin.

The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention may be administered alone (e.g., as substantially homogeneous populations) or as mixtures with other cells, for example, neurons, neural stem cells, retinal stem cells, ocular progenitor cells, retinal or corneal epithelial stem cells and/or other multipotent or pluripotent stem cells. Where the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention are administered with other cells, they may be administered simultaneously or

sequentially with the other cells (either before or after the other cells). The cells of different types may be mixed with the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention immediately or shortly prior to administration, or they may be co-cultured together for a period of time prior to administration.

The cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention may be administered with at least one pharmaceutical agent, such as, for example, growth factors, trophic factors, conditioned medium, or other active agents, such as anti-inflammatory agents, anti apoptotic agents, antioxidants, neurotrophic factors or neuroregenerative or neuroprotective drugs as known in the art, either together in a single pharmaceutical composition, or in separate pharmaceutical compositions, simultaneously or sequentially with the other agents (either before or after administration of the other agents); it is expected that the use of said agents increases the efficiency of the cell regeneration or decreases cell degeneration.

Examples of said other agents or components that may be administered with the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention include, but are not limited to: (1) other neuroprotective or neurobeneficial drugs; (2) selected extracellular matrix components, such as one or more types of collagen known in the art, and/or growth factors, platelet-rich plasma, and drugs (alternatively, the cells may be genetically engineered to express and produce growth factors); (3) anti- apoptotic agents (e.g., erythropoietin (EPO), EPO mimetibody, thrombopoietin, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, hepatocyte growth factor, caspase inhibitors); (4) anti- inflammatory compounds (e.g., p38 MAP kinase inhibitors, TGF-beta inhibitors, statins, IL-6 and IL-1 inhibitors, Pemirolast, Tranilast, Remicade, Sirolimus, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) such as, for example, tepoxalin, tolmetin, and suprofen; (5) immunosuppressive or immunomodulatory agents, such as calcineurin inhibitors, mTOR inhibitors, antiproliferatives, corticosteroids and various antibodies; (6) antioxidants such as probucol, vitamins C and E, coenzyme Q- 10, glutathione, L-cysteine, N- acetylcysteine, etc.; and (7) local anesthetics, to name a few.

The pharmaceutical composition of the invention may be typically formulated as liquid or fluid compositions, semisolids (e.g., gels or hydrogels), foams, or porous solids (e.g., polymeric matrices, composites, calcium phosphate derivatives, and the like, as appropriate for ophthalmic tissue engineering) or particles for cell encapsulation from natural or synthetic origin to allow a better administration of the cells or a higher survival and function. In a particular embodiment, the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention may be administered in semi-solid or solid devices suitable for surgical implantation; or may be administered with a liquid carrier (e.g., to be injected into the recipient subject). Thus, said cells may be surgically implanted, injected or otherwise administered directly or indirectly to the site of ocular damage or distress. When cells are administered in semi-solid or solid devices, surgical implantation into a precise location in the body is typically a suitable means of administration. Liquid or fluid pharmaceutical compositions, however, may be administered to a more general location in the eye (e.g., intra-ocularly).

The pharmaceutical composition of the invention may be delivered to the eye of a subject in need thereof (patient) in one or more of several delivery modes known in the art. In an embodiment the pharmaceutical composition is implanted or delivered to the retina or surrounding area, via periodic intraocular or intravitrea injection, or under the retina. In addition ideally cells will be delivered only one time at the early onset of the disease, however if there will be a reversion of the phenotype it might be possible additional deliveries during the life of the subject. As it will be understood by a person skilled in the art, sometimes the direct administration of the pharmaceutical composition of the invention to the site wishing to benefit can be advantageous. Therefore, the direct administration of the pharmaceutical composition of the invention to the desired organ or tissue can be achieved by direct administration (e.g., through injection, etc.) by means of inserting a suitable device, e.g., a suitable cannula, or by other means mentioned in this description or known in the technique.

Pharmaceutical compositions for injection may be designed for single-use administration and do not contain preservatives. Injectable solutions may have isotonicity equivalent to 0.9% sodium chloride solution (osmolality of 290-300

milliosmoles). This may be attained by addition of sodium chloride or excipients such as buffering agents and antioxidants, as listed above.

The administration of the pharmaceutical composition of the invention to the subject will be carried out by conventional means, for example, said pharmaceutical composition can be administered to said subject through intravitreal route by using suitable devices such as syringes, cannulas, etc. In all cases, the pharmaceutical composition of the invention will be administered using equipment, apparatuses and devices suitable for administering cell compositions known by the person skilled in the art.

Dosage forms and regimes for administering the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention or any of the other pharmaceutical compositions described herein are developed in accordance with good medical practice, taking into account the condition of the subject, e.g., nature and extent of the retinal degenerative condition, age, sex, body weight and general medical condition, and other factors known to medical practitioners. Thus, the effective amount of a pharmaceutical composition to be administered to a subject will be determined by these considerations as known in the art.

Nevertheless, in general, the pharmaceutical composition of the invention (or any of the other pharmaceutical compositions described herein) will contain a therapeutically effective amount of the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention, preferably a substantially homogenous population of said cells to provide the desired therapeutic effect. In the sense used in this description, the term "therapeutically effective amount" relates to the amount of cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention which is capable of producing the desired therapeutic effect (e.g., regenerate total or partially the retina and/or rescue of functional vision, and the like) and will generally be determined by, among other factors, the characteristics of said cells themselves and the desired therapeutic effect. Generally, the therapeutically effective amount of said cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention that must be administered will depend on, among other factors, the characteristics of the subject himself, the seriousness of the disease, the dosage form, etc. For this purpose, the dose

mentioned in this invention must only be taken into account as a guideline for the person skilled in the art, who must adjust this dose depending on the aforementioned factors. In a particular embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is administered in a dose containing between about 10^4 and about 10^{10} cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention per eye, preferably between about 10^6 and 10^8 cells per eye. The dose of said cells can be repeated depending on the status and evolution of the subject in temporal intervals of days, weeks or months that must be established by the specialist in each case.

In some occasions, it may be desirable or appropriate to pharmacologically immunosuppress a subject prior to initiating cell therapy. This may be accomplished through the use of systemic or local immunosuppressive agents, or it may be accomplished by delivering the cells in an encapsulated device. These and other means for reducing or eliminating an immune response to the transplanted cells are known in the art. As an alternative, the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention may be genetically modified to reduce their immunogenicity.

Kits

In another aspect, the invention relates to a kit, hereinafter referred to as "kit of the invention", selected from the group consisting of:

1) a kit comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, and instructions for use of the kit components, and
2) a kit comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and instructions for use of the kit components.

In order that the HSCs, progenitor cells, and/or MSCs have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated [kit of the invention 1)], said HSCs, progenitor cells and/or MSCs are treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or are manipulated in order to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

The kit of the invention can be used in the treatment of a retinal degeneration disease.

The particulars of the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to Treatments A or B of the invention, pharmaceutical composition of the invention, and retinal degeneration disease to be treated have been previously mentioned and are incorporated herein.

Methods of treatment

According to another aspect of the invention, a method is provided for treating a subject having a retinal degeneration disease (i.e., a patient), which comprises administering to said subject in need of treatment a cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, a pharmaceutical composition of the invention, in an amount effective to treat the retinal degeneration disease, wherein said treatment of the retinal degeneration disease occurs by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway.

The particulars of the cells for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to the invention, pharmaceutical compositions of the invention, retinal degeneration diseases to be treated and effective amount to treat said diseases have been previously mentioned and are incorporated herein.

In a particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.). In another particular embodiment, the retinal cells comprise retinal neurons (e.g., rods, ganglion cells, amacrine cells, etc.) and retinal glial cells (e.g., Müller cells, etc.).

In a particular embodiment, the method for treating a subject having a retinal degeneration disease comprises the administration of a pharmaceutical composition of the invention 1), i.e., a pharmaceutical composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC, and any combination thereof, wherein said cells have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated, and a pharmaceutically acceptable carrier, in an amount effective to treat the retinal degeneration disease, wherein said treatment of the retinal degeneration disease occurs by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway.

In order that the HSCs, progenitor cells, and/or MSCs have their Wnt/β-catenin signalling pathway activated [kit of the invention 1)], said HSCs, progenitor cells and/or MSCs are treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or are manipulated in order to overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

In another aspect, the invention provides a method for treating a subject having a retinal degeneration disease (i.e., a patient), which comprises administering to said subject in need of treatment a cell selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells and MSCs, or a cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of HSCs, progenitor cells, MSCs, and any combination thereof, or a pharmaceutical composition comprising said cell or cell population, in an amount effective to treat the retinal degeneration disease, wherein said treatment of the retinal degeneration disease occurs by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway.

In a particular embodiment, the above method for treating a subject having a retinal degeneration disease comprises the administration of a pharmaceutical composition composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a HSC, a progenitor cell, a MSC, and any combination thereof, together with, optionally, a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and a pharmaceutically acceptable carrier, in made

from cells other than the cells of the invention, in an amount effective to treat the retinal degeneration disease, wherein said treatment of the retinal degeneration disease occurs by reprogramming of retinal cells, such as retinal neurons and/or retinal glial cells, mediated by cell fusion of said cells with said retinal cells, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin pathway.

The present invention is further illustrated, but not limited by, the following examples.

EXAMPLE 1

Haematopoietic stem cell fusion triggers retinal regeneration in a mouse model of Retinitis Pigmentosa

1. Methods

Cell preparation

Lineage-negative HSPCs were isolated from total bone marrow of Cre-RFP mice (mice stably expressing CRE and red fluorescent protein [RFP]; provided by Jackson Laboratories) using Lineage Cell Depletion kits (Miltenyi Biotech). They were treated either with 1 μM BIO or PBS and with 1 μM tamoxifen for 24 h before transplantation.

Animals

R26Y^{rd1} mice (mice carrying the R26Lox-Stop-Lox-YFP transgene and homozygous for the *rd1* mutation) [Srinivas *et al.*, *BMC Dev Biol* **1**, 4 (2001)].

Transplantation

A range of 10^5-10^6 cells were transplanted in mice previously anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine: metomidine (80 mg/kg: 1.0 mg/kg, i.p.), the eye lid opened carefully, a small incision made below the ora serrata and 1 up to 5 μl of a solution containing cell suspension in PBS was injected into the vitreus or in the subretinal space. The capillary was maintained in the eye for about 3 seconds to avoid reflux.

Hybrid FACS sorting

For gene expression analysis, 24 h after cell transplantation mouse retinal tissues were isolated and disaggregated in trypsin, by mechanical trituration. A FACS cell sorter was used to isolate the red and green positive hybrid cells. Total RNA was extracted using RNA Isolation Micro kits (Qiagen), according to the manufacturer protocol. The RNA was reverse-transcribed with SuperScript III (Invitrogen) and qRT-PCR reactions using Platinum SYBR green qPCix-UDG (Invitrogen) were run in an ABI Prism 7000 real-time PCR machine. All experiments were performed in triplicate, and differences in cDNA input were compensated for by normalisation to expression of GAPDH. The primers used in the qRT-PCR analysis are shown in Table 2.

Table 2
Mouse specific primers for qRT-PCR

Species/Gene	Sequence 5'-3'	SEQ ID NO:
Gata1	SuperArray Bioscience Corporation [Catalog No. PPM24651A-200]	
Rhodopsin	Fw GTAGATGACCGGGTTATAGATGGA	1
	Rv GCAGAGAAGGAAGTCACCCGC	2
RDS	Fw CGGGACTGGTTCGAGATTC	3
	Rv ATCCACGTTGCTCTTGCTGC	4
Crx	Fw ATCCGCAGAGCGTCCACT	5
	Rv CCCATACTCAAGTGCCCCTA	6
Rx	Fw GTTCGGGTCCAGGTATGGTT	7
	Rv GCGAGGAGGGGAGAATCCTG	8
Chx10	Fw ATCCGCAGAGCGTCCACT	9
	Rv CGGTCACTGGAGGAAACATC	10
Nestin	Fw TGGAAGTGGCTACA	11
	Rv TCAGCTTGGGGTCAGG	12
Noggin	Fw CTTGGATGGCTTACACACCA	13
	Rv TGTGGTCACAGACCTTCTGC	14
Otx2	Fw GAGCTCAGTCGCCACCTCTACT	15
	Rv CCGCATTGGACGTTAGAAAAG	16

[Fw: Forward; Rv: Reverse]

TUNEL assay

Apoptotic nuclei were detected by TdT-mediated dUTP terminal nick-end labeling kit (TUNEL, fluorescein; Roche Diagnostics, Monza, Italy) according to the producer s protocols.

H&E staining

Briefly, tissue sections were stained with Histo•Perfect™ *H&E Staining Kit*™. (Manufacturer: BBC Biochemical) according to the producer s protocols.

Samples treatment

Tissues were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde overnight, and then embedded in OCT compound (Tissue-Tek). Horizontal serial sections of 10-mm thickness were processed for analysis. For fluoresceine immunostaining, the primary antibodies used were: anti-Nestin (1:300, Abcam), anti-Otx2 (1:200, Abcam), anti-Noggin (1:200, Abcam), anti-Thy1.1 (1:100, Abcam), anti-syntaxin (1:50, Sigma), anti-glutamine synthetase (Sigma, 1:100) anti-Annexin V (1:200, Abcam) and anti-Ki67 (Sigma, 1.100). The secondary antibodies used were: anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 or Alexa Fluor 633 (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen).

Statistical analysis

The numbers of immunoreactive or YFP-positive cells within three different retinal areas (40× field) were counted in individual sections. A total of 10 serial sections were examined for each eye, from at least three different mice. For statistical analysis, the data were expressed as means ±SEM, as pooled from at least three independent experiments, each carried out in duplicate.

2. Results

Retinitis Pigmentosa is a devastating blindness disorder that arises from different mutations in more than 100 known genes [Wright *et al. Nat Rev Genet* **11**, 273-284, doi:nrg2717 [pii]10.1038/nrg2717 (2010)]. *Rd1* mice carry a spontaneous recessive

mutation in the *PDE6B* gene that encodes the β subunit of cyclic GMP-specific 3□,5□-cyclic phosphodiesterase. This loss of function mutation results in accumulation of cyclic GMP and Ca^{2+} in the rods, which in turn leads to photoreceptor cell death [Doonan *et al. Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 3530-3538, doi:46/10/3530 [pii]10.1167/iovs.05-0248 (2005)]. *Rd1* mice are homozygous for this mutation, and they represent a severe model for fast progression of this degenerative disease.

HSPCs are multipotent cells that can give rise to all types of blood cells. In addition, they have been proposed to retain some plasticity with some degree of regenerative potential for different tissues, including for the CNS [Alvarez-Dolado, M. *Front Biosci* **12**, 1-12 (2007)].

Activation of the Wnt/β-catenin pathway has been shown to promote proliferation and dedifferentiation of Müller glia (Müller cells) in different mouse models of retinal degeneration, suggesting a possible contribution of this pathway in the modulation of CNS plasticity [Osakada, F. *et al. J Neurosci* **27**, 4210-4219 (2007)]. Indeed, inventors recently reported that periodic activation of the Wnt/β-catenin pathway via Wnt3a or via the GSK-3 inhibitor BIO in embryonic stem cells (ESCs) strongly enhances the reprogramming of neural precursor cells after cell fusion [Lluis *et al. Cell Stem Cell* **3**, 493-507 (2008)]. Inventors, therefore, asked whether fusion of HSPCs with retinal neurons along with a transient activation of the Wnt/β-catenin pathway in transplanted HSPCs might be a mechanism for retinal regeneration and functional vision rescue in *rd1* mice.

Thus, inventors transplanted Lin^- $HSPCs^{CRE/RFP}$ (isolated from donor mice stably expressing CRE and red fluorescent protein [RFP]) subretinally in the eyes of postnatal day 10 (p10) $R26Y^{rd1}$ mice (carrying the R26Lox-Stop-Lox-YFP transgene and homozygous for the *rd1* mutation) and sacrificed the mice 24 h later. It was expected to observe RFP and yellow fluorescent protein (YFP) double-positive hybrid cells in case of cell fusion (Fig. 1a). Indeed, it was observed a very high number of hybrids (RFP/YFP-positive) in the outer nuclear layer (ONL) of the retina, and some in the inner nuclear layer (INL) (Fig. 2a).

Inventors have previously shown that the GSK-3 inhibitor BIO does not increase the fusion efficiency of ESCs with neural progenitor cells *in vitro* [Lluis *et al.* (2008) cited *supra*]. Similarly, here it was observed comparable levels of hybrids in the ONL

when inventors transplanted HSPCs^{CRE,RFP} pre-treated with BIO for 24 h (henceforth referred to as BIO-HSPCs), to activate the Wnt/β-catenin pathway (Fig. 1b and 1c). This ruled out a role for BIO in modulating fusion efficiency *in vivo*. In contrast, it was not observed any fusion event after subretinal transplantations in control wild-type R26Y mice at p10 (Fig. 1d and 1e), showing that the genetic cell damage triggers fusion between retinal neurons and HSPCs.

HSPCs^{CRE} (not RFP positive) were then transplanted subretinally in R26Y^{rd1} mice to identify the retinal cell fusion partners. These HSPCs fused specifically with rods in the ONL (rhodopsin/YPF double-positive cells) (Fig. 2b) and with Müller cells (glutamine synthetase/YFP double-positive cells) (Fig. 2c). However, fusion between these HSPCs and cones was never observed (Fig. 2d).

Neurodegeneration in *rd1* mice is already apparent at p10 as the photoreceptors (first rods, and later, as a consequence, cones) undergo apoptosis and degeneration; by p20 these are already almost completely gone. Interestingly, the number of apoptotic photoreceptors decreased substantially after BIO-HSPCs transplantation, which suggested that rod-cell death was delayed or stopped already at 24 h after transplantation (Fig. 2e). Furthermore, in the YFP-positive hybrids that derived from fusion of the BIO-HSPCs^{CRE,RFP} with retinal neurons (i.e., the BIO-hybrids), there were low levels of apoptosis (20%, of total YFP-positive cells) and a high proliferation rate (16%). In contrast, in the hybrids formed between non-BIO-treated HSPCs^{CRE,RFP} and retinal neurons (i.e., no-BIO-hybrids), there were high levels of cell death (75%) and a low proliferation rate (2%) (Fig. 2f, 2g and Fig. 3).

To characterise the YFP/RFP hybrids, they were FACS sorted from the transplanted retinas and analysed for expression of several precursor neuronal and retinal markers, by qRT-PCR analysis (Fig. 2h). The neuronal precursors Nestin, Noggin and Otx2 were clearly activated in the BIO-hybrids, with low activation of the Crx, Rx and Chx10 photoreceptor precursor markers. Moreover, rhodopsin and pheripherin (rds), which are expressed in terminally differentiated photoreceptors, and GATA-1, an HSPC marker, were strongly down-regulated in the BIO-hybrids. In contrast, in the no-BIO-hybrids, there was no reactivation of precursor cell markers or silencing of lineage genes (Fig. 2h).

The protein expression was then analysed in sections. Here, the BIO-hybrids had activated expression of Nestin, Noggin and Otx2; in contrast, in the no-BIO-hybrids, there was almost no activation of these markers (Fig. 4). These data thus show the induction of a dedifferentiation process in the newly generated BIO-hybrids.

In conclusion, BIO-hybrids derived from fusion of the BIO-treated HSPCs with retinal neurons do not enter into apoptosis, but instead undergo cell proliferation and dedifferentiation reactivating different retinal precursor neuronal markers. In contrast, the hybrids derived from non-BIO-treated HSPCs do not proliferate, and nor do they dedifferentiate; instead, they undergo apoptosis.

Next, to investigate whether these BIO-hybrids can regenerate retinal tissue, inventors performed a time-course experiment. BIO-HSPCs$^{RFP/CRE}$ and no-BIO-HSPCs$^{RFP/CRE}$ were transplanted subretinally at p10 in different groups of R26Y^{rd1} mice, and TUNEL and H&E staining were performed on retinal sections after 5 (p15), 10 (p20) and 15 (p25) days, and after 2 months (p60). Although the photoreceptors were still clearly present at p15 in retinal sections from eyes transplanted with both BIO-HSPCs and no-BIO-HSPCs, as shown by the normal structure of the ONL (Fig. 5a, 5b and 6a), the viabilities of the retinal neurons were very different. At p15, there was widespread apoptosis in the photoreceptor layer in sections from the eyes transplanted with no-BIO-HSPCs (Fig. 5c and 6a); in contrast, cell death was almost absent at p15 in the ONL of retinas transplanted with BIO-HSPCs (Fig. 5d and 6a). Remarkably, at the subsequent time points (p20 and p25), the photoreceptor layer in BIO-HSPC-transplanted eyes maintained its normal structure (Fig. 5f, 5h and 6a), while rods and cones nuclei were absent in the ONL of no-BIO-HSPC-transplanted eyes. In their place, few aberrant nuclear layers of cells were seen, which expressed pigmentum and which were positive to the retinal pigment epithelium marker, Rpe65 and to the RFP only (Fig. 5e, 5f, 5g, 6a and 6b).

Finally, at 2 months after transplantation, the retinas of the BIO-HSPCs-transplanted *rd1* mice were still indistinguishable from the wild-type retinas along the entire tissue (Fig. 5i, 5j, 5k and 5l), with 10 rows of photoreceptor nuclei and normal outer and inner segment structures. On the other hand, the histology of no-BIO-HSPCs-transplanted retinas was comparable to those of the non-transplanted *rd1* eyes, with fully degenerated photoreceptor layers (Fig. 5m, 5n, 5o and 5p).

Thus, it can be concluded that the transplanted BIO-HSPCs fully preserved the photoreceptor layer in the *rd1* mouse retinas at least up to two months after their transplantation. This would suggest either a block in the degeneration mechanism or activation of a regeneration process. In contrast, transplantation of no-BIO-HSPCs did not rescue the *rd1* mouse phenotype, even if the transplanted cells retained a moderate potential to transdifferentiate into retinal pigmented epithelium cells.

To investigate differentiation of the hybrids in the long term, $R26Y^{rd1}$ mice were transplanted at p10 with BIO-$HSPCs^{CRE}$ or no-BIO-$HSPCs^{CRE}$ and analysed again two months after the transplantation. Here, there was a full layer of YFP-positive cells in the BIO-HSPC-transplanted *rd1* mouse retinas (Fig. 7a).

Immunofluorescence staining showed that YFP hybrids were differentiated into rods, but not into cones, as they were positive to staining for rhodopsin (Fig. 7a) but not for cone opsin (Fig. 7b). Furthermore no YFP hybrid cells that were also positive for the Müller cell marker glutamine synthetase or for the endothelial cell marker CD31 were found, thus excluding differentiation of the hybrids into Müller cells or into retinal vessels (Fig. 7c and 7d). In contrast, with the no-BIO-HSPC-transplanted cells, almost no YFP-positive hybrids were found two months after their transplantation because the hybrids did not survive for this length of time (Fig. 8a). Thus, it can be concluded that the BIO-hybrids differentiate specifically in rods, and as a consequence the cones are able to survive. All in all, the expression of YFP in all of the rods clearly indicates that newborn hybrids replace the *rd1* mutated photoreceptors, thereby regenerating the retinal tissue.

To further assess hybrid differentiation in rods and to determine whether this fusion-mediated regeneration process can rescue the *rd1* mouse mutation, the expression of *PDE6B*, which is not expressed in *rd1* mice, was analysed. Remarkably YFP/rhodopsin double-positive rods were also positive for *PDE6B* expression, as also confirmed by Western blotting of total extracts from transplanted retina (Fig. 7g). These results indicate that the BIO-hybrids can generate wild-type rods, and thereby can regenerate the retina (Fig. 7e, 7f and 8b); since *rd1* rods cannot express wild-type *PDE6B*, the mutation was complemented by the HSPC genome in the hybrids,

Next, to determine whether regenerated rods were also electrophysiologically functional, inventors performed electroretinogram tests on *rd1* mice 1 month after

transplantation of BIO-HSPCs or no-BIO-HSPCs. Of note, both A and B waves under scotopic and photopic conditions were recorded in 4 mice out of 8 transplanted with BIO-HSPCs, with a Δ amplitude in the order of 150 μV on average (not shown) indicating that the regenerated rods underwent cell-membrane hyperpolarisation in response to a light stimulus, and that they could transmit the electric signals to the interneurons, as indicated by the B-wave response. Retinal regeneration under histological analysis confirmed the functional rescue (not shown). Moreover, the visual acuity of a group of treated *rd1* mice between 2.0 and 2.5 months of age were analysed with the optometer test. In the BIO-HSPCs-transplanted *rd1* mice, the number of head tracking movements, which measures the automatic response of the animals when detecting a moving target [Abdeljalil *et al. Vision Res* **45**, 1439-1446, doi:S0042-6989(05)00005-2 [pii]10.1016/j.visres.2004.12.015 (2005)] was significantly higher than that measured in the non-transplanted and no-BIO-HSPCs-transplanted *rd1* mice (not shown). This demonstrated a visual response after stimulus in the BIO-HSPCs-transplanted *rd1* mice.

3. Discussion

Some attempts have been undertaken to improve the function of retinal degeneration using bone-marrow-derived stem cells (BMSCs). It has been reported that Lin^- HSPCs injected intravitreally in *rd1* mouse eyes can prevent retinal vascular degeneration, a secondary disease phenotype, which then delayed retinal cone degeneration. However, the transplanted retinas were formed of nearly only cones, and the electroretinogram responses were severely abnormal and comparable to untreated animals [Otani *et al. J Clin Invest* **114**, 765-774, doi:10.1172/JCI21686 (2004)]. Additional investigations relating to the mechanisms of improved retinal function after BMSC transplantation have been based on the role of BMSCs in promoting an increase in angiogenesis, or a decrease in inflammation, or even anti-apoptotic effects, which might delay retinal degeneration and therefore be beneficial due to slowed progression of the disease. In addition, transdifferentiation of transplanted BMSCs in retinal-pigmented epithelium, which can sustain photoreceptor survival, has been shown in acute eye injury mouse models [Siqueira *et al. Arq Bras Oftalmol* **73**, 474-479, doi:S0004-27492010000500019 [pii] (2010)]. All of these approaches, however, have

remained far from therapeutically efficient as they have not been seen to significantly improve the regeneration of retinal tissue.

In addition, systemically transplanted BMSCs have been reported to fuse with resident cells in different tissues, such as heart, skeletal muscle, liver and brain [Terada *et al. Nature* **416**, 542-545 (2002); Alvarez-Dolado *et al. Nature* **425**, 968-973 (2003); Piquer-Gil *et al. J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 480-485 (2009)]. However, these fusion events are seen to be very rare, which naturally promotes some skepticism as to their physiological relevance [Wurmser & Gage. *Nature* **416**, 485-487 (2002)]. Here, inventors have clearly demonstrated that if Wnt/β-catenin signalling pathway is not activated, the hybrids undergo apoptosis and therefore cannot be detected at late stages. The majority of these transplanted HSPCs do not fuse, and instead die; however, a few can transdifferentiate into retinal-pigmented epithelium cells, which are of mesenchymal origin. This transdifferentiation can provide some slowing down of the degeneration, but it cannot rescue the phenotype.

In contrast, the activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway induces the HSPC genome in the hybrids to activate the *PDE6B* gene; in this condition the hybrids themselves were instructed to differentiate into rods, passing through a transient de-differentiated state. No heterokaryons could be detected, although it cannot formally discarded that there were some present. However, the regenerated photoreceptors co-expressed *PDE6B* and YFP, which indicated that the genomes of the retinal neurons and of the transplanted HSPCs were mixed in the same cells. It remains to be determined whether reduction mitosis or a multipolar mitosis mechanism as previously reported during liver regeneration can reduce the ploidy of the regenerated photoreceptors, or if double genome copies are tolerated in the newborn rods, which finally preserve cone degeneration. Indeed, tetraploid neurons have been identified in mouse and human brain [Wurmser & Gage cited *supra*].

Several gene therapy attempts have been undertaken to treat individual Retinitis Pigmentosa mutations; however, a mutation-independent cell-therapy approach could be much more efficient and practical then creating individual gene therapies to treat each single gene mutation. These data provide real hope for the treatment of patients with Retinitis Pigmentosa as well as further retinal degeneration diseases.

EXAMPLE 2

Wnt/β-Catenin Signalling Triggers Neuron Reprogramming in the Mouse Retina

This Example was performed to analyze if somatic cell reprogramming can be induced in tissues in mammalian. The results obtained show that upon activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway, mouse retinal neurons can be transiently reprogrammed *in vivo* back to a precursor stage after spontaneous fusion with transplanted haematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). Moreover, it has been shown that retinal damage is essential for cell-hybrid formation *in vivo*. Newly formed hybrids reactivate neuronal precursor markers, *Oct4* and *Nanog*; furthermore, they can proliferate. The hybrids soon commit to differentiation along a neuroectodermal lineage, and finally into terminally differentiated neurons, which can regenerate the damaged retinal tissue. Following retinal damage and induction of Wnt/β-catenin signalling pathway in the eye, cell-fusion-mediated reprogramming also occurs after endogenous mobilisation of bone marrow cells in the eyes. These data show that *in-vivo* reprogramming of terminally differentiated retinal neurons is a possible mechanism of tissue regeneration.

1. Experimental Procedures

Animal care and treatments

All of the procedures on mice were performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and with our institutional guidelines for animal research. All of the animals were maintained under a 12 h light/dark cycle, with access to food and water *ad libitum*.

Retinal damage and BrdU treatment

Mice at the age of 3 months were anaesthetised by injection of ketamine: metomidine (80 mg/kg: 1.0 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)). To induce retinal damage, the animals were treated intravitreally with 2 µl of 20 mM N-methyl-D-aspartate (NMDA) (total 40 nmol; Sigma) for 24 h [Timmers *et al.*, *Mol Vis* 7, 131-137 (2001)]. Control eyes received 2 µl PBS. For the BrdU incorporation assays, the mice received intraperitoneal (i.p.) BrdU administration of 50 mg/kg body weight.

Stem cell preparation and transplantation

Retinal stem and progenitor cells (RSPCs) were isolated from the ciliary margin of adult Cre mice as previously described [Sanges *et al., Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17366-17371 (2006)]. Lineage negative HSPCs (Lin^- HSPCs) were isolated from the total BM of Cre, Cre-RFP or R26Y mice using Lineage Cell Depletion kits (Miltenyi Biotech). Human $CD34^+$ HSPCs were purchased from StemCell Technologies. Cells were pre-treated with 1 μM tamoxifen for 24 h to induce nuclear translocation of Cre recombinase, and labelled with Vybrant DiD (5 μl/ml) (Invitrogen) before transplantation, where necessary.

To obtain $ESCs^{Cre}$, 5×10^6 ESCs were electroporated with the Cre-recombinase-carrying vector (CAGG-Cre), using ES nucleofector kits (Amaxa).

The stem cells (SCs) were left non-treated or were pretreated with 100 ng/ml Wnt3a or 1 μM BIO, for 24 h, and finally 5×10^5 cells were injected intravitreally into the eyes of the anaesthetised mice. The mice were sacrificed by cervical dislocation, and their eyeballs were enucleated for histological analyses.

Hybrid isolation for gene expression and tetraploidy analysis

Twenty-four hours after cell transplantation, the retinal tissue was isolated from treated mice and disaggregated in trypsin by mechanical trituration.

To analyze the tetraploid content of hybrids, cells were pelleted, washed twice with 1x PBS and fixed for 2 h in ice with 70% ethanol. After fixation, cells were washed twice with 1x PBS and incubated with 25 μg/ml propidium iodide and 25 μg/ml RNAse A (Sigma-Aldrich) for 30 minutes at room temperature. Samples were analyzed by flow cytometry in a FACSCanto (Becton Dickinson). Doublet discrimination was performed by gating on pulse-width versus pulse-area of the PI channel. Samples were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc).

For gene expression analysis, a BD FACSAria II sorting machine (Becton Dickinson) was used to isolate the red and green positive hybrids cells. Total RNA was extracted using RNA Isolation Micro kits (Qiagen), according to the manufacturer protocol. The eluted RNA was reverse-transcribed with SuperScript III (Invitrogen) and qRT-PCR reactions using Platinum SYBR green qPCix-UDG (Invitrogen) were

performed in an ABI Prism 7000 real-time PCR machine, according to the manufacturer recommendations. The species specific oligos used are listed in Table 3. All of the experiments were performed in triplicate, and differences in cDNA input were „compensated normalising to the expression of GAPDH.

Table 3

Human and mouse specific primers for qRT-PCR

Human specific primers for qRT-PCR

Species/Gene	Sequence 5'-3'	SEQ ID NO:
h*Oct4*	Fw TCGAGAACCGAGTGAGAGGC	17
	Rv CACACTCGGACCACATCCTTC	18
h*Nanog*	Fw CCAACATCCTGAACCTCAGCTAC	19
	Rv GCCTTCTGCGTCACACCATT	20
h*Nestin*	Fw TGTGGCCCAGAGGCTTCTC	21
	Rv CAGGGCTGGTGAGCTTGG	22
h*Otx2*	Fw ACCCCTCCGTGGGCTACCC	23
	Rv CAGTGCCACCTCCTCAGGC	24
h*Noggin*	Fw AGCACGAGCGCTTACTGAAG	25
	Rv AAGCTGCGGAGGAAGTTACA	26
hCD34	Fw GTTGTCAAGACTCATGAACCCA	27
	Rv ACTCGGTGCGTCTCTCTAGG	28

Mouse specific primers for qRT-PCR

Species/Gene	Sequence 5'-3'	SEQ ID NO:
m*Oct4*	Fw CGTGGAGACTTTGCAGCCTG	29
	Rv GCTTGGCAAACTGTTCTAGCTCCT	30
m*Nanog*	Fw GCGCATTTTAGCACCCCACA	31
	Rv GTTCTAAGTCCTAGGTTTGC	32
m*Nestin*	Fw TGGAAGTGGCTACA	11
	Rv TCAGCTTGGGGTCAGG	12
m*Otx2*	Fw GAGCTCAGTCGCCACCTCTACT	15
	Rv CCGCATTGGACGTTAGAAAAG	16

m*Noggin*	Fw CTTGGATGGCTTACACACCA	13
	Rv TGTGGTCACAGACCTTCTGC	14
mCD34	Fw CTGGTACTTCCAGGGATGCT	33
	Rv TGGGTAGCTCTCTGCCTGAT	34

[Fw: Forward; Rv: Reverse]

Gata1 primers were purchased at SuperArray Bioscience Corporation [Catalog number PPM24651A-200]

Bone marrow (BM) replacement

BM transplantation was conducted as previously reported with minor modifications. The BM of 4- to 6-week-old R26Y or Nestin-Cre recipient mice was reconstituted with BM cells from the tibias and femurs of RFP/CRE or R26Y transgenic mice respectively. BM cells ($1x10^7$ cells) were injected intravenously into the recipients 3 hours after irradiation with γ-rays (9 Gy). The eyes of the recipients were protected with lead shields to prevent radiation-induced damage (radiation retinopathy). Four weeks after transplantation, the peripheral blood of chimeric mice was extracted from the tail vein, and the reconstituted BM was assessed.

Fixing, sectioning and immunohistochemistry

Tissues were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde overnight, and then embedded in OCT compound (Tissue-Tek). Horizontal serial sections of 10 μm thickness were processed for immunohistochemistry, and visualisation of Nanog-GFP and Rosa26-YFP fluorescence was performed by fluorescent microscopy.

For fluoresceine immunostaining, the primary antibodies used were: anti-Nanog (1:200, R&D), anti-Oct4 (1:100, AbCam), anti-Nestin (1:300, Abcam), anti-GATA4 (1:500, Abcam), anti-Otx2 (1:200, Abcam), anti-Noggin (1:200, Abcam), anti-Hand1 (1:400, Abcam), anti-Tuj-1 (1:100, Abcam), anti-Thy1.1 (1:100, Abcam), anti-syntaxin (1:50, Sigma), anti-glutamine synthetase (Sigma, 1:100) anti-Annexin V (1:200, Abcam), anti-Ki67 (Sigma, 1.100) and anti-BrdU (1:300, Sigma). The secondary antibodies used were: anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG antibodies conjugated with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 or Alexa Fluor 633 (1:1000; Molecular Probes, Invitrogen).

Percentages of GFP and YFP positive cells were evaluated counterstaining the tissue sections with DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and they were photographed using either an Axioplan microscope (Zeiss) or a Leica laser confocal microscope system.

