



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901415862
Data Deposito	19/05/2006
Data Pubblicazione	19/11/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DI SOSTANZE PARASIMPATICOLITICHE PER POTENZIARE ED ACCELERARE IL
DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI, RELATIVO PROCEDIMENTO E RELATIVI
PRODOTTI.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Uso di sostanze parasimpaticolitiche per potenziare ed accelerare il differenziamento di cellule staminali, relativo procedimento e relativi prodotti"

di: Università degli Studi di Torino, nazionalità italiana, via Verdi 8, Torino

Inventori designati: Antonio Ponzetto; Luisa Gennero; Maria Augusta Roos; Gian Piero Pescarmona; Tetyana Denysenko; Paolo Di Nardo; Roberto Sangiorgio.

Depositata il: 19 maggio 2006

TO 2006 A 000365

TESTO DELLA DESCRIZIONE

La presente invenzione concerne un nuovo uso di sostanze parasimpaticolitiche e, più in particolare, l'uso di sostanze parasimpaticolitiche per potenziare ed accelerare il differenziamento di cellule staminali, preferibilmente cellule staminali pluripotenti, in cellule con fenotipo tessuto-specifico, il relativo procedimento ed i relativi prodotti.

E' noto dal 1998 [1, 2] che le cellule staminali possono essere mantenute *in vitro* indefinitamente in uno stadio indifferenziato, ovvero lasciate

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

proliferare amplificandone il numero, o anche essere "guidate" a differenziarsi in cellule epatiche, miocardiche, neurali, pancreatiche ecc. utilizzando terreni di coltura inducenti diversi, principalmente a base di fattori di crescita [3-6].

La presente invenzione si prefigge lo scopo di individuare sostanze capaci di stimolare, potenziare ed accelerare il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali in cellule con fenotipo tessuto-specifico rispetto a quanto operato attualmente.

Secondo la presente invenzione, tale scopo è raggiunto grazie alla soluzione richiamata in modo specifico nelle rivendicazioni che seguono. Le rivendicazioni formano parte integrante dell'insegnamento tecnico qui fornito in relazione all'invenzione.

L'invenzione riguarda l'uso di sostanze parasimpaticolitiche capaci di stimolare, potenziare ed accelerare il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali in cellule aventi un fenotipo tessuto-specifico.

In una forma di attuazione l'invenzione concerne l'uso di almeno una sostanza parasimpaticolitica per la preparazione di un

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

medicamento per stimolare, potenziare ed accelerare il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali in cellule aventi un fenotipo tessuto-specifico in un soggetto che ne abbisogni.

In un'altra forma di attuazione la presente invenzione concerne mezzi di coltura addizionati di almeno una sostanza parasimpaticolitica aventi la capacità di stimolare, potenziare ed accelerare il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali in cellule aventi un fenotipo tessuto-specifico.

Ancora la presente invenzione riguarda un procedimento per stimolare, potenziare ed accelerare il differenziamento e la proliferazione delle cellule staminali in cellule aventi un fenotipo tessuto-specifico, dove le cellule staminali sono coltivate in presenza di almeno una sostanza parasimpaticolitica e di un fattore di crescita inducente tessuto-specifico.

L'invenzione sarà ora descritta in modo dettagliato, a puro titolo di esempio non limitativo, facendo riferimento ad alcune forme di attuazione particolarmente preferite.

E' nota l'osservazione in vivo di un particolare stimolo proliferativo esercitato da

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

alcune sostanze simpaticomimetiche [6-10].

La presente invenzione si fonda sull'osservazione *in vitro* di un particolare stimolo al differenziamento cellulare di cellule staminali esercitato da sostanze parasimpaticolitiche. Tali sostanze addizionate al terreno di coltura fenotipo inducente sulle cellule staminali oggetto di studio inducono un accelerato differenziamento e di seguito una proliferazione cellulare; le sostanze parasimpaticolitiche sono, infatti, state utilizzate per la prima volta come attivatori di fattori di crescita (HGF, fattore di crescita epatocitario; MCSF, fattore di crescita di macrofagi) e come induttori di un accelerato differenziamento e proliferazione di cellule staminali in un fenotipo tessuto-specifico. L'accelerazione rispetto ai terreni di coltura inducenti precedentemente studiati dai presenti inventori (e.g. domande di brevetto italiano n. TO2005A000800 e TO2005A000819) è dimostrata dal minor tempo occorso per ottenere il differenziamento: 7-10 giorni invece di 15-28 giorni.

Le composizioni oggetto della presente invenzione forniscono i seguenti vantaggi:

- eccellente crescita e recupero del

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

trofismo fisiologico quando le composizioni vengano addizionate ai comuni terreni di coltura specifici per cellule staminali;

- rapido differenziamento *in vitro* delle cellule staminali nel fenotipo tessuto-specifico, quando si utilizzi un terreno di coltura tessuto-specifico-inducente;

- tutti i fenotipi tessuto-specifici ottenuti sono stati congelati a -80°C , scongelati, e riattivati in coltura per un altro mese, constatandone sempre la isto-normo funzionalità.

MATERIALI E METODI

Le composizioni oggetto della presente invenzione sono state preparate impiegando tra le altre le sostanze riportate di seguito:

1. Aminoacidi

Metionina, cistina, N-acetilcisteina, cisteina, glicina, leucina, isoleucina, prolina, glutamina, arginina, acido glutamico, istidina, istidina-HCl-H₂O, lisina, lisina-HCl, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina, tirosina-sale disodico, valina, prolina, idrossiprolina, soluzione contenente tutti gli aminoacidi non essenziali.

2. Peptidi

Glutatione, collagene, elastina, estratto di

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

frumento, polipeptidi cui sono attribuite funzioni trofiche.

3. Vitamine

Acido retinoico, retinolo, acido ascorbico, acido pantotenico, D-calcio pantotenato, piridoxina, piridoxina-HCl, acido folico, niacinamide, riboflavina, cobalamina, acido para-aminobenzoico e biotina.

4. Fattori vitaminici

Inositolo, mio-inositolo, colina cloruro, acido piruvico, piruvato di sodio, putresceina e putresceina-HCl.

5. Fattori di crescita

TGF-Beta (fattore di crescita di trasformazione Beta), LIF (fattore inibitore della leucemia), ITS (insulina-transferrina-selenio), insulina, HGF (fattore di crescita stimolatore epatocitario), M-CSF (fattore di crescita stimolatore di macrofagi), IL-2 (Interleuchina 2), IL-6 (Interleuchina 6), PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato), acido linoleico, siero autologo.

6. Sali

Gluconato di calcio, desametasone 21-fosfato disodico, fosfato di calcio, bicarbonato di sodio, calcio cloruro, magnesio cloruro, magnesio solfato,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

potassio cloruro, potassio fosfato, sodio cloruro, calcio nitrato, zinco cloruro, nitrato ferrico, piruvato di sodio, D-calcio pantotenato, tirosina sale disodico, sodio selenite, zinco selenite.

7. Enzimi proteolitici

Papaina, collagenasi (preferibilmente di tipo Ia, tipo II, tipo IV), serratiopeptidasi, eparanasi, DNasi, elastasi, bromelaina, bradichinasi, *Clostridium* peptidasi, enzimi espressi da *Lactobacillus acidophilus*, enzimi espressi dal genere *Aspergillus*, proteasi, aliinasi, fibrinolisinasi.

8. Mucopolisaccaridi

Acido ialuronico, condroitinsolfati.

9. Zuccheri, loro alcoli derivati e loro miscele

Glucosio, saccarosio, glucani, mannani, glucomannani, fucosio, fruttosio, eparansolfati, pectine, amidi, loro alcoli derivati.

10. Soluzioni per coltura cellulare

RPMI 1640 (terreno per colture cellulari), DMEM-LG (terreno per colture cellulari), FBS (siero bovino fetale per colture cellulari), F12 (soluzione per colture cellulari contenente una fonte aminoacidica completa), HANK'S solution (soluzione

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

per colture cellulari contenente bicarbonato di sodio), SyntheChol (NS0 Supplement Sigma).

11. Emoderivati

Siero autologo da sangue periferico del soggetto donatore e ricevente di tessuti, cellule e mezzi di coltura.

12. Sostanze parasimpaticolitiche

Adifenina, amminocarbofluorene, anisotropina, anticolinesterasici, atropina, benzatropina, ciclopentolato, clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcu-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutininil-trimetil-ammonio-cloruro), metil-scopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina; tutti i derivati e loro alcaloidi naturali e di sintesi delle sostanze elencate. E preferibilmente, secondo la classificazione IUPAC:

1) Anisotropina

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

[(8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]otto-3-il)-2-propilpentanoato];

2) Anisotropina metilbromuro;

3) Atropina

[(8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]otto-3-il) 3-idrossi-2-fenil-propanoato];

4) Atropina idrocloruro;

5) Atropina iperdurica (hyperduric);

6) Atropina metilbromuro;

7) Atropina metilnitrato;

8) Atropina N-ossido;

9) Atropina solfato;

10) Clidinio

[(4-metil-4-azoniabicyclo[2.2.2]otto-2-il)-2-idrossi-2,2-difenil-acetato];

11) Clidinio bromuro;

12) Ciclopentolato

[2-dimetilaminoetil-2-(1-idrossiciclopentil)-2-fenil-acetato];

13) Ciclopentolato idrocloridrato;

14) Diciclomina

[2-dietilaminoetil-1-cicloesilciclo-esano-1-carbossilato];

15) Glicopirrolato

[(1,1-dimetil-2,3,4,5-tetraidropirrolo-3-il)-2-ciclo

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

pentil-2-idrossi-2-fenil-acetato];

16) Isopropamide

[(3-carbamoil-3,3-difenil-propil)-metil-dipropano-2-il-ammonio] ;

17) Esociclio metilsolfato

[1-cicloesil-2(4,4-dimetil-2,3,5,6 tetraidropirazina-1-il)-1-fenil-etanolo; solfonato-ossimetano];

18) Mepenzolato

[(1,1-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2H-piridina-3-il)2-idrossi-2,2-difenil-acetato];

19) Metantelina

[dietil-metil-[2-(9H-xanten-9-il-carbonil-ossi)-etil]ammonio];

20) Metilatropina

[(8,8-dimetil-8-azoniabicciclo [3.2.1]otto-3-il) 3-idrossi-2-fenil-propanoato];

21) Metilatropina nitrato;

22) Omatropina;

[(8-metil-8-azabicciclo[3.2.1]otto-3-il) 2-idrossi-2-fenil-acetato];

23) Omatropina idrobromuro;

24) Omatropina metilbromuro;

25) Omatropina idrocloruro;

26) Ossifenciclimina

[(1-metil-5,6-didro-4H-pirimidina-2-il)metil-2-

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

- cicloesil-2-idrossi-2-fenil-acetato];
- 27) Ossifenonio
[2-(2-cicloesil-2-idrossi-2-fenil-acetile)ossietil-trietil-ammonio] ;
- 28) Ossifenonio bromuro ;
- 29) Pirenzepina
[5,11-Diidro-11-[(4-metil-1-piperazinil)acetile]-6H-piridolo[2,3b][1,4] benzodiazepina-6-one] ;
- 30) Propantelina
[metil-dipropano-2-il-[2-(9H-xanten-9-il-carbonilossi)etil ammonio] ;
- 31) Metilscopolamina
[7(S)-(1 α ,2 β ,4 β ,5 α ,7 β)]-7-(3-idrossi-1-oso-2-fenil-propossi)-9,9-dimetil-3-osa-9-azoniatriciclo
[3.3.1.0^{2,4}]nonano bromuro] ;
- 32) Scopolamina
[[7(S)-(1 α ,2 β ,4 β ,5 α ,7 β)]- α -(idrossimetil) acido benzenacetico-9-metil-3-osa-9-azatriciclo
[3.3.1.0^{2,4}]non-7-il-estere] ;
- 33) Scopolamina idrobromuro;
- 34) Scopolamina idrocloruro;
- 35) Scopolamina metilbromuro;
- 36) Scopolamina metilnitrato;
- 37) Scopolamina N-ossido;
- 38) Tifenamil

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

[1-(2-dietilaminoetilsolfanil)-2,2-difenil-etanone];

39) Tifenamil idrocloruro;

40) Tridiexetil

[(3-cicloesil-3-idrossi-3-fenil-propil)-trietil-ammonio];

41) Tridiexetil cloruro ;

42) Tropicamide

[N-etil-3-idrossi-2-fenil-N-(piridina-4-il-metil)propanamide] ;

43) Tropicamide idrobromuro ;

44) Tropicamide idrocloruro.

COMPOSIZIONI

Le composizioni oggetto della presente invenzione (denominate con i seguenti acronimi: PSL-BASE-1, PSL-BASE-2, PSL-BASE-FARMA, PSL-BASE-INFUS) per uso *in vitro* ed *in vivo* sono state preparate impiegando le sostanze nelle quantità indicate nelle tabelle da 1 a 4.

Tabella 1. Composizione PSL-BASE-1

Composizione	per Litro
Glucosio	1 gr
RPMI 1640 o DMEM-LG	q.b. per un litro di soluzione
FCS	50 ml
F12	10 ml
HANK'S solution	20 ml
MEM solution - aminoacidi non essenziali	20 ml
Siero autologo	2 ml
Fattore di crescita a scelta	
TGF-Beta3	20 ug

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

LIF	1.000.000 unità
IL-6	1.000.000 unità
Insulina	10 UI
Transferrina	6,35 mg
Zinco selenite	3,18 mg
Sodio selenite	3,18 mg
Acido linoleico	10 mg
PMA	3 nM
IL-2	1.000.000 unità
M-CSF	50 ug
HGF	100 ug
Acido Ascorbico	515 mg
Insulina	10 unità
Calcio gluconato	0,1 g
Desametasone 21-fosfato disodico	40 ug
Parasimpaticolitici	per litro di soluzione
Scopolamina	200 ug

Tabella 2. Composizione PSL-BASE-2

Composizione	mg/L
Metionina	4,94
Cistina	5,12
N-acetilcisteina	1,00
Cisteina	3,51
Glicina	4,37
Leucina	15,90
Prolina	4,67
Glutamina	45,00
Biotina	0,05
Acido pantotenico	0,25
Acido L-Ascorbico	515,00
Retinolo	0,0015
Papaina	0,20
Acido Ialuronico	0,50
Glucosio	2000,00
Soluzioni addizionate	L/sol
RPMI 1640 o DMEM-LG	q.b. per un litro di soluzione
FCS	50 ml
F12	10 ml
HANK'S solution	20 ml
MEM solution - aminoacidi non essenziali	20 ml
Siero autologo	2 ml

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

Fattore di crescita a scelta	per Litro
TGF-B3	20 ug
LIF	1.000.000 unità
IL-6	1.000.000 unità
Insulina	10 UI
Transferrina	6,35 mg
Zinco selenite	3,18 mg
Sodio selenite	3,18 mg
Acido linoleico	10 mg
PMA	3 nM
IL-2	1.000.000 unità
M-CSF	50 ug
HGF	100 ug
Calcio gluconato	0,1 g
Desametasone 21-fosfato disodico	40 ug
Parasimpaticolitici	per Litro
Scopolamina	200 ug