In-vitro culture of reprogrammed hybrids

BIO-treated or non-BIO-treated ESCs or HSPCs were injected into the eyes of NMDA-damaged Nanog-GFP-puro mice. Twenty-four hours after transplantation, the retinal tissue was isolated and treated with trypsin for 30 min at 37°C. The cells were then resuspended as single-cell suspensions in ES culture media using a fire bore hole Pasteur, and plated onto gelatine-coated dishes at a concentration of 3×10^5 cells/ 9.6 cm^2. To select the reprogrammed clones, puromycin was added to the culture medium after 72 h. GFP-positive clones were counted and photographed after one month of culture. The clones were alkaline phosphatase (AP) stained after 1 month of culture, as previously described [Lluis *et al.*, *Cell Stem Cell* **3**, 493-507 (2008)].

Preparation of flat-mounted retinas and optic nerves, and counting of ganglion cells

Retinal flat mounts were prepared as previously described. Briefly, the eyes were hemisected along the ora serrata, and the retinas were separated from the pigment epithelium and mounted with the ganglion cell side up, on Isopore 3mm (Millipore). Retinas were then fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, washed with phosphate-buffered saline, and treated for immunostaining as described above. Optic nerves were dissected from the eyes and mounted directly on the slices using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Total cells in the ganglion cell layer were counted as described previously (Jakobs *et al.*, (2005). J Cell Biol 171:313-315) with minor modifications. Flat-mounted retinas were counterstained with DAPI and survey pictures were taken at 20X on a confocal microscope (Leica SP5) focusing on the gcl. Covering the whole retina required about 80 images. Cell nuclei were counted using Fiji Software and graphed as cells/millimeter^2. A two-dimensional density map of each image was obtained by a routine written in Matlab and pictures of the whole-mount retina were assembled from individual pictures in Photoshop 9.

Statistical analysis

The numbers of immunoreactive or of Nanog-GFP- and -YFP-positive cells within three different retinal areas (40× field) were counted in individual sections. A total of ten serial sections were examined for each eye, from at least three different mice. For statistical analysis, the data were expressed as means ±SEM, as pooled from at least three independent experiments, each carried out in duplicate. The experiments were performed using at least three different mice. Differences were examined using the unpaired Student t-test.

2. Results

NMDA-induced injury triggers fusion between retinal neurons and stem cells

Although cell fusion-mediated somatic cell reprogramming can be induced *in culture*, it remained to be seen if terminally differentiated cells can be reprogrammed via cell fusion within tissues of adult vertebrates.

Thus, inventors first determined whether SPCs could fuse with retinal neurons *in vivo*. For this, inventors used transgenic mice carrying YFP flanked by loxP sites under the control of the ubiquitously expressed Rosa26 promoter as recipients (i.e. with a LoxP-STOP-LoxP-YFP [R26Y] allele) [Srinivas *et al.*, *BMC Dev Biol* **1**, 4 (2001)]. Different SPCs stably expressing Cre recombinase and labelled in red were transplanted in the eyes of recipient mice by intra-vitreal injection (5×10^5 cells/eye). Specifically, inventors used Lineage negative (Lin^-) $HSPCs^{Cre/RFP}$ isolated from CRE-RFP double transgenic donor mice, 1,1□-dioctadecyl-3,3,3□,3□-tetramethylindodicarbocyanine dye (DiD)-labelled $RSPCs^{Cre}$ isolated from the ciliary margin of Cre transgenic mouse eyes [Sanges et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17366-17371 (2006)], and DiD-labelled $ESCs^{Cre}$ generated by the inventors. Mice were sacrificed at different times after SPCs injection. If cell fusion had occurred between the injected $SPCs^{Cre}$ and LoxP-STOP-LoxP-YFP (R26Y) retinal neurons, it could be expected to detect YFP expression in retinal sections, due to excision of the STOP codon by Cre (Fig. 9A).

Firstly, inventors tested whether retinal tissue damage caused by intravitreal injections of NMDA in R26Y mice could induce cell fusion. NMDA caused apoptosis

of neurons in the inl and gcl of the retina (Fig. 10A and 10B), as shown previously [Osakada *et al.*, *J Neurosci* **27**, 4210-4219 (2007)]; however, NMDA did not enhance the stochastic expression of the YFP transgene in these R26Y mice (Fig. 10C). Then, inventors induced NMDA damage in the right eye of R26Y mice and left the contralateral eye undamaged as control; 24 h later $HSPCs^{Cre/RFP}$ were transplanted into both eyes. Mice were finally sacrificed 24, 48 or 72 h after transplantation (Fig. 9A).

Already 24 h after transplantation, up to 70% of the injected $HSPCs^{Cre/RFP}$ that were detected in the optical field had fused with retinal cells, thus giving rise to YFP-positive hybrids (Fig. 9B, 9D and 10D). Interestingly, the transplanted cells integrated into the retinal tissue and crossed the gcl, even reaching the inl (Fig. 9B, NMDA). In contrast, there were no YFP-positive hybrids in the controlateral, non-damaged, eyes; furthermore, transplanted $HSPCs^{Cre/RFP}$ remained on the border of the gcl and were not integrated into the retinal tissue (Fig. 9C and 9D, No NMDA). Similar results were seen in retinal sections of mice sacrificed 48 and 72 h after transplantation (Fig. 9D). The presence of tetraploid cells was also analysed by flow cytometry. Nuclei with 4C DNA content were clearly evident in the hybrids present in the retinas of R26Y mice transplanted with $HSPCs^{Cre/RFP}$ (Fig. 10C).

These data demonstrated that the injury was necessary to induce migration of transplanted HSPCs into the retinal tissue and their fusion with retinal neurons.

The localization of the hybrids (YFP positive cells) in the retinal tissue suggested that transplanted cells fused with ganglion cells (that localize their nuclei in the gcl) and amacrine cells (that localize across the inl and the inner plaxiform layer (ipl)) (Fig. 10A); to note, those are the retinal cells specifically damaged after NMDA treatment [Osakada *et al.* (2007), cited *supra*]. Thus, to confirm which of the retinal cells fused with the HSPCs, inventors analyzed the expression of different retinal cell markers in the YFP-positive hybrids 12 h after the transplantation of Lin^{-} $HSPCs^{Cre/RFP}$ into NMDA-damaged R26Y eyes. YFP hybrids either positive to the ganglion-cell marker thy1.1 in the gcl (Fig. 9E), or to the amacrine-cell marker syntaxin in the ipl (Fig. 9F). No co-localisation was seen with the Müller cell marker glutamine synthetase (Fig. 9G). 60% of the YFP-positive hybrids were thy1.1-positive, while 22% were syntaxin positive (Fig. 10F and 10F), indicating that the majority of the hybrids were formed between ganglion cells and HSPCs, with some fusion with amacrine cells. In the

remaining 18% of the YFP-positive hybrids, the fusion partners were unclear; indeed, there might also have been down-regulation of thy1.1 and/or syntaxin in the newly formed hybrids.

Next inventors performed similar experiments by injecting DiD-labelled $ESCs^{Cre}$ and DiD-$RSPCs^{Cre}$ into undamaged and NMDA-damaged eyes of the R26Y mice. With both cell types, up to 70% of the injected cells detected in the optical field fused with retinal neurons (Fig. 11A, 11B, and 10D). Also these cells fuse with ganglion cells and amacrine cells as demonstrated by the localisation of the YFP signal in the gcl and ipl and by the co-localisation of the YFP and thy1.1 or syntaxin signals (Fig. 11A, 11B and data not shown).

To further confirm that injected SPCs do indeed fuse with post-mitotic retinal neurons, the proliferative potential of retinal cells before the fusion event was analyzed. Concurrently inventors injected thymidine analogue 5□bromo-2□deoxyuridine (BrdU) intraperitoneally and NMDA into the eyes of R26Y mice; then, after 24 h $ESCs^{Cre}$ were injected and, finally, the mice were sacrificed 24 h after this transplantation. Not BrdU-positive cells (red arrows) were seen to be also positive for YFP (green arrows), thus excluding the fusion of ESCs with proliferating cells (Fig. 11C). The BrdU-positive cells found next to the gcl (Fig. 11C, red arrows) were probably microglial cells that had been recruited to the retina following the damage [Davies *et al.*, *Mol Vis* **12**, 467-477].

Overall, these data demonstrate that HSPCs, ESCs and RSPCs can spontaneously fuse with retinal neurons *in vivo* upon cell damage.

The Wnt/β-catenin signalling pathway triggers reprogramming of retinal neurons *in vivo*

Wnt/β-catenin signalling pathway is activated after NMDA damage resulting in increased expression of β-catenin, which accumulates into the cells (see Fig. 12A and Osakada *et al.* (2007) cited *supra*). Thus, inventors tested whether endogenous Wnt/β-catenin pathway activation could mediate reprogramming after cell fusion *in vivo*.

For this, two different mouse models were used as recipient mice: Nestin-CRE (transgenic mice expressing Cre recombinase gene under the control of Nestin promoter in neural precursors) [Tronche *et al.*, *Nat Genet* **23**, 99-103 (1999); Okita *et al.*, *Nature* **448**, 313-317 (2007)]and Nanog-GFP-Puro mice (transgenic mice expressing GFP-

puromycine genes under the control of the Nanog promoter in the embryo [Okita *et al.*, *Nature* **448**, 313-317 (2007)], which allowed us to investigate reprogramming at the neuronal precursor and the embryonic stages, respectively. DiD-labelled $HSPCs^{R26Y}$ and $HSPCs^{RFP}$ were injected into the eyes of the Nestin-CRE and Nanog-GFP-puro mice, respectively. NMDA was injected intravitreally into one eye of a group of mice, while the contralateral eye remained undamaged as control. Importantly here, no expression of Nanog-GFP (Fig. 12C) or Nestin-Cre (data not shown) transgene was detected following NMDA treatment in the ganglion and amacrine cell. After 24 h, HSPCs were injected into both the non-treated and NMDA-treated eyes, and the mice were sacrificed after an additional 24 h. In the case of reprogramming of the retinal neurons, in these mouse models it could be expected to find double red/green positive cells (Fig. 13A and Fig. 12B). No green-positive cells were seen after injection of HSPCs into the non-damaged eyes (Fig. 13B, 13C, 13D and 13E, No NMDA). In contrast, about 30% and 20% of the total red cells were also green when HSPCs were injected into the NMDA-damaged eyes of Nestin-CRE and Nanog-GFP-puro mice, respectively (Fig. 13B, 13C, 13D and 13E, NMDA; and 10C), indicating that up to 30% of the hybrids were indeed reprogrammed, as they had reactivated Nanog and Nestin promoters in the neuron genome.

To assess the role of activation of the endogenous Wnt/β-catenin signalling pathway in the reprogramming of retinal neurons, in both of these mouse models, DKK1 was also injected immediately after NMDA injection; DKK1 is an inhibitor of the Wnt/β-catenin pathway [Osakada et al. (2007) cited *supra*, Fig. 12A]. HSPCs were transplanted after 24 h, and mice were sacrificed 24 h later. DKK1 injections almost completely blocked the reprogramming of neuron–HSPC hybrids (Fig. 13B, 13C and 13D, NMDA+DKK1), which demonstrated that endogenous and damage-dependent activation of the Wnt/β-catenin pathway triggers reprogramming of retinal neurons after their fusion with HSPCs.

Next, inventors aimed to analyse whether reprogramming of retinal neurons was increased after transplantation of HSPCs in which the Wnt/β-catenin signalling pathway had been previously activated by the GSK-3 inhibitor BIO or by Wnt3a treatment before injection (Fig. 12D, 12E and 12F). Surprisingly, 24 h after transplantation of BIO-pretreated or Wnt3a-pretreated HSPCs in NMDA-damaged eyes of the Nestin-

CRE and Nanog-GFP mice, there was a striking increase in the number of reprogrammed (green-positive) hybrids with respect to those seen in NMDA-damaged eyes that received untreated-HSPCs (Fig. 13B and 13E; NMDA+BIO, NMDA+Wnt3a). Similar results were also observed in mice sacrificed 48 h and 72 h after cell transplantation (data not shown). Of note, after injection of BIO-treated HSPCs into non-damaged eyes, both Nanog-GFP-puro (Fig. 12G) and Nestin-CRE transgenes (data not shown) were not expressed, confirming that the tissue damage is necessary for spontaneous cell fusion-mediated retinal neuron reprogramming.

To evaluate the efficiency of this *in-vivo* reprogramming, inventors counted the green-positive reprogrammed cells relative to the total population of red-HSPCs detected in the optical field (Fig. 10C). In the damaged retinas, up to 65% of both the BIO-pretreated and the Wnt3a-pretreated HSPCs reprogrammed retinal neurons after fusion, leading to the formation of double-positive HSPC-neuron hybrids in both of these mouse models (Fig. 13C and 13D).

Given that it was surprising to observe reprogramming at the embryonic stage after fusion of HSPCs with terminally differentiated neurons, it was investigated activation of the Nanog-GFP transgene after transplantation of ESCs and RSPCs into NMDA-injured eyes.

As it could be expected, in the case of the ESC transplantation, reprogramming of the retinal neurons, which was also dependent on activation of the endogenous Wnt/β-catenin signalling pathway, was also observed. GFP-positive cells were also strikingly increased when ESCs were pretreated with BIO or with Wnt3a before being transplanted (Fig. 14A). To confirm reprogramming of ESC-retinal neuron hybrids, inventors cultured GFP-positive hybrids FACS-sorted from NMDA-damaged retinas of Nanog-GFP-puro mice transplanted with BIO-treated or untreated ESCs. Reprogrammed GFP positive colonies were grown *in culture* and they were also resistant to puromycine selection and positive to the alkaline phosphatise (AP) staining (Fig. 14B).

In contrast, no reprogramming events after injection of RSPCs into the NMDA-injured eyes of the Nanog-GFP mice was observed, even in the case of BIO pre-treatment of transplanted RSPCs (Fig. 14C). Interestingly, only a few YFP-positive

cells were observed after transplantation of BIO-treated $RSPC^{R26Y}$, in NMDA-damaged eyes of Nestin-CRE mice (not shown).

Finally, it was also ruled out an effect of BIO in the enhancement of fusion events *in vivo*. BIO pre-treatment did not enhance the fusion efficiency of the HSPCs, ESCs or RSPCs injected into the NMDA-damaged eyes of the R26Y mice (Fig. 14D).

In conclusion here, it has been shown that activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway triggers the reprogramming of retinal neurons back to an embryonic/neuronal precursor stage, and that this occurs following damage-dependent cell-cell fusion of HSPCs and ESCs, but not of RSPCs.

To better characterize the reprogrammed hybrids, in addition to look at Nestin-CRE and Nanog-GFP transgenes reactivation, the expression profile of precursor and embryonic genes *in vivo* was analyzed in the newly formed hybrids. Then it was injected BIO-treated or untreated $HSPCs^{Cre/RFP}$ in NMDA-damaged eyes of R26Y mice, and 24 h later the hybrid cells from the retinas were sorted by FACS. Marker expression was analysed by real time PCR. In the BIO-hybrids (hybrids formed by the BIO-treated HSPCs) Oct4, Nanog, Nestin, Noggin and Otx2 were up-regulated (Fig. 15A); indeed, no expression of these genes was detected in the non-transplanted NMDA-injured retinas, nor in the HSPCs, with the exception of Nanog in the HSPCs (Fig. 16A and 16B). In contrast, Gata1, which is a HSPC specific gene, was down-regulated in the BIO-hybrids (Fig. 15A). None of the precursors markers were re-expressed (or they were poorly expressed in the case of Nanog and Nestin) in non-BIO-hybrids, where expression of Gata1 was comparable to that observed in the HSPCs (Fig. 15A and Fig. 16B).

Expression of Oct4, Nanog and Nestin proteins in the BIO-hybrids was also confirmed by their merged immunostaining signals with the YFP-positive hybrids in sections (Fig. 15B).

However, to clearly demonstrate that the re-expression of embryonic and progenitor markers resulted from reprogramming of the neuron genome and not from the genome of the injected HSPCs, inter-species hybrids were analyzed. For this, inventors transplanted BIO-treated and DiD-labelled $CD34^{+}$ human HSPCs into damaged eyes of Nanog-GFP mice. The reprogramming of the retinal neurons was confirmed in sections after fusion of the human HSPCs (Fig. 16C). Interestingly Oct4,

Nanog, Nestin, Noggin and Otx2 were all expressed (as analysed with mouse-specific oligonucleotides; see Table 3) from the reprogrammed mouse neuron genome in the sorted hybrids (Fig. 15C). In addition, in the human genome, expression of Oct4, Nestin, Otx2 and Noggin was activated, while CD34 was down-regulated (Fig. 15D).

Overall, it can be concluded that HSPC-fusion-mediated reprogramming of retinal neurons controlled by Wnt/β-catenin signalling pathway can occur *in vivo*.

Reprogrammed neurons can proliferate and differentiate *in vivo*

Next the proliferative potential of the reprogrammed neurons was investigated. Thus, BIO-treated and untreated HSPCs^{Cre} were injected into the NMDA-damaged eyes of a group of R26Y mice and retinal sections were analysed 24 h later.

Surprisingly, 8% of the YFP-positive reprogrammed hybrids (after injection of BIO-treated HSPCs^{Cre}) underwent proliferation (Fig. 15E and 15G, Ki67/YFP double positive); these cells were not committed to an apoptotic fate, as only about 5% of the hybrids were positive for Annexin-V staining (Fig. 15F and 15H). On the contrary, injection of non-BIO-treated HSPCs^{CRE} led to the formation of non-proliferative hybrids (Fig. 15E and 15I; as negative to Ki67 staining) that underwent apoptosis, as up to 30% of the YFP-positive hybrids were positive for Annexin-V staining (Fig. 15F and 15J, Anexin-V/YFP double positive). Similar results were obtained 72 h after transplantation of BIO-treated or non-BIO-treated ESCs (Fig. 16D and 16E). Overall, these data show that hybrids formed between HSPCs or ESCs and retinal neurons embark into apoptosis, but if the Wnt/β-catenin pathway is activated in the transplanted SPCs, the neurons can be reprogrammed, survive and re-enter into the cell cycle.

Inventors then analysed the *in-vivo* differentiation potential of the reprogrammed retinal neurons in the NMDA-damaged retinas of the R26Y mice injected with BIO-treated and non-BIO-treated HSPCs^{Cre}. The mice were sacrificed 24, 48 and 72 h after transplantation. The percentages of YFP-positive hybrids for each marker were determined from retinal sections (Fig. 10C). Remarkably, 24 h after the injection of the BIO-treated HSPCs, reprogrammed neurons (as YFP positive) were already re-expressing Nestin, Noggin and Otx2, and this expression was maintained at the subsequent time points analysed (48, 72 h). Conversely, the neuronal terminal differentiation marker Tuj-1 was progressively silenced. In addition Sca1 and c-kit were

strongly down-regulated in these hybrids. Oct4 and Nanog were also highly expressed at 24 and 48 h, although their expression was decreased by 72 h (Fig. 15B and 15K). In contrast, a low number of YFP positive hybrids obtained after fusion with non-BIO-treated HSPCs reactivated Nestin, Noggin and Otx2, and instead they maintained expression of Tuj-1, Sca-1 and c-kit in the majority of the hybrids. Oct4 and Nanog were also expressed, although only at 24 h and in very few hybrids at the later (48, 72 h) time points (Fig. 15L), GATA4, a mesoderm marker, and Hand1, an endoderm marker, were never expressed in the hybrids (Fig. 15K and 15L). In conclusion, the BIO-hybrids were reprogrammed and tended to differentiate into the neuroectoderm lineage. In contrast, the non-BIO hybrids were poorly reprogrammed, and thus they did not embark into neuroectoderm differentiation.

Similar differentiation analysis, performed after injection of BIO-treated $ESCs^{Cre}$ in the damaged R26Y retinas, showed a delay in the neuroectodermal differentiation potential of the resulting hybrids (as Nestin, Noggin and Otx2 were expressed more at 72 h after ESC injection while Oct4 and Nanog where highly expressed from 24 to 72 h) and the positive expression of Gata4 and Hand1. These results indicate that ESC-neuron hybrids are more pluripotent and can differentiate in the neuroectodermal lineage but also in the mesoderm and endoderm lineages (Figure 16F).

Finally, inventors investigated whether the BIO-hybrids that were committed to a neural differentiation fate can terminally differentiate into retinal neurons and thus regenerate the damaged retina. For this, a group of NMDA-damaged eyes of R26Y mice were injected with BIO-treated or non-BIO-treated $HSPCs^{Cre/RFP}$ and sacrificed 2 weeks later. Remarkably, YFP/RFP neurons in the gcl and in the inl were observed only after transplantation of BIO-treated HSPCs. These cells were positive to the markers for thy1.1 and syntaxin, clearly indicating that the hybrids differentiated into ganglion and amacrine neurons. On the contrary, no YFP/RFP hybrids were detected 2 weeks after transplantation of untreated HSPCs, as they undergo cell death at short time. Next, the histology of the transplanted retina was analyzed. Strikingly, it was observed that the number of nuclear rows in the gcl and in the inl of the retinas transplanted with the BIO-treated HSPCs was increased substantially with respect to those with the non-BIO-treated HSPCs and to untransplanted retinas. Their numbers were comparable to those in the wild-type retina (Fig. 17A, 17B and 17C). These data clearly indicate that

reprogrammed HSPC-neuron hybrids can differentiate in retinal neurons and regenerate the damaged retina. Thus, it can be concluded that cell-fusion-mediated reprogramming can trigger retinal tissue regeneration.

Reprogrammed hybrids can regenerate the injured retina

Having seen that the reprogrammed hybrids can proliferate and differentiate towards neuroectodermal lineage inventors aimed to evaluate long-term differentiation and their regenerative potential. Then, $HSPCs^{Cre}$ were pre-treated with BIO to activate Wnt signalling and transplanted into the NMDA-damaged R26Y eyes. In parallel, untreated $HSPCs^{Cre}$ were transplanted as control. The mice were sacrificed 4 weeks later (Figure 18A).

Analysis of flat-mounted retinas transplanted with BIO-$HSPCs^{Cre}$ showed a high number of YFP+ hybrids (Figure 18B) that were positive for expression of ganglion (SMI-32) and amacrine (Chat) neuron markers (Figure 18C). Inventors then also analysed the optical nerves 24h and one month after transplantation. Remarkably, in one-month optical nerves we observed YFP+ axons, likely derived from projections of the regenerated ganglion neurons (Figure 18D). In contrast, retinas transplanted with untreated $HSPCs^{Cre}$ showed very few YFP+ hybrids (Figure 22A) and no YFP+ axons were found along the optical nerves (Figure 18D, untr.HSPCs). Interestingly, no YFP+ axons were seen in the optical nerves 24 h after transplantation of BIO-HSPCs (Figure 22B), indicating that the newly generated ganglion neurons project their axons some time after transplantation, likely during the regeneration process (Figure 18D).

NMDA treatment induces recruitment of macrophages in the eye (Sasahara *et al.*, *Am J Pathol* **172**, 1693-1703 (2008)). Indeed, as expected, in retinas harvested 24 h after transplantation, a percentage of the YFP+ hybrids were positive to monocyte/ macrophage CD45 and Mac1 markers, which suggested phagocytosis of some transplanted $HSPCs^{Cre/RFP}$ by endogenous macrophages carrying the R26Y allele or phagocytosis of some YFP+ hybrids themselves (Figures 22C and 22D). Interestingly, this percentage was already drastically decreased in retinas harvested 2 weeks after transplantation (Figures 22E and 22F). This result clearly indicates that although some hybrids can be phagocytosed son after transplantation, a percentage of them can survive and regenerate the retinas.

Next, inventors analysed the occurrence of cell nuclei regeneration in vertical sections. Interestingly, the number of neuronal nuclei in the ganglion cell layer (Figures 17A and 17B, gcl), and the number of nuclear rows in the inner nuclear layer (Figures 17A and 17C, inl) of retinas transplanted with BIO-HSPCs was comparable to wild-type retinas and substantially increased with respect to nontransplanted retinas or retinas transplanted with untreated HSPCs (Figures 17A, 17B and 17C). This clearly indicates retinal regeneration. Inventors also investigated the nuclear density of the ganglion neurons in the whole flat-mounted retinas by counting the total number of ganglion nuclei in the whole retinas harvested one month after transplantation. Remarkably, there was a significant increase of nuclei number in BIO-HSPCs^{Cre}-transplanted retinas, with respect to the non-transplanted retinas (Figure 17D). However, newly generated ganglion neurons were not uniformly distributed, as shown by the nuclear density maps, indicating non-homogenous retinal regeneration (Figure 17E).

These data clearly demonstrate that if Wnt signalling is activated, partial regeneration of retinal cells after NMDA-damage can be achieved after fusion of transplanted HSPCs.

Endogenous BMC fusion-mediated reprogramming of retinal neurons occurs *in vivo* after damage

It has been reported that endogenous BMCs can be recruited into the eye after NMDA damage [Sasahara *et al.*, *Am J Pathol* **172**, 1693-1703 (2008)]; however, their role remains unknown. Thus, inventors investigated whether endogenous BMCs can also fuse and reprogramme retinal neurons after NMDA damage. For this, BMCs from donor RFP-CRE mice (transgenic mice expressing RFP and CRE, both under the control of the ubiquitously expressed β-actin promoter (Long *et al.*, (2005). BMC Biotechnol *5*, 20; Srinivas et al. (2001) cited *supra*)) were tail-vein transplanted in sub-lethally irradiated R26Y recipient mice, thereby substituting their BM with BM$^{Cre/RFP}$. The repopulation of the BM with cells of donor origin was analysed according to the expression of RFP in blood cells and by haemocytometric analysis (Fig. 19A). One month after transplantation, NMDA was injected intra-vitreally in one eye of each group of chimeric mice, and then 24 h later the mice were sacrificed (Figure 20A). Interestingly, it was found that after NMDA damage, 50% of the RFP-positive cells

were also YFP positive, indicating fusion of endogenous BMCs recruited in the eyes (Fig. 20B, 20C and 20F, NMDA, and Fig. 10D). In contrast, no RFP/YFP-positive cells were found in sections of non-NMDA-injected eyes (Fig. 20D, 20E and 20F, No NMDA). These results, clearly demonstrate that cell fusion occurs between the BMCs recruited into the eyes and the retinal neurons.

Inventors then analysed the identity of these hybrid cells that were obtained after endogenous cell fusion. It was observed that 12 h after NMDA damage, the YFP-positive cells in the retinal sections were also positive for the Sca1, Ckit, Thy1.1, Syntaxin, and GS cell markers, clearly indicating that HSPCs were recruited from the BM and fuse with ganglion, amacrine and Müller cells (Fig. 20G, 20H, 20I, 20J and 20K).

Next inventors investigated if reprogramming can occur after BMC recruitment and fusion with retinal neurons; to this aim, $BMCs^{R26Y}$ were transplanted into a group of sub-lethally irradiated Nestin-CRE mice to generate chimeric mice. The reactivation of Nestin-CRE transgene and the consequent YFP expression enabled us to identify reprogramming events after BMC recruitment in the eye. One month later, NMDA and BIO were injected into only one eye of the chimeric mice, which were sacrificed 24 h later (Fig. 21A). YFP-positive cells were observed after injection of BIO in the gcl and inl of NMDA damaged eye, but not in the NMDA-damaged (non-BIO injected) untreated contralateral eyes (Fig. 21B and 21C). This clearly indicates that the retinal neurons had fused with the recruited BMCs and were reprogrammed because of the reactivation of the Nestin promoter. About 8% of these YFP-positive hybrids were positive for Ki67 expression, and only 1% were Annexin-V positive, which indicated that some of the hybrids were dividing and very few were apoptotic (Fig. 21D, 19B and 19C). Strikingly, 50% of these YFP-positive hybrids were also positive for Oct4 expression (Fig. 21E, 21F and 21G), and 70% for Nanog (Fig. 21E, 21H and 21I), confirming that reprogramming of the retinal neurons occurred also after mobilisation of the BMCs into the eyes.

In conclusion, endogenous activation of BMC-fusion-mediated reprogramming of retinal neurons can occur in the eye if the Wnt/β-catenin pathway is activated.

3. Discussion

Here it has been demonstrated that the canonical Wnt/β-catenin signalling pathway mediates the reprogramming of retinal neurons *in vivo*. In addition, it has been shown that spontaneous cell fusion can occur in the mouse retina after injury and that a proportion of fusion hybrids proliferate if they are reprogrammed by Wnt activity. Furthermore, it has also been shown that if not reprogrammed, the neuron-SPC hybrids undergo apoptosis. Surprisingly, the reprogrammed hybrids can regenerate the damaged retinal tissue. Finally, it has been clearly showed that after activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway in the eye, BM-derived cells that are recruited into the injured retina can fuse and reprogramme the retinal neurons upon activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway. Overall, it can be concluded that cell-fusion-mediated reprogramming can be an endogenous mechanism of damage repair.

Adult SPCs show a high degree of plasticity and pluripotency, and they can contribute to a wide spectrum of differentiated cells. Transplanted BMCs can fuse and acquire the identity of liver cells, Purkinje neurons, kidney cells, epithelial cells, and more. This plasticity has been ascribed to either transdifferentiation or cell-cell fusion mechanisms.

Up to now however, cell fusion events have been considered very rare, and therefore the cell identity of the "newborn" hybrids has never been clearly investigated. Here, inventors have demonstrated that cell-cell fusion occurs and can be visualised as a very relevant event shortly after transplantation of HSPCs into a damaged eye. This is true also after mobilisation of c-kit/sca-1-positive cells from the BM into damaged retinas. In previous studies, the numbers of hybrids derived from BMC fusion have been largely underestimated; indeed, it has been found here that unless these newly formed hybrids are reprogrammed, they undergo cell death, and therefore a long time after the transplantation they cannot be detected.

HSPCs fuse with high efficiency with ganglion and amacrine neurons; the resulting "newborn" hybrids are novel cell entities, which if a Wnt-signalling stimulus is provided, can initially be transiently reprogrammed and can proliferate and then become terminally differentiated neurons. It is remarkable that it was found expression of Nanog and Oct4, and at the same time, expression of Nestin, Noggin and Otx2 precursor neuronal markers in these hybrids. The expression of Nanog and Oct4 is a

clear evidence of reprogramming back to the embryonic stage; however, this state is transient, at least in the case of fusion between HSPCs and retinal neurons. The hybrids very soon commit to neuroectodermal lineage, and indeed, 72 h after transplantation, Oct4 and Nanog were already down-regulated. Finally, in two weeks, the hybrids become terminally differentiated neurons and regenerate the gcl and the inl in the retinal tissue. Interestingly, it was also observed full functional regeneration of photoreceptors in a mouse model of Retinitis Pigmentosa (RP) after cell-fusion-mediated reprogramming of retinal neurons upon transplantation of Wnt/β-catenin pathway activated HSPCs (Example 1).

These observations led to anticipate that Oct4 and Nanog are not only stem cell genes that are expressed in embryos, but that they have a functional role also in adult tissue during cell-fusion-mediated regeneration processes. Expression of these genes in adults is controversial [Shin *et al.*, *Mol Cells* **29**, 533-538 (2010); Kucia *et al.*, *J Physiol Pharmacol* **57** *Suppl 5*, 5-18 (2006)]; however, it might well be that their expression has not been clearly appreciated in some circumstances, probably due to its very transient nature.

ESCs also have great plasticity, and here inventors were able to identify dedifferentiation events *in vivo*; i.e., reprogrammed hybrids expressing Nanog after the fusion of retinal neurons with ESCs. ESC-retinal-neuron hybrids are probably more pluripotent than HSPC-derived hybrids. They can form clones *in culture* and express markers of three different lineages; in addition, they form teratoma *in vivo* (data not shown). In contrast, *in vitro*, inventors were not able to isolate clones from HSPC-retinal neuron hybrids, clearly indicating their transient reprogramming and fast commitment to neuroectoderm lineage differentiation. Interestingly, reprogramming of retinal neurons up to the expression of Nanog was not observed after fusion of RSPCs, indicating the lower degree of plasticity of these cells with respect to HSPCs.

For a long time, it has been thought that differentiation is a one-way-direction mechanism; the possibility to induce somatic-cell reprogramming has completely abrogated this opinion. However, to date, neuron dedifferentiation has been considered as relatively difficult. Here, it has been demonstrated that neurons can indeed change their developmental stage in a living organism while resident in their own tissue. However, when they fuse with HSPCs, they keep the memory of their neuronal identity,

as these "newborn" hybrids finally differentiate into neurons. This is not a trivial observation, as researchers normally force *in vitro* reprogrammed cells to propagate with a de-differentiated phenotype; indeed, even ESCs, in principle, do not exist in the embryo. Pluripotent cells, such as the reprogrammed cells, should rapidly undergo a change of fate *in vivo*, which will depend on the different tissue signals, and they should commit to progress into a specific differentiation fate. A lineage identity memory that is not erased during the reprogramming process might be beneficial, to direct the correct differentiation path *in vivo*. Interestingly, induced pluripotent SCs (iPSCs) have been shown to retain epigenetic memory of their somatic cells of origin [Polo *et al.*, *Nat Biotechnol* **28**, 848-855 (2010); Kim *et al.*, *Nature* **467**, 285-290 (2010)]. Here, in the model used herein, the transition from one cell fate to another is not direct, but passes through the transient re-expression of precursor genes; thereby passing through an intermediate, less-differentiated, developmental precursor.

Wnt signalling controls the regeneration of tissues in response to damage in lower eukaryotes [Lengfeld *et al.*, *Dev Biol* **330**, 186-199 (2009)]. Regeneration of the Zebra fish tail fin and the *Xenopus* limbs requires activation of Wnt/β-catenin signalling; likewise for tissue regeneration in planarians [De Robertis, *Sci Signal* **3**, pe21 (2010)]. Interestingly, in fish and postnatal chicken retina, down-regulation of Müller cell specific markers, such as glutamine synthetase and activation of progenitor markers, such as Pax6 and Chx10 have been associated to a regenerative potential of these cells. However, exogenous activation of Wnt signalling is necessary to induce Müller cell de-differentiation in mouse retina. The Wnt signalling regenerative activity that is present in lower eukaryotes might therefore have been lost during evolution.

Although all of these studies highlight the important role of the Wnt/β-catenin signalling pathway in the regeneration process, the biological mechanisms that form the basis of this regeneration were still largely unknown to date; here, it is shown that at least in mouse retina, regeneration can occur through cell-fusion-mediated reprogramming. On the other hand, it was found a not homogenous regeneration of the transplanted retinas, indicating that other factors, such nerve growth factors for example, might be used to enhance the process. Also, it cannot be excluded that in addition to generate new neurons and therefore to *bona-fide* regenerate the retinal tissue, a delayed neuronal degeneration might have also been induced.

Moreover, this process can be induced upon recruitment of BMCs into the eye. Interestingly, a few recruited BMCs fuse with Müller cells after damage were observed. Therefore, it might well be that the de-differentiation of Müller cells, reported previously [Osakada et al., (2007) cited *supra*] is due to fusion events with recruited BMCs.

This endogenous *in vivo* reprogramming can be a mechanism of damage repair and, minor damages, like photo-damage or mechanical-damage, might be repaired through cell fusion-mediated reprogramming after recruitment of BMCs. It is also possible that Wnt-mediated reprogramming is a safeguard mechanism after *in vivo* cell fusion. The hybrids that are not reprogrammed undergo apoptosis-mediated cell death. Instead, Wnt-mediated reprogrammed hybrids can survive and can proliferate.

However, although other attempts to fully regenerate damaged mouse retinas after ectopic activation of Wnt signalling in the eye have failed [Osakada et al., (2007) cited *supra*] here it has been demonstrated that in addition to the activation of Wnt signalling, cell-fusion-mediated reprogramming is also essential in the regeneration process. Thus, strategies to increase BMC recruitment to the eyes along with the activation of Wnt signalling might be therapeutically relevant to regenerate damaged retinal tissue.

The assays show that expression of RFP and YFP transgenes derived from the genome of the two different fusion partners were detected two weeks after cell fusion, which indicates the contribution of both genomes in the hybrids. Moreover, proliferation of the reprogrammed hybrids was observed, an indication that they were mononucleate cells or *bona-fide* synkarions. Stable heterokaryons have been seen with Purkinje cell fusion with BM-derived cells, and their numbers were greatly increased upon inflammation [Johansson *et al.*, *Nat Cell Biol* **10**, 575-583 (2008)]. In addition, recently, heterokaryons have been also found in wild-type retinas [Morillo *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 109-114 (2010)]. However, inventors never detected heterokaryons in the retina of the injected eyes, although its presence cannot be formally excluded.

On the other hand, it should be taken into account that detrimental consequences were seen when increased resistance to apoptosis was observed after fusion of cancer SCs with somatic cells, such as multidrug resistance of a developing tumour (Lu &

Kang. *Cancer Res* **69**, 8536-8539 (2009)]. Moreover, cell fusion, and thus polyploid cells, can also arise during pathological conditions, and often the genetic instability in these cells can lead to aneuploidy and the development of cancers. Thus, data provided by the present invention might also be important in the future to follow a different path; i.e., to study the fusion of cancer SCs with somatic cells during tumour development.