Tabella 3. Composizione PSL-BASE-FARMA

Composizione	mg/L
Metionina	4,94
Cistina	5,12
N-acetilcisteina	1,00
Cisteina	3,51
Glicina	4,37
Leucina	15,90
Prolina	4,67
Glutamina	45,00
Biotina	0,05
Acido pantotenico	0,25
Acido L-Ascorbico	515,00
Retinolo	0,0015
Papaina	0,20
Acido Ialuronico	0,50
Glucosio	2000,00
Transferrina	6,35 mg
Zinco selenite	3,18 mg
Sodio selenite	3,18 mg
Acido linoleico	10 mg
Calcio gluconato	0,1 g
Desametasone 21-fosfato disodico	40 ug
Transferrina	6,35 mg
Base di glicerolo	q.b. per 1 Kg

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

Sostanze in soluzione addizionate	L/sol
Siero autologo	2 ml
Insulina	10 UI
Parasimpaticolitici	per Litro
scopolamina	200 ug

Tabella 4. Composizione PSL-BASE-INFUS

Composizione	mg/L
Metionina	4,94
Cistina	5,12
N-acetilcisteina	1,00
Cisteina	3,51
Glicina	4,37
Leucina	15,90
Prolina	4,67
Glutamina	45,00
Biotina	0,05
Acido pantotenico	0,25
Acido L-Ascorbico	515,00
Retinolo	0,0015
Papaina	0,20
Acido Ialuronico	0,50
Glucosio	2000,0
Transferrina	6,35 mg
Zinco selenite	3,18 mg
Sodio selenite	3,18 mg
Acido linoleico	10 mg
Calcio gluconato	0,1 g
Desametasone 21-fosfato disodico	40 ug
Soluzioni addizionate	L/sol
Siero autologo	2 ml
Insulina	10 UI
Soluzione fisiologica	q.b. per 1 Litro di soluzione finale
Parasimpaticolitici	per Litro
Scopolamina	200 ug

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

Culture cellulari

Isolamento dei monociti da sangue periferico

Eseguito un prelievo di 40 ml di sangue periferico (sei provette con EDTA da 7 ml), si separa la popolazione linfo-monocitaria come segue.

Il sangue intero viene ripartito in due aliquote da 20 ml e ogni aliquota viene stratificata goccia a goccia su 25 ml di Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) in provette da 50 ml (Lab-Tek, Nunc, Kamstrup, Denmark). Si centrifuga nuovamente a 1800 rpm per 25 minuti, si elimina il surnatante lasciandone 1 centimetro e si procede con la raccolta dell'anello trasparente di monociti che si forma dopo l'ultima centrifugazione. L'anello così ottenuto viene diluito in 10 ml di RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) e centrifugato a 1300 rpm per 10 minuti. Quindi si elimina il sopranatante e si lava ancora 2 volte, centrifugando a 1000 rpm per 10 minuti, ed infine, si risospende il pellet in 10 ml RPMI 1640 con 10% di FBS (Fetal Bovine Serum). Le cellule così ottenute vengono contate con l'ausilio della camera di Burker al fine di ottenere una sospensione finale di 5×10^5 cellule/ml. A questo punto si seminano le cellule in capsule Petri, piastre da 100 millimetri di diametro (Falcon, Becton Dickinson, Labware Europe, Milano, Italia). Si sottopongono i campioni ad una incubazione di 30 minuti a 37°C con una tensione di CO₂ del 5%. 30 minuti è il tempo necessario perché i monociti ottenuti aderiscano alla piastra, le

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

cellule non vanno lasciate per un tempo più lungo per evitare l'adesione anche dei linfociti. Le cellule sono state lavate, risospese e coltivate come di seguito dettagliato.

Linea cellulare monocitoide e monociti isolati da sangue periferico

Le cellule sono state lavate tre volte con centrifugazione a 160 g per 10 min a temperatura ambiente in terreno RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) e risospese dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) di 15-cm alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml cellule in terreno composto come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peprotech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

Cruz Biotechnology, America, California).

Sono state preparate tre tipologie di controlli, un controllo negativo (1) di cellule non trattate, un controllo (2) di cellule trattate solo con LIF (fattore anti-leucemico, Fattore inibitore della leucemia) ed un controllo (3) di cellule trattate con LIF (fattore anti-leucemico, Fattore inibitore della leucemia), con M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peprotech Inc., America, New Jersey), con PMA (3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato, Santa Cruz Biotechnology, America, California) e con IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante) come descritto in dettaglio di seguito.

1. Controllo 1: le cellule di controllo non sottoposte a condizioni sono state lavate tre volte con centrifugazione a 160 g per 10 min a temperatura ambiente in terreno RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) e risospese dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) di 15-cm alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml cellule in terreno RPMI 1640 supplementato con:

10% FCS (Celbio, Milano, Italy)

100 unità/ml di penicillina

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

100 ug/ml streptomicina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium).

2. Controllo 2: le cellule sono state lavate tre volte con centrifugazione a 160 g per 10 min a temperatura ambiente in terreno RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) e risospese dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) di 15-cm alla concentrazione finale di 1×10^6 /ml cellule in terreno RPMI 1640 supplementato con:

10% FCS (Celbio, Milano, Italy)

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peprtech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, Santa Cruz Biotechnology, America, California).

Tutti i campioni sono stati incubati per 15 giorni in un incubatore Heraeus termostaticamente controllato alla temperatura di 37°C con una atmosfera contenente il 5% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria). Si precisa che in tutti i campioni il terreno è stato regolarmente sostituito ogni 7 giorni lasciando il 30% del vecchio terreno per non portare via tutte le citochine prodotte dalle cellule e necessarie per la crescita.

Campioni di tutte le cellule oggetto di studio, sono stati lavati tre volte con centrifugazione a 160 g per 10 min a 37°C e sono stati sottoposti ad una analisi al citofluorimetro (Epics Profile II, Coulter, Hialeath, FL) dopo marcatura con i seguenti anticorpi monoclonali di topo (Mabs) anti uomo coniugati con R-ficoeritrina (PE) o Fluoresceina-IsoTioCianato (FITC): anti CD14 umano (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti CD34 umano (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti CD45 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti c-Kit (Santa Cruz Biotechnology, America, California) ed anti c-Met (Santa Cruz Biotechnology, America, California). Le cellule,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

testate con tecnica citofluorimetrica cellulare (Facs), presentavano tutti i marcatori di espressione staminale (CD14, CD34, CD45, CD90, c-Kit, c-Met) ampiamente positivi.

Trascorsa l'incubazione le cellule si presentavano in uno stato di semi adesione/sospensione con morfologia mista ovalare e fibroblastoide. Le cellule staccate con lidocaina al 2% (Sigma Aldrich, Milano, Italia) in PBS [17, 21] sono state lavate tre volte con centrifugazione a 160 g per 10 min a 37°C in RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) e sono state poste in una seconda incubazione come da seguente descrizione.

3. Controllo 3: i controlli trattati destinati a restare cellule staminali indifferenziate pluripotenti (es. PSC-THP1, ICLC PD No. 05005) sono stati risospesi alla concentrazione finale di 1×10^5 cellule per ml in piastre da sei pozzetti (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) in 0.5 ml per pozzetto di soluzione finale composta da terreno RPMI 1640 supplementato con:

10% FCS (Celbio, Milano, Italy)

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peptotech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, Santa Cruz Biotechnology, America, California).

4. Controllo 4: i controlli di monociti e di cellule monocitoidi destinati ad essere stimolati in modo usuale verso la specializzazione epatocitaria sono stati risospesi in provette da 50 ml (Lab-Tek , Nunc, Kamstrup, Denmark) alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peptotech Inc., America, New Jersey)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia,
Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana
ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa
Cruz Biotechnology, America, California)

HGF (hepatocyte growth factor, Peprotech Inc.,
America, New Jersey) 100 ng/ml

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali
(Sigma Aldrich, Milano, Italia).

5. Campione 1: i campioni di monociti e di
cellule monocitoidi destinati ad essere stimolati in
modo accelerato con l'addizione di sostanze
parasimpaticolitiche verso la specializzazione
epatocitaria sono stati risospesi in provette da 50
ml (Lab-Tek , Nunc, Kamstrup, Denmark) alla
concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una
soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomina

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano,
Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi,
Peprotech Inc., U.S.A., NJ)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa Cruz Biotechnology, America, California)

100 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, Peprotech Inc., America, New Jersey)

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali (Sigma Aldrich, Milano, Italia)

addizione di sostanze parasimpaticolitiche:

0,2 ug/ml scopolamina (Buscopan®, Boehringer Ingelheim, Italia).

Tutti i campioni ed i controlli sono stati allestiti in triplice copia. Tre copie sperimentali, ciascuna formata da quattro controlli (1, 2, 3, 4) ed un campione, sono state incubate a 37°C con una atmosfera contenente il 5% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria), per 30 giorni totali.

Isolamento e coltura di cellule mesenchimali pluripotenti staminali umane

Cellule mesenchimali pluripotenti staminali umane (MSCs, Mesenchinal Stem Cells) sono state ricavate da campioni di midollo osseo (BM, Bone Marrow) derivanti da testa femorale (prelievo di

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

spongiosa e midollo osseo) durante interventi chirurgici di protesizzazione totale dell'articolazione coxo-femorale. Le cellule nucleate sono state separate con gradiente di densità (Ficoll -Paque, Amersham) e risospese in terreno di coltura Dulbecco's modified Eagles medium-low glucose (DMEM-LG, Gibco, Grand Island, NY) supplementato con 10% siero bovino fetale (FBS, Sigma), 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina. Dopo 24 ore il terreno con le cellule in sospensione è stato aspirato ed è stato aggiunto terreno fresco sulle cellule adese. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75-cm² e poste in incubatore al 5% CO₂ ad una temperatura di 37°C. Quando le cellule raggiungono una confluenza del 80%, vengono staccate mediante tripsina-EDTA (5 minuti ad una temperatura di 37°C; scaduta l'incubazione si addizionano 5 ml di FBS puro e si raccolgono le cellule ormai staccate ed in sospensione), lavate 2 volte mediante centrifugazione a 160 g per 7 minuti a 37°C in solo terreno DMEM-LG (Gibco; Grand Island, NY) privo di addizionanti. Le cellule contenute nei pellet così ottenuti vengono risospese ad una concentrazione di 1x10⁶ in terreno fresco DMEM-LG (Gibco; Grand

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

Island, NY) supplementato con 10% siero bovino fetale (FBS, Sigma), 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina. Le cellule riseminate dopo diluizione 1:4 (concentrazione finale 2.5×10^4). In questo lavoro sono state utilizzate cellule al terzo passaggio in coltura continua.

Controllo 1: i controlli (1) destinati a restare cellule staminali indifferenziate pluripotenti sono stati coltivati in piastre da 60 millimetri di diametro (Falcon, Becton Dickinson, Labware Europe, Milano, Italia) per 15 giorni aggiungendo a 10 ml di terreno di coltura originale (terreno fresco DMEM-LG, Gibco; Grand Island, NY) supplementato con 10% siero bovino fetale, Sigma, 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina.

Controllo 2: i campioni destinati ad essere stimolati in modo usuale verso la specializzazione epatocitaria, staccati e raccolti come sopra descritto, sono stati risospesi in provette da 50 ml (Lab-Tek, Nunc, Kamstrup, Denmark) alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 µg/ml streptomycin

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano,

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peptotech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa Cruz Biotechnology, America, California)

100 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, Peptotech Inc., America, New Jersey)

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Campione 1: i campioni destinati ad essere stimolati in modo accelerato verso la specializzazione epatocitaria, staccati e raccolti come sopra descritto, sono stati risospesi in provette da 50 ml (Lab-Tek , Nunc, Kamstrup, Denmark) alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomina

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)
50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi,
Peprotech Inc., America, New Jersey)
1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia,
Santa Cruz Biotechnology, America, California)
1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana
ricombinante)
3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa
Cruz Biotechnology, America, California)
100 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, Peprotech
Inc., America, New Jersey)
5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali
(Sigma Aldrich, Milano, Italia)
addizione di sostanze parasimpaticolitiche:
0,2 ug/ml scopolamina (Buscopan®, Boehringer
Ingelheim, Italia).

Tutti i campioni ed i controlli sono stati
allestiti in triplice copia. Tre copie sperimentali,
ciascuna formata da quattro controlli (1, 2, 3, 4)
ed un campione, sono state incubate a 37°C con una
atmosfera contenente il 5% di apporto costante di
CO₂ (v/v in aria), per 30 giorni.

Isolamento e coltura di cellule sinoviali

Cellule sinoviali (SynCs, Synovial Cells) sono
state ottenute da pazienti durante interventi di

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

exeresi e couretage della membrana sinoviale all'interno della cavità articolare femoro-tibiale. Porzioni di tessuti sinoviali freschi sono stati dispersi in collagenasi (10µg per ml di terreno, Sigma) per 2 ore a 37°C. Il pellet lavato due volte in solo terreno DMEM-LG (Gibco; Grand Island, NY) privo di addizionanti mediante centrifugazione a 160 g per 10 minuti e viene poi risospeso in terreno completo Dulbecco's modified Eaglès medium-low glucose ([DMEM-LG] GIBCO; Grand Island, NY) supplementato con 10% di siero fetale bovino ([FBS] Sigma), 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina; infine seminato in fiasche da 75-cm² e posto in incubatore al 5% CO₂ ad una temperatura di 37°C. Dopo 24 ore il terreno con le cellule in sospensione è stato aspirato ed è stato aggiunto terreno fresco (DMEM-LG, Gibco; Grand Island, NY, supplementato con 10% di FBS, Sigma, 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina) sulle cellule adese. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75-cm² e poste in incubatore al 5% CO₂ ad una temperatura di 37°C. Quando le cellule raggiungono una confluenza del 80%, vengono staccate mediante tripsina-EDTA (5 minuti ad una temperatura di 37°C; scaduta l'incubazione si addizionano 5 ml di FBS

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

puro e si raccolgono le cellule ormai staccate ed in sospensione), lavate 2 volte mediante centrifugazione a 160 g per 7 minuti a 37°C in solo terreno DMEM-LG (Gibco; Grand Island, NY) privo di addizionanti. Le cellule contenute nei pellet così ottenuti vengono risospese ad una concentrazione di 1×10^6 in terreno fresco DMEM-LG (Gibco; Grand Island, NY) supplementato con 10% siero bovino fetale ([FBS] Sigma), 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina. Le cellule sono state riseminate dopo diluizione 1:4 (concentrazione finale 2.5×10^4). In questo lavoro sono state utilizzate cellule al secondo passaggio in coltura continua.

Campione 1: i campioni destinati ad essere stimolati verso la specializzazione epatocitaria, staccati e raccolti come sopra descritto, sono stati risospesi in provette da 50 ml (Lab-Tek , Nunc, Kamstrup, Denmark) alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 µg/ml streptomycin

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutamina (Life Technologies; growth medium)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi, Peptotech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa Cruz Biotechnology, America, California)

HGF (hepatocyte growth factor, Peptotech Inc., America, New Jersey) 100 ng/ml

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali (Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Controllo 2: i campioni destinati ad essere stimolati in modo usuale verso la specializzazione epatocitaria, staccati e raccolti come sopra descritto, sono stati risospesi in provette da 50 ml (Lab-Tek, Nunc, Kamstrup, Denmark) alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi,

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OULX
s.r.l.

Peprotech Inc., America, New Jersey)

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia,
Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana
ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa
Cruz Biotechnology, America, California)

100 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, Peprotech
Inc., America, New Jersey)

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali
(Sigma Aldrich, Milano, Italia).