Reprogramming is a gradual and slow process, with lineage specific genes silenced, while endogenous genes associated with pluripotency are induced. Overall, the process is very inefficient, because of the different genetic and epigenetic barriers [Sanges & Cosma. *Int J Dev Biol* **54**, 1575-1587 (2010)]. Indeed pre-iPS (partially reprogrammed cells) show incomplete epigenetic remodelling and persistent DNA hypermethylation, among other features. They can be converted into iPS cells through global inhibition of DNA methylation. Inventors recently showed that deletion of Tcf3, which is a repressor of β-catenin target genes, relieves epigenome modifications during reprogramming, thereby facilitating iPS cell derivation *in vitro* [Lluis et al., (2011) in press]. This might also take place during *in vivo* cell fusion: the epigenome of SPCs might be actively remodelled, and some reprogrammers transcribed, which might change the neuronal epigenome in the hybrids *in trans*.

In conclusion, it can be asserted that cell-fusion-mediated reprogramming controlled by Wnt signalling is a physiological *in vivo* process, which can contribute to cell regeneration/repair in normal tissues.

CLAIMS

1. A cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

2. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 1, wherein said cell is a cell treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or is a cell that overexpresses a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

3. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 2, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, 2-(4-acetylphenylazo)-2-(3,3-dimethyl-3,4-dihydro-2H-isoquinolin-1-ylidene)-acetamide (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-yloxy)-9-(1,1'-biphenyl-4-yl)methyl)-9*H*-purin-6-ylamino]-3-phenyl-propan-1-ol (QS11), deoxycholic acid (DCA), 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

4. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 2, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

5. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 1 to 4, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior

ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

6. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 5, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

7. A cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC) and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

8. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 7, wherein said cells are cells treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or are cells that overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

9. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 8, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

10. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 8, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

11. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 7 to 10, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

12. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 11, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

13. A cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming, mediated by the Wnt/β-catenin signalling pathway, of a retinal cell by fusion of said cell with said retinal cell upon contact of said cell and retinal neuron in the eye of a subject.

14. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 13, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor.

15. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 14, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

16. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 14, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from

the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

17. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 13 to 16, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

18. Cell for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 17, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

19. A cell population comprising a plurality of cells, said cells being selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC) and any combination thereof, for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by reprogramming, mediated by the Wnt/β-catenin signalling pathway, of a retinal cell by fusion of said cell with said retinal cell upon contact of said cell and said retinal cell in the eye of a subject.

20. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 19, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor.

21. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 20, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)

pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

22. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 20, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

23. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 19 to 22, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

24. Cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 23, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

25. A cell composition, wherein at least 50% of the cells of said cell composition are selected from the group consisting of hematopoietic stem cells (HSCs), progenitor cells, mesenchymal stem cells (MSCs) and any combination thereof and wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated.

26. A pharmaceutical composition selected from the group consisting of:

1) a pharmaceutical composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, and a pharmaceutically acceptable carrier, and

2) a pharmaceutical composition comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and a pharmaceutically acceptable carrier.

27. A kit selected from the group consisting of:

1) a kit comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, and instructions for use of the kit components, and

2) a kit comprising at least a cell selected from the group consisting of a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, a mesenchymal stem cell (MSC), and any combination thereof, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and instructions for use of the kit components.

28. A kit according to claim 27, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

29. Kit for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 28, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

30. Kit for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 28, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

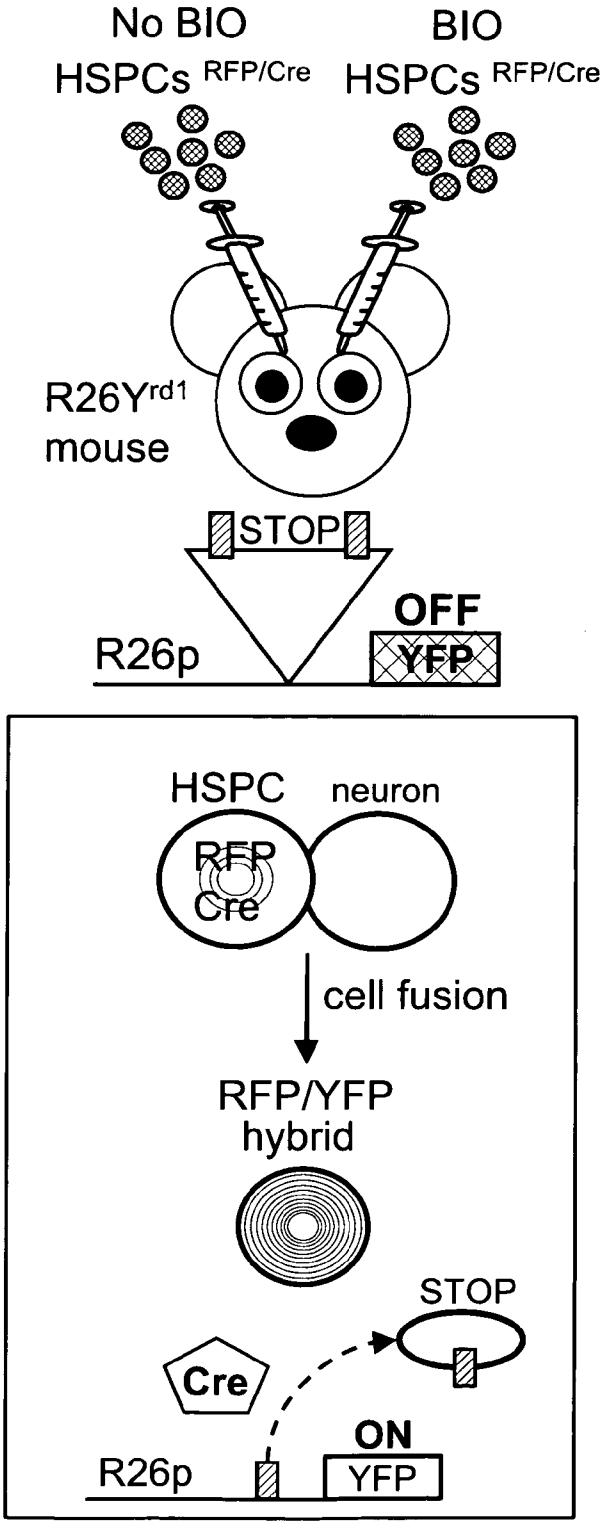

No BIO
HSPCs RFP/Cre
BIO
HSPCs RFP/Cre
R26Y^rd1
mouse
STOP
OFF
R26p
YFP
HSPC
neuron
RFP
Cre
cell fusion
RFP/YFP
hybrid
STOP
Cre
ON
R26p
YFP

Fig. 1A

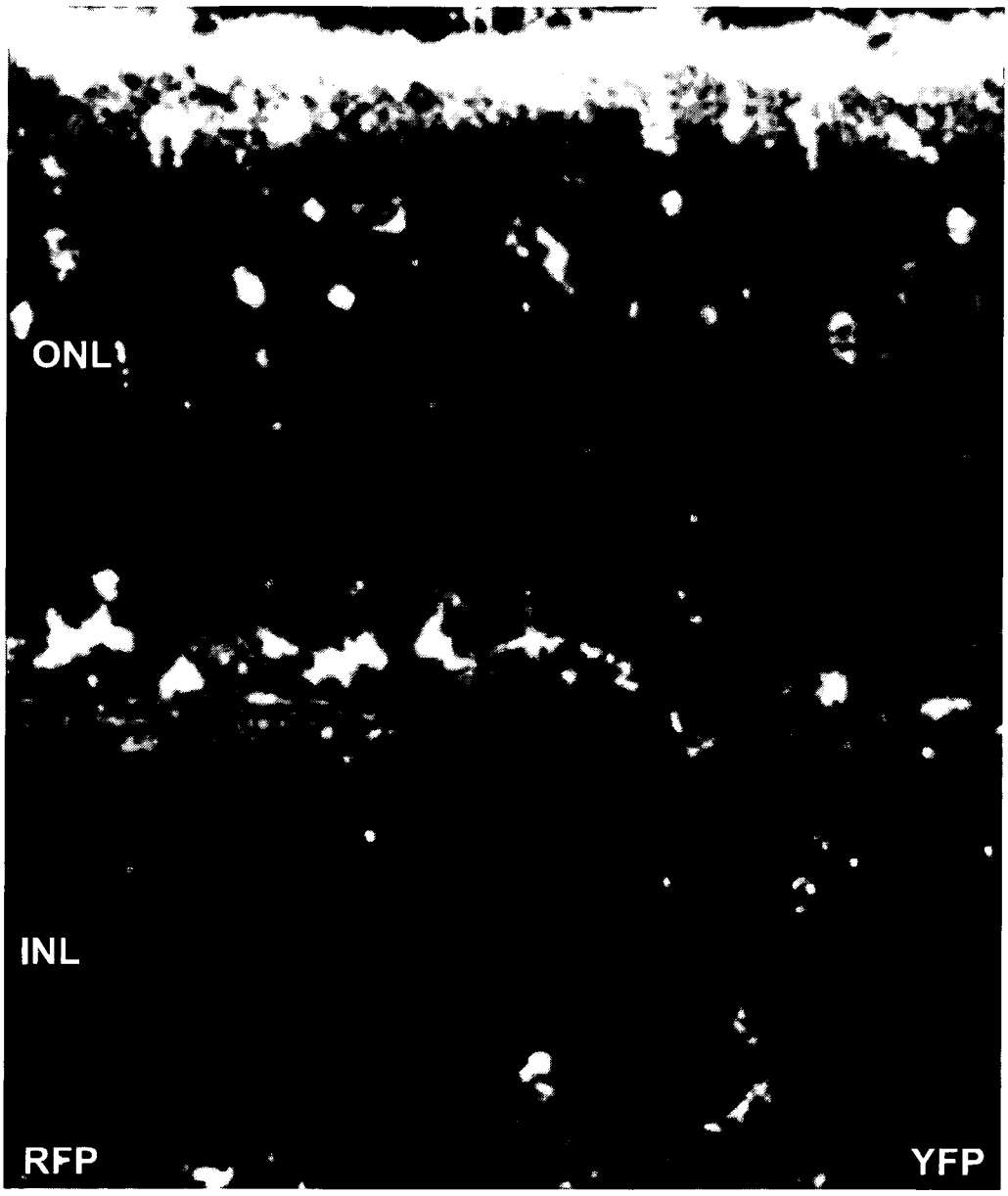


Fig.1B

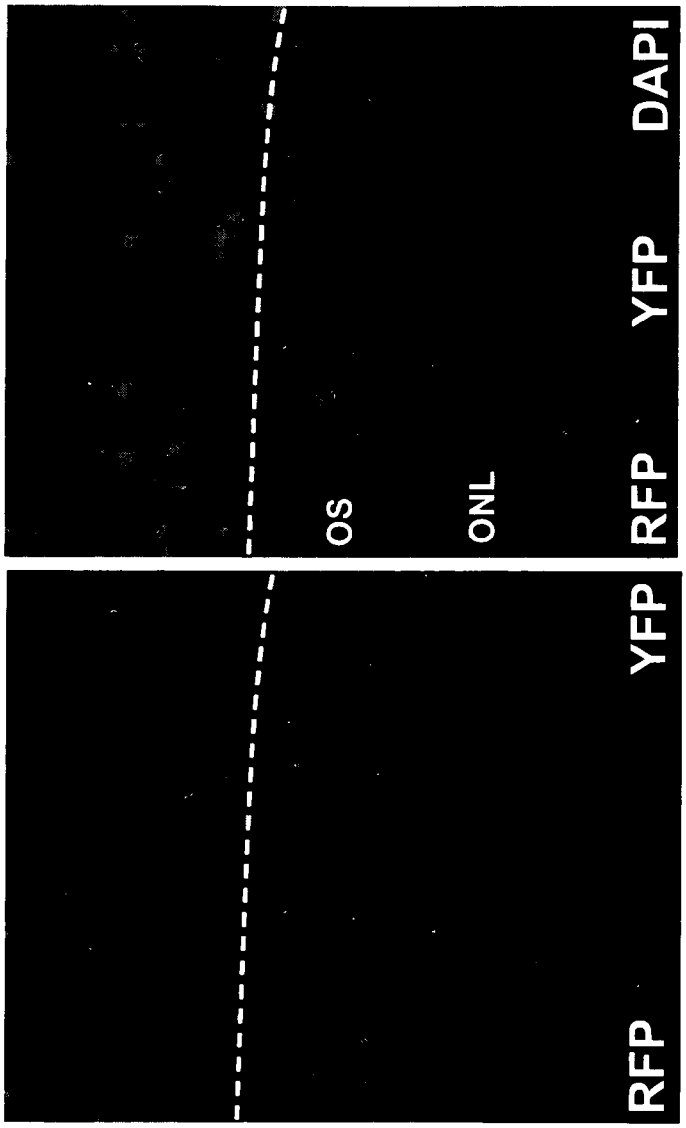


Fig.1E

Fig.1D

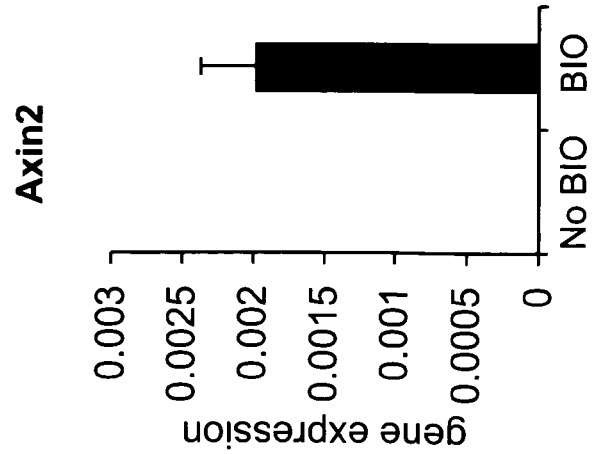


Fig.1C

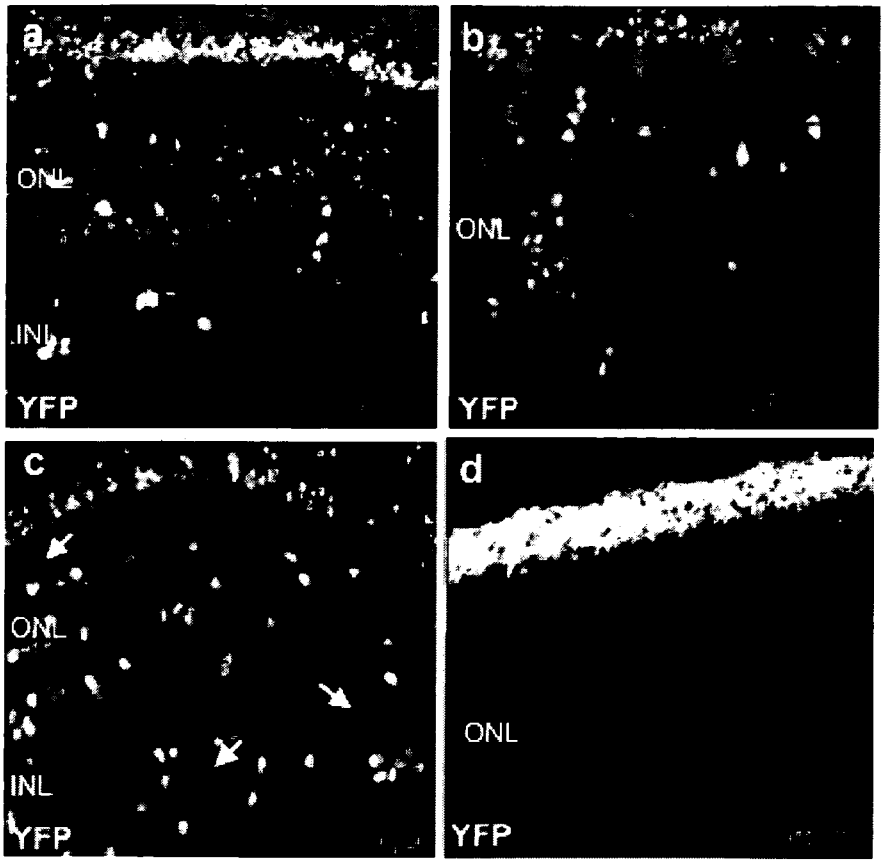


Fig. 2

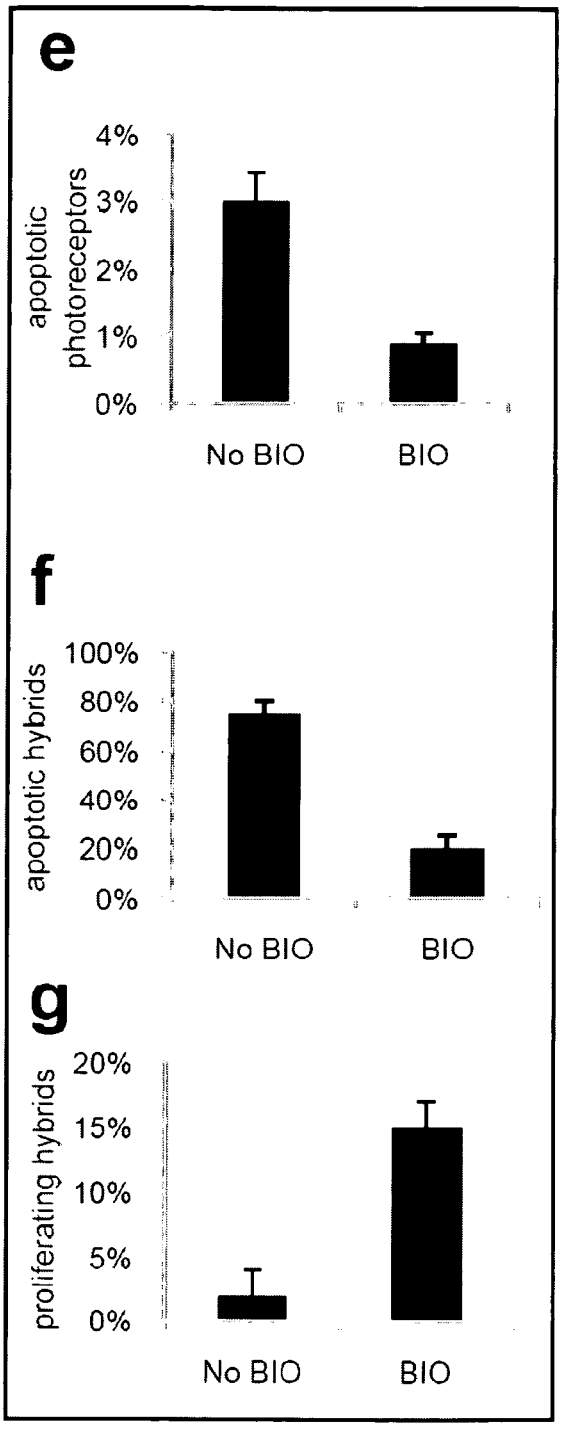

e
apoptotic photoreceptors
4%
3%
2%
1%
0%
No BIO
BIO
f
apoptotic hybrids
100%
80%
60%
40%
20%
0%
No BIO
BIO
g
proliferating hybrids
20%
15%
10%
5%
0%
No BIO
BIO

Fig. 2

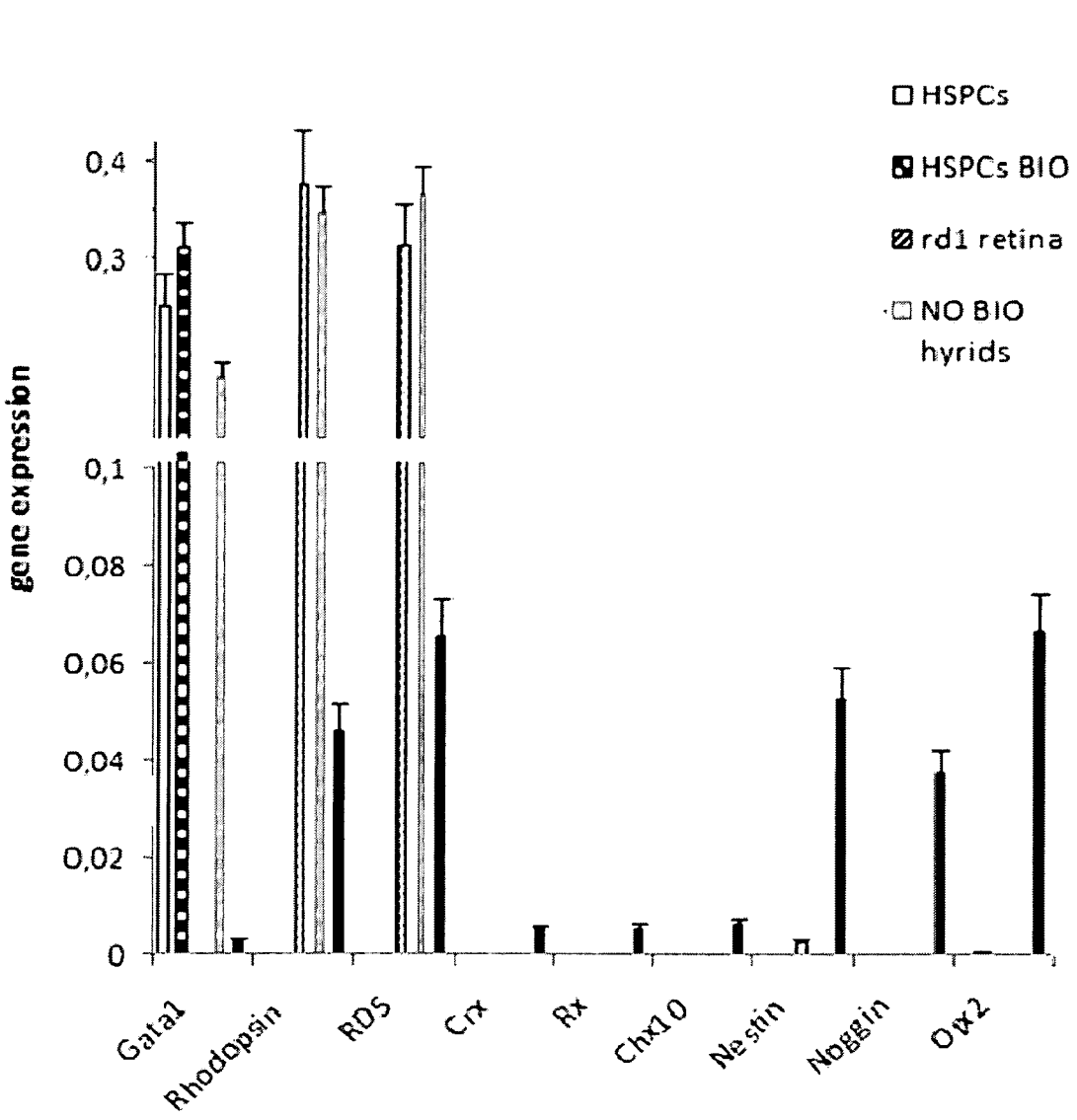

h
HSPCs
HSPCs BIO
rd1 retina
NO BIO hyrids
gene expression
0,4
0,3
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
Gata1
Rhodopsin
RDS
Crx
Rx
Chx10
Nestin
Noggin
Otx2

Fig. 2

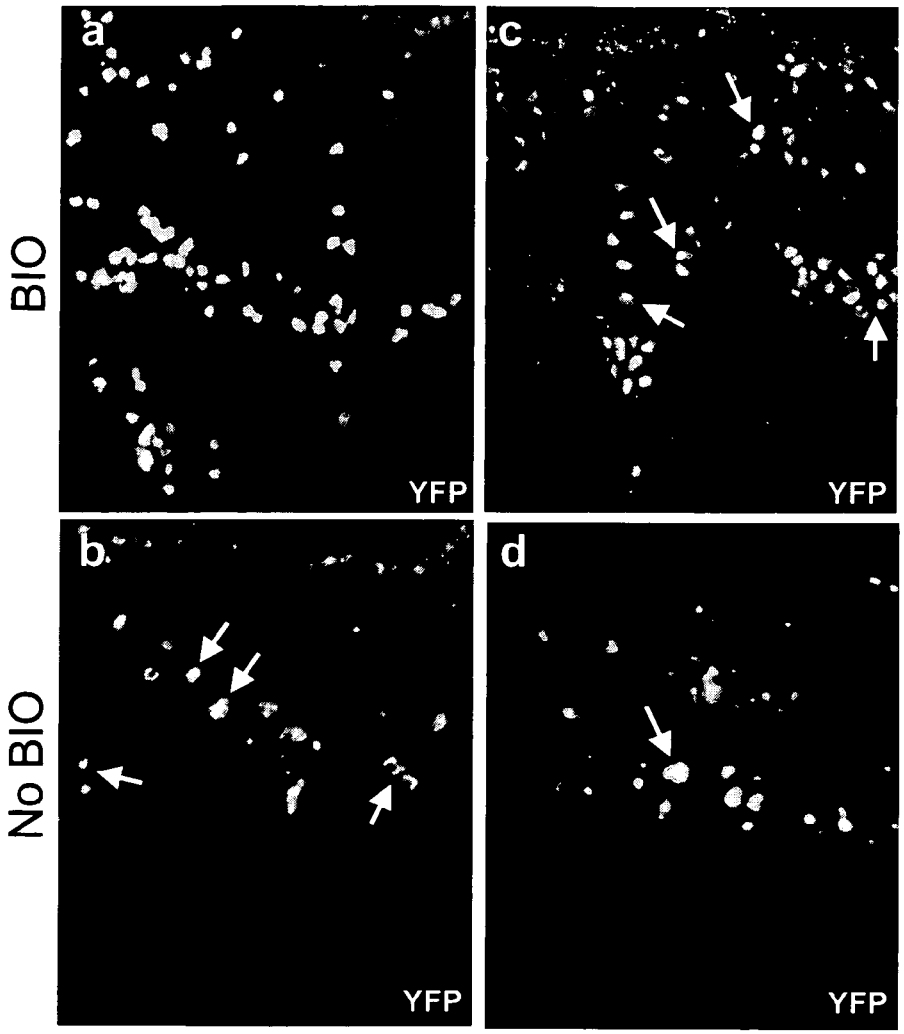


Fig. 3

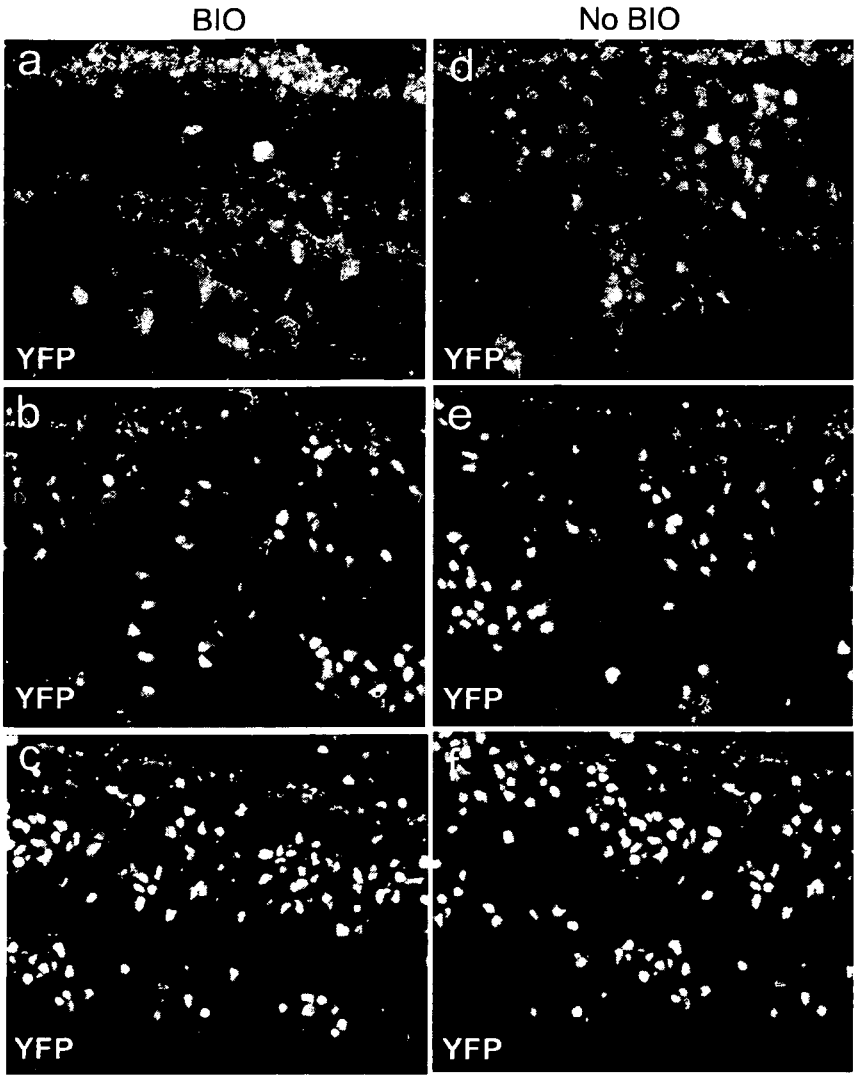


Fig. 4

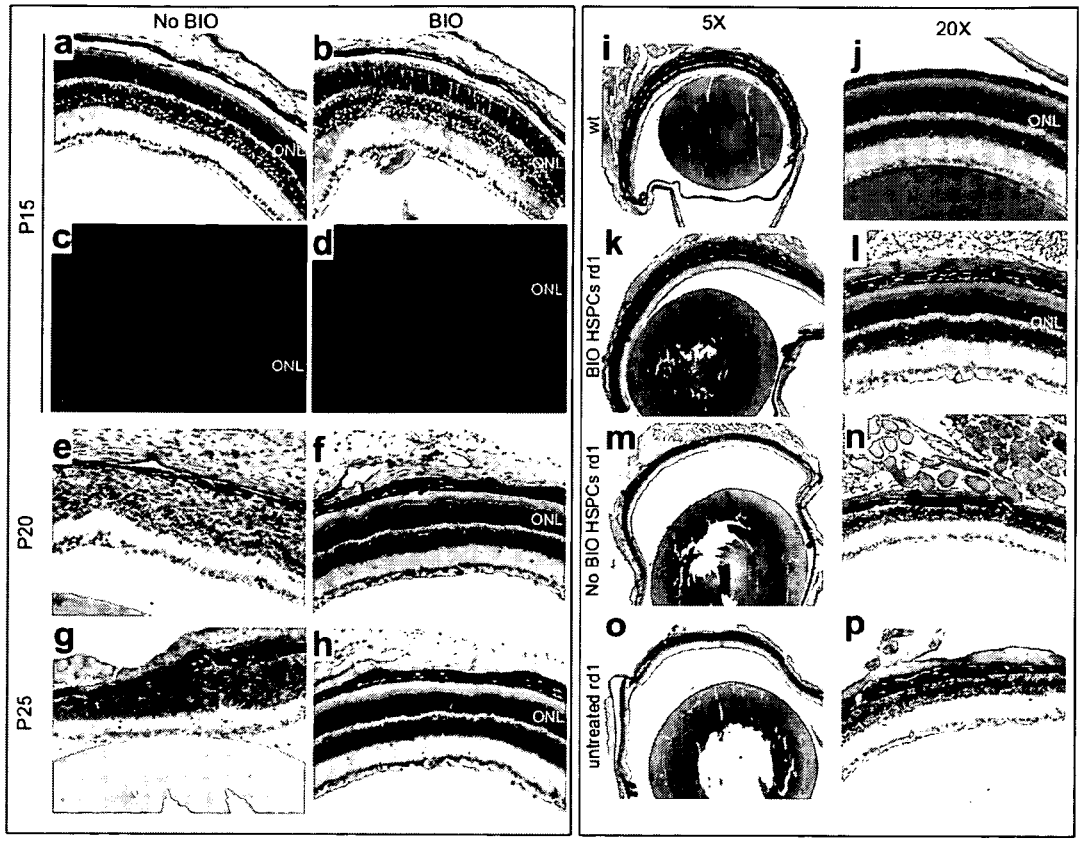

No BIO
BIO
5X
20X
P15
P20
P25
wt
BIO HSPCs rd1
No BIO HSPCs rd1
untreated rd1
ONL

Fig. 5

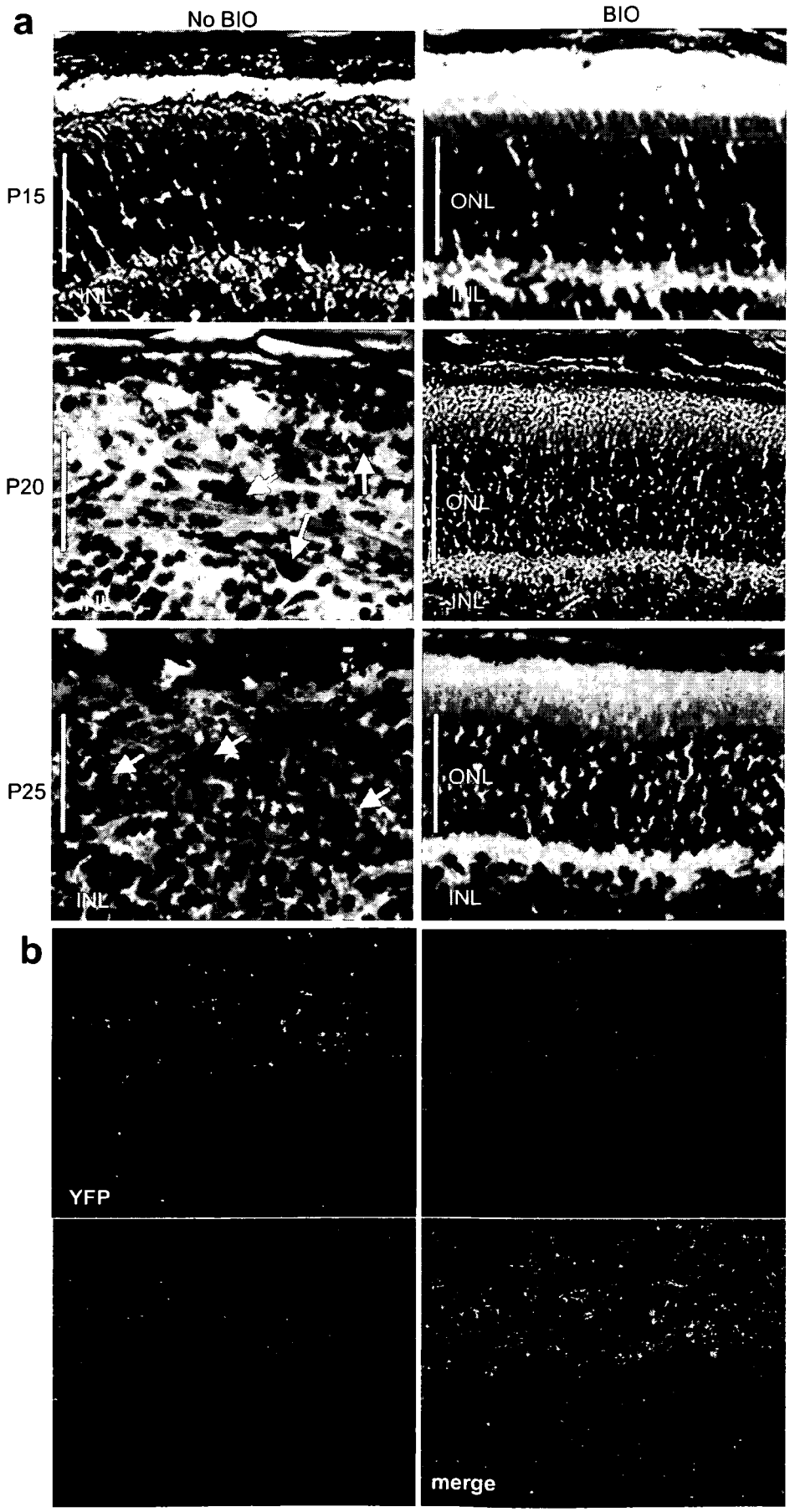


Fig. 6

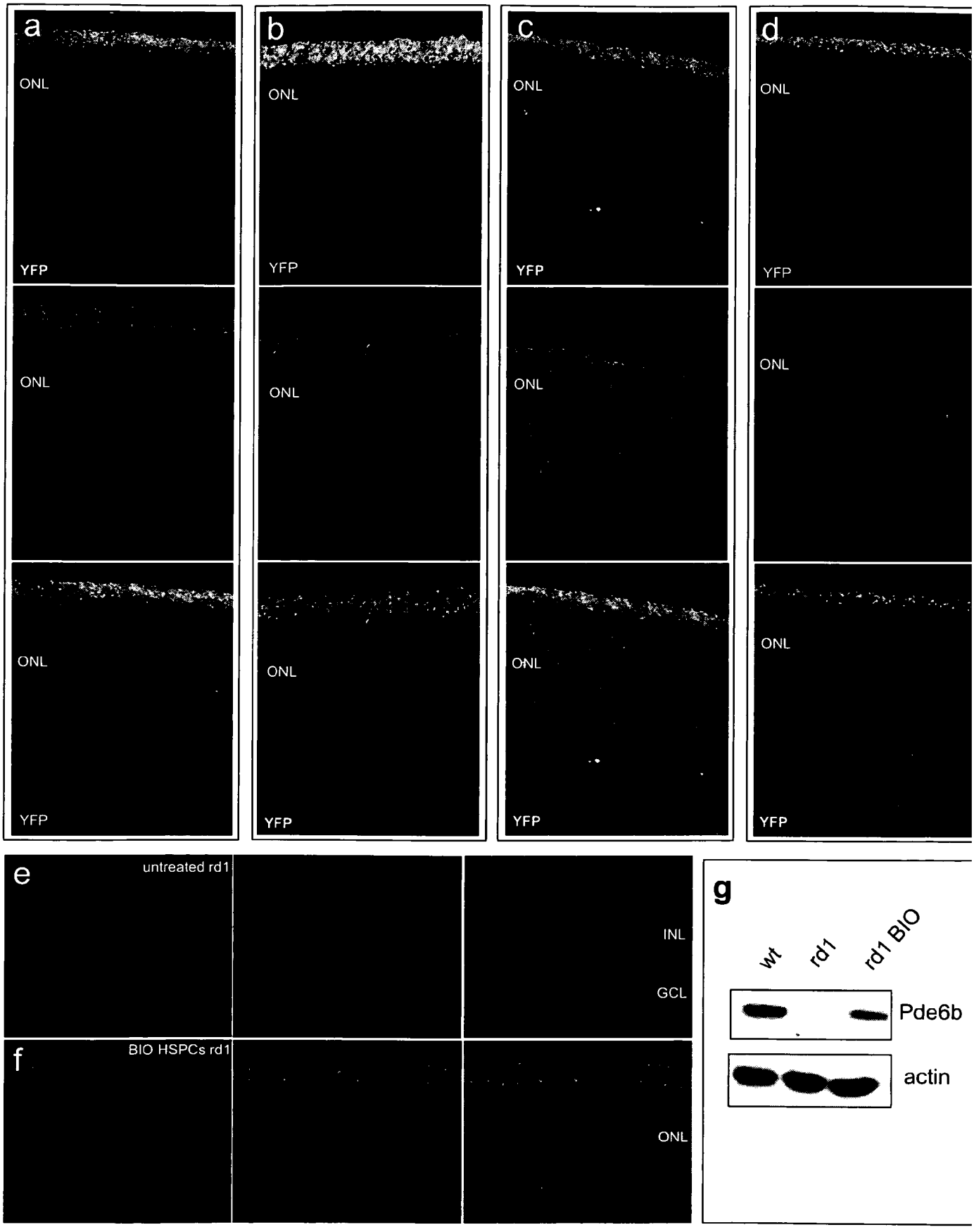

a
ONL
YFP
ONL
ONL
YFP
b
ONL
YFP
ONL
ONL
YFP
c
ONL
YFP
ONL
ONL
YFP
d
ONL
YFP
ONL
ONL
YFP
e
untreated rd1
INL
GCL
f
BIO HSPCs rd1
ONL
g
wt
rd1
rd1 BIO
Pde6b
actin