Campione 1: i campioni destinati ad essere
stimolati in modo accelerato verso la
specializzazione epatocitaria, staccati e raccolti
come sopra descritto, sono stati risospesi in
provette da 50 ml (Lab-Tek, Nunc, Kamstrup, Denmark)
alla concentrazione finale di 2×10^6 cellule per ml
in una soluzione finale composta come segue:

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/ml/L gentamicina (Schering-Plough, Milano,
Italy)

2 mM L-glutammina (Life Technologies; growth medium)

50 ng/ml M-CSF (Fattore di crescita dei macrofagi,
Peprotech Inc., America, New Jersey)

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

1000 unità/ml LIF (Fattore inibitore della leucemia, Santa Cruz Biotechnology, America, California)

1000 unità/mL IL-2 (Interleuchina 2 umana ricombinante)

3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA, (Santa Cruz Biotechnology, America, California)

100 ng/ml HGF (hepatocyte growth factor, Peprotech Inc., America, New Jersey)

5 uL/ml di soluzione di aminoacidi non essenziali (Sigma Aldrich, Milano, Italia)

addizione di sostanze parasimpaticolitiche:

0,2 ug/ml scopolamina (Buscopan®, Boehringer Ingelheim, Italia).

Tutti i campioni ed i controlli sono stati allestiti in triplice copia. Tre copie sperimentali, ciascuna formata da quattro controlli (1, 2, 3, 4) ed un campione, sono state incubate a 37°C con una atmosfera contenente il 5% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria), per 30 giorni totali.

Sospensioni cellulari preliminari

Durante tutto l'esperimento e dopo la stimolazione ad assumere il fenotipo epatocitario, come sopra descritta, da tutti i campioni in studio si sono ottenuti campionature di cellule ogni 7 giorni di incubazione.

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

Per le linee cellulari monocitoidi ed i monociti da sangue periferico in semi adesione, tutti i campioni, ogni 3 giorni di incubazione, sono stati testati con metodica di immunofluorescenza nelle campionature in adesione sui vetrini per coltura cellulare.

Inoltre, campionature delle medesime cellule, ogni 7 giorni di incubazione, sono state incubate per 5-8 min con 2% di lidocaina (Sigma Aldrich, Milano, Italia) in PBS; raccolta la soluzione così ottenuta, come descritto in bibliografia [24-26], le cellule sono state lavate tre volte mediante centrifugazione a 160 g per 10 min a 37°C con RPMI 1640 senza addizionanti (Life Technologies, Grand Island, NY). Le cellule ottenute dai pellets di campioni e relativi controlli sono state risospese in tubi (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) da 15 ml alla concentrazione finale di 5×10^5 /ml cellule finale per le successive analisi fenotipiche (Western Blott, immunofluorescenza diretta e FACS).

Per le cellule MSCs e SynCs in confluenza, ogni 7 giorni di incubazione, sopra descritta in dettaglio, tutti i campioni sono stati testati con metodica di immunofluorescenza nelle campionature in

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

adesione sui vetrini per coltura cellulare.

Inoltre, campionature delle medesime cellule sono state staccate, ogni 7 giorni di incubazione, mediante tripsina-EDTA (5 minuti ad una temperatura di 37°C; scaduta l'incubazione si aggiungono 5 ml di FBS puro e si raccolgono le cellule ormai staccate ed in sospensione), lavate 2 volte mediante centrifugazione a 160 g per 7 minuti a 37°C in solo terreno DMEM-LG (Gibco; Grand Island, NY) privo di supplementi. Le cellule ottenute dai pellets di campioni e relativi controlli sono state risospese in tubi (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Denmark) da 15 mL alla concentrazione finale di $5 \times 10^5/\text{ml}$ cellule finale per le successive analisi fenotipiche (Western Blott, immunofluorescenza diretta e FACS).

Western Blot

La tecnica Western sfrutta prima una elettroforesi denaturante (SDS-Page) per far separare le varie proteine in funzione della massa molecolare, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzerebbero la migrazione. I campioni di cellule sospesi in tampone lisante (1% SDS, 30 mM Tris pH 6,8, 5% glicerolo) al quale sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (Protease

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

Inhibitor Cocktail, Calbiochem, San Diego, CA), hanno subito una incubazione per 30 minuti a 4°C. I lisati ottenuti sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 20 min a 4°C ed è stato raccolto il surnatante; la concentrazione proteica dei campioni è stata valutata con metodo Bio-Rad (Benchmark Plus assay, Bio-Rad). Prima della corsa elettroforetica, i campioni sono stati fatti bollire per 5 minuti in presenza di beta-mercapto etanolo e blu di bromofenolo. I campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel al 12% (SDS-PAGE) e trasferiti su membrana PVDF (Perkin Elmer Inc.). Le membrane sono state saturate con metanolo a temperatura ambiente e successivamente incubate per tutta la notte a 4° C con i seguenti anticorpi primari diluiti con titolo di 1:500 in PBS con 5% di latte in polvere scremato: anti-CD 34 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 14 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 45 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 71 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 90 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 29 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 105 (Santa Cruz Biotechnology, America,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

California), anti CD 117/c-KIT (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti c-MET (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 7 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 8 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 18 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 19 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 7/17 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti albumina (Rockland Immunochemicals, America, Pennsylvania), anti alfafetoproteina (Monosan Europa, Netherlands). Dopo cinque lavaggi, le membrane sono state incubate con i relativi anticorpi secondari (1:1000) coniugati con perossidasi di rafano (HRP, SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) per 1h a temperatura ambiente. Le bande corrispondenti sono state evidenziate con liquidi di chemiluminescenza (Super Signal Western Pico solution, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, USA) e fissate su lastre fotografiche.

Protocollo di immunofluorescenza

Cellule in sospensione sono state incubate con MitoTracker Red 0,2 mM per 10 minuti a 37°C. Dopo

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

tre lavaggi con centrifugazione a 160 g per 10 min a temperatura ambiente in PBS (pH 7,4), i pellets cellulari sono stati risospesi in una soluzione fissante di paraformaldeide al 4% in RPMI 1640 con pH 7,4, per un ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state risospese in una soluzione di PBS e Tryton allo 0,1 % per un ora a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS le cellule sono state seminate su vetrini portaoggetti e il liquido è stato fatto evaporare all'aria. Le cellule sono state bloccate con siero di capra normale (normal goat serum) al 20 % per un'ora, incubate con anticorpi monoclonali anti uomo anti-CD 34 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 14 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 45 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 71 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 90 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 29 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 105 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti CD 117/c-KIT (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti c-KIT (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti c-MET (Santa Cruz Biotechnology, America,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

California), anti citocheratina 7 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 8 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 18 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 19 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 7/17 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti albumina (Rockland Immunochemicals, America, Pennsylvania), anti alfafetoproteina (Monosan Europa, Netherlands), coniugati con Fluoresceina-isothiocianato (FITC) per 30 minuti. Per ogni anticorpo monoclonale sono stati allestiti controlli specifici con i relativi isotipi (Santa Cruz Biotechnology, America, California). I coprioggetti montati su vetrino con moviol sono stati osservati al microscopio ottico. I nuclei sono stati marcati con soluzione Hoechst (diluizione 1:1000). I coprioggetti montati su vetrino con moviol sono stati osservati al microscopio ottico [24-25].

RISULTATI

Microscopia ottica: incubazione a 7 gg

I controlli trattati con terreno specifico per colture staminali dopo 7 giorni di incubazione con

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

terreno RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) mostravano la trasformazione morfologica da rotondeggiante ad una forma fibroblastoide allungata adesa alla piastra in coltura. I controlli non trattati mostravano unicamente una morfologia tondeggiante ed erano esclusivamente in sospensione.

Monociti da sangue periferico (controllo 1) non trattati (terreno RPMI 1640, 10% FCS 100 unità/ml di penicillina, 100 g/ml streptomicina, 160 mg/L gentamicina, 2 mM L-glutammina + PanLeuKine).

Monociti da sangue periferico (controllo 2) trattati esclusivamente con il fattore (LIF, Fattore inibitore della leucemia) anti-leucemico (terreno RPMI 1640, 10% FCS 100 unità/ml di penicillina, 100 g/ml streptomicina, 160 mg/L gentamicina, 2 mM L-glutammina, LIF 1000 unità/ml).

Monociti da sangue periferico (controllo 3) a 166 ore (giorno 7) dalla stimolazione con MCSF (terreno RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA)).

Cellule THP-1 (controllo 1) non trattate

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

(terreno RPMI 1640, 10% FCS 100 unità/ml di penicillina, 100 g/ml streptomycin, 160 mg/L gentamicina, 2 mM L-glutamina).

Cellule THP-1 (controllo 2) trattate esclusivamente con il fattore (LIF, Fattore inibitore della leucemia) anti-leucemico (terreno RPMI 1640, 10% FCS 100 unità/ml di penicillina, 100 g/ml streptomycin, 160 mg/L gentamicina, 2 mM L-glutamina, LIF 1000 unità/ml).

Cellule THP-1 (controllo 3, PSC-THP-1) a 166 ore (giorno 7) dalla stimolazione con MCSF (terreno RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbole 12-miristato 13-acetato (PMA)).

Cellule MSCs (controllo 1) a 166 ore, giorno 7 di incubazione (DMEM-LG, Gibco, Grand Island, NY), supplementato con 10% siero bovino fetale, Sigma, 10 U/ml penicillina G, e 160 mg/L gentamicina).

Cellule isolate da liquido e membrane sinoviali (controllo 1) a 166 ore, giorno 7 di incubazione (DMEM-LG, Gibco, Grand Island, NY), supplementato con 10% siero bovino fetale, Sigma, 10 U/ml penicillina G, e 40 µg/ml gentamicina).

Microscopia ottica: incubazione a 15 gg

I campioni di monociti da sangue periferico e

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

cellule monocitoidi (linea cellulare THP-1) dopo 15 giorni di incubazione (sette con induzione staminale e sette terreno specifico addizionato a sostanze parasimpaticolitiche acceleranti il differenziamento) con terreno RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF, 100 ng/ml HGF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e 0,2 ug scopolamina mostravano la trasformazione morfologica delle cellule da rotondeggiante ad una forma tetraedrica adesa alla piastra in coltura, positiva per la produzione di albumina, alfafetoproteina, glicogeno, citocheratine 7, 8, 17, 18 19, OV-6, recettore per c-MET (FACS, Immunoistochimica, WB, PCR). I controlli mostravano unicamente una morfologia tondeggiante ed erano esclusivamente in sospensione con risultati negativi per albumina, alfafetoproteina, glicogeno, citocheratine 7, 8, 17, 18 e 19, OV-6.

Monociti da sangue periferico (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Monociti (campione 1) da sangue periferico a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Cellule THP-1 (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Cellule (campione 1) THP-1 a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Cellule MSCs (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

nanogrammi/mL + 0,2 ug scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Cellule isolate da liquido e membrane sinoviali (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione.

Immunofluorescenza

Le cellule sono state trattate con anticorpi monoclonali anti uomo anti albumina (Rockland Immunochemicals, America, Pennsylvania), coniugati con Fluoresceina-isotiocianato (FITC) per 30 minuti. Per ogni anticorpo monoclonale sono stati allestiti controlli specifici con i relativi isotipi (Santa Cruz Biotechnology, America, California).

Monociti da sangue periferico (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Monociti da sangue periferico (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug/ml scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule THP-1 (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule THP-1 (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug/ml scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule MSCs (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule MSCs (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug/ml scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule isolate da liquido e membrane sinoviali (controllo 4) a 344 ore (giorno 14 di incubazione

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Cellule isolate da liquido e membrane sinoviali (campione 1) a 344 ore (giorno 14 di incubazione totale: 7 giorni di induzione alla staminalità + 7 giorni di induzione al differenziamento verso il fenotipo epatocitario), trattate con terreno specifico (RPMI 1640, addizionato come descritto in precedenza, e contenente 1000 unità/ml di LIF, 50 ng/ml M-CSF e 3 nM forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) e con addizione di 5 uL/mL di soluzione di aminoacidi non essenziali e di HGF alla concentrazione di 100 nanogrammi/mL + 0,2 ug/ml scopolamina) dal giorno 7 al giorno 14 di incubazione. Marcatura con Mabs anti albumina FITC.

Western blot

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

I campioni sono stati sottoposti ad analisi fenotipiche con Western Blot per i marcatori anti-CD 34 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 14 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 45 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 71 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 90 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 29 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti-CD 105 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti CD 117/c-KIT (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti c-MET (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 7 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 8 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 18 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratina 19 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti citocheratine 7/17 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti albumina (Rockland Immunochemicals, America, Pennsylvania), anti alfafetoproteina (Monosan Europa, Netherlands). Dopo cinque lavaggi, le membrane sono state incubate con i relativi anticorpi secondari (1:1000) coniugati

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

con perossidasi di rafano (HRP, SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) per 1h a temperatura ambiente, come riportato nelle tabelle che seguono.

Caratterizzazione di monociti circolanti versus monociti staminali pluripotenti e differenziati

I risultati relativi all'espressione del CD34, del CD14, di c-KIT e di c-Met delle citocheratine 7, 8, 18, 19, 7/17, di albumina e di alfafetoproteina sono stati espressi come segue:

Tabella 5

Antigeni di superficie	monociti	monociti	monociti	monociti
		PSCs	Tipo epatociti	Tipo epatociti + parasimpat.
CD34	+++	++++	-----	-----
CD14	++	+++	+	+
c-KIT	++	+++	+	+
c-MET	+++	++++	+++	++
Citocheratina 7	+	++	+++	++++
Citocheratina 8	+	++	+++	++++
Citocheratina 18	++	+++	+++	+++
Citocheratina 19	++	+++	+++	++++
Citocheratine 7/17	++	++	++	++++
albumina umana	+/-	+	++	++++
alfafetoproteina	---	+/-	++++	++

----- = assenza di fluorescenza
 + = 1-5 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++ = 6-10 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++ = 10-20 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++++ = 20-50 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++++ > 50 cellule fluorescenti per campo ottico

Caratterizzazione delle THP-1 versus PSCs-THP e PSC-THP1-like liver cells

I risultati relativi all'espressione del CD34,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

del CD14, di c-KIT, di c-Met, delle citocheratine 7, 8, 18, 19, 7/17, di albumina e di alfafetoproteina sono stati espressi come segue:

Tabella 6

Antigeni di superficie	THP-1	PSC-THP1	PSC-THP1	PSC-THP1
			Tipo epatociti	Tipo epatociti + parasimpat.
CD34	+++	++++	+++	-----
CD14	++	+++	++	+
c-KIT	++	+++	++	+
c-MET	+++	++++	+++	++
Citocheratina 7	+	++	++	+++++
Citocheratina 8	+	++	++	++++
Citocheratina 18	++	+++	++	+++
Citocheratina 19	++	+++	+++	+++++
Citocheratine 7/17	++	++	+++	++++
albumina umana	+/-	+	+++	+++++
alfafetoproteina	---	+/-	++++	++

----- = assenza di fluorescenza
 + = 1-5 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++ = 6-10 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++ = 10-20 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++++ = 20-50 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++++ > 50 cellule fluorescenti per campo ottico

Caratterizzazione delle cellule mesenchimali di controllo e trattate

I risultati relativi all'espressione del CD34, del CD14, del CD45, del CD29, del CD117/c-KIT, del CD71, del CD90, del CD105, di albumina e di alfafetoproteina sono stati espressi come segue:

Tabella 7

Antigeni di superficie	Cellule Mesenchimali	Cellule Mesenchimali	Cellule Mesenchimali
------------------------	----------------------	----------------------	----------------------