Fig.7

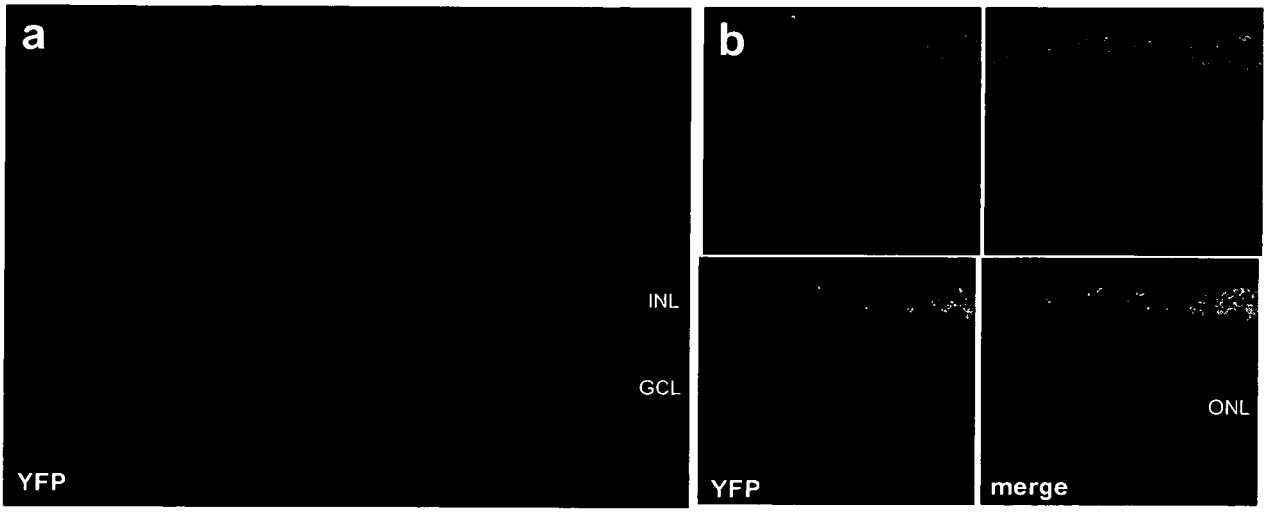


Fig. 8

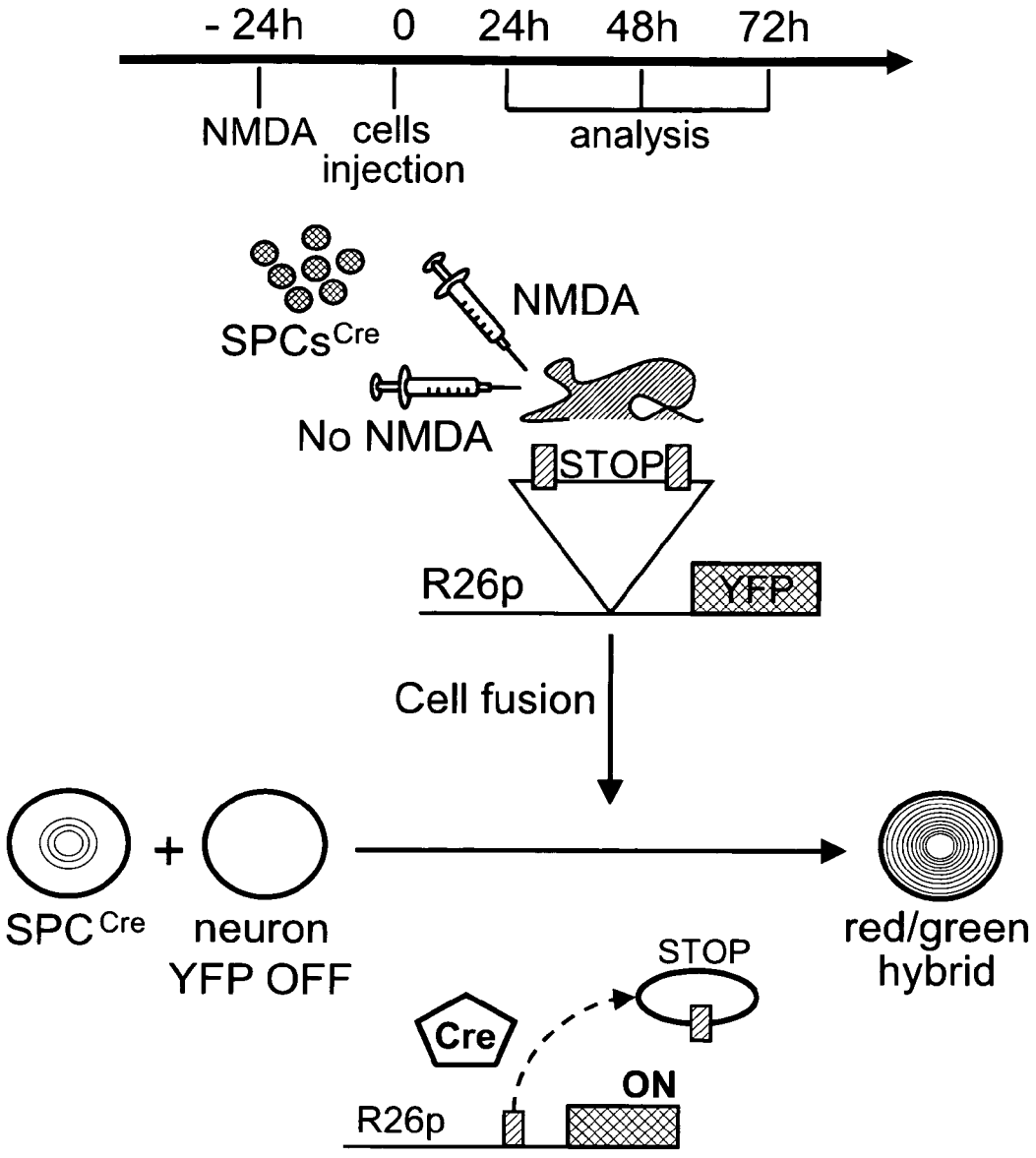

- 24h
0
24h
48h
72h
NMDA
cells injection
analysis
SPCs Cre
NMDA
No NMDA
STOP
R26p
YFP
Cell fusion
SPC Cre
neuron YFP OFF
red/green hybrid
STOP
Cre
ON
R26p

Fig. 9A

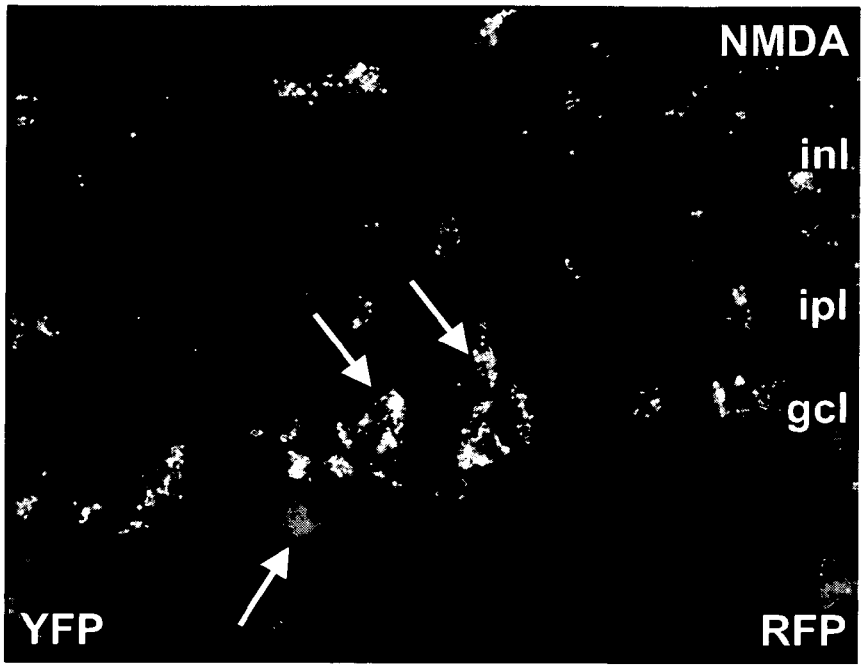


Fig. 9B

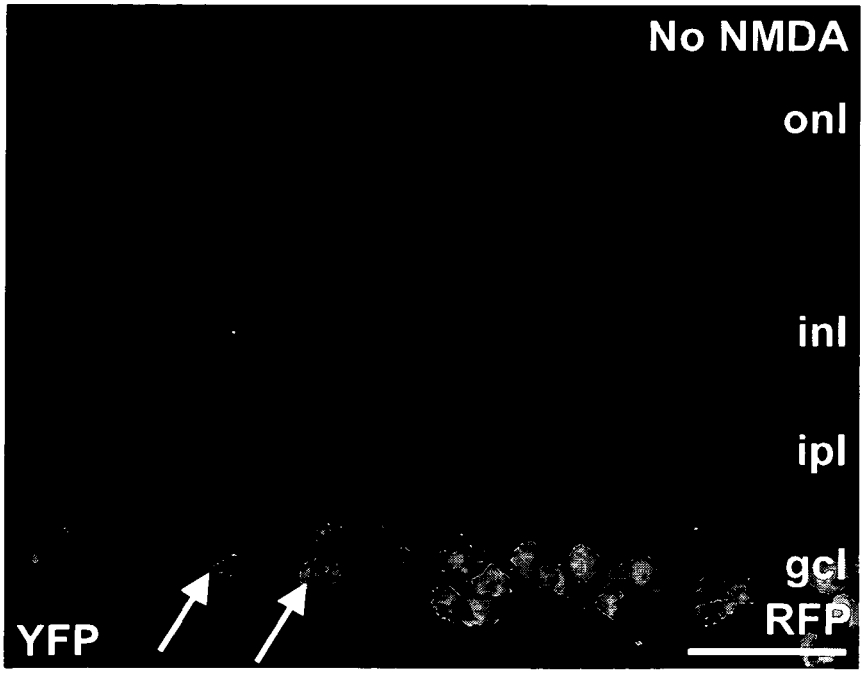


Fig. 9C

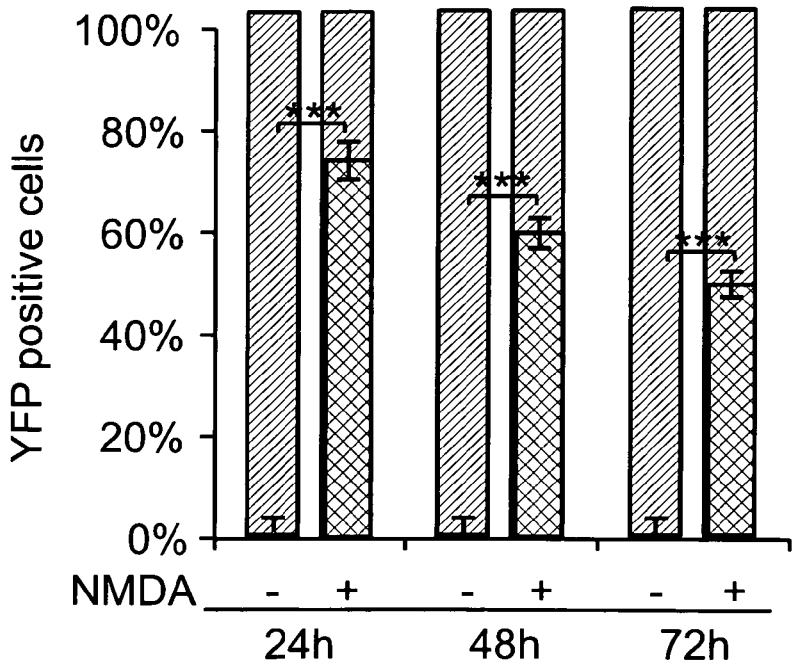


Fig. 9D

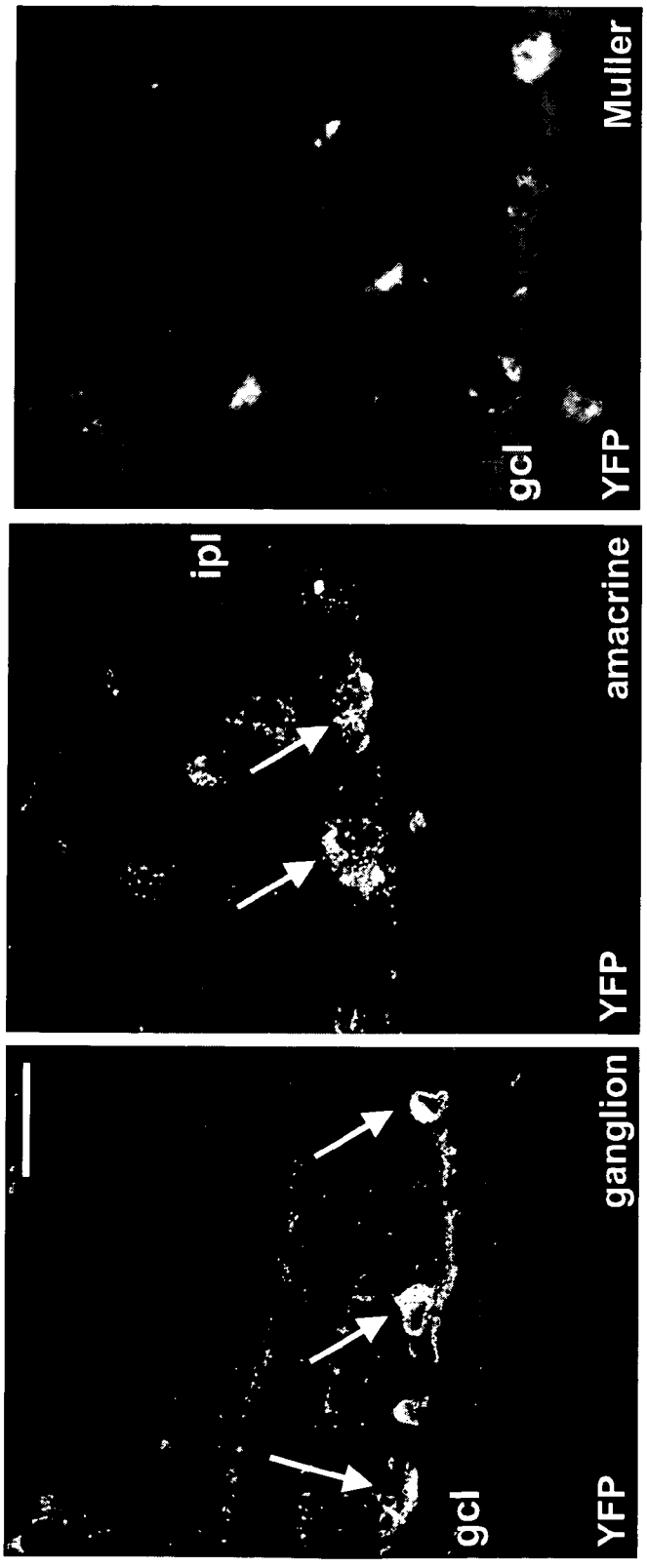


Fig. 9E

Fig. 9F

Fig. 9G

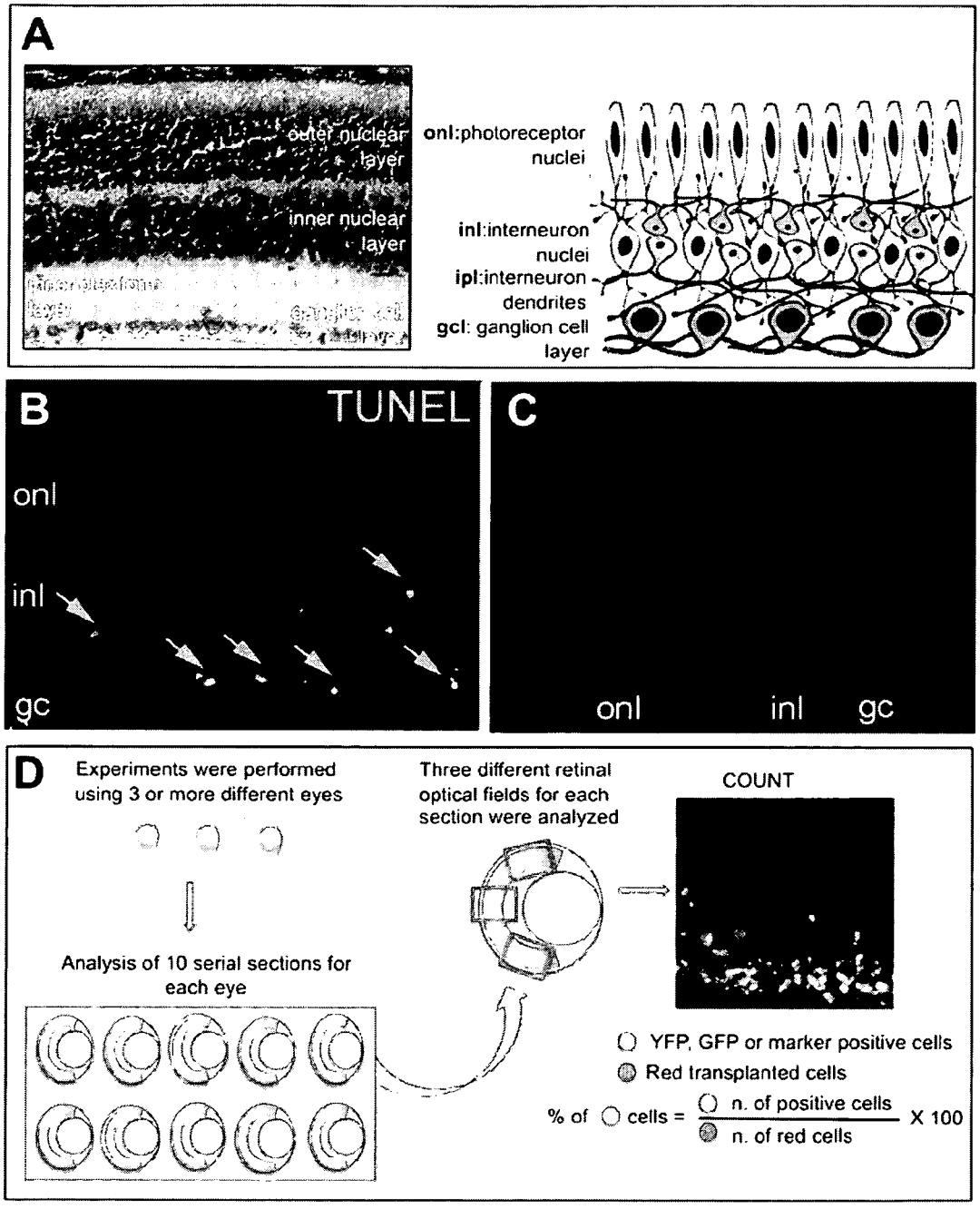

A
outer nuclear layer
inner nuclear layer
onl:photoreceptor nuclei
inl:interneuron nuclei
ipl:interneuron dendrites
gcl: ganglion cell layer
B
TUNEL
onl
inl
gc
C
onl
inl
gc
D
Experiments were performed using 3 or more different eyes
Analysis of 10 serial sections for each eye
Three different retinal optical fields for each section were analyzed
COUNT
YFP, GFP or marker positive cells
Red transplanted cells
% of cells = n. of positive cells / n. of red cells X 100

Fig. 10

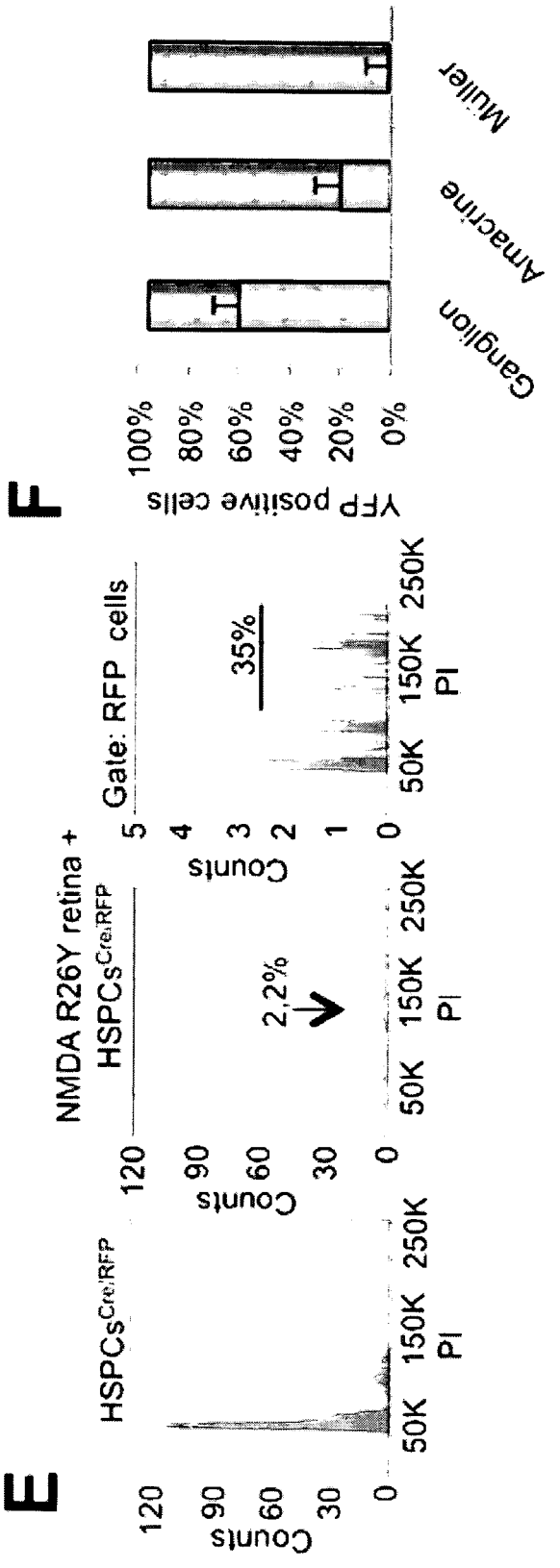

E
HSPCs Cre:RFP
Counts
120
90
60
30
0
50K
150K
250K
PI
NMDA R26Y retina +
HSPCs Cre:RFP
2,2%
Gate: RFP cells
35%
F
YFP positive cells
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Ganglion
Amacrine
Muller

Fig. 10

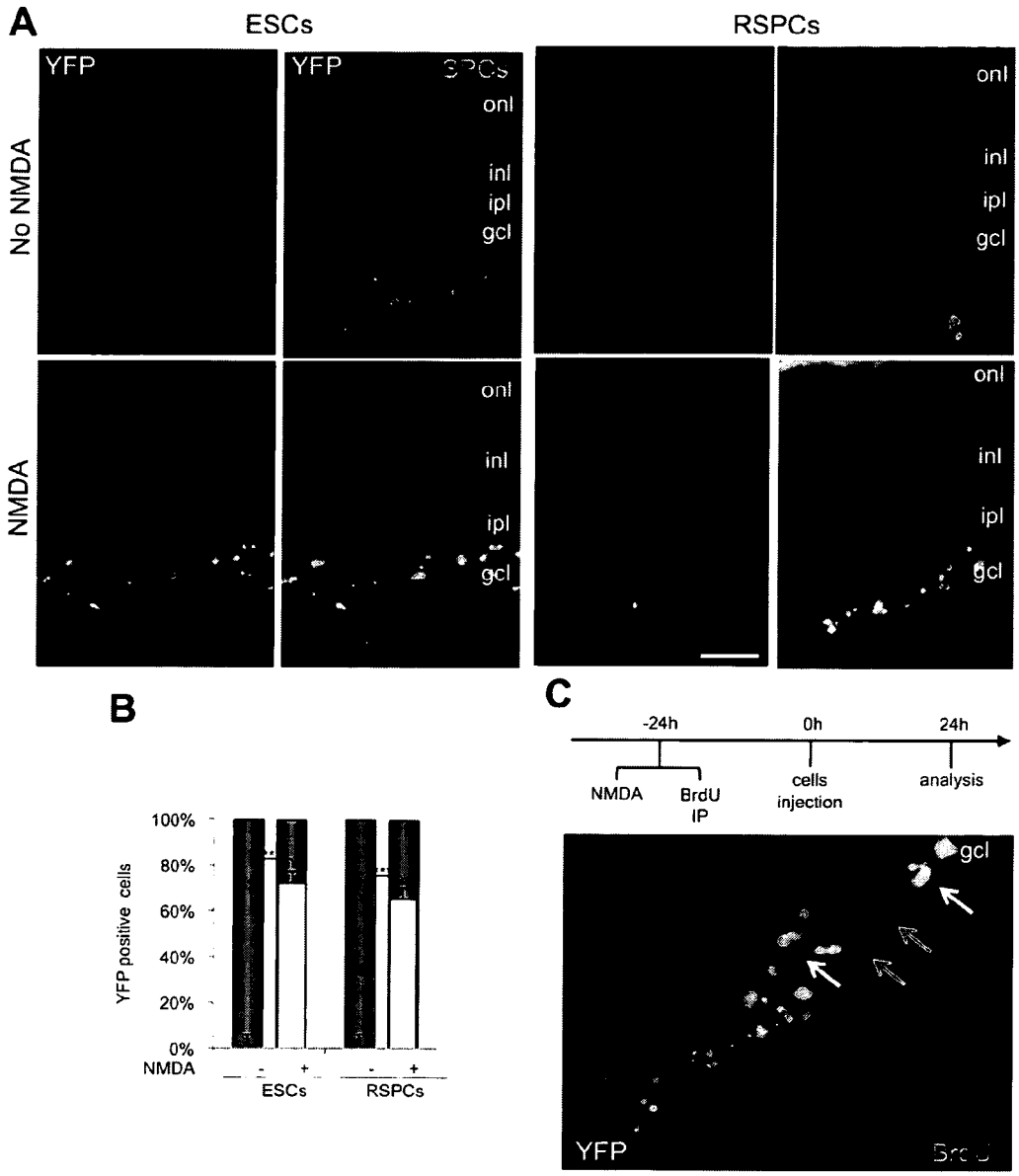

A
ESCs
RSPCs
YFP
YFP
onl
inl
ipl
gcl
No NMDA
NMDA
B
YFP positive cells
100%
80%
60%
40%
20%
0%
NMDA
ESCs
RSPCs
C
-24h
0h
24h
NMDA
BrdU IP
cells injection
analysis
gcl
YFP