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

		Tipo epatociti	Tipo epatociti + Parasimpat.
CD34	---	---	---
CD14	---	---	---
CD45	---	---	---
CD29	++	++	+
c-KIT	+++	++	+
CD71	++++	+++	++
CD90	++++	+++	+
CD105	+++	++	+
albumina umana	+/-	+	++
alfafetoproteina	---	++	+

----- = assenza di fluorescenza
 + = 1-5 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++ = 6-10 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++ = 10-20 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++++ = 20-50 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++++ > 50 cellule fluorescenti per campo ottico

Caratterizzazione delle cellule sinoviali

I risultati relativi all'espressione del CD34, del CD14, del CD45, del CD29, del CD117/c-KIT, del CD71, di albumina e di alfafetoproteina sono stati espressi come segue:

Tabella 8

Antigeni di superficie	cellule sinoviali	cellule sinoviali	cellule sinoviali
		Tipo epatociti	Tipo epatociti + parasimpat.
CD34	---	---	---
CD14	---	---	---
CD45	---	---	---
CD29	--	--	--
c-KIT	+++	++	+
CD71	++++	+++	++
albumina umana	+/-	+	+++
alfafetoproteina	---	+++	+

----- = assenza di fluorescenza
 + = 1-5 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++ = 6-10 cellule fluorescenti per campo ottico
 +++ = 10-20 cellule fluorescenti per campo ottico
 ++++ = 20-50 cellule fluorescenti per campo ottico

BUZZI, NOTARO &
 ANTONIELLI D'IOULX
 s.r.l.

+++++ > 50 cellule fluorescenti per campo ottico

Naturalmente, fermo restando il principio del trovato, i particolari di costruzione e le forme di realizzazione potranno ampiamente variare rispetto a quanto descritto ed illustrato a puro titolo di esempio, senza per questo uscire dall'ambito della presente invenzione.

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUJX
s.r.l.

BIBLIOGRAFIA

1. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*. 2006;439:216-19.

2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.

3. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19:193-204.

4. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA. Basic FGF Support of Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*. 2006;24(3):568-74.

5. Ram PT, Iyengar R. G protein coupled receptor signalling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene*. 2001;20(13):1601-6.

6. Cassiman D, Libbrecht L, Sinelli N, Desmet V, Deneef C and Roskams T. The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *American Journal of Pathology*. 2002;161(2):521-30.

7. Refsnes M, Thoresen GH, Sandnes D, Dajani OF, Dajani L, Christoffersen T. Stimulatory and inhibitory effects of catecholamines on DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: role of alpha 1- and beta-adrenergic mechanisms. *J Cell Physiol*. 1992;151(1):164-71.

8. Takayoshi K. The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis - recent developments. *Digestion* 2002;66:79-88.

9. Costa LG, Guazzetti M, Oberdoerster J, Yagle K, Costa-Mallen P, Tita B, Bordi F, Vitalone A, Palmery M, Valeri P. Modulation of DNA synthesis by muscarinic cholinergic receptors. *Growth Factors*. 2001;18(4):227-36.

10. Yagle K, Lu H, Guizzetti M, Moller T, Costa LG. Activation of mitogen-activated protein kinase by muscarinic receptors in astroglial cells: role in DNA synthesis and effect of ethanol. *Glia*. 2001;35(2):111-20.

11. Jimenez E, Montiel M. Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):678-86.

12. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem.* 1980;102(1):196-202.

13. Burdon T, Smith A and P Savatier. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002;12(9):432-8.

14. Dechow TN, Pedranzini L, Leitch A, Leslie K, Gerald WL, Linkov I and Bromberg JF. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10602-7.

15. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, Huang S. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene.* 2004;23(20):3550-60.

16. Hsieh FC, Cheng G, Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(2):292-9.

17. Kortylewski M, Jove R and Yu H. Targeting

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OULX
s.r.l.

STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2005;24:315-27.

18. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2426-31.

19. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Department of Health and Human Services. June 2001.

20. Uzan G. Therapeutic use of stem cells. *Rev Prat*. 2004;54(13):1399-403.

21. Wagers AJ, Christensen JL and Weissman IL. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther*. 2002;9:606-12.

22. Domen J and Weissman IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today*. 1999;5:201-08.

23. Bianco P and Cossu G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res*. 1999;251(2):257-63.

24. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUILX
s.r.l.

characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26:171-6.

25. Rabinovitch M and De Stefano M J. Cell shape changes induced by cationic anesthetics. *J Exp Med*. 1976;143:290-304.

26. Parker F. "Cute e ormoni" in Williams R.H. eds: *"Trattato di Endocrinologia"*. III° edizione italiana, Piccin, Padova. 1979;vol II°, cap 23:1115-19.

27. Robinson M, Reynolds AJ, Gharzi A, Jahoda CA. *In vivo* induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture. *J Invest Dermatol*. 2001;117(3):596-604.

28. Mankin HJ. Chondrocyte transplantation. One answer to an old question. *New Eng J Med*. 1994;331:940-1.

29. Pangborn CA, Athanasiou KA. Effects of growth factors on meniscal fibrochondrocytes. *Tissue Eng*. 2005;11(7-8):1141-8.

30. Glowacki J, Yates KE, Maclean R, Mizuno S. *In vitro* engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF-beta, and IL-1alpha. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):200-8.

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUXX
s.r.l.

31. Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater.* 2005;9:58-67.

32. Giannoni P, Pagano A, Maggi E, Arbico R, Randazzo N, Grandizio M, Cancedda R, Dozin B. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for aged patients: development of the proper cell expansion conditions for possible therapeutic applications. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(7):589-600.

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di almeno una sostanza parasimpaticolitica per accelerare il differenziamento di cellule staminali in cellule con fenotipo tessuto-specifico.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata fra Adifenina, amminocarbofluorene, atropina, anisotropina, anticolinesterasici, benzatropina, ciclopentolato, clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcn-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutininil-trimetil-ammonio-cloruro), metil-scopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina e loro alcaloidi derivati naturali e di sintesi.

3. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

preferibilmente fra Anisotropina, Anisotropina metilbromuro, Atropina, Atropina idrocloruro, Atropina iperdurica (hyperduric), Atropina metilbromuro, Atropina metilnitrato, Atropina N-ossido, Atropina solfato, Clidinio, Clidinio bromuro, Ciclopentolato, Ciclopentolato idrocloridrato, Dicciclomina, Glicopirrolato, Isopropamide, Esociclio metilsolfato, Mepenzolato, Metantelina, Metilatropina, Metilatropina nitrato, Omatropina, Omatropina idrobromuro, Omatropina metilbromuro, Omatropina idrocloruro, Ossifenciclimina, Ossifenonio, Ossifenonio bromuro, Pirenzepina, Propantelina, Metilscopolamina, Scopolamina, Scopolamina idrobromuro, Scopolamina idrocloruro, Scopolamina metilbromuro, Scopolamina metilnitrato, Scopolamina N-ossido, Tifenamil, Tifenamil idrocloruro, Tridixetil, Tridixetil cloruro, Tropicamide, Tropicamide idrobromuro, Tropicamide idrocloruro.

4. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è impiegata in una quantità 0,001 mg/L - 10 mg/L.

5. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

che detta sostanza parasimpaticolitica è impiegata in una quantità fra 0,02 mg/L - 1 mg/L.

6. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è scopolamina, ed è impiegata in una quantità 0,01 mg/L - 0,4 mg/L.

7. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto fenotipo-tessuto specifico è preferibilmente selezionato fra epatocitario, condrocitario, cardiomiocitario, endoteliale, epiteliale, osteocitario, ematopoietico, pancreatico, neuronale, gliale, adiposo, miocitario.

8. Uso di almeno una sostanza parasimpaticolitica per la preparazione di un medicamento per indurre un'accelerazione del differenziamento di cellule staminali in cellule con fenotipo tessuto-specifico da somministrare ad un paziente che ne abbisogni.