Fig. 11

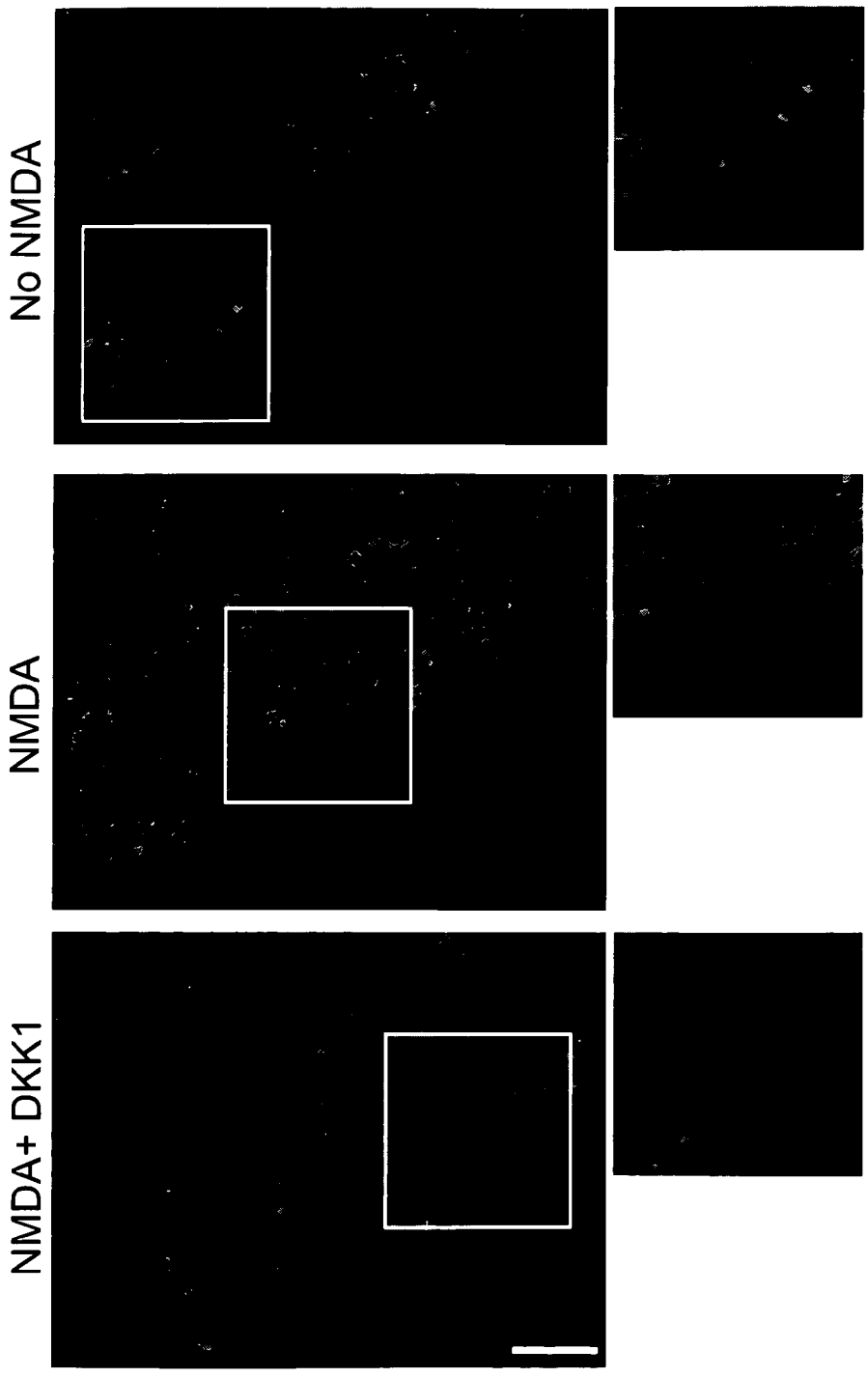


Fig. 12A

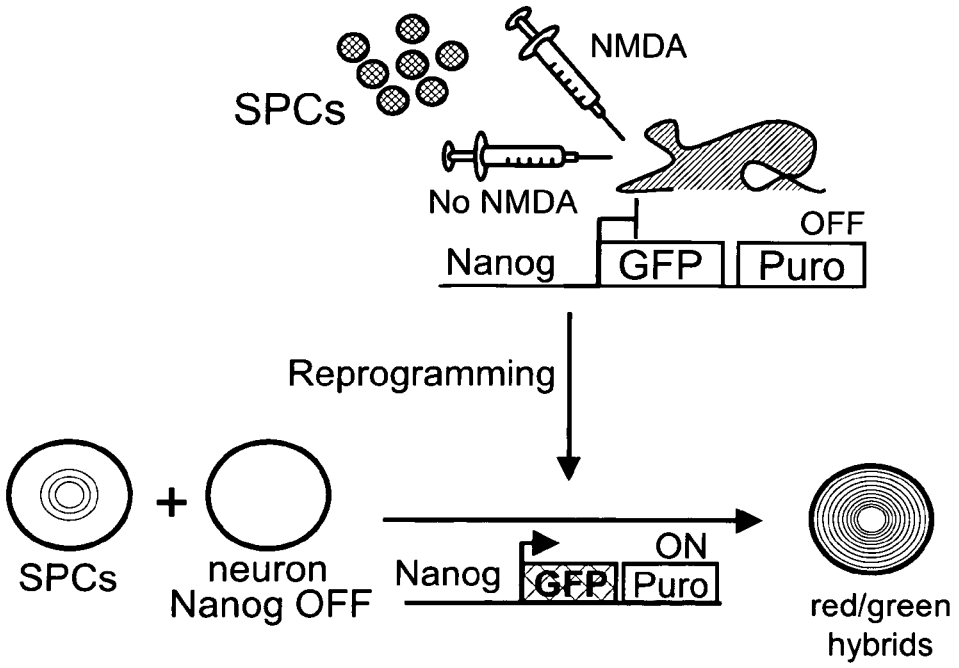


Fig. 12B

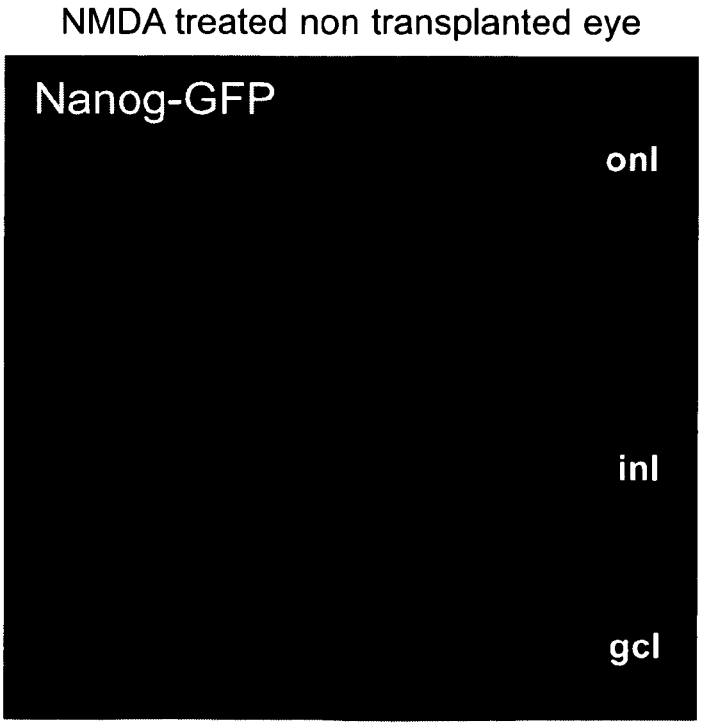


Fig. 12C

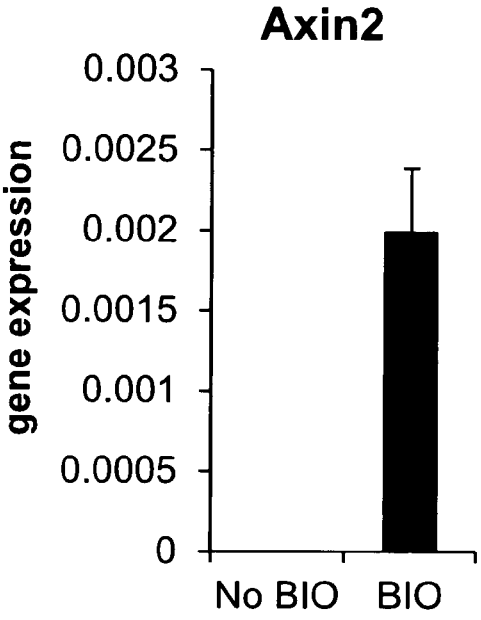


Fig. 12D



Fig. 12E

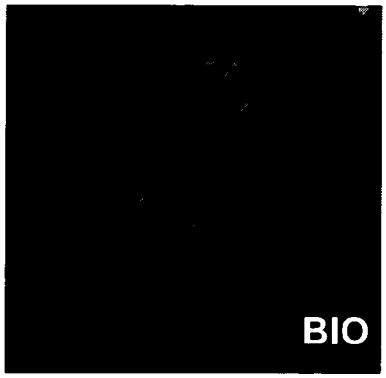


Fig. 12F

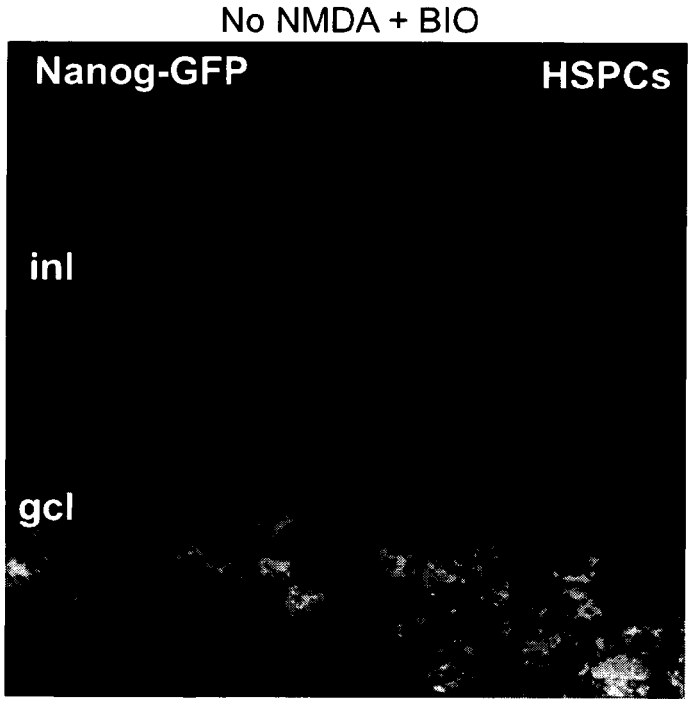


Fig. 12G

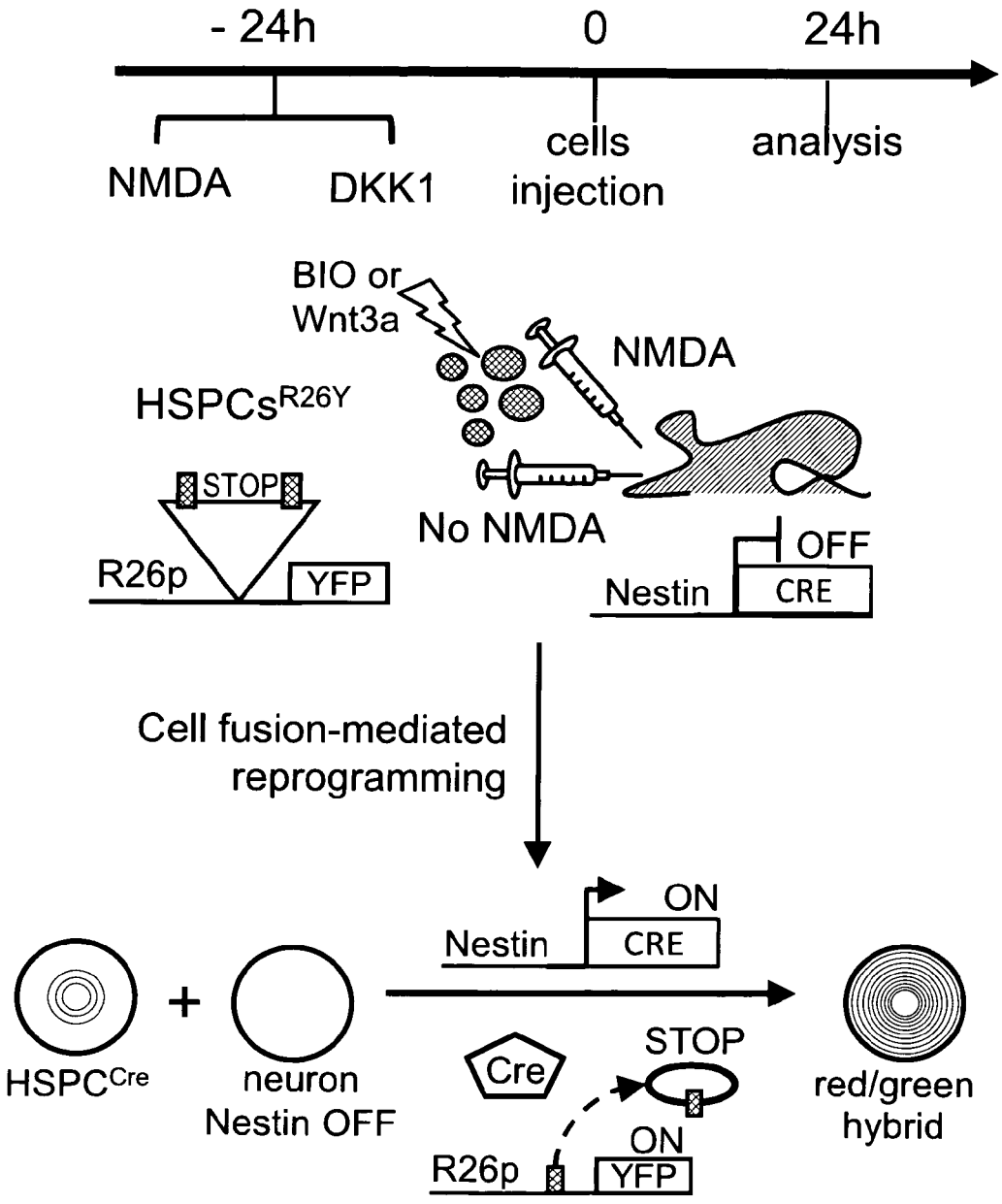

- 24h
0
24h
NMDA
DKK1
cells injection
analysis
BIO or Wnt3a
NMDA
HSPCsR26Y
STOP
R26p
YFP
No NMDA
OFF
Nestin
CRE
Cell fusion-mediated reprogramming
ON
Nestin
CRE
HSPCCre
neuron Nestin OFF
Cre
STOP
ON
R26p
YFP
red/green hybrid

Fig. 13A

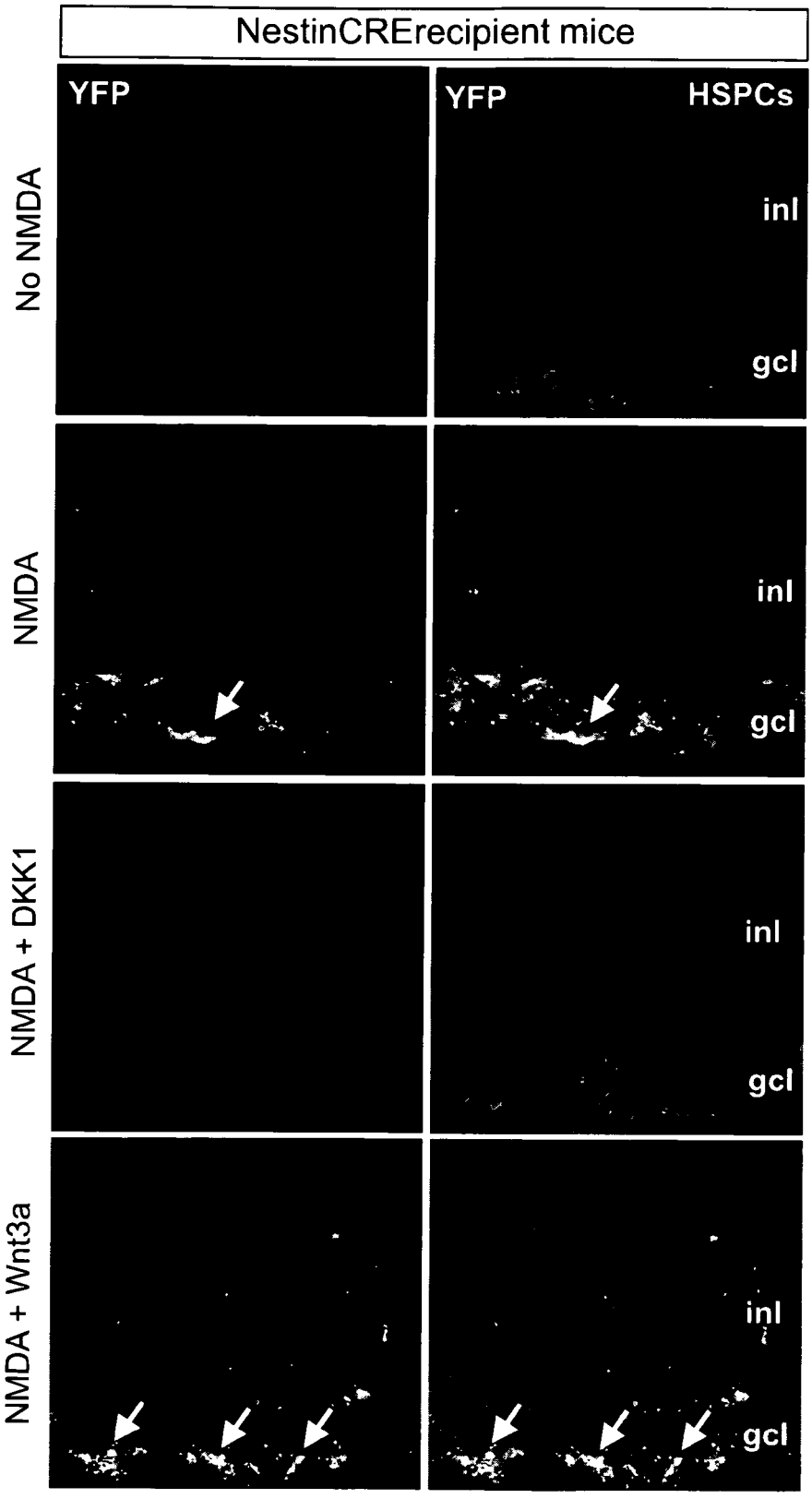

NestinCRErecipient mice
YFP
YFP
HSPCs
No NMDA
inl
gcl
NMDA
inl
gcl
NMDA + DKK1
inl
gcl
NMDA + Wnt3a
inl
gcl

Fig. 13B

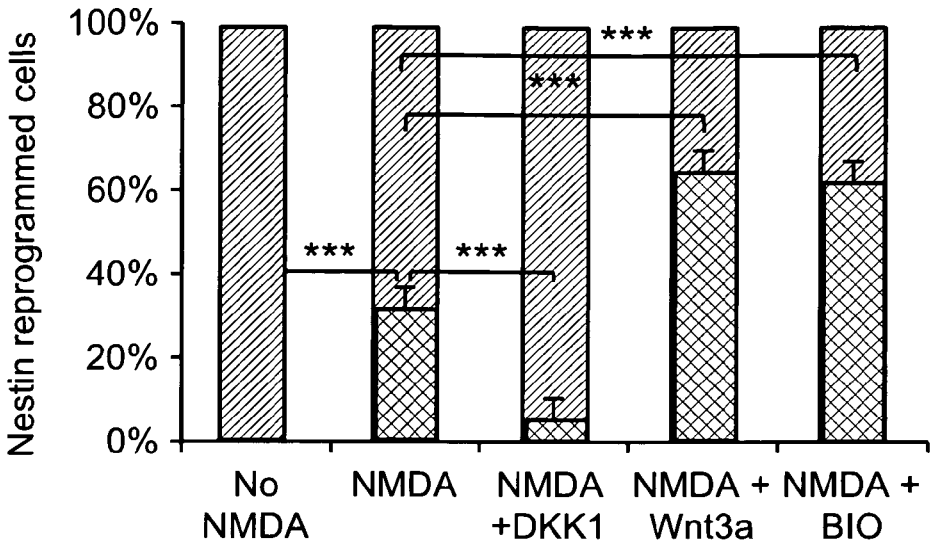


Fig. 13C

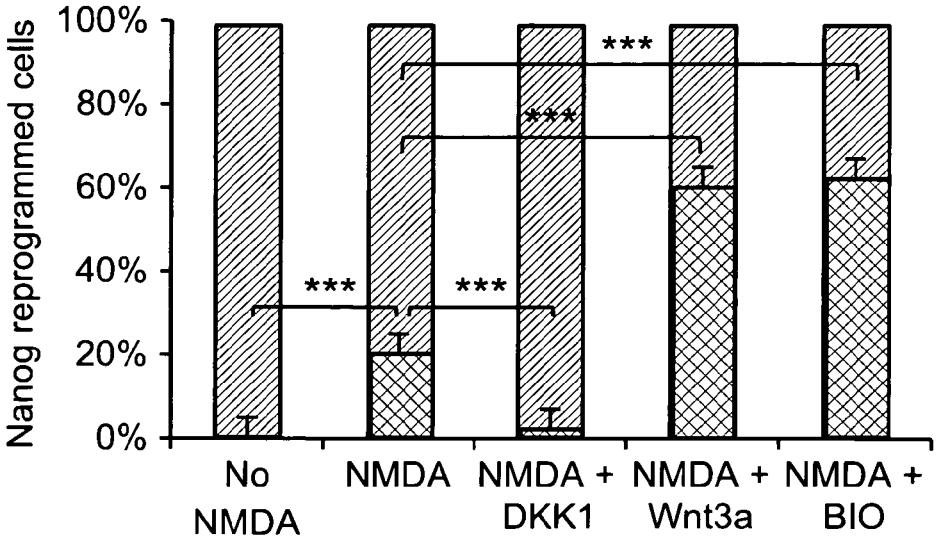


Fig. 13D

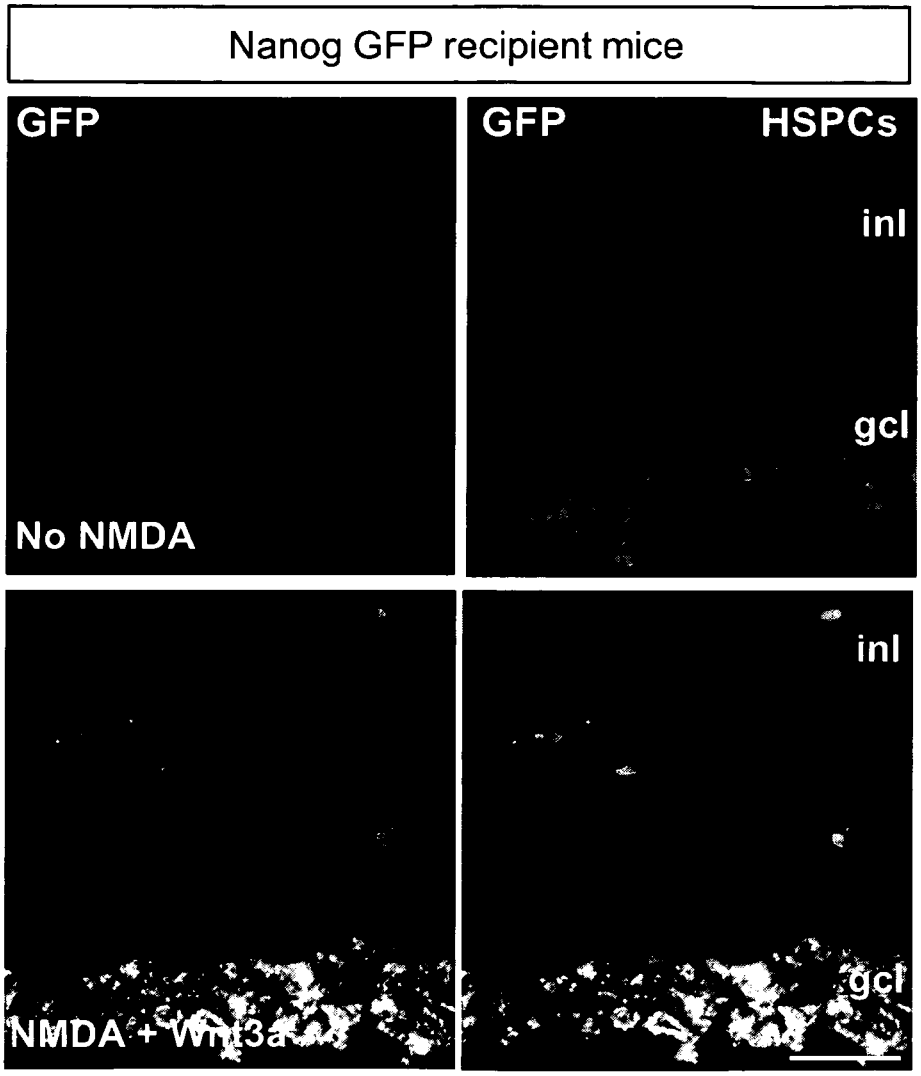

Nanog GFP recipient mice
GFP
GFP
HSPCs
inl
gcl
No NMDA
inl
gcl
NMDA + Wnt3a

Fig. 13E

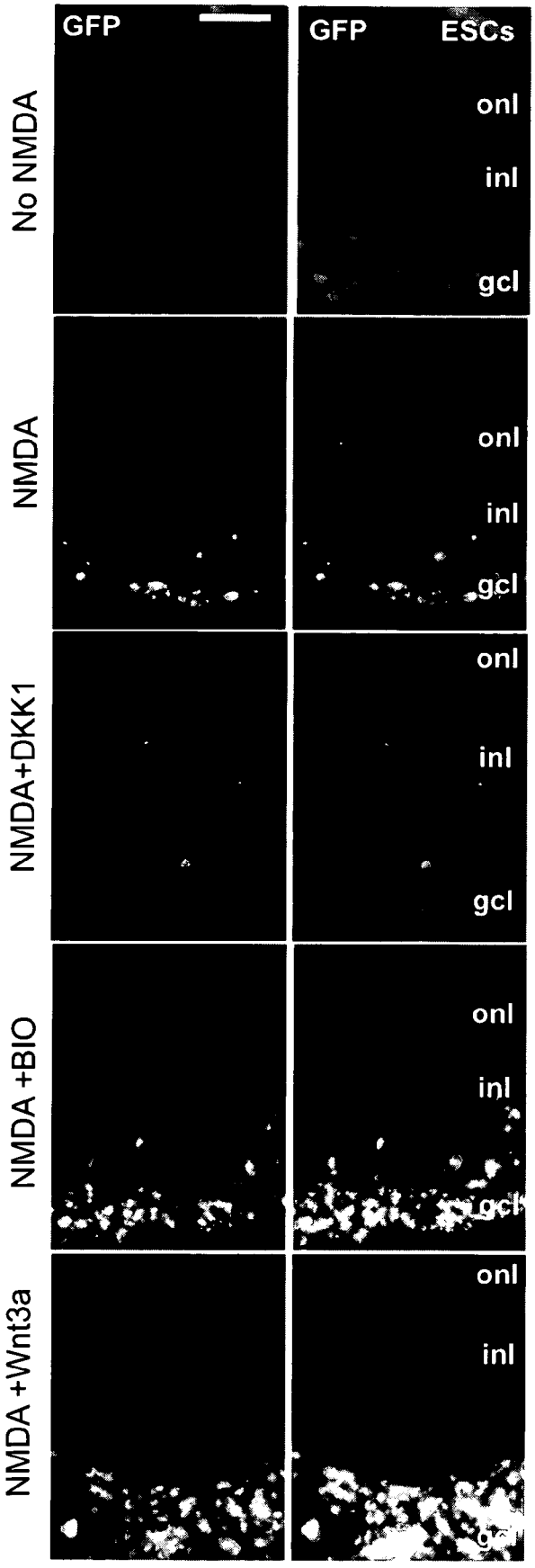

GFP
GFP
ESCs
No NMDA
NMDA
NMDA+DKK1
NMDA +BIO
NMDA +Wnt3a
onl
inl
gcl

Fig. 14A

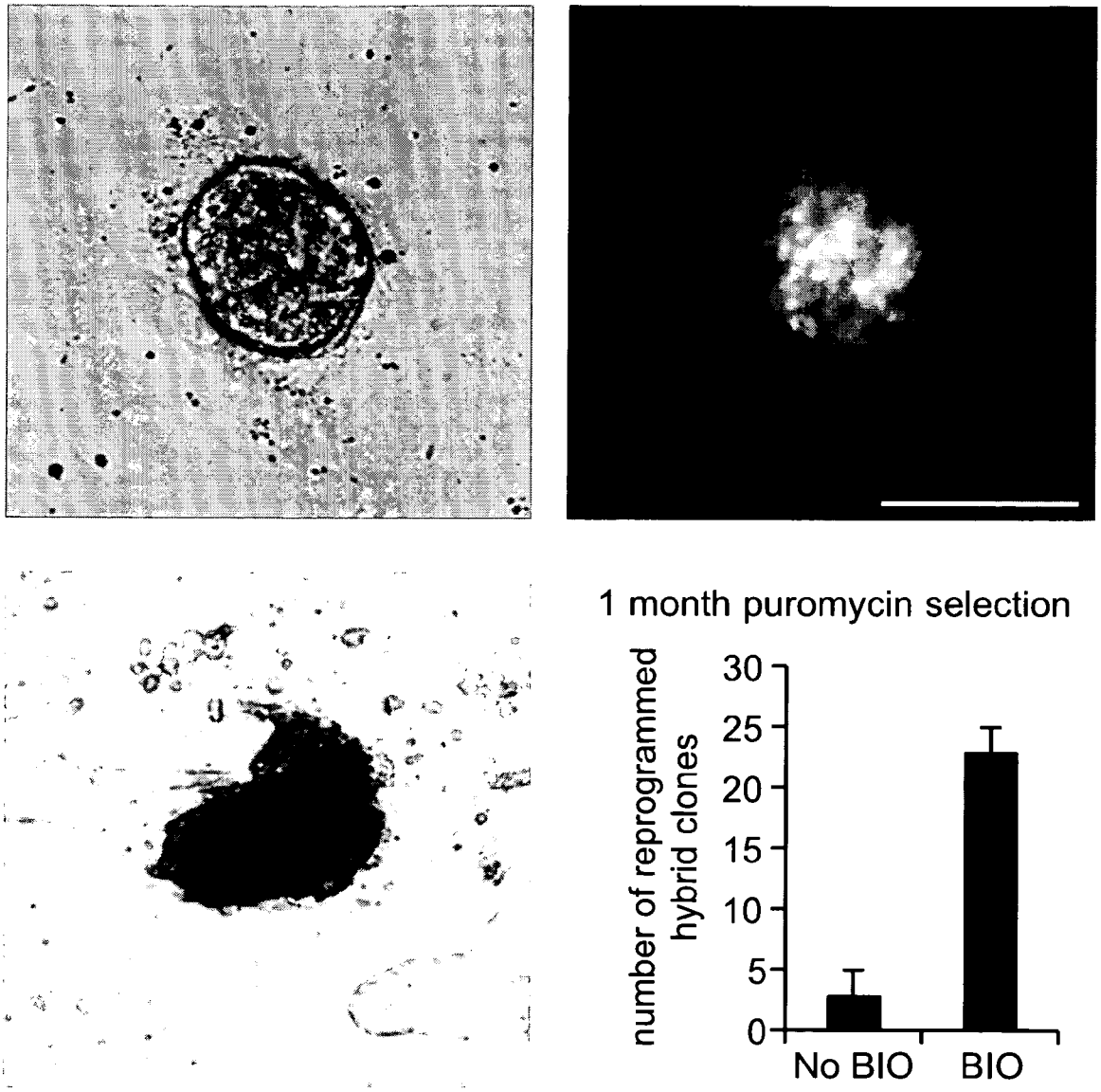

1 month puromycin selection
number of reprogrammed hybrid clones
30
25
20
15
10
5
0
No BIO
BIO

Fig. 14B

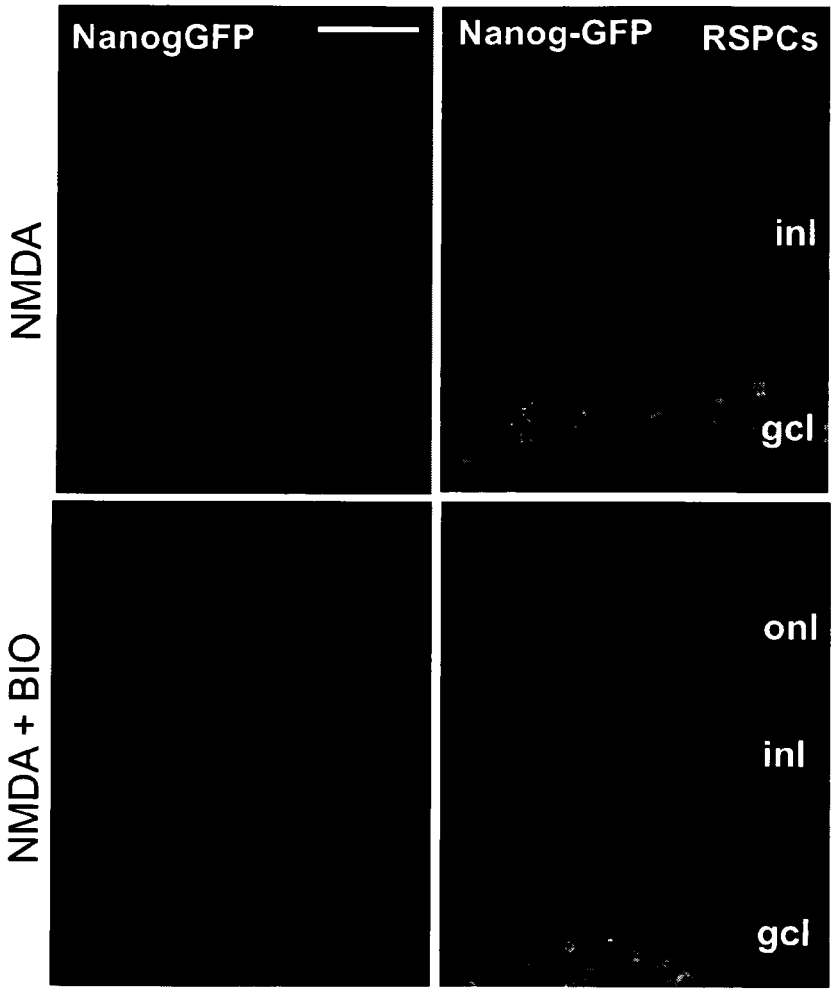


Fig. 14C

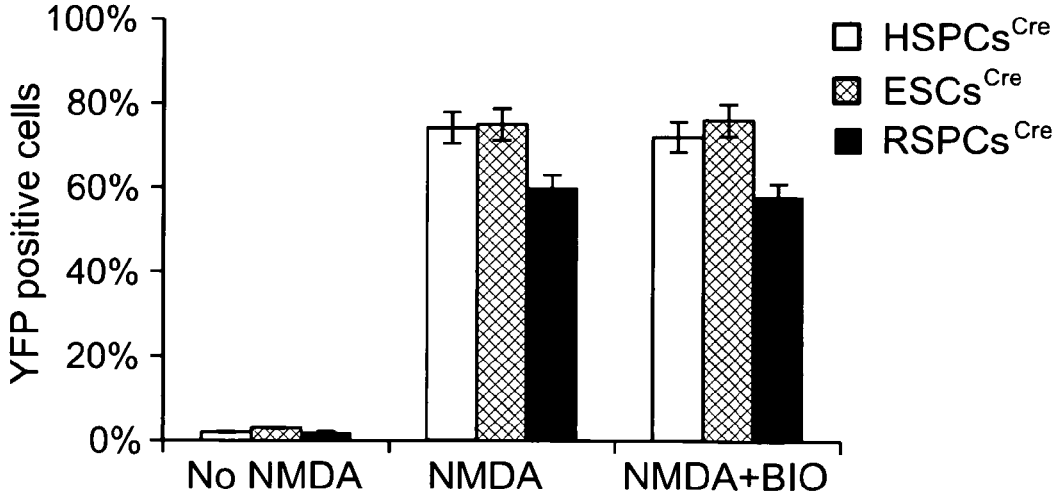


Fig. 14D

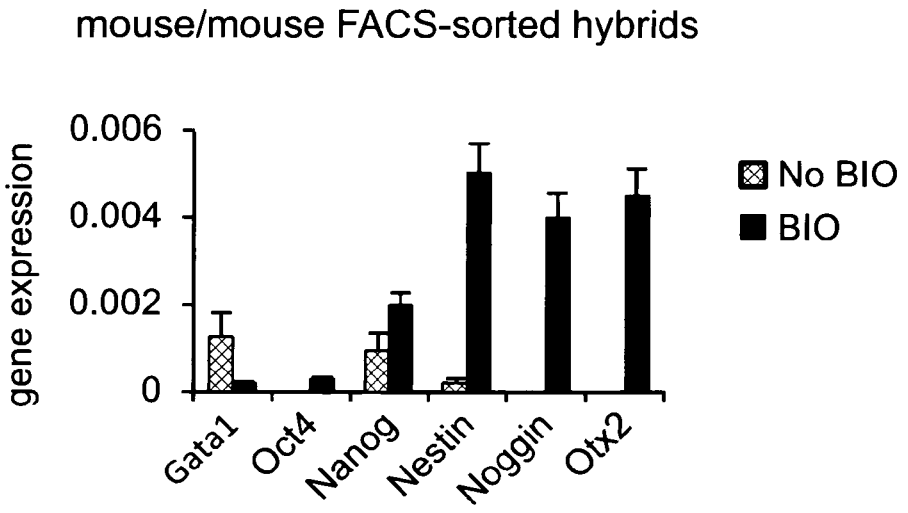

mouse/mouse FACS-sorted hybrids
gene expression
0.006
0.004
0.002
0
Gata1
Oct4
Nanog
Nestin
Noggin
Otx2
No BIO
BIO

Fig. 15A

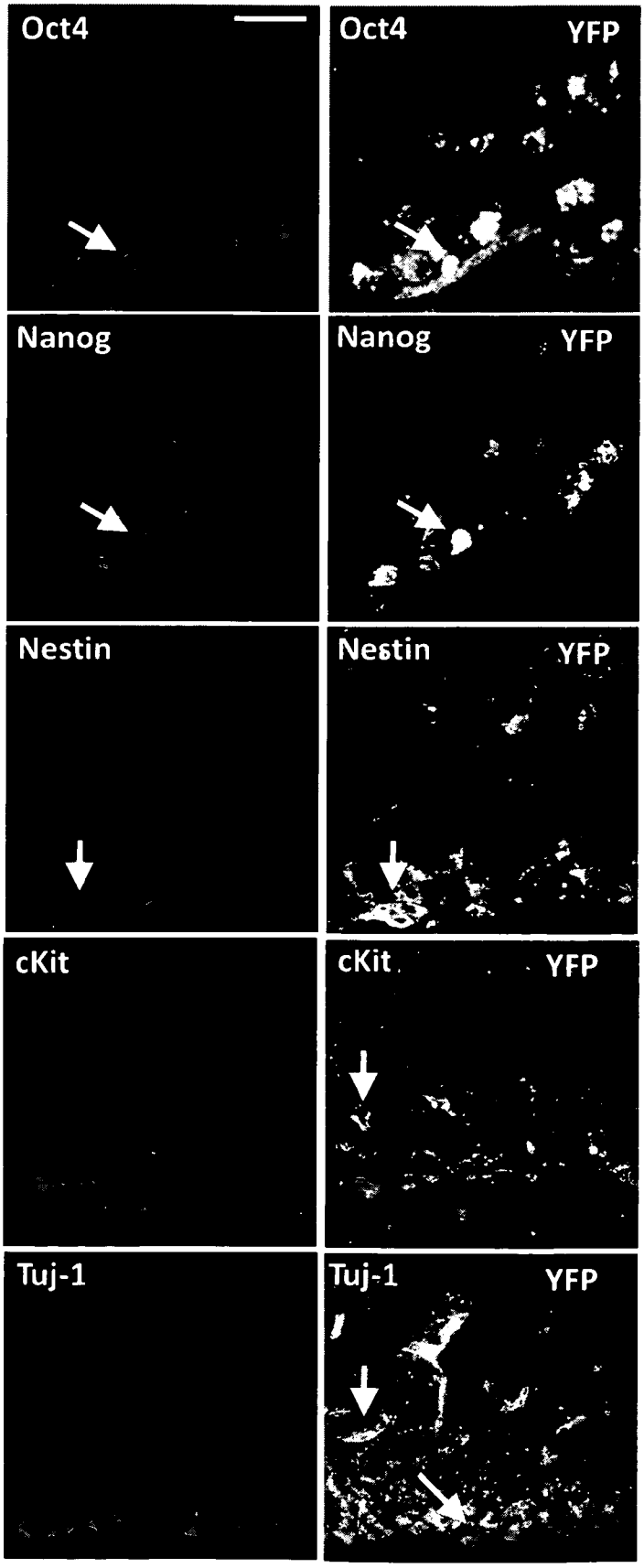

Oct4
Oct4
YFP
Nanog
Nanog
YFP
Nestin
Nestin
YFP
cKit
cKit
YFP
Tuj-1
Tuj-1
YFP

Fig. 15B

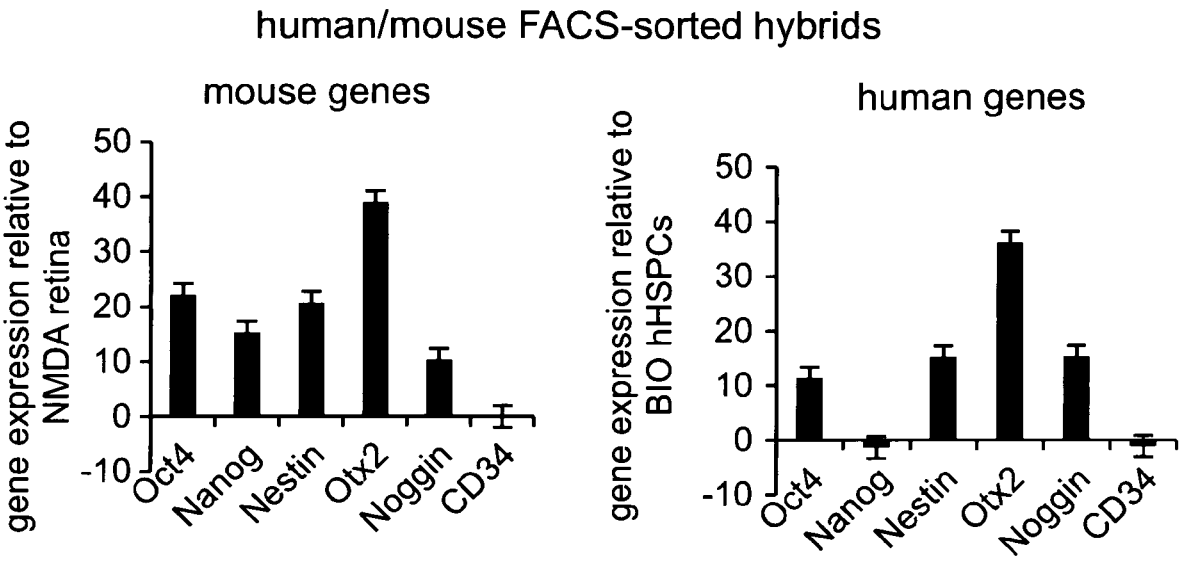
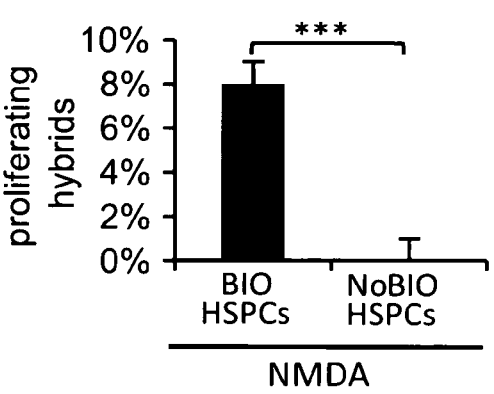


Fig. 15C

Fig. 15D



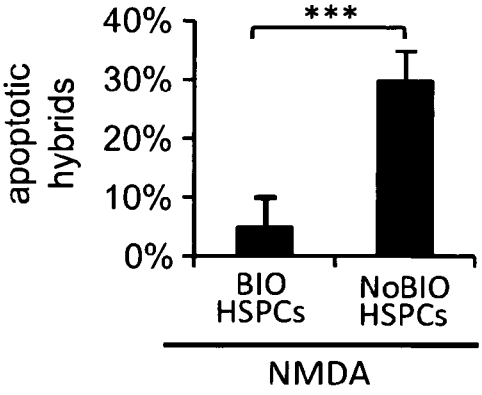


Fig. 15E

Fig. 15F

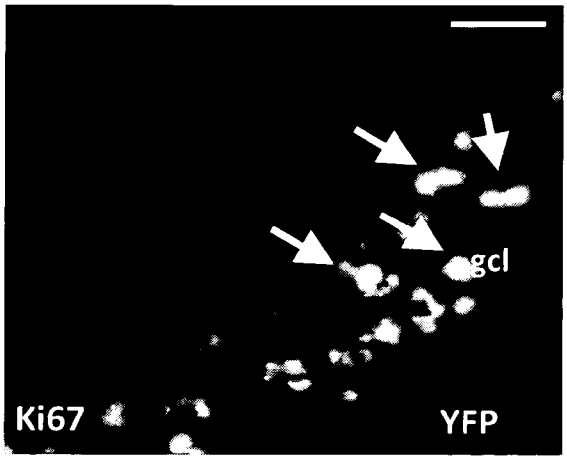


Fig. 15G

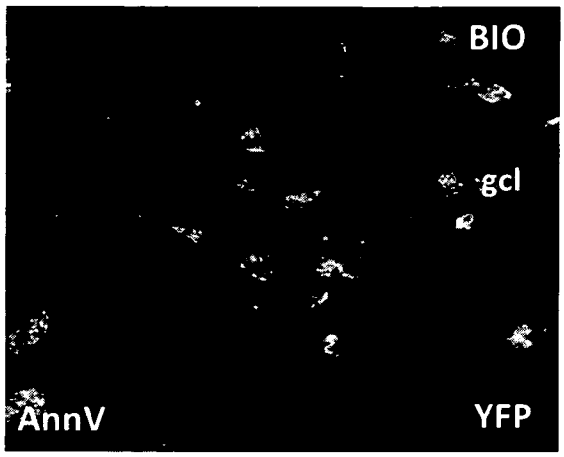


Fig. 15H

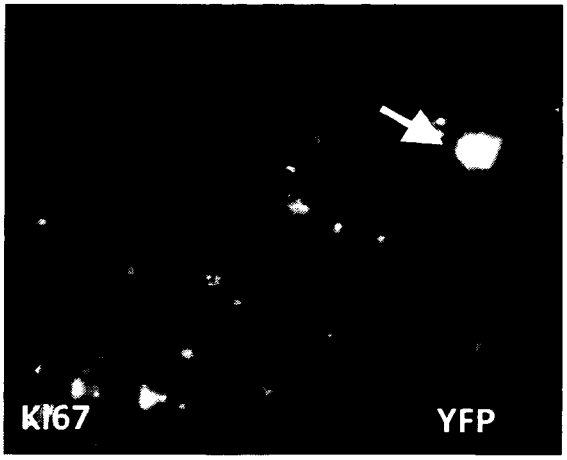


Fig. 15I

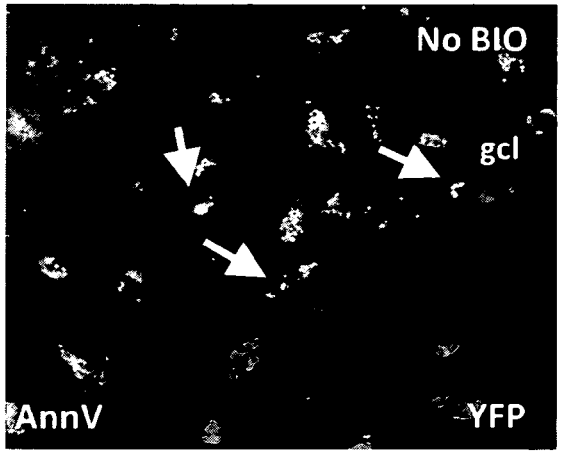


Fig. 15J

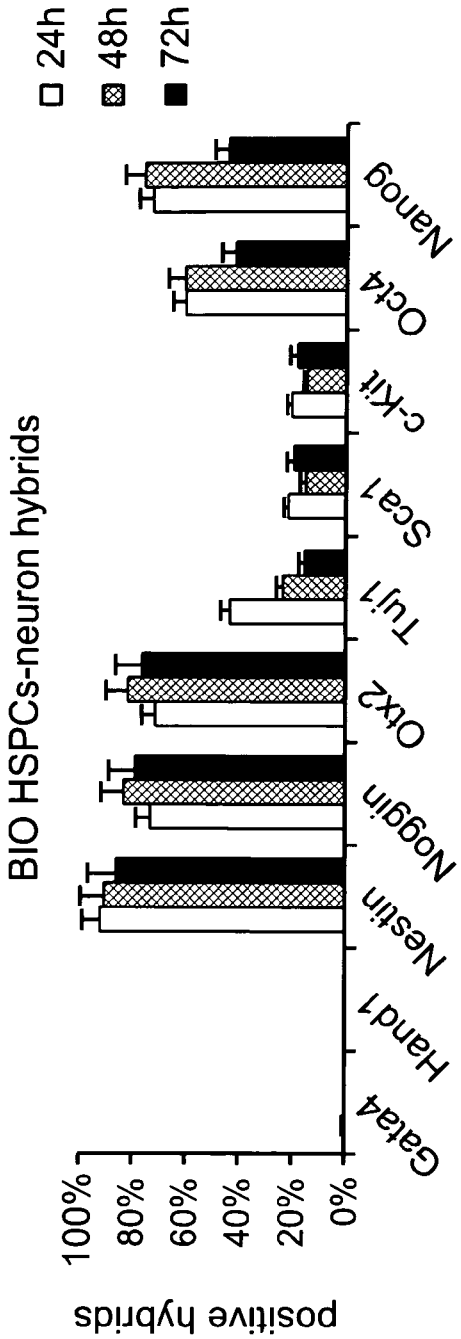


Fig. 15K

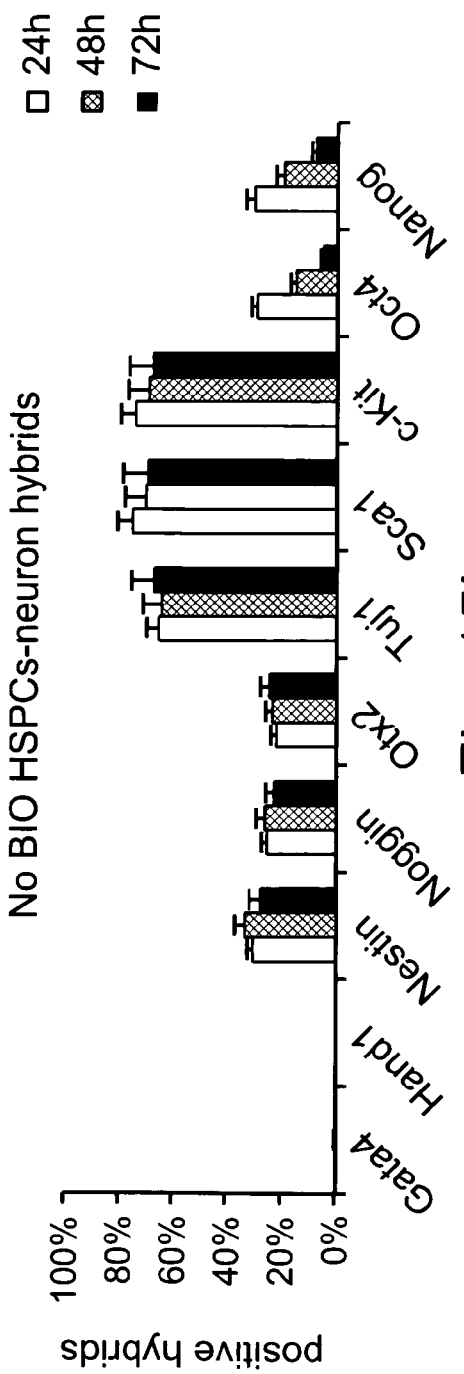


Fig. 15L

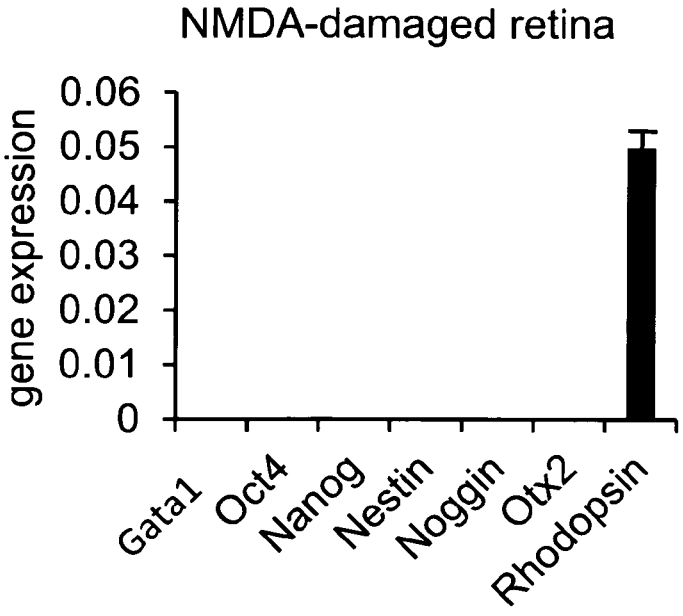


Fig. 16A

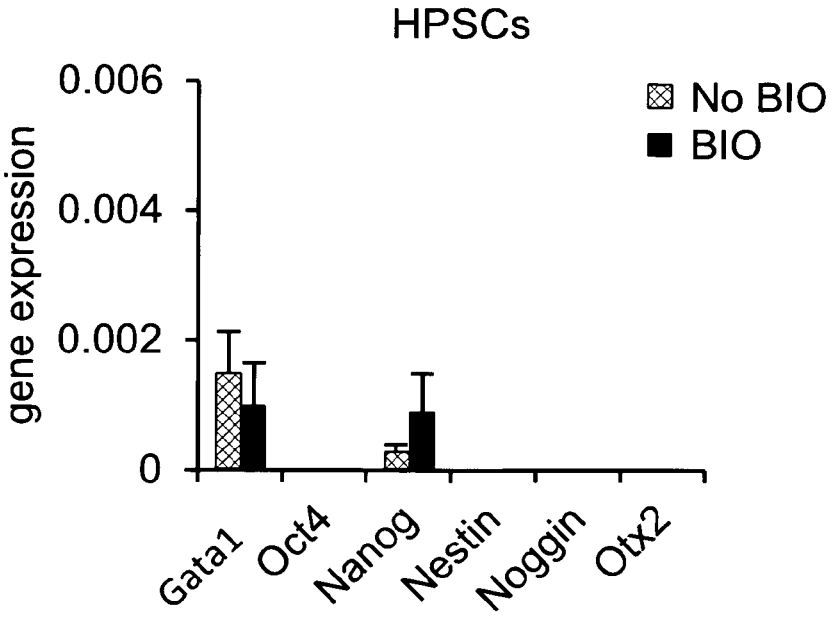


Fig. 16B

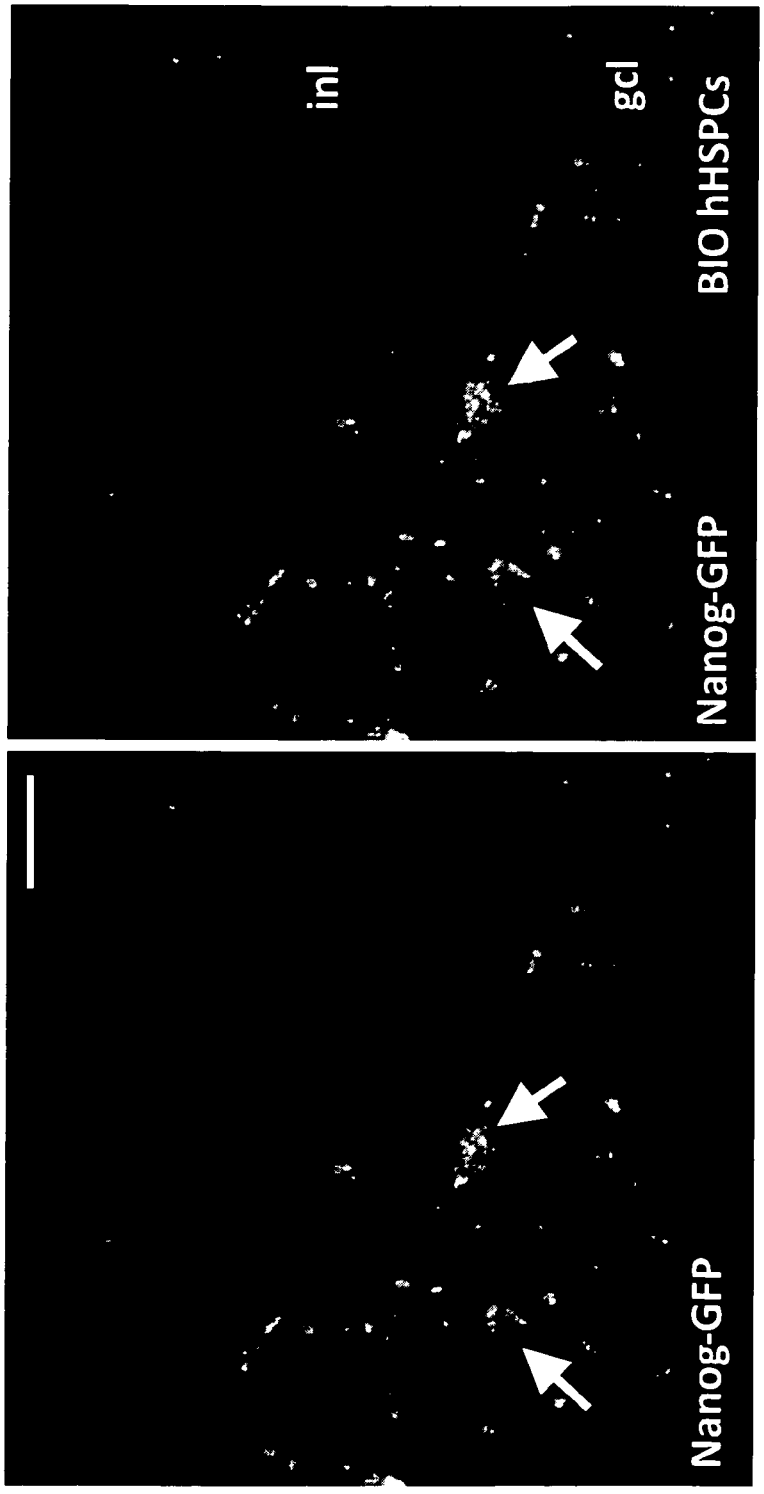


Fig. 16C

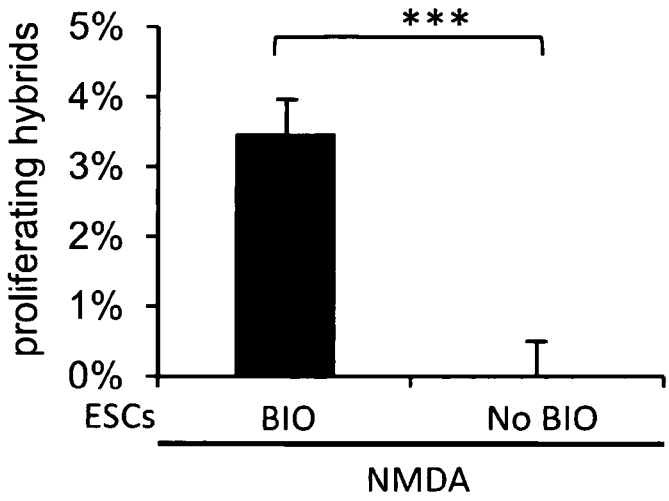


Fig. 16D

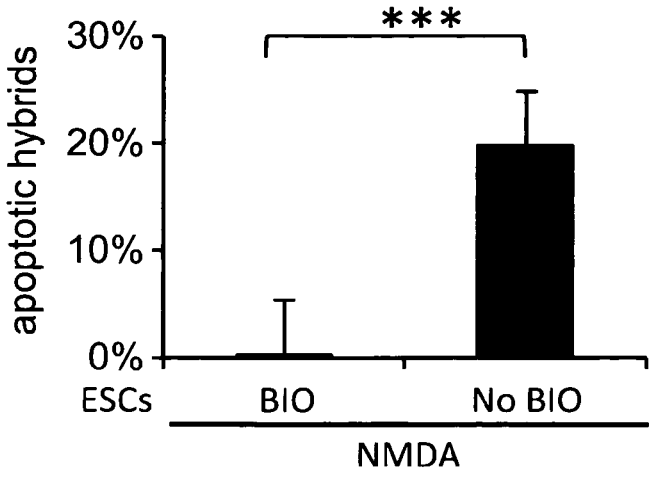


Fig. 16E

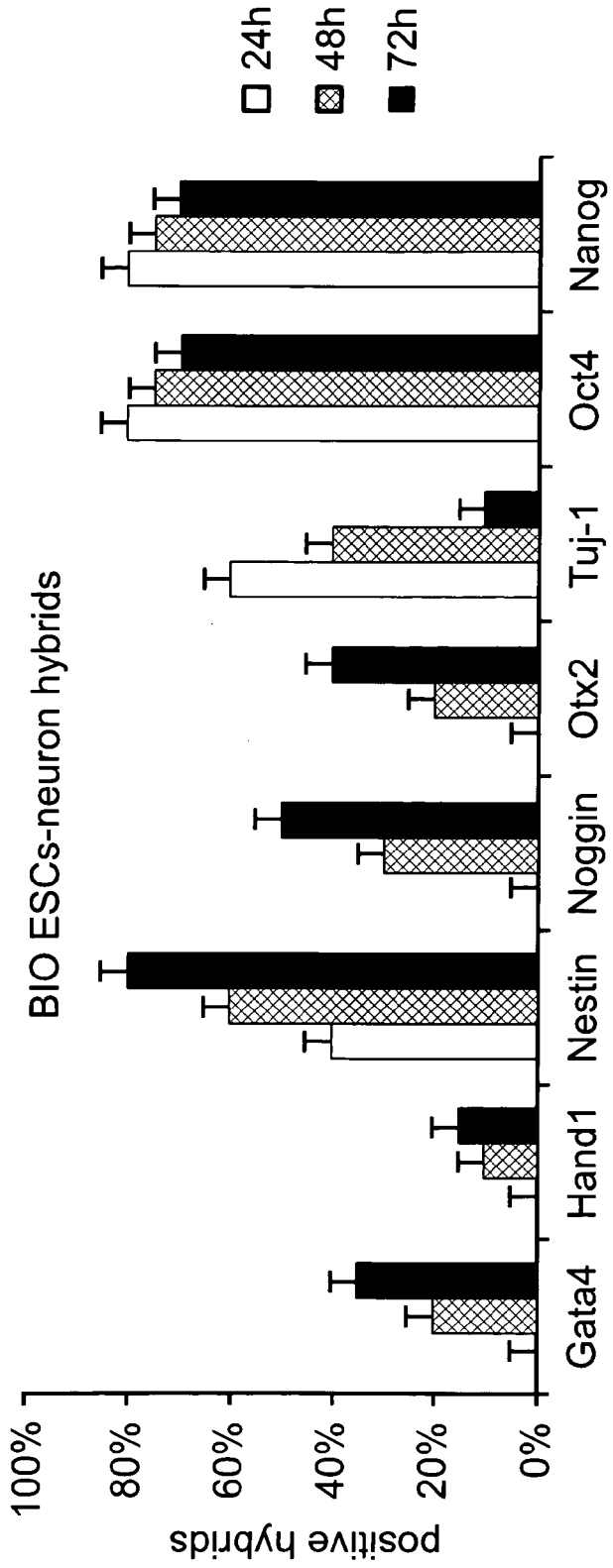

24h
48h
72h
BIO ESCs-neuron hybrids
positive hybrids
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Gata4
Hand1
Nestin
Noggin
Otx2
Tuj-1
Oct4
Nanog

Fig. 16F

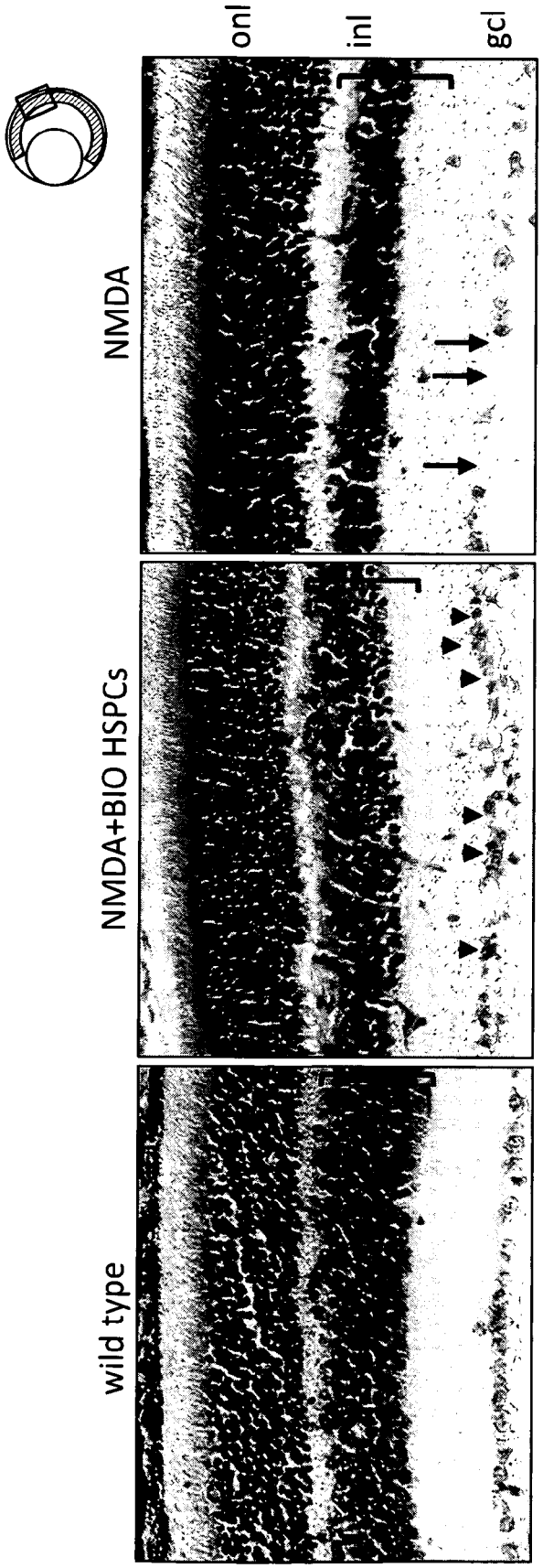


Fig. 17A

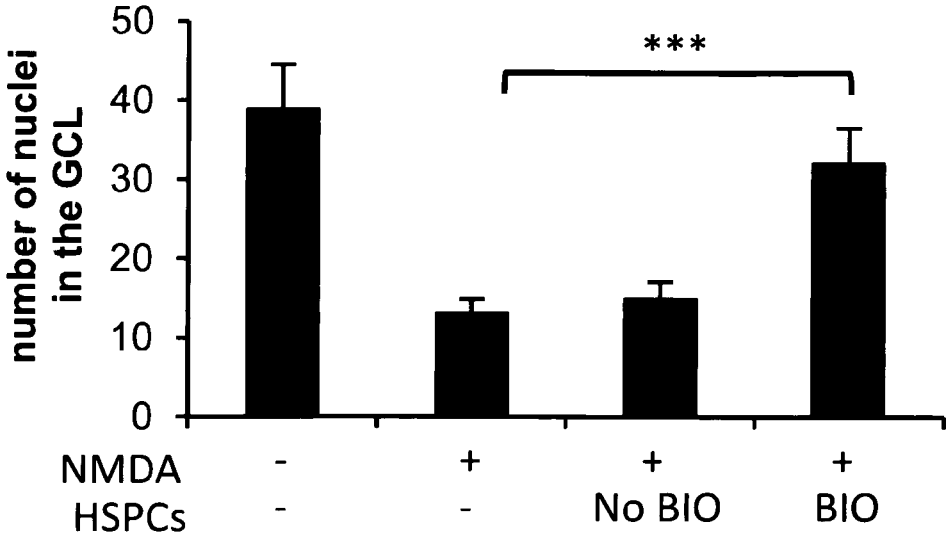


Fig. 17B

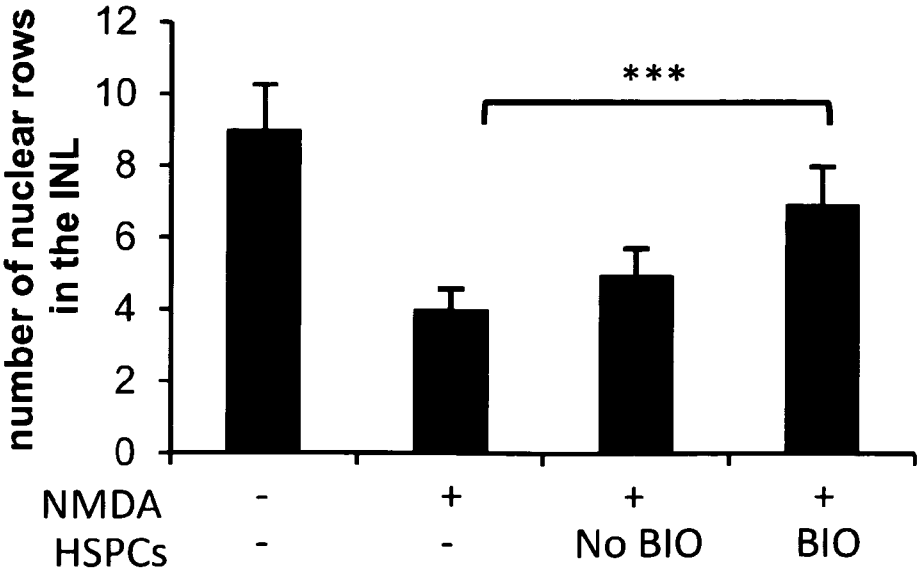


Fig. 17C

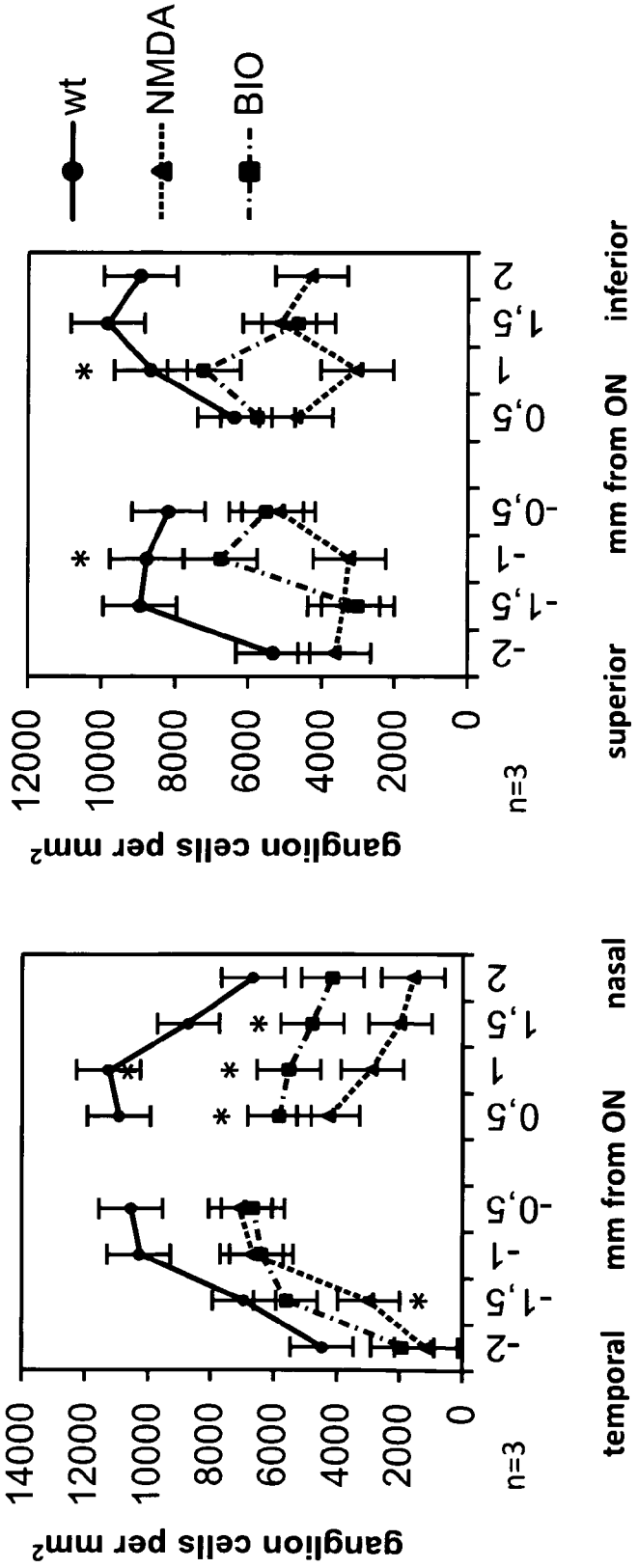

wt
NMDA
BIO
ganglion cells per mm²
n=3
superior
mm from ON
inferior
temporal
nasal

Fig. 17D

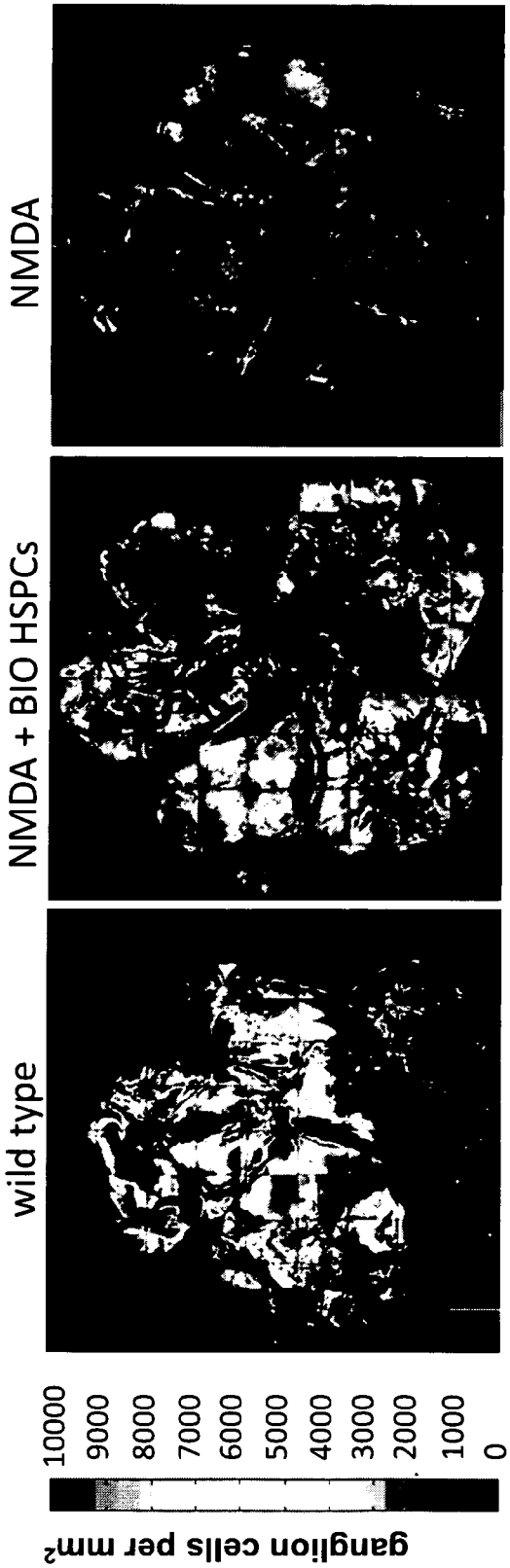

NMDA
NMDA + BIO HSPCs
wild type
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
ganglion cells per mm²

Fig. 17E

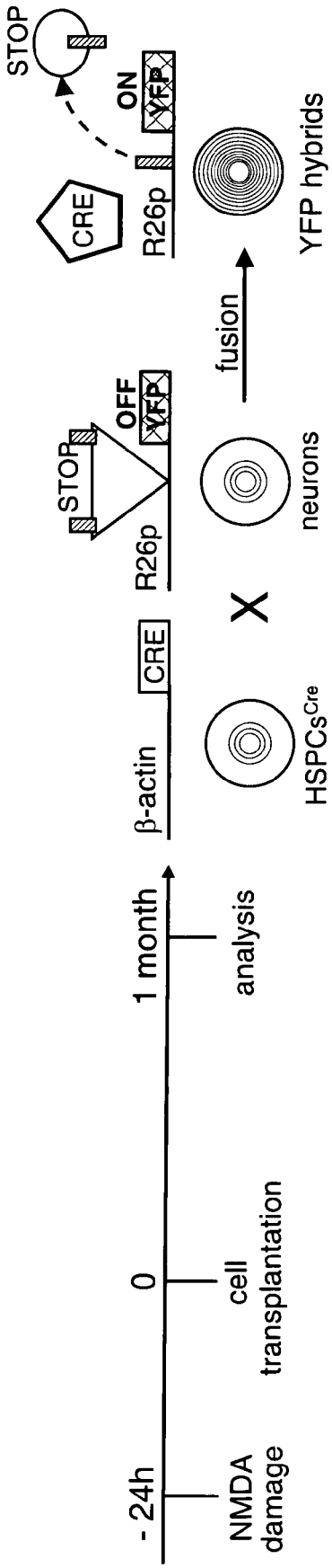

- 24h
NMDA damage
0
cell transplantation
1 month
analysis
β-actin
CRE
HSPCs^{Cre}
X
R26p
STOP
OFF
YFP
neurons
fusion
CRE
R26p
ON
YFP
STOP
YFP hybrids