9. Uso secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata fra Adifenina, amminocarbofluorene, atropina, anisotropina, anticolinesterasici, benzatropina, ciclopentolato,

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcu-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutinil-trimetil-ammonio-cloruro), metilscopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina e loro alcaloidi derivati naturali e di sintesi.

10. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8 e 9, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata preferibilmente fra Anisotropina, Anisotropina metilbromuro, Atropina, Atropina idrocloruro, Atropina iperdurica (hyperduric), Atropina metilbromuro, Atropina metilnitrato, Atropina N-ossido, Atropina solfato, Clidinio, Clidinio bromuro, Ciclopentolato, Ciclopentolato idrocloridrato, Diciclomina, Glicopirrolato, Isopropamide, Esociclio metilsolfato, Mepenzolato, Metantelina, Metilatropina, Metilatropina nitrato, Omatropina, Omatropina idrobromuro, Omatropina

BUZZI, NOTARO &
ANTONELLI D'OUX
s.r.l.

metilbromuro, Omatropina idrocloruro,
Ossifenciclimina, Ossifenonio, Ossifenonio bromuro,
Pirenzepina, Propantelina, Metilscopolamina,
Scopolamina, Scopolamina idrobromuro, Scopolamina
idrocloruro, Scopolamina metilbromuro, Scopolamina
metilnitrato, Scopolamina N-ossido, Tifenamil,
Tifenamil idrocloruro, Tridiexetil, Tridiexetil
cloruro, Tropicamide, Tropicamide idrobromuro,
Tropicamide idrocloruro.

11. Uso secondo una qualsiasi delle
rivendicazioni 8 a 10, caratterizzato dal fatto che
detta sostanza parasimpaticolitica è impiegata in
una quantità 0,001 mg/L - 10 mg/L.

12. Uso secondo una qualsiasi delle
rivendicazioni 8 a 11, caratterizzato dal fatto che
detta sostanza parasimpaticolitica è impiegata in
una quantità fra 0,02 mg/L - 1 mg/L.

13. Uso secondo una qualsiasi delle
rivendicazioni 8 a 12, caratterizzato dal fatto che
detta sostanza parasimpaticolitica è scopolamina, ed
è impiegata in una quantità 0,01 mg/L - 0,4 mg/L.

14. Uso secondo una qualsiasi delle
rivendicazioni 8 a 13, caratterizzato dal fatto che
detto fenotipo-tessuto specifico è preferibilmente
selezionato fra epatocitario, condrocitario,

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

cardiomiocitario, endoteliale, epiteliale, osteocitario, ematopoietico, pancreatico, neuronale, gliale, adiposo, miocitario.

15. Mezzo di coltura per accelerare il differenziamento di cellule staminali in cellule con fenotipo tessuto-specifico, caratterizzato dal fatto che comprende almeno una sostanza parasimpaticolitica.

16. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata fra Adifenina, amminocarbofluorene, atropina, anisotropina, anticolinesterasici, benzatropina, ciclopentolato, clidinio, diciclomina, dicicloverina, diossilina, esociclio, etaverina, glicopirrolato, imbacina, ipratropio, mcn-a-343 (m-clorofenil-carbamolo-ossibutinil-trimetil-ammonio-cloruro), metil-scopolamina, metocramina, mepenzolato, metantelina, muscarina, omatropina, ossifenciclimina, ossifenonio, oxotremorina, piperidolato, poldina, pipenzolato, pirenzepina, pirenzepina analogo (AF-DX 116), pralidossina, propantelina, propantelina bromuri, prifinio, tiemonio, tiotropio, tolterodina, tripitramina, tropicamina, trospio, scopolamina e loro alcaloidi derivati naturali e di sintesi.

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

17. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 15 e 16, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è selezionata preferibilmente fra Anisotropina, Anisotropina metilbromuro, Atropina, Atropina idrocloruro, Atropina iperdurica (hyperduric), Atropina metilbromuro, Atropina metilnitrato, Atropina N-ossido, Atropina solfato, Clidinio, Clidinio bromuro, Ciclopentolato, Ciclopentolato idrocloridrato, Diciclomina, Glicopirrolato, Isopropamide, Esociclio metilsolfato, Mepenzolato, Metantelina, Metilatropina, Metilatropina nitrato, Omatropina, Omatropina idrobromuro, Omatropina metilbromuro, Omatropina idrocloruro, Ossifenciclimina, Ossifenonio, Ossifenonio bromuro, Pirenzepina, Propantelina, Metilscopolamina, Scopolamina, Scopolamina idrobromuro, Scopolamina idrocloruro, Scopolamina metilbromuro, Scopolamina metilnitrato, Scopolamina N-ossido, Tifenamil, Tifenamil idrocloruro, Tridiexetil, Tridiexetil cloruro, Tropicamide, Tropicamide idrobromuro, Tropicamide idrocloruro.

18. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15 a 17, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

impiegata in una quantità 0,001 mg/L - 10 mg/L.

19. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15 a 18, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è impiegata in una quantità fra 0,02 mg/L - 1 mg/L.

20. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15 a 19, caratterizzato dal fatto che detta sostanza parasimpaticolitica è scopolamina ed è impiegata in una quantità 0,01 mg/L - 0,4 mg/L.

21. Mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15 a 20, caratterizzato dal fatto che detto fenotipo-tessuto specifico è preferibilmente selezionato fra epatocitario, condrocitario, cardiomiocitario, endoteliale, epiteliale, osteocitario, ematopoietico, pancreatico, neuronale, gliale, adiposo, miocitario.

22. Procedimento per accelerare il differenziamento di cellule staminali in cellule con fenotipo tessuto-specifico, comprendente le seguenti operazioni:

- a. provvedere cellule staminali;
- b. provvedere un mezzo di coltura secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 15 a 21;
- c. aggiungere a detto mezzo di coltura almeno

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

un fattore di differenziamento tessuto-specifico-inducente;

d. coltivare dette cellule staminali in detto mezzo di coltura, così da ottenere cellule con fenotipo tessuto-specifico.

23. Procedimento secondo la rivendicazione 22, caratterizzato dal fatto che detto mezzo di coltura comprende inoltre almeno uno fra un fattore di crescita stimolatore di macrofagi e un fattore inibitore della leucemia.

24. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22 a 23, caratterizzato dal fatto che detto mezzo di coltura comprende inoltre almeno una interlecuchina, preferibilmente interleuchina-2 o interleuchina-6.

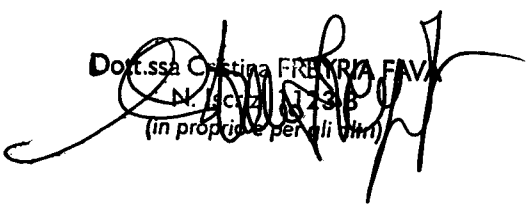
25. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22 a 24, caratterizzato dal fatto che detto mezzo di coltura comprende inoltre almeno un antibiotico, preferibilmente gentamicina, penicillina o streptomina.

26. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 22 a 25, caratterizzato dal fatto che detto mezzo di coltura comprende inoltre forbolo 12-miristato 13-acetato.

27. Procedimento secondo una qualsiasi delle

BUZZI, NOTARO &
ANTONIELLI D'OUX
s.r.l.

rivendicazioni 22 a 26, caratterizzato dal fatto che detto fattore di differenziamento tessuto-specifico-inducente è selezionato fra TGF-Beta (fattore di crescita di trasformazione Beta), LIF (fattore inibitore della leucemia), ITS (insulina-transferrina-selenio), insulina, HGF (fattore di crescita stimolatore epatocitario), M-CSF (fattore di crescita stimolatore di macrofagi), desametasone 21-fosfato disodico, gluconato di calcio, acido retinoico, retinolo, acido linoleico, siero autologo.


Dott.ssa Cristina FREYRIA FAVA
N. Iscrizione 11238
(in proprio e per gli altri)

 CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI TORINO