Fig. 18A

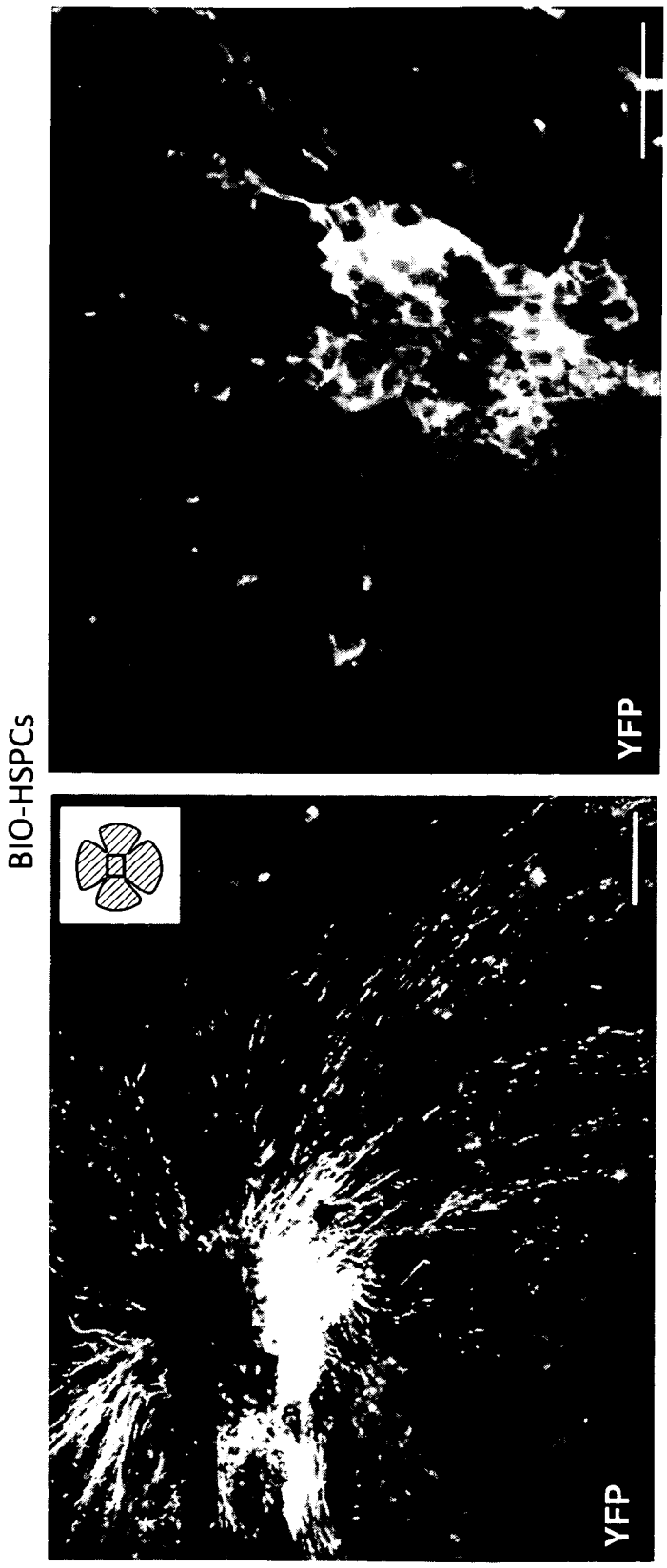


Fig. 18B

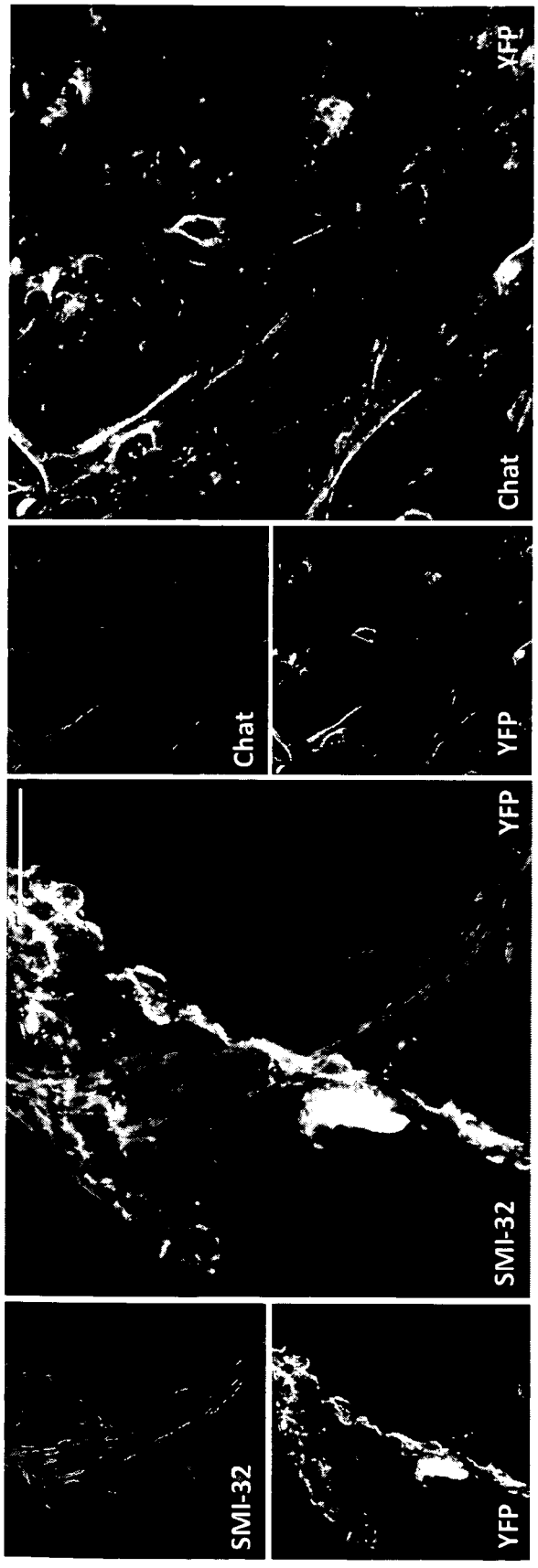


Fig. 18C

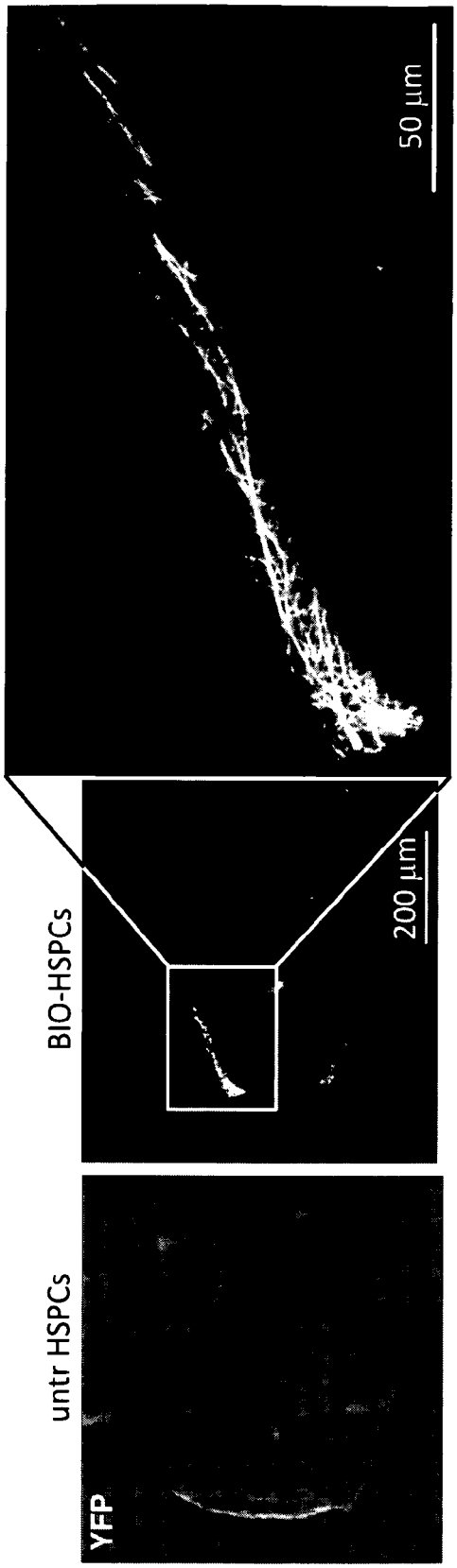


Fig. 18D

A

Blood cells	values	Unit of mesaure	Range value
WBC	6,18	10^9/l	[2,60-13,00]
LYM	3,92	10^9/l	[3,40-7,44]
MID	0,40	10^9/l	[<0,60]
GRA	1,85	10^9/l	[0,50-3,80]
LY%	63,5	%	[57,0-93,0]
MI%	6,5	%	[<7,0]
GR%	30,0	%	[8,0-48,0]
RBC	10,23	10^{12}/l	[7,00-12,00]
HGB	15,5	g/dl	[12,2-17,3]
HCT	43,24	%	[35,00-52,00]
MCV	42	Fl	[40-51]
MCH	15,1	pg	[13,5-17,6]
MCHC	35,7	g/dl	[30,0-38,0]
RDWc	17,1	%	
PLT	496	10^9/l	[485-1800]
PCT	0,32	%	
MPV	6,4	fl	
PDWc	31,7	%	
RFP+	65%	%	

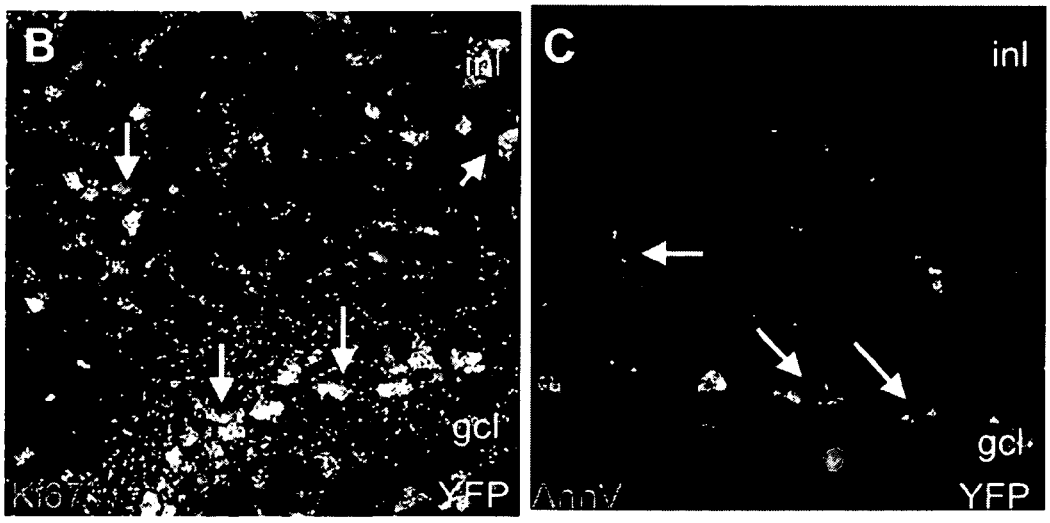


Fig. 19

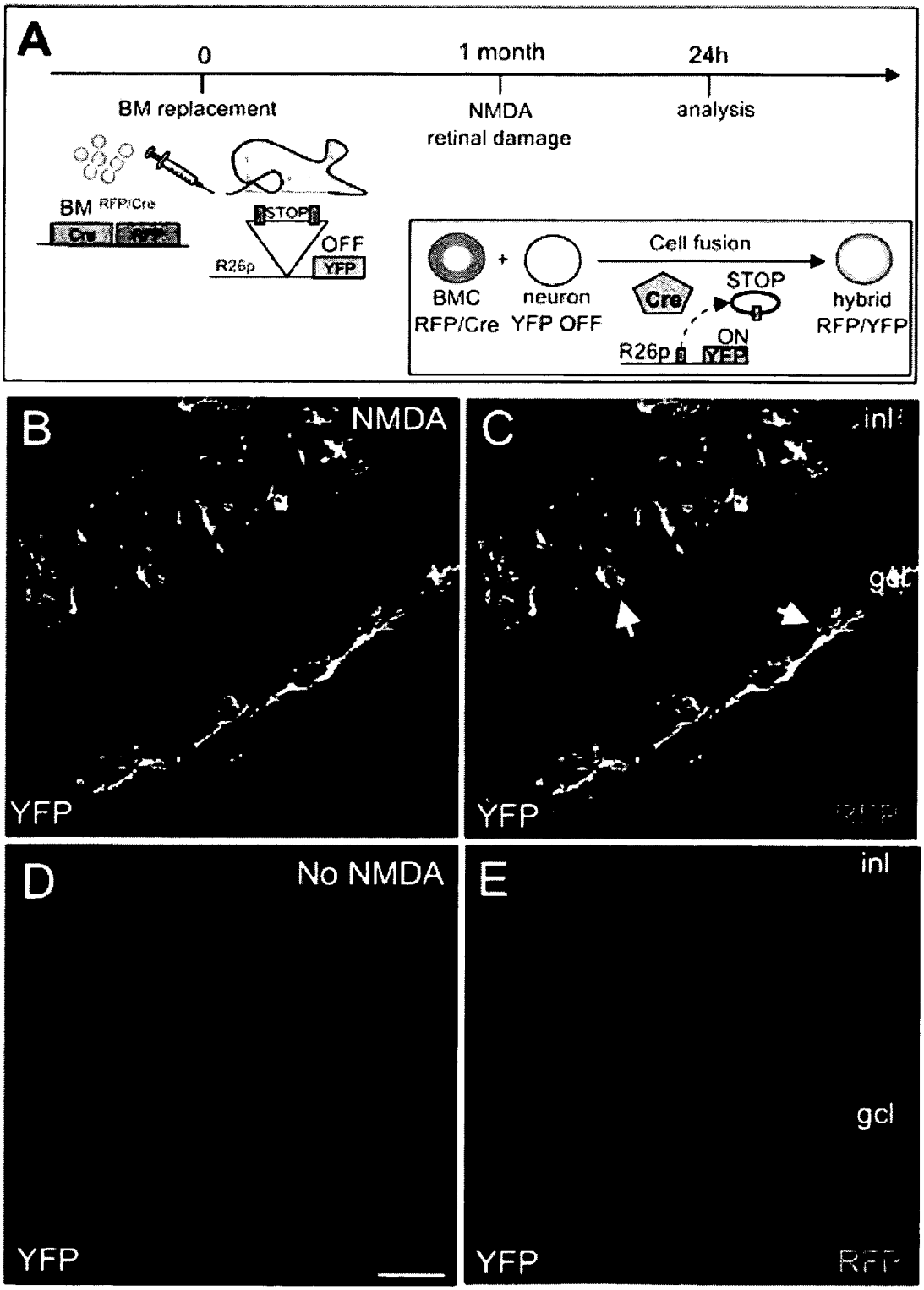

A
0
1 month
24h
BM replacement
NMDA
retinal damage
analysis
BM RFP/Cre
STOP
OFF
R26p
YFP
Cell fusion
BMC
RFP/Cre
neuron
YFP OFF
Cre
STOP
ON
hybrid
RFP/YFP
B
NMDA
YFP
C
inl
gcl
YFP
D
No NMDA
YFP
E
inl
gcl
YFP

Fig. 20

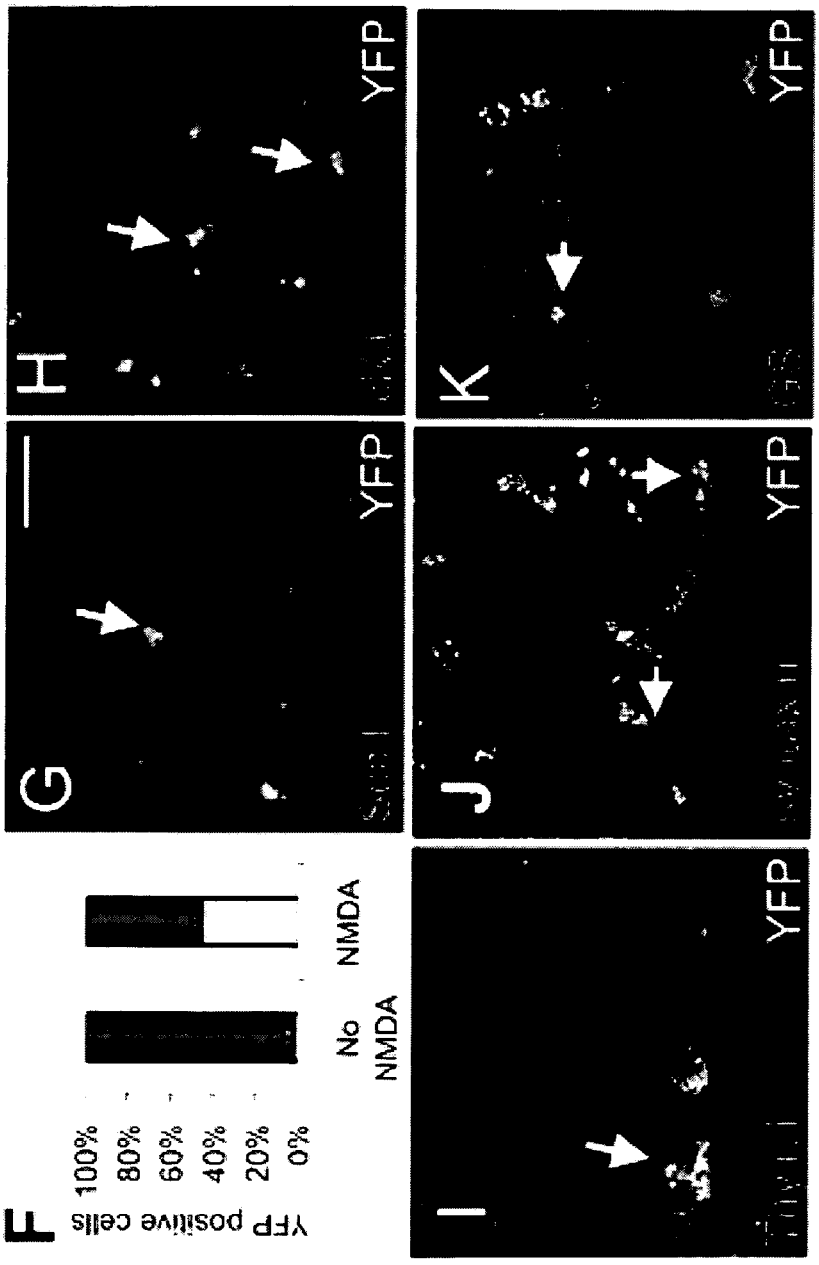


Fig. 20

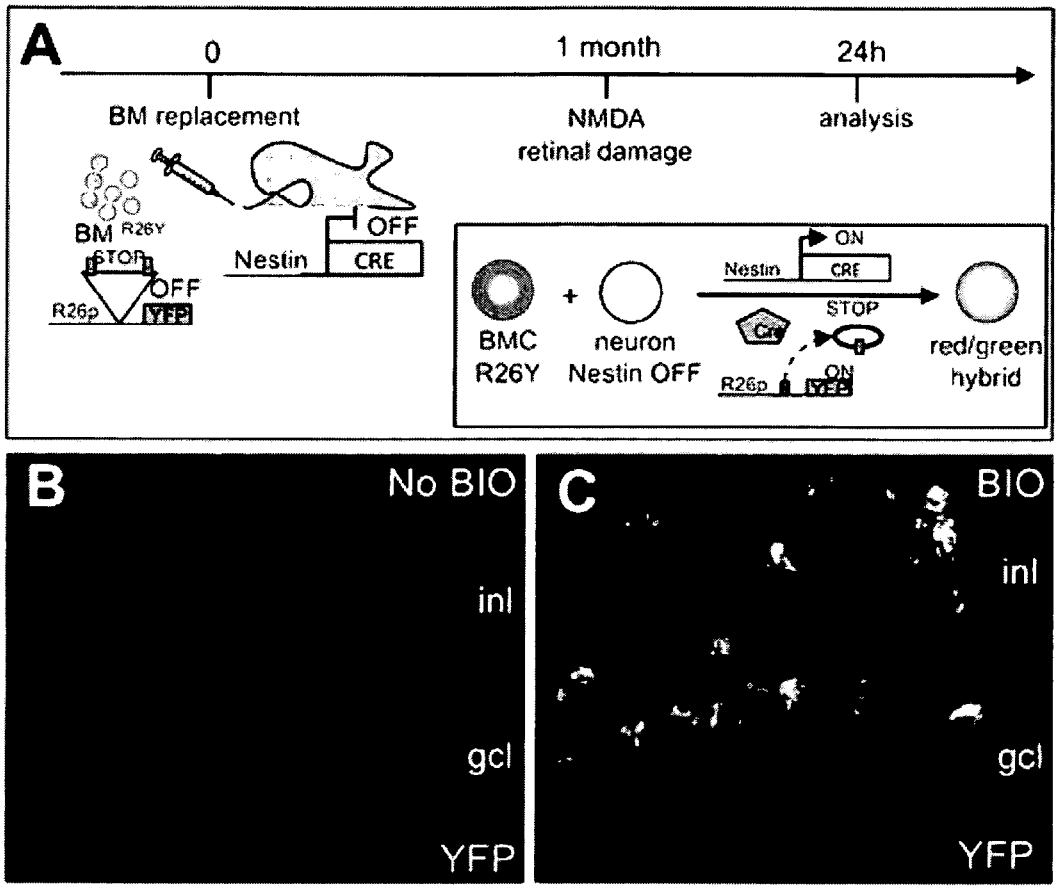

A
0
1 month
24h
BM replacement
NMDA
retinal damage
analysis
BM R26Y
STOP
OFF
R26p
YFP
Nestin
OFF
CRE
ON
Nestin
CRE
STOP
Cre
ON
R26p
YFP
BMC
R26Y
neuron
Nestin OFF
red/green
hybrid
B
No BIO
inl
gcl
YFP
C
BIO
inl
gcl
YFP

Fig. 21

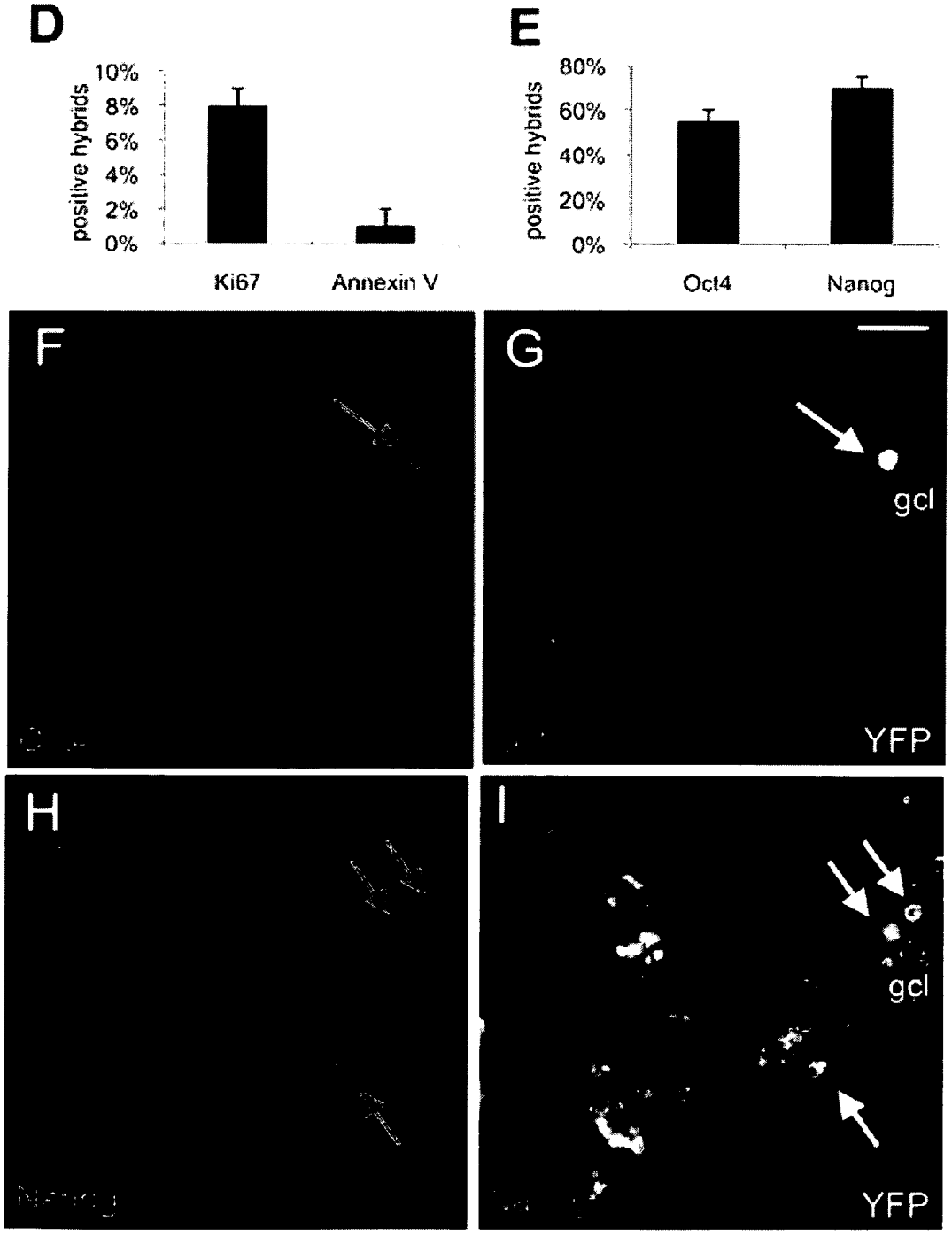

D
positive hybrids
10%
8%
6%
4%
2%
0%
Ki67
Annexin V
E
positive hybrids
80%
60%
40%
20%
0%
Oct4
Nanog
F
G
gcl
YFP
H
I
gcl
YFP

Fig. 21

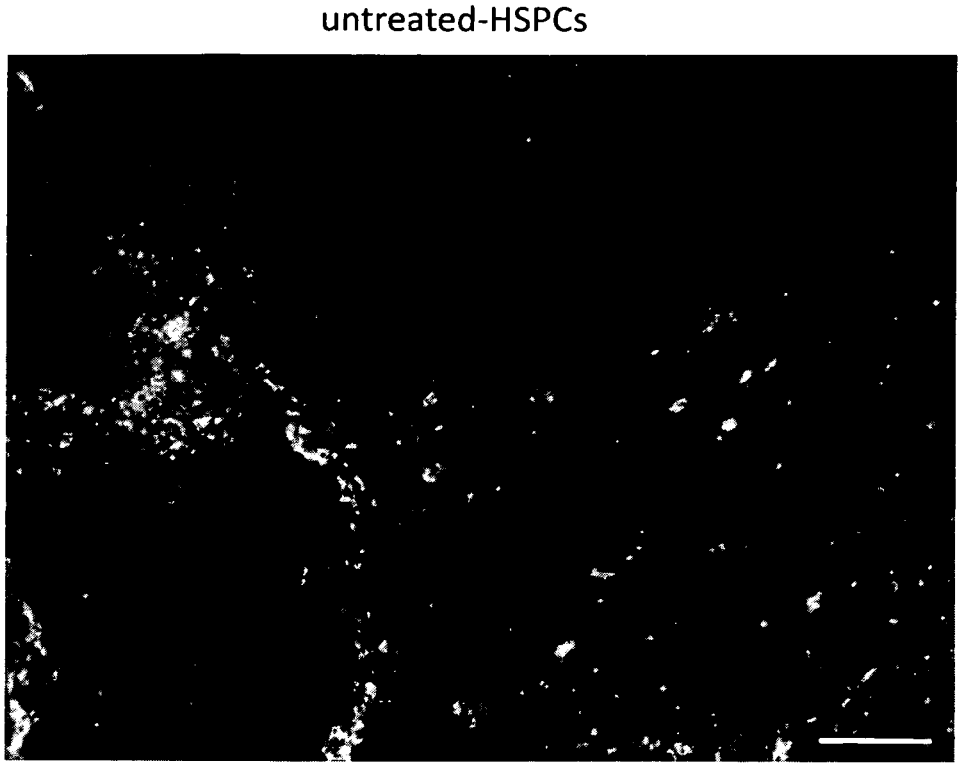


Fig. 22A

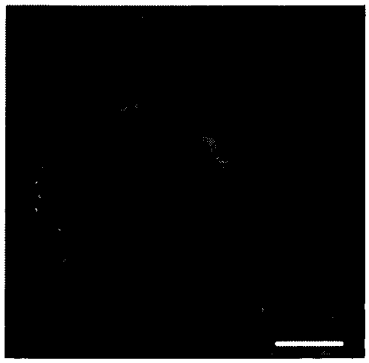


Fig. 22B

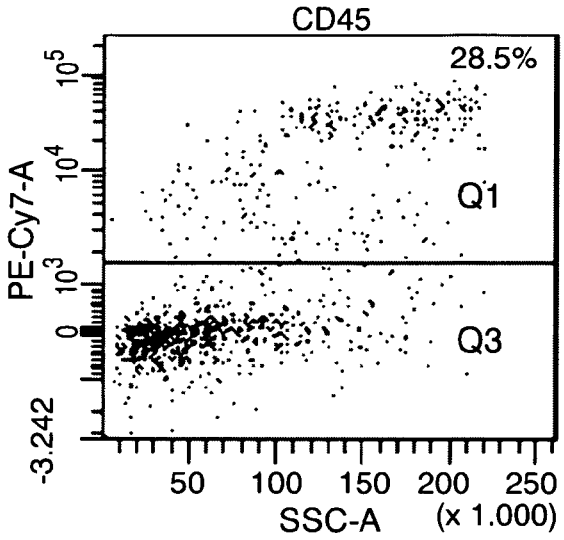


Fig. 22C

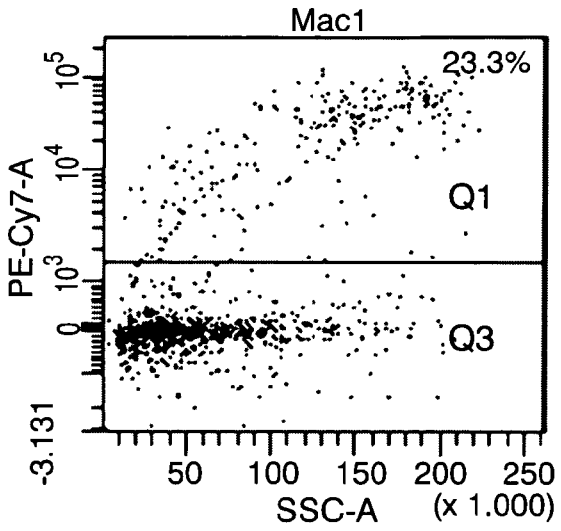


Fig. 22D

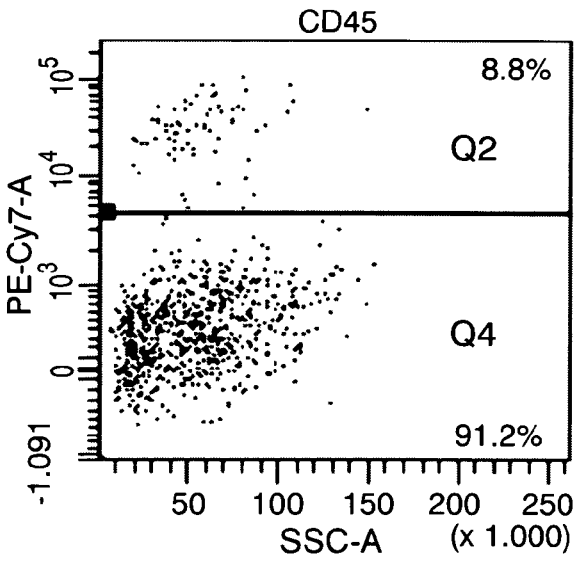


Fig. 22E

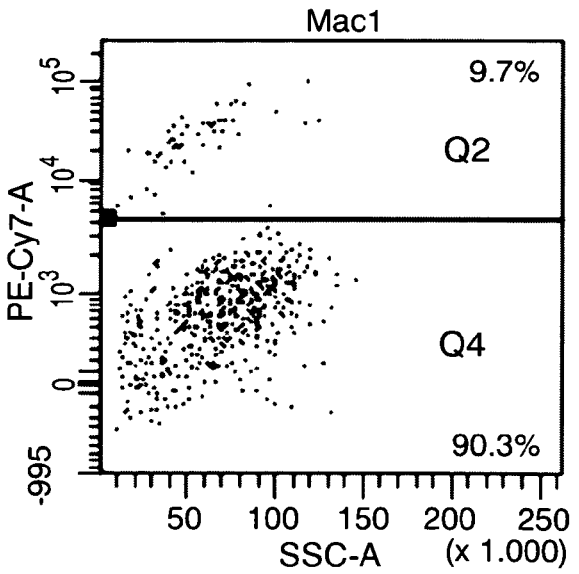


Fig. 22F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/065327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0793 A61K35/28 C12N5/0789 C12N5/0735 C12N5/0775
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/043591 A2 (SNU R&DB FOUNDATION [KR]; KIM JI YEON [KR]; PARK SUNG SUP [KR]) 14 April 2011 (2011-04-14) claims 1-47 page 38 - page 54; examples 6-8; tables 4, 8	1-30
X	WO 2010/029288 A2 (AXORDIA LTD [GB]; WALSH JAMES [GB]) 18 March 2010 (2010-03-18) page 13 - page 18; claims 1-30	1-30

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 November 2012	19/11/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Heiduschat, Carola

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INOUE T ET AL: "Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin", STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 24, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 95-104, XP003002106, ISSN: 1066-5099 abstract	1-30
X	AOKI H ET AL: "Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, vol. 82, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 265-274, XP024945331, ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/J.EXER.2005.06.021 [retrieved on 2006-02-01] page 267, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 page 272 - page 273	1-30
A	JIN-A KIM ET AL: "Identification of a Stroma-Mediated Wnt/[beta]-Catenin Signal Promoting Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells in the Stem Cell Niche", STEM CELLS, vol. 27, no. 6, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 1318-1329, XP055015905, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.52 page 1323, right-hand column, last paragraph - page 1324, left-hand column, paragraph 1	1-30
A	EP 2 090 649 A1 (FOND TELETHON [IT]) 19 August 2009 (2009-08-19) paragraph [0013] - paragraph [0031] claims 1-26	1-30
A	US 2005/129665 A1 (FRIEDLANDER MARTIN [US] ET AL) 16 June 2005 (2005-06-16) the whole document	1-30

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/065327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011043591 A2	14-04-2011	CN 102712900 A	03-10-2012
		EP 2486126 A2	15-08-2012
		KR 20110037907 A	13-04-2011
		US 2011223140 A1	15-09-2011
		WO 2011043591 A2	14-04-2011
WO 2010029288 A2	18-03-2010	NONE	
EP 2090649 A1	19-08-2009	EP 2090649 A1	19-08-2009
		EP 2271746 A1	12-01-2011
		US 2010311170 A1	09-12-2010
		WO 2009101084 A1	20-08-2009
US 2005129665 A1	16-06-2005	US 2005129665 A1	16-06-2005
		US 2010303768 A1	02-12-2010

retina de ratones R26Y^{rd1} 24 h tras el trasplante en p10 de HSPCs^{CRE} tratadas con BIO (BIO; a-c) o células no tratadas (No BIO; d-f). Los híbridos de YFP (verde) obtenidos tras la fusión fueron positivos para estos marcadores sólo tras el tratamiento con BIO (a-c, flechas amarillas).

Figura 5. Análisis histológico a lo largo del tiempo de regeneración retiniana en ratones *rd1*. (a-h) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL (c, d; rojo) representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sometidos a trasplante en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas (a, c, e, g) o tratadas con BIO (b, d, f, h) y analizados 5 (p15; a-d), 10 (p20; e, f) y 15 días (p25; g, h) tras el trasplante. (i-p) Tinción con H&E representativa de ratones de tipo natural (i, j) y *rd1* (k-p) sin trasplante (i, j, o, p) o sometidos a trasplante en p10 (k-n) con HSPCs (m-n) no tratadas (m, n) o tratadas con BIO (k-l), analizados todos en p60. Ampliación: 20× a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o. ONL: capa nuclear externa.

Figura 6. Análisis histológico a lo largo del tiempo de ojos de R26Y^{rd1} sometidos a trasplante. (a~~-h~~) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL ~~(c, d; rojo)~~ representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} transplantados en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas ~~(a, c, e, g)~~ o tratadas con BIO ~~(b, d, f, h)~~ y analizados 5 (p15~~; a-d~~), 10 (p20~~; e, f~~) y 15 días (p25~~; g, h~~) tras el trasplante. ~~(i-p)~~(b) Inmunot~~-T~~inción ~~con H&E~~ representativa de retinas de ratones R26Y^{rd1} transplantados con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas con BIO~~de tipo natural (i, j) y *rd1* (k-p) sin trasplante (i, j, o, p) o transplantados en p10 (k-n) con HSPCs (m-n) no tratadas (m, n) o tratadas con BIO (k-l), analizados todos en p60. Ampliación: 20×, a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o~~. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna.

Figura 7. Análisis de diferenciación de híbridos en p60. (a-f) Tinción de inmunofluorescencia representativa de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sin trasplante (e) y sometidos a trasplante en p10 de HSPCs tratadas con BIO (a-d, f) y analizados en p60. (a-d) los híbridos positivos para YFP (verde) son positivos para rodopsina (a, rojo) pero no para la opsina de los conos (b, rojo), glutamina sintetasa (c, rojo), y CD31 (d, rojo). Imágenes inferiores: fusiones de rojo y verde, con núcleos también contrateñidos con DAPI (azul). (e-f) rodopsina (rojo), Pde6b (magenta) y núcleos contrateñidos con DAPI (azul). (g) Inmunotransferencia de tipo Western la expresión de la proteína Pde6b en la retina de ratones de tipo natural (wt) y R26Y^{rd1} o bien no tratados (rd1 NT) o bien

retina de ratones R26Y^{rd1} 24 h tras el trasplante en p10 de HSPCs^{CRE} tratadas con BIO (BIO; a-c) o células no tratadas (No BIO; d-f). Los híbridos de YFP (verde) obtenidos tras la fusión fueron positivos para estos marcadores sólo tras el tratamiento con BIO (a-c, flechas amarillas).

Figura 5. Análisis histológico a lo largo del tiempo de regeneración retiniana en ratones *rd1*. (a-h) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL (c, d; rojo) representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sometidos a trasplante en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas (a, c, e, g) o tratadas con BIO (b, d, f, h) y analizados 5 (p15; a-d), 10 (p20; e, f) y 15 días (p25; g, h) tras el trasplante. (i-p) Tinción con H&E representativa de ratones de tipo natural (i, j) y *rd1* (k-p) sin trasplante (i, j, o, p) o sometidos a trasplante en p10 (k-n) con HSPCs (m-n) no tratadas (m, n) o tratadas con BIO (k-l), analizados todos en p60. Ampliación: 20× a-h, j, l, n, p; 5× i, k, m, o. ONL: capa nuclear externa.

Figura 6. Análisis histológico a lo largo del tiempo de ojos de R26Y^{rd1} sometidos a trasplante. (a) Tinción con H&E (a, b, e-h) y tinción TUNEL representativas de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} transplantados en p10 con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas o tratadas con BIO y analizados 5 (p15), 10 (p20) y 15 días (p25) tras el trasplante. (b) Inmunotinción representativa de retinas de ratones R26Y^{rd1} transplantados con HSPCs$^{RFP/CRE}$ no tratadas con BIO. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna.

Figura 7. Análisis de diferenciación de híbridos en p60. (a-f) Tinción de inmunofluorescencia representativa de cortes de retina de ratones R26Y^{rd1} sin trasplante (e) y sometidos a trasplante en p10 de HSPCs tratadas con BIO (a-d, f) y analizados en p60. (a-d) los híbridos positivos para YFP (verde) son positivos para rodopsina (a, rojo) pero no para la opsina de los conos (b, rojo), glutamina sintetasa (c, rojo), y CD31 (d, rojo). Imágenes inferiores: fusiones de rojo y verde, con núcleos también contrateñidos con DAPI (azul). (e-f) rodopsina (rojo), Pde6b (magenta) y núcleos contrateñidos con DAPI (azul). (g) Inmunotransferencia de tipo Western la expresión de la proteína Pde6b en la retina de ratones de tipo natural (wt) y R26Y^{rd1} o bien no tratados (rd1 NT) o bien

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

ABG Patentes, S.L.
Avenida de Burgos 16D
Edificio Euromor
28036 Madrid
ESPAGNE

RECEIVED
14 NOV. 2013
ABG Patentes, S.L.

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	08.11.2013
Applicant's or agent's file reference P7377PC00	**IMPORTANT NOTIFICATION**

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2012/065327	06.08.2012	05.08.2011

Applicant
Cosma, Maria Pia

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Papiol Rovira, M Tel. +49 89 2399-7199

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P7377PC00	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/EP2012/065327	International filing date *(day/month/year)* 06.08.2012	Priority date *(day/month/year)* 05.08.2011
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N5/0793		
Applicant Cosma, Maria Pia		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☒ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of 10 sheets, as follows:
      ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3*bis* of Annex C of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
04.06.2013	08.11.2013
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Heiduschat, Carola Telephone No. +49 89 2399-7804

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
   - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
   - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

   Description, Pages

   1-86 as originally filed

   Sequence listings, SEQ ID NO

   1-43 as originally filed

   Claims, Numbers

   1-20 filed with telefax on 14-10-2013

   Drawings, Sheets

   1-22 as originally filed

   ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
   - ☐ the description, pages
   - ☐ the claims, Nos.
   - ☐ the drawings, sheets/figs
   - ☐ the sequence listing *(specify)*:
   - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
   - ☐ the description, pages
   - ☐ the claims, Nos.
   - ☐ the drawings, sheets/figs
   - ☐ the sequence listing *(specify)*:

5. ☒ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-20
	No:	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☒ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ to this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 **The Prior Art**

Reference is made to the following document/s/:

D1 WO 2011/043591 A2 (SNU R&DB FOUNDATION [KR]; KIM JI YEON [KR]; PARK SUNG SUP [KR]) 14 April 2011 (2011-04-14)

D2 WO 2010/029288 A2 (AXORDIA LTD [GB]; WALSH JAMES [GB]) 18 March 2010 (2010-03-18)

D3 INOUE T ET AL: "Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin",
STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US,
vol. 24, no. 1, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 95-104,
XP003002106,
ISSN: 1066-5099

D4 AOKI H ET AL: "Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo",
EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, ACADEMIC PRESS LTD, LONDON,
vol. 82, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 265-274,
XP024945331,
ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/J.EXER.2005.06.021
[retrieved on 2006-02-01]

D5 JIN-A KIM ET AL: "Identification of a Stroma-Mediated Wnt/[beta]-Catenin Signal Promoting Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells in the Stem Cell Niche",
STEM CELLS,
vol. 27, no. 6, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 1318-1329,
XP055015905,
ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.52

D6 EP 2 090 649 A1 (FOND TELETHON [IT]) 19 August 2009 (2009-08-19)

D7 US 2005/129665 A1 (FRIEDLANDER MARTIN [US] ET AL) 16 June 2005 (2005-06-16)

2 Amendments

The Applicant filed an amended set of claims with the telefax of 14.10.2013. These amendments are considered to meet the requirements of Article 34(2) PCT.

3 Novelty and Inventive Step

3.1 The present application meets the criteria of Articles 33(2) and 33(3) PCT.

3.2 Claim 1 relates to a MSC or a cell popuplation comprising a HSC, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), wherein the Wnt/beat-catenin signalling pathway of said cell is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease by direct implantation of said cell.

3.3 D1 discloses compositions and methods allowing the differentiation of human ESC into retinal cells, particularly photoreceptor cells. It was found that Wnt signaling pathway activators (e.g. Wnt3a or GSK-3 inhibitor BIO) played an important role in the proliferation of retinal cells and the differentiation and maturation of stem-cell derived retinal progenitors into retinal cells. Retinal cells generated according to the method are transplanted into degenerated or injured retinas in order to treat retinal degeneration-related diseases. Stem cells to be used to generate retinal cells in the described method are bone marrow stem cells, cord blood stem cells, amniotic fluid stem cells, fat stem cells, retinal stem cells, intraretinal Muller glial cells and neural stem cells. However, D1 refers to the use of said cells for the generation of retinal cells in vitro which are only subsequently transplanted into the eye. Thus, D1 differs from the subject-matter of the present application, here claim 1, in that only the differentiated cells are implanted, not the starting cells.

3.4 Documents D2 to D7 are all based on the differentiation of ESC, hematopoietic stem cells or retinal stem cells. None of the documents discloses the activation of the cells as defined in the claims or even their subsequent implantation without any differentiation.

3.5 Thus, the subject-matter of independent claim 1 as well as dependent claims 2 to 12 is considered novel over the prior art. Same applies to the compositions according to claims 13 to 16 and to the kits and their uses according to claims 17 to 20.

3.6 Document D1, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses the generation of retinal cells from ESC and the implantation of said retinal cells for the treatment of retinal degeneration, from which the subject-matter of claim 1 differs in that a different cell type is activated and directly implanted.

3.7 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of alternative cells useful in the treatment of retinal degeneration.

3.8 The solution provided by the present application is the activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway on a MSC or a cell population comprising a HSC, a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), and the direct implantation of said cell for the treatment of a retinal degeneration disease. Apparently the implanted cells fuse and reprogram retinal neurons. Thereby the technical problem is solved. Neither in view of D1 alone nor in combination with other documents was it obvious to select said stem cell populations and to implant them before any further differentiation into a retinal cell.

3.9 Thus, the solution proposed in claim 1 and dependent claims 2 to 12 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT). Same applies to the compositions and their uses according to claims 13 to 16 and to the kits and their uses according to claims 17 to 20.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because the subject-matter of claim 7 is not clearly defined.

Claim 7 is directed to a MSC or a cell population comprising a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell, and a mesenchymal stem cell (MSC), for use in the treatment of a retinal degeneration disease, by direct implantation of said cells into the eye of a subject in need of treatment prior to reprogramming of a retinal cell by fusion of said cell with said retinal cell, said reprogramming being mediated by the activation Wnt/beta-catenin signalling pathway.

Claim 7 defines the product for medical use by its mechanism of action. It is not clear how, when, where or in which cell the activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway occurs (e.g. by pretreatment of the cells or coadministration at implantation).

As the claim is actually directed to a product for use, it appears necessary to provide all essential features of the product itself, rather than describing details of its administration or mechanism of action.

Spain Prosecution
IP FIRM of YEAR
2011 - 2012 - 2013

abg patentes
ARIAS, BERNARDO & GONZÁLEZ
Asesoría y Agencia de la Propiedad Industrial
Intellectual Property

PARTNERS
Juan Arias
M.Sc. Chemistry
European Patent Attorney
Spanish Patent & Trademark Agent
Francisco Bernardo
M.Sc. Chemistry
European Patent Attorney, CEIPI
Vicente González
M.Sc. Chemistry & Biotechnology
Spanish Patent & Trademark Agent
Fernando Prieto
B.Sc. Electronic Engineering, ICAI
European Patent Attorney
Enric Carbonell
M.Sc. Chemistry
European Patent Attorney
Agustín Alconada
Ph.D. Pharmacy (Molecular Biology)
European Patent Attorney
Almudena Fernández
Ph.D. Chemistry
European Patent Attorney

ASSOCIATES
Christine Weimann
Attorney-at-Law
Spanish Patent & Trademark Agent
Community Trademark & Design Attorney
Pablo Calvo
Ph.D. Mechanical Engineering
European Patent Attorney
Laura de la Vega
Ph.D. Physics
European Patent Attorney
Tomás Llamas
Ph.D. Chemistry
European Patent Attorney

ADVISERS
Marta Rodríguez
Ph.D. Chemistry
Paula Carreio
Ph.D. Chemistry
Sofía Pettersson
Ph.D. Chemistry
Laura Durán
Ph.D. Chemistry
Elena López-Camacho
Ph.D. Chemistry
Irene Vázquez
Ph.D. Pharmacy (Biomedicine)
Gemma Muruáis
Ph.D. Biology
Lorena Rodríguez
Ph.D. Biochemistry
Noelia Sainz
Ph.D. Molecular Biology
Inés Sánchez
Ph.D. Biology (M.Sc. Biochemistry)
María Corral
Ph.D. Biochemistry
Laura Artigas
M.Sc. Telecommunications Engineering
Gustavo A. de Dios
M.Sc. Aeronautical Engineering
Juan Sánchez
M.Sc. Aeronautical Engineering
Rocío Jiménez
Attorney-at-Law
Spanish Patent & Trademark Agent
Community Trademark & Design Attorney

FORMALITIES MANAGER
Beatriz Rodera
M.Sc. Business Administration
FORMALITIES COORDINATORS
EP/PCT Filings
Cecilia Ranilla
M.Sc. Business Administration
International Filings
María Susana Malcas
M.Sc. Biology
National Filings
Sonia Sebastián

abg patentes
Madrid
Avenida de Burgos, 16D
Edificio Euromor
E-28036 Madrid (Spain)
Tel: +34 91 417 13 00
Fax: +34 91 417 13 01
Barcelona
Comte d'Urgell, 143
E-08036 Barcelona (Spain)
Tel: +34 93 452 59 58
Fax: +34 91 417 13 01

www.abgpatentes.com

EUROPEAN PATENT OFFICE
D-80298 Munich
GERMANY

By fax

O/Ref.: P7377PC00
Application No.: PCT/EP2012/065327

Madrid, 14 October 2013

Re.: International application No. PCT/EP2012/065327 with title "METHODS OF TREATMENT OF RETINAL DEGENERATION DISEASES", in the name of Maria Pia COSMA and Daniela SANGES
Response to Written Opinion from IPEA *[VG-GM]*

Dear Sirs,

This is in reply to the Written Opinion (PCT Rule 66) dated August, 13 2013, issued by the European Patent Office (EPO) as International Preliminary Examining Authority (IPEA) in connection with the above identified international patent application. The Demand for the preliminary examination of this application was filed on 4 June 2013.

A new set of claims is enclosed herewith together with comments to be taken into consideration when carrying out the International Preliminary Examination and when issuing the International Preliminary Report on Patentability (IPRP).

A working copy is enclosed for the Examiner's convenience showing the amendments introduced in the new claims as compared to the former, wherein the added parts have been underlined and the deleted parts have been crossed out.

1. New claims & basis for the amendments

New claim 1, corresponding to former claim 1, has been amended in order to indicate that the defined cells are directly implanted into the eye. Basis for the amendment can be found on page 24, lines 15 to 25 of the application as filed. Additionally, Figure 1 shows that HSPCs are implanted directly into the eye prior to cell fusion and hybrid formation.

Claims 2 to 6 remain unchanged.

New claim 7, corresponding to former claim 7, has been amended in order to indicate the kind of administration necessary to allow for the mechanism. Basis for the amendment can be found on page 38, lines 6 to 13 of the application as filed.

Claims 8 to 14 remain unchanged.

New claim 15 has been included. Basis for the claim can be found on page 49, lines 29-30 and on page 52, lines 16 to 18 and on page 44, lines 8 to 10 of the application as filed.

New claim 16 has been included. Basis for the amendment can be found on page 52, lines 17 to 20 of the application as filed.

New claim 17 corresponds to former claim 15 without any amendment.

New claims 18 to 20 correspond to former claims 16 to 18 wherein the dependencies have been correctly adapted.

2. Novelty (Art. 33(2) PCT)

In the Written Opinion from the IPEA, the Examiner considers that the subject-matter of former claims 1 to 14 lacked novelty in view of D1.

The inventors of the present invention have found that retinal regeneration can be achieved by implanting cells into the eye of a subject which fuse with retinal cells, such as retinal neurons, e,g., rods, etc., or retinal glial cells, e.g., Müller cells, to form hybrid cells which reactivate neuronal precursor markers, proliferate, de-differentiate and finally differentiate into terminally differentiated retinal neurons of interest, e.g., photoreceptor cells, ganglion cells, etc., which can regenerate the damaged retinal tissue. The activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway is essential to induce de-differentiation of said hybrid cells and final re-differentiation in the retinal neurons of interest.

Thus, newly drafted claim 1 now defines that the MSC or the cell population comprising a HSC, a progenitor cell and a MSC are directly implanted into the eye of a subject in need of treatment for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

D1 discloses a method for differentiating stem cells into neural retinal progenitor cells, photoreceptor cell precursors, photoreceptor cells and other retinal cells, by culturing in different media comprising a Wnt signaling pathway activator. The differentiated photoreceptor cells, when transplanted into degenerated or injured retinas, can be engrafted and fused within the retinas to prevent or cure retinal degeneration (see paragraph [15]). D1 discloses bone marrow stem cells (see paragraph [155]) as a useful stem cell.

Although bone marrow stem cells were considered as a cell population comprising a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC) D1 does not disclose that said cell population is directly implanted into the eye, instead of that the implanted cells are differentiated photoreceptor cells (see page 31 lines 10-11).

Annex I is attached herein in order to facilitate the comparison between the cells and implantation disclosed by D1 (upper part) and the cells and implantation according to the instant invention (lower part).

As it can be seen in Annex I, retinal progenitor cells of D1, and not stem cells, are treated with a Wnt activator. Said cells differentiate *in vitro* to obtain neural retinal progenitor cells which are differentiated to obtain photoreceptor cell precursors and finally photoreceptor and retinal cells. The differentiated photoreceptor and retinal cells are thus implanted into the eye.

However, according to the instant invention, MSC or a cell population comprising MSC, HSC and progenitor cells, said cells having the Wnt/β-catenin signaling pathway activated, are directly implanted into the eye.

Thus, the use defined in new claim 1 differs from D1 among other things in the implanted cells used for treating the retinal degeneration disease, namely MSC or a cell population comprising MSC, HSC and progenitor cells, said cells having the Wnt/β-catenin signaling pathway activated (claim 1) vs *in vitro* differentiated, Wnt activator treated, cells wherein said in vitro differentiated cells, treated with a Wnt activator, are neural retinal progenitor cells, photoreceptor cell precursors, photoreceptor cells and other retinal cells.

Therefore the use defined in new claim 1 is novel over D1.

New claims 2 to 6 are also novel as they include all the limitations of claim 1.

New claim 7 is also novel in view of D1 for the same reasons as those mentioned in connection with claim 1.

New claims 8 to 12 are also novel as they include all the limitations of claim 7.

D1 discloses a composition comprising retinal cells including photoreceptor cells and their progenitor cells and other types of retinal cells (see paragraph [13]). However, D1 does not disclose a cell composition as defined in new claim 13 and thus, claim 13 is novel over D1.

New claim 14 relates to a pharmaceutical composition which is not described in D1, and thus claim 14 is novel.

New claims 15 to 16 contain all the limitations of new claim 14, which is considered novel, and thus they are also novel.

D1 does not disclose a kit as defined in new claim 17 and thus, new claim 17 is novel.

New claims 18 and 19 contain all the limitations of claim 17, which is considered novel, and thus new claims 18 and 19 are also novel.

abg patentes

3. **Inventive step (Art. 33(3) PCT)**

In the Written Opinion from the IPEA, the Examiner considers that the subject-matter of former claims 15 to 18 lacks inventive step.

Newly drafted claim 1 defines a MSC or a cell population comprising a HSC, a progenitor cell and a MSC, wherein the Wnt/β-catenin signaling pathway of said cells is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease by direct implantation of said cells into the eye of a subject in need of treatment.

D1 can be considered the closest prior art since it relates to the same technical problem, the use of a cell treated with a Wnt/β-catenin signaling pathway activator for the treatment of a retinal degeneration disease.

The implanted cell used in the treatment of the retinal degeneration disease in newly drafted claim 1 differs from the implanted cell use in the treatment of the retinal degeneration disease disclosed by D1 because the cells implanted according to D1 are *in vitro* differentiated photoreceptor and retinal cells treated with a Wnt/β-catenin signaling pathway activator, whereas the implanted cell or cell population for treating the retinal degeneration disease as defined in new claim 1 is a MSC or a cell population comprising MSC, HSC and progenitor cell, wherein the Wnt/β-catenin signaling pathway of said cells is activated.

In the absence of comparative studies on the suitability of the cells for the treatment of retinal degeneration diseases, the problem to be solved can be seen as the provision of an alternative cell or cell population for the treatment of retinal degeneration diseases.

The problem has been solved by the cell (MSC) and cell population defined in new claim 1 as shown in paragraph bridging pages 63 and 64 of the present application.

It is respectfully submitted that the person skilled in the art, when confronted with the above problem, would not have arrived at the claimed cell or cell population when considering D1 since there is no indication in this document that a MSC or a cell population comprising a HSC, a progenitor cell and a MSC, wherein the Wnt/β-catenin signaling pathway of said cells is activated, could be directly implanted into the eye for the treatment of a retinal degeneration disease.

Thus, newly drafted claim 1 does involve an inventive step over D1.

New independent claims 7, 13, 14 and 17 are based on the same inventive concept as that of new claim 1.

Therefore, new claims 7, 13, 14 and 17 are also inventive over the cited prior art D1.

New claims 2-6, 8-13, 15-16,18-20 which are directly or indirectly depend on inventive claims 1, 7, 13,14 and 17 are also inventive over the cited prior art D1.

patentes

4. Additional defects

The Examiner considers that the extrapolation to any activator of the pathway appears speculative and is not enabled over the whole scope.

Regarding the Wnt/β-catenin signaling pathway activator and Wnt/β-catenin signaling pathway repressor, it is submitted that the information given in the description is sufficient to enable a person skilled in the art to extend the teaching of the description to the whole claimed field without undue burden. The term "Wnt/β-catenin signalling pathway activator" as well as methods of detecting the activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway are disclosed in paragraph bridging pages 27 and 28 of the application as filed. Examples of useful Wnt/β-catenin signalling pathway activators are disclosed on page 28-30 of the application as filed. The term "inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor" as well as methods of detecting said inhibitor and examples of inhibitors are disclosed on pages 31 and 32 of the application as filed.

Additionally, supplementary technical information was filed on July 19, 2013 demonstrating that different compounds can activate the Wnt/β-catenin signaling pathway in HSPCs.

Thus, it is submitted that the objection is now moot.

Additionally, the Examiner considers that the subject-matter of claim 7 is not clearly defined because it was not clear which technical features or preparation of the cells or which kind of administration is necessary to allow for this mechanism.

Newly drafted claim 7 has been amended in order to clearly indicate the kind of administration necessary to allow for the mechanism, particularly direct implantation into the eye. Thus it is submitted that the objection is now moot.

5. Concluding remarks

It is therefore submitted that the subject-matter of new claims 1-20 is novel and involves an inventive step and hence, it is respectfully requested that a positive IPRP is issued. In case the IPEA intends to depart from this request, either a written opinion under R. 66.2 PCT or a telephone conversation under R. 66.6 PCT (PCT Guidelines 19.31) is respectfully requested.

Yours sincerely,

Agustín Alconada Rodríguez
European Patent Attorney
ABG Patentes, S.L.
[Association of Representatives 234]

- Encl.: -Amended set of claims (working copy and clean copy)
  -Annex I

CLAIMS

1. A mesenchymal stem cell (MSC) or a cell population comprising a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC), wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated, for use in the treatment of a retinal degeneration disease by direct implantation of said cells into the eye of a subject in need of treatment.

2. Cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 1, wherein said cells are cells treated with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and/or are cells that overexpress a Wnt/β-catenin signalling pathway activator.

3. Cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 2, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, 2-(4-acetylphenylazo)-2-(3,3-dimethyl-3,4-dihydro-2H-isoquinolin-1-ylidene)-acetamide (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-yloxy)-9-(1,1'-biphenyl-4-yl)methyl)-9*H*-purin-6-ylamino]-3-phenyl-propan-1-ol (QS11), deoxycholic acid (DCA), 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl)pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

4. Cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 2, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

5. Cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 1 to 4, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night

blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

6. Cell or cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 5, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

7. A mesenchymal stem cell (MSC) or a cell population comprising a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC) for use in the treatment of a retinal degeneration disease by direct implantation of said cells into the eye of a subject in need of treatment prior to reprogramming of a retinal cell by fusion of said cells with said retinal cell, said reprogramming being mediated by activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway.

8. Cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 7, in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator, or with an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor.

9. Cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 8, wherein said Wnt/β-catenin pathway activator is selected from the group consisting of a Wnt isoform, β-catenin, a R-spondin, IQ1, QS11, DCA, 2-amino-4-[3,4-(methylenedioxy)benzylamino]-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine, an (hetero)arylpyrimidine of formula (I), (II), (III) or (IV) shown in Table 1, and combinations thereof.

10. Cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 8, wherein said inhibitor of a Wnt/β-catenin pathway repressor is selected from the group consisting of a GSK-3 inhibitor, a SFRP1 inhibitor, and combinations thereof.

11. Cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to any one of claims 7 to 10, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

12. Cell or a cell population for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 11, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

13. A cell composition, wherein at least 50% of the cells of said cell composition are selected from mesenchymal stem cells (MSCs) or t hematopoietic stem cells (HSCs), progenitor cells and mesenchymal stem cells (MSCs) and wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cells is activated.

14. A pharmaceutical composition selected from the group consisting of:

1) a pharmaceutical composition comprising at least a mesenchymal stem cell (MSC) or a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC), wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, and a pharmaceutically acceptable carrier, and

2) a pharmaceutical composition comprising at least a mesenchymal stem cell (MSC) or a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC), in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and a pharmaceutically acceptable carrier.

15. A pharmaceutical composition according to claim 14 for use in the treatment of a retinal degeneration disease by direct implantation of said composition into the eye of a subject in need of treatment.

16. A pharmaceutical composition for use according to claim 15 wherein said composition is administered by intraocular, intravitreal or subretinal injection.

17. A kit selected from the group consisting of:

1) a kit comprising at least a mesenchymal stem cell (MSC) or a hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC) wherein the Wnt/β-catenin signalling pathway of said cell is activated, and instructions for use of the kit components, and

2) a kit comprising at least a mesenchymal stem cell (MSC) ora hematopoietic stem cell (HSC), a progenitor cell and a mesenchymal stem cell (MSC), in combination with a Wnt/β-catenin signalling pathway activator or an inhibitor of a Wnt/β-catenin signalling pathway repressor, and instructions for use of the kit components.

18. A kit according to claim 17, for use in the treatment of a retinal degeneration disease.

19. Kit for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 18, wherein said retinal degeneration disease is selected from the group consisting of retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, Stargardt disease, cone-rod dystrophy, congenital stationary night blindness, Leber congenital amaurosis, Best's vitelliform macular dystrophy, anterior ischemic optic neuropathy, choroideremia, age-related macular degeneration, foveomacular dystrophy, Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, Usher's syndrome, and a retinal degenerative condition derived from a primary pathology.

20. Kit for use in the treatment of a retinal degeneration disease according to claim 18, wherein said retinal degeneration derives from cataracts, diabetes or glaucoma.

REIVINDICACIONES

1. Una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal (MSC), en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dicha célula está activada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

2. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 1, en la que dicha célula es una célula tratada con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o es una célula que sobreexpresa un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

3. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 2, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de formula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

4. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 2, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

5. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha

enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

6. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 5, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

7. Una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en donde la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

8. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 7, en la que dichas células son células tratadas con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y/o son células que sobreexpresan un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

9. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 8, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-

dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de formula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

10. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 8, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

11. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

12. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 11, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

13. Una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, y una célula madre mesenquimal (MSC), para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante reprogramación, mediada por la ruta de señalización Wnt/β-

catenina, de una célula retiniana por fusión de dicha célula con dicha célula retiniana tras contacto de dicha célula con dicha célula retiniana en el ojo de un sujeto.

14. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 13, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

15. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 14, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de formula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

16. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 14, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

17. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular

relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

18. Célula para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 17, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

19. Una población celular que comprende una pluralidad de células, seleccionándose dichas células del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana, mediante reprogramación, mediada por la ruta de señalización Wnt/β-catenina, de una célula retiniana por fusión de dicha célula con dicha célula retiniana tras contacto de dicha célula con dicha célula retiniana en el ojo de un sujeto.

20. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 19, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, o con un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.

21. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 20, en la que dicho activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en una isoforma de Wnt, β-catenina, una R-espondina, 2-(4-acetilfenilazo)-2-(3,3-dimetil-3,4-dihidro-2H-isoquinolin-1-iliden)-acetamida (IQ1), (2*S*)-2-[2-(indan-5-iloxi)-9-(1,1'-bifenil-4-il)metil)-9*H*-purin-6-ilamino]-3-fenil-propan-1-ol (QS11), ácido desoxicólico (DCA), 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)bencilamino]-6-(3-metoxifenil)pirimidina, una (hetero)arilpirimidina de formula (I), (II), (III) ó (IV) mostrada en la Tabla 1 y cualquier combinación de los mismos.

22. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 20, en la que dicho inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de SFRP1 y combinaciones de los mismos.

23. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

24. Población celular para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 23, en la que dicha enfermedad de degeneración retiniana deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

25. Una composición celular, en la que al menos el 50% de las células de dicha composición celular se seleccionan del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas (HSCs), células progenitoras, células madre mesenquimales (MSCs) y cualquier combinación de las mismas y en la que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada.

26. Una composición farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en:
    1) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética

(HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en la que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, y un portador farmacéuticamente aceptable, y

2) una composición farmacéutica que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y un portador farmacéuticamente aceptable.

27. Un kit seleccionado del grupo que consiste en:

1) un kit que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en el que la ruta de señalización Wnt/β-catenina de dichas células está activada, e instrucciones para el uso de los componentes del kit, y

2) un kit que comprende al menos una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula madre hematopoyética (HSC), una célula progenitora, una célula madre mesenquimal (MSC) y cualquier combinación de las mismas, en combinación con un activador de la ruta de señalización Wnt/β-catenina o un inhibidor de un represor de la ruta de señalización Wnt/β-catenina, e instrucciones para el uso de los componentes del kit.

28. Un kit según la reivindicación 27, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana.

29. Kit para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 28, en el que dicha enfermedad de degeneración retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos-bastones, ceguera nocturna estacionaria congénita, amaurosis

congénita de Leber, distrofia macular viteliforme de Best, neuropatía óptica isquémica anterior, coroideremia, degeneración macular relacionada con la edad, distrofia foveomacular, distrofia corneoretiniana cristalina de Bietti, síndrome de Usher, y un estado degenerativo retiniano derivado de una patología primaria.

30. Kit para su uso en el tratamiento de una enfermedad de degeneración retiniana según la reivindicación 29, en el que dicha enfermedad de degeneración deriva de cataratas, diabetes o glaucoma.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DELEGATURA PARA LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

1. Datos del otorgante

☒ Persona Natural ☐ Persona Jurídica

DANIELA SANGES

Nombre o denominación /Razón Social completa

Nombre del representante

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☒ Otra

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Titular	
ITALIANA	C/Gombau, 12, E-08003 Barcelona España	
Dirección Electrónica:	No. Fax	Número telefónico

2. Datos del apoderado:

TOBOS MATEUS Andrea	**52.223.325**	**148648**
Apellidos y Nombre	**Documento de identificación**	**Tarjeta profesional**

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Apoderado	
COLOMBIANA	Carrera 7C No. 138-19 Oficina 901 Bogotá, D.C. Colombia	
Dirección Electrónica	Número de Fax	Número telefónico
andrea.tobos@tobos.com.co	8 123335	8 123335

☒ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico: andrea.tobos@tobos.com.co**

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a la persona que se identifica en el punto 2 como apoderado para las actuaciones que se relacionan a continuación:

3. Actuaciones en cuestión:

Este poder concierne:

☒ Todas las solicitudes de signos distintivos y de nuevas creaciones; y registros o patentes actuales y futuros del otorgante; inscripción de fusiones, conversiones o divisiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, inscripción de licencias de uso, embargos, renovaciones y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de oposiciones y acciones de cancelación relacionadas con trámites de propiedad industrial, a cuyo efecto la faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra (mi) propiedad industrial; asimismo, se concede a la mencionada mandataria poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, sustituir el presente poder y revocar dichas sustituciones.

☐ La(s) siguiente(s) solicitud(es) y/o registro(s):

NOMBRE	NÚMERO DE SOLICITUD O REGISTRO

4. Alcance del poder:

☒ Confiero expresamente al apoderado todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:

☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de las demás actuaciones

☐ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones

☐ Transigir

☐ Recibir

☐ Conciliar

5. Firma Daniela Sanges **FIRMA DEL PODERDANTE** NIE: Y1133583L **DANIELA SANGES** **DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN** 28/02 **de 2014** **FECHA DE FIRMA**	 **FIRMA DEL APODERADO** **ANDREA TOBOS MATEUS** **T.P. 148648** **C.C. 52.223.325**

Instrucciones:

Llenar el punto 1 del formulario.

Firmar en el punto 5 sobre la línea de "firma del poderdante" y poner el número del documento de identificación del poderdante. No requiere ningún tipo de legalización o presentación personal.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DELEGATURA PARA LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

1. Datos del otorgante

☒ Persona Natural ☐ Persona Jurídica

MARIA PIA COSMA

Nombre o denominación /Razón Social completa

Nombre del representante

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☒ Otra

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Titular	
ITALIANA	Carrer Fernando Poo, 16; 2-3, E-08005 Barcelona España	
Dirección Electrónica:	No. Fax	Número telefónico

2. Datos del apoderado:

TOBOS MATEUS Andrea	**52.223.325**	**148648**
Apellidos y Nombre	**Documento de identificación**	**Tarjeta profesional**

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Apoderado	
COLOMBIANA	Carrera 7C No. 138-19 Oficina 901 Bogotá, D.C. Colombia	
Dirección Electrónica	Número de Fax	Número telefónico
andrea.tobos@tobos.com.co	8 123335	8 123335

☒ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico: andrea.tobos@tobos.com.co**

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a la persona que se identifica en el punto 2 como apoderado para las actuaciones que se relacionan a continuación:

3. Actuaciones en cuestión:

Este poder concierne:

☒ Todas las solicitudes de signos distintivos y de nuevas creaciones; y registros o patentes actuales y futuros del otorgante; inscripción de fusiones, conversiones o divisiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, inscripción de licencias de uso, embargos, renovaciones y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de oposiciones y acciones de cancelación relacionadas con trámites de propiedad industrial, a cuyo efecto la faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra (mi) propiedad industrial; asimismo, se concede a la mencionada mandataria poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, sustituir el presente poder y revocar dichas sustituciones.

☐ La(s) siguiente(s) solicitud(es) y/o registro(s):

NOMBRE	NÚMERO DE SOLICITUD O REGISTRO

4. Alcance del poder:

☒ Confiero expresamente al apoderado todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:

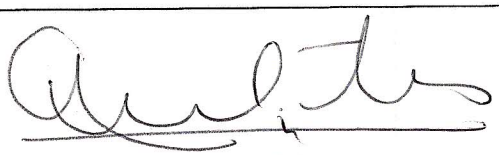
☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de las demás actuaciones

☐ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones

☐ Transigir

☐ Recibir

☐ Conciliar

5. Firma **FIRMA DEL PODERDANTE** **MARIA PIA COSMA** PASSPORT AA3039338 **DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN** 28/02 **de 2014** **FECHA DE FIRMA**	 **FIRMA DEL APODERADO** **ANDREA TOBOS MATEUS** **T.P. 148648** **C.C. 52.223.325**

Instrucciones:

Llenar el punto 1 del formulario.

Firmar en el punto 5 sobre la línea de "firma del poderdante" y poner el número del documento de identificación del poderdante. No requiere ningún tipo de legalización o presentación personal.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cosma, Maria Pia
Sanges, Daniela

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEGENERACIÓN RETINIANA

<130> P7377PC00

<150> EP11176713.3
<151> 2011-08-05

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Rodopsina)

<400> 1
gtagatgacc gggttataga tgga 24

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Rodopsina)

<400> 2
gcagagaagg aagtcacccg c 21

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (RDS)

<400> 3
cgggactggt tcgagattc 19

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (RDS)

<400> 4
atccacgttg ctcttgctgc 20

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Crx)

<400> 5
atccgcagag cgtccact 18

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Crx)

<400> 6
cccatactca agtgccccta 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Rx)

<400> 7
gttcgggtcc aggtatggtt 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Rx)

<400> 8
gcgaggaggg gagaatcctg 20

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Chx10)

<400> 9
atccgcagag cgtccact 18

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Chx10)

<400> 10
cggtcactgg aggaaacatc 20

<210> 11
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Nestina)

<400> 11
tggaagtggc taca 14

<210> 12
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Nestina)

<400> 12
tcagcttggg gtcagg 16

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Nogina)

<400> 13
cttggatggc ttacacacca 20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Nogina)

<400> 14
tgtggtcaca gaccttctgc 20

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (Otx2)

<400> 15
gagctcagtc gccacctcta ct 22

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (Otx2)

<400> 16
ccgcattgga cgttagaaaa g 21

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hOct4)

<400> 17
tcgagaaccg agtgagaggc 20

<210> 18
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hOct4)

<400> 18
cacactcgga ccacatcctt c 21

<210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hNanog)

<400> 19
ccaacatcct gaacctcagc tac 23

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hNanog)

<400> 20
gccttctgcg tcacaccatt 20

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hNestina)

<400> 21
tgtggcccag aggcttctc 19

<210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hNestina)

<400> 22
cagggctggt gagcttgg 18

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hOtx2)

<400> 23
acccctccgt gggctaccc 19

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hOtx2)

<400> 24
cagtgccacc tcctcaggc 19

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hNogina)

<400> 25
agcacgagcg cttactgaag 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hNogina)

<400> 26
aagctgcgga ggaagttaca 20

<210> 27
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (hCD34)

<400> 27
gttgtcaaga ctcatgaacc ca 22

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (hCD34)

<400> 28
actcggtgcg tctctctagg 20

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (mOct4)

<400> 29
cgtggagact ttgcagcctg 20

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (mOct4)

<400> 30
gcttggcaaa ctgttctagc tcct 24

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (mNanog)

<400> 31
gcgcatttta gcaccccaca 20

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (mNanog)

<400> 32
gttctaagtc ctaggtttgc 20

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador directo (mCD34)

<400> 33
ctggtacttc cagggatgct 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido iniciador inverso (mCD34)

<400> 34
tgggtagctc tctgcctgat 20

RESUMEN

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEGENERACIÓN RETINIANA

Los métodos comprenden la administración de células que tienen propiedades de células madre o células progenitoras, a la retina y la reprogramación de células de la retina mediada por la fusión celular de dichas células con dichas células de la retina, estando mediada dicha reprogramación por la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina.