



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

DOMANDA NUMERO	102008901609936
Data Deposito	18/03/2008
Data Pubblicazione	18/09/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

KIT PER LA RACCOLTA DI SANGUE, PREFERIBILMENTE PERIFERICO, PER LA PRODUZIONE
DI CELLULE STAMINALI

Classe Internazionale: C 12 N 005 / 0000

Descrizione del trovato avente per titolo:

"KIT PER LA RACCOLTA DI SANGUE, PREFERIBILMENTE
SANGUE PERIFERICO, PER LA PRODUZIONE DI CELLULE

5 STAMINALI"

a nome THANKSTEM S.r.l. di nazionalità italiana con
sede legale in Via Manzini, 21 - 33100 UDINE.

dep. il al n.

* * * * *

10 CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente trovato si riferisce ad un kit per la
raccolta di sangue, preferibilmente di tipo perife-
rico, per la produzione di cellule staminali adul-
te.

15 STATO DELLA TECNICA

Negli ultimi anni l'utilizzo delle cellule stami-
nali in terapia ha avuto vasti consensi per i suc-
cessi ottenuti nella cura di patologie finora con-
siderate inguaribili.

20 Tuttavia, i metodi noti per l'ottenimento delle
cellule staminali sono laboriosi e dispendiosi.

Le cellule staminali pluripotenti (PSC) sono una
fonte disponibile non solo per la ricerca ma anche
per la creazione di farmaci e per i trapianti (Wa-
25 gers A. J. et al., 2002; Griffith L. G. et al.,

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

2002).

Si hanno cellule staminali embrionali ed adulte: le prime derivano da blastocisti di 8 giorni, quelle adulte invece possono essere ottenute principalmente da midollo osseo, tessuto adiposo, muscolare, 5 da sangue periferico e dal cordone ombelicale.

La definizione di cellula staminale è in costante evoluzione e, al momento, non esiste un generale consenso o metodica standard per isolarle o identificare. Per tutte queste cellule, embrionali (ES) e adulte, sia ematopoietiche (HSC) che mesenchimali (MSC) (Kuwana M., et al., 2003), sono stati identificati diversi marcatori genetici di cui alcuni comuni a molti tipi cellulari (Condomines M, 10 et al., 2006; Kang WJ, et al., 2006; Zhao Y., et al., 2003; Rabinovitch, M. et al., 1976).

Al momento, la ricerca è più orientata verso l'utilizzazione delle cellule staminali isolate da tessuto embrionale, feti e cordone ombelicale, ma 20 ciò sta ponendo diverse questioni legali ed etiche.

Oltretutto, ad oggi l'utilizzazione di queste cellule presenta diverse controindicazioni come: rischi di infezioni, di rigetto se trapiantate e, in alcuni mammiferi, tipo i cavalli, sviluppo di 25 teratomi.

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP s.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

Per ovviare a questi problemi, è noto utilizzare nella terapia "in vivo" cellule staminali autologhe isolate preferibilmente da midollo osseo, dal tessuto adiposo o dal sangue periferico. A partire da 5 cellule staminali adulte si ha una fase di differenziamento "in vitro" (o "ex vivo") delle cellule staminali nella linea cellulare desiderata mediante fattori specifici di induzione del differenziamento e una fase successiva di trapianto "in vivo" della 10 linea cellulare differenziata ottenuta. In questi metodi si ha l'inconveniente di fenomeni di rigetto poichè le cellule differenziate reintrodotte nell'organismo interessato non vengono riconosciute come "self" in quanto perdono, durante la fase di 15 differenziamento indotta in vitro, i fattori di riconoscimento "self".

Nell'uomo, il prelievo delle cellule staminali da sangue periferico comporta la loro purificazione attraverso un processo chiamato "aferesi" o "leuco-20 aferesi". Le cellule vengono estratte dal sangue, raccolte, e quindi inoculate nei pazienti subito dopo una chemio o radioterapia.

Nell'aferesi, che dura dalle 6 alle 8 ore, il sangue viene prelevato dalla vena di un braccio o 25 da una vena del collo o del petto e fatto passare

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
~~STUDIO CLP S.r.l.~~
P.le Cavezzali, 6/2 - 33100 UDINE

attraverso una macchina che rimuove le cellule staminali. Il sangue, così purificato, ritorna al paziente, mentre le cellule raccolte vengono conservate tramite refrigerazione in azoto liquido (Con-

5 domines M, et al., 2006; Kang WJ, et al., 2006). Questa tecnica, oltre che dolorosa, risulta anche essere estremamente stressante per il paziente. Oltre tutto la tecnica non prevede una reale discriminazione e/o purificazione delle cellule staminali

10 circolanti. Le principali tecniche note per la loro purificazione sono:

- utilizzo di fattori di accrescimento o derivati piastrinici (TGF-B, VEGF) per la cui estrazione i costi economici sono proibitivi (Hou M, et al.,

15 2006);

- isolamento di cellule staminali prelevate da midollo osseo, che consente di purificare e quindi utilizzare per la terapia circa il 15% delle cellule contenute nel materiale estratto;
- isolamento di cellule staminali da tessuto adiposo, che richiede la preventiva asportazione chirurgica di notevoli quantità di tessuto dal donatore e non consente la somministrazione per via endovenosa;
- 20 - IGF-1 (insuline- like growth factor 1) cono-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GRS s.r.l.
P.le Cavedale 6/2 - 33100 UDINE

sciuto come Tendotrophin (Fiedler J, et al., 2006);

- UBM (urinary bladder matrix): è un derivato dal maiale contenente citochine (ma non cellule nucleate), che inducono la cicatrizzazione della ferita ma non la rigenerazione della zona lesionata (Zhang YS, et al., 2005).

Altro metodo noto è descritto da Zhao Y. et al, nell'articolo "A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells" ed in WO-A-2004/043990. Si tratta di un metodo per preparare cellule staminali derivate da monociti, che comprende le fasi di isolare monociti da sangue periferico, porre a contatto questi ultimi con un componente mitogenico e successivamente effettuare la coltura dei monociti da sangue periferico in condizioni adatte alla propagazione delle cellule.

Questo metodo, che richiede inizialmente una fase d'isolamento del monocita e poi una fase d'espansione in un mezzo di coltura, risulta essere molto lungo, circa 15 – 20 giorni, per ottenere un numero significativo di cellule staminali, e non consente d'ottenere cellule staminali pluripotenti, cioè non specializzate, adatte ad essere inoculate direttamente e dopo breve tempo nel paziente.

Alla luce di quanto sopra esposto, è evidente la

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 33100 UDINE

necessità mettere a punto un metodo di espansione o divisione e purificazione di cellule staminali adulte da fonti facilmente reperibili, particolarmente il sangue, preferibilmente sangue periferico,
5 che permetta anche di ottenere cellule staminali atte al trattamento farmacologico.

E', inoltre, evidente la necessità di avviare la produzione di cellule staminali dal sangue, preferibilmente periferico, nei tempi più rapidi possibili,
10 per poter intervenire tempestivamente sul paziente.

Scopo del presente trovato è, quindi, realizzare un kit per la raccolta di sangue, preferibilmente sangue periferico, per la produzione di cellule staminali pluripotenti, sì da permettere un rapido avvio della produzione delle cellule staminali pluripotenti.
15

Per ovviare agli inconvenienti della tecnica nota e per ottenere questo ed ulteriori scopi e vantaggi,
20 la Richiedente ha studiato, sperimentato e realizzato il presente trovato.

ESPOSIZIONE DEL TROVATO

Il presente trovato è espresso e caratterizzato nella rivendicazione indipendente.

25 Le rivendicazioni dipendenti espongono altre ca-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP s.r.l.
P.le Cav. G. Lanza, 6/2 - 33100 UDINE

ratteristiche del presente trovato o varianti dell'idea di soluzione principale.

Un metodo di crescita e purificazione in vitro di cellule staminali da sangue, preferibilmente periferico, sviluppato dai presenti autori e descritto nella domanda di brevetto internazionale 5 PCT/EP2007/059531 a nome della Richiedente, che viene qui incorporata per riferimento, consente l'ottenimento di cellule staminali pluripotenti 10 adulte e comprende una prima fase avente due sotto-fasi:

- a) una prima sottofase di crescita delle cellule staminali di sangue periferico dopo il prelievo di sangue mediante il trattamento in vitro con MCSF 15 (Macrophage Colony Stimulating Factor) in concentrazione compresa tra 8-15 nM, preferibilmente 10 nM;
- b) una seconda sottofase di purificazione, preferibilmente mediante frzionamento su gradiente di 20 Ficoll.

La suddetta prima sottofase di crescita può avere durata variabile a seconda delle condizioni nelle quali il trattamento in-vitro è condotto; gli autori hanno verificato sperimentalmente che una durata 25 del trattamento in-vitro con MCSF compresa tra cir-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.R.L.
P.le Cavallini, 6/2 - 33100 UDINE

ca 24 e 96 ore, vantaggiosamente tra 48 e 72 ore, porta alla stabilizzazione della crescita, con l'identificazione dei marcatori staminali CD90, CD90/34, CD34 e CD117. Si tratta della condizione 5 ritenuta ottimale.

Le purificazione della seconda sottofase b) è principalmente indirizzata a distruggere i globuli rossi.

La seconda fase, che utilizza i semiprodotti ot-10 tenuti dalla fase b), prevede:

c) crescita delle cellule staminali di sangue periferico purificate nella fase b) mediante il trattamento in vitro con MCSF in concentrazione compresa tra 35-55 nM, preferibilmente 50 nM, ancora preferibilmente 45 nM. 15

Con queste concentrazioni di MCSF, le cellule mantengono il fenotipo di cellule staminali adulte pluripotenti.

Tale seconda fase può avere una durata che varia 20 tra 24 e 96 ore, preferibilmente tra 48 e 72 ore.

E' stato, infatti, osservato che utilizzando MCSF in concentrazione maggiore di 55 nM (ad esempio 70 nM), già dopo 24 ore le cellule non mantengono, invece, il fenotipo di cellule staminali pluripoten-25 ti.

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedale, 6/2 - 33100 UDINE

In particolare, la fase a) di divisione e crescita preventiva in sospensione con MCSF dopo il prelievo del sangue consente di aumentare la percentuale di cellule staminali. La successiva fase b) 5 consente di ottenere cellule staminali pluripotenti adulte che, una volta somministrate al paziente, si differenzieranno direttamente in vivo senza dare luogo a fenomeni di rigetto o infezione.

L'efficacia di tale produzione è testimoniata 10 dalla presenza dei marcatori di staminalità CD90, CD90/34, CD34 e CD117 e dal fatto che le cellule staminali non perdono i fattori di riconoscimento "self" in seguito alla divisione o espansione. Tali cellule staminali non danno luogo ad effetti collaterali come fenomeni di rigetto, di infezione, 15 sviluppo di teratomi una volta somministrate nel paziente, sono capaci di differenziarsi "in vivo" e di comportarsi come cellule staminali pluripotenti.

Gli autori hanno constatato che le cellule così 20 cresciute per divisione o espansione, una volta iniettate localmente o per via endovenosa, acquisiscono "in vivo" (e non "in vitro" come nei metodi noti nella tecnica anteriore mediante opportuni fattori di crescita e/o stimoli chimici (Gulati R., et al., 25 2003; Katz R.L., et al., 2002; Okazaki T. et al

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedal 6/2 33100 UDINE

2005)), tutte le caratteristiche morfologiche e chimiche di cellule macrofagiche, linfocitarie, epiteliali, endoteliali, neuronali e epatocitarie a seconda delle necessità e delle patologie degli organismi viventi trattati. Il metodo risulta essere meno invasivo rispetto agli altri metodi finora utilizzati per raccogliere le cellule staminali, indolore (al contrario dell'aferesi) ed economicamente conveniente.

10 Infine la possibilità di ottenere facilmente queste cellule e di poterle, quindi, conservare a lungo, ad esempio refrigerate in azoto liquido, rende le cellule ottenute con il metodo secondo l'invenzione adatte ai trapianti autologhi ed alla cura di 15 molte patologie (lesioni di diversa natura, malattie metaboliche, patologie neurologiche e infiammatorie acute e croniche).

In accordo con un aspetto del presente trovato, un kit per la raccolta di sangue, preferibilmente 20 sangue periferico, per la produzione di cellule staminali pluripotenti secondo il metodo sopra descritto, comprende un primo contenitore atto al contenimento del sangue prelevato, tipo una provetta, contenente un anticoagulante e la sostanza 25 MCSF. Tipicamente, detto primo contenitore è in ve-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP SRL
P.le Cavedine, 6/2 - 33100 UDINE

tro.

Con il presente kit è possibile raccogliere il sangue, preferibilmente periferico, per avviare rapidamente la crescita e produzione delle cellule 5 staminali mediante il metodo sopra illustrato e renderne, perciò, molto più rapida la produzione.

Tipicamente, la concentrazione di MCSF nella provetta del kit secondo il presente trovato varia da circa 2 a 20 nM, preferibilmente da circa 8 a 10 10 nM.

Usualmente, come anticoagulante si impiega eparina, oppure EDTA.

La presenza dell'anticoagulante è essenziale per impedire l'avvio della coagulazione del sangue, 15 mentre MCSF è il responsabile della procedura di crescita ed espansione delle cellule staminali.

Secondo una forma di realizzazione in variante del presente trovato, il kit può comprendere uno o più contenitori ulteriori al primo contenitore, tipo provetta. Questi ultimi sono preferibilmente realizzati con almeno la parete interna in un materiale, ad esempio materiale plastico tipo polipropilene (PP), trattato agli infrarossi oppure mediante raggi gamma, che impedisce l'adesione delle 25 cellule staminali alla parete stessa e quindi la

Il mandatario
STEPANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO CLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

loro aggregazione, condizione ritenuta da evitarsi.

Tipicamente, per questi ultimi, si tratta di un secondo contenitore per contenere le cellule staminali ottenute per uso endovenoso e di un terzo contenitore, di differenti dimensioni, per uso locale.

Le cellule staminali che si producono nei suddetti contenitori possono essere utilizzate subito oppure possono essere conservate, in azoto liquido, per poter essere utilizzate successivamente, quando 10 ve ne sia la necessità.

Secondo un'ulteriore variante, i suddetti contenitori, sia quello adibito al prelievo, che contiene l'anticoagulante e MCSF, sia quelli adibiti alla conservazione, possono essere identificati da un 15 numero seriale, comune, sequenziale o generato secondo un criterio predeterminato, per renderne più agevole l'identificazione all'interno del laboratorio predisposto alla preparazione delle cellule staminali ed al momento della spedizione.

20 Per l'identificazione univoca si possono utilizzare codici a barre e/o tag RFID, di lettura o lettura/scrittura, applicati ai contenitori, in cooperazione con relativi lettori ottici od elettromagnetici.

25 La prima sottofase di crescita del metodo sopra

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO CLR S.r.l.
P.le Cavedine, 6/2 - 33100 UDINE

descritto viene preferibilmente avviata immediatamente dopo il prelievo del sangue, sì che questo non coaguli nel frattempo.

Con le parole "immediatamente dopo" s'intende il 5 minor tempo possibile tra il prelievo del sangue e la sua coagulazione, sì da evitare la coagulazione del sangue ed avviare la procedura d'espansione delle cellule staminali nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo del sangue.

10 In altri termini, le parole "immediatamente dopo" si riferiscono al fatto che la crescita delle cellule staminali viene avviata subito dopo il prelievo del sangue dal paziente, tenendo presente che, per il presente trovato, è essenziale che si avvii 15 la suddetta procedura d'espansione prima che il sangue coaguli.

Infatti, il sangue appena prelevato dal paziente viene inserito nella provetta con l'anticoagulante e MCSF. L'anticoagulante blocca l'avvio della coagulazione, mentre la contestuale presenza di MCSF permette il rapido avvio del processo d'espansione e garantisce di minimizzare i tempi in inizio della cura sul paziente.

Rientra in tale definizione anche il caso in cui 25 il campione di sangue, preferibilmente periferico,

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 33100 UDINE

viene prelevato dal paziente, addizionato di anticoagulante per bloccare la coagulazione del sangue e sottoposto ad una procedura di conservazione che non ne alteri la capacità di produrre cellule staminali.

Quando si presenta la necessità, il sangue viene prelevato dal luogo dove è conservato e viene sottoposto alla procedura d'espansione delle cellule staminali sopra descritta, aggiungendovi, cioè, la sostanza MCSF, ottenendo in tempi rapidi il necessario quantitativo di cellule staminali.

Rientra, quindi, nel presente trovato, anche una procedura di prelievo e conservazione di sangue, preferibilmente periferico, adatto a produrre cellule staminali in apposite banche del sangue ed il suo successivo utilizzo, quando necessario, per la produzione di cellule staminali pluripotenti, mediante l'aggiunta di MCSF.

Tipicamente, dopo avere prelevato il sangue dal luogo dove è conservato, lo s'immette in una provetta che già contiene la sostanza MCSF in concentrazione da 2 a 20 nM, preferibilmente da 8 a 10 nM.

Ciò permette di evitare la complessa e costosa procedura di conservazione delle cellule staminali

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

stesse, che prevede ad esempio l'impiego dell'azoto liquido come sopra citato, basandosi solo sulle convenzionali tecniche di conservazione del sangue.

DESCRIZIONE DI UNA FORMA PREFERENZIALE DI REALIZZAZIONE

Con riferimento alla fig. 1 allegata, un kit 10 per la raccolta di sangue periferico secondo il presente trovato, per la produzione di cellule staminali pluripotenti, comprende una prima provetta 10 12, in vetro, contenente la sostanza MCSF 14 e, nel caso di specie, eparina 16.

La concentrazione di MCSF nella provetta 11 va da circa 8 a 10 pM.

Il kit comprende altre due provette 18 e 20, realizzate in materiale plastico tipo polipropilene (PP), trattato agli infrarossi o mediante raggi gamma.

Una seconda provetta 18 è destinata alla conservazione delle cellule ottenute per uso endovenoso ed una terza provetta 20 per uso locale.

E' importante che le provette 12, 18 e 20 assicurino la sterilità del loro contenuto.

Tutte le provette 12, 18 e 20 sono provviste di un rispettivo tappo 22, 24 per la loro chiusura.

25 I tappi 22, 24 possono essere a pressione a vi-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP s.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

te, od altro.

Il tappo 22 del contenitore 12 può essere, ad esempio, del tipo a pressione.

Il tappo 24 di ciascuna delle provette 18 e 20
5 può essere, ad esempio, del tipo a vite.

Le dimensioni della seconda provetta 18 sono: altezza 115 mm, diametro 17 mm, spessore 0,3 mm, capacità di 12 mL, mentre le dimensioni della terza provetta 20 sono: altezza 110 mm, diametro 30 mm,
10 spessore 0,3 mm, capacità 40 mL.

In seguito all'espansione mediante MCSF, secondo il presente trovato, le cellule isolate da sangue periferico agiscono "in vivo" da cellule staminali pluripotenti (PSC) e sono adatte a risolvere, nel-
15 l'arco di pochi mesi, lesioni o patologie inguari-
bili o guaribili solo lentamente con la metodologia e/o i farmaci classici.

MATERIALI E METODI

Prelievo:

20 Ogni campione di sangue periferico, di circa al-
meno 0,5 - 7 ml, è stato prelevato da cavalli e da cani dagli arti inferiori e immediatamente messo in provette contenenti eparina in quantità idonea e MCFS (10 nM).

25 Altri anticoagulanti, come EDTA, possono, comun-

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedale, 6/2 - 33100 UDINE

que, essere impiegati.

Avviene, a questo punto, la prima sottofase di trattamento in vitro, in cui si ha la divisione e crescita preventiva delle cellule staminali, grazie
5 a MCSF.

Purificazione:

I campioni di sangue sono stati diluiti 1:5 in PBS (Phosphate Buffer Saline) contenente NH₄Cl (200 mM), per provocare la lisi dei globuli rossi, cen-
10 trifugati a 10.000g, lavati due volte con PBS e centrifugati di nuovo a 200g. Le cellule nucleate ottenute sono state incubate per 7-12 ore a 37°C, preferenzialmente per 10-12 ore, e purificate me-
diante frazionamento su gradiente di Ficoll, quindi
15 isolate e lavate tre volte con RPMI medium 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY).

Una volta purificate, le cellule sono state incu-
bate altre 24 - 72 ore in presenza di 50 ng/ml di
MCFS 45 nM, per ottenere cellule con circa il 95%
20 di cellule con fenotipo CD90 (come determinate me-
diante analisi citofluorimetrica tramite fotometro
a flusso FACScan - Becton Dickinson), e quindi e-
spanse per ottenere il numero di cellule necessario
per i trattamenti locali o centrifugate a 10.000g e
25 risospese in PBS ad una concentrazione di circa

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLPS s.r.l.
P.le Cavedali, 6/2 - 33100 UDINE

90x10³ cellule/ml per i trattamenti endovenosi.

Immunostaining:

Per la citofenotipizzazione le cellule sono state lavate in PBS e quindi fissate su vetrino in Formaldeide 4% in PBS per 20 min a 20 °C.

Per l'identificazione delle proteine intracellulari, le cellule sono state permeabilizzate con 0,5% Triton X-100 per 5 min a 20 °C e quindi incubate per 1 ora con gli anticorpi primari diluiti in PBS contenente 1% BSA (per bloccare i siti antigenici aspecifici). Dopo tre lavaggi successivi, i vetrini sono quindi stati incubati per 45 min. con l'anticorpo secondario coniugato con il fluorocromo più appropriato: FITC o tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC), o Cy5.

Tutti gli anticorpi secondari sono stati sviluppati utilizzando l'asino come ospite, dalla Jackson ImmunoResearch.

Le immunocitochimiche sono state condotte alla temperatura di 4 °C e in atmosfera satura di umidità. Dopo tre lavaggi, i vetrini sono stati montati utilizzando il "gelvatol-PBS".

Le immagini in fluorescenza sono state quindi acquisite tramite un microscopio a fluorescenza utilizzando come standard interno

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedal 6/2 - 33100 UDINE

un'immunofluorescenza diretta contro la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (anticorpo policlonale di pecora prodotto da Cortex Biochem, San Leandro, CA).

5 Come controlli negativi e per calibrare i livelli del fondo di fluorescenza sono stati utilizzati vetrini incubati con anticorpi aspecifici dello stesso isotipo dei campioni d'interesse.

Il metodo appena descritto è stato utilizzato per 10 identificare tutti i marcatori oggetto di indagine (CD90, CD90/34, CD34 e CD117) e i marcatori riportati nella seguente tabella.

Tabella: caratterizzazione delle cellule trattate con MCSF(PSC) e macrofagi isolati dal sangue periferico.

Antigeni superficie	Intensità di fluorescenza relativa	
	PSC	Macrophagi
MAC-1	76 ± 18	84 ± 15
CD14	126 ± 29	157 + 19
CD34	77 ± 16	15 ± 5
CD45	143 ± 26	165 ± 38
Produzione di citochine		
IL-1	82 ± 27	83 ± 12

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GIP S.r.l.
P.le Cavedine, 6/2 - 33100 UDINE

IL-6	43 ± 22	67 ± 14
IL-10	7 ± 8	58 ± 7
TNF-	25 ± 16	67 ± 16
Indicatori funzionali		
Fagocitosi	187 ± 23	195 ± 26
Stimolazione linfociti, Abs540	0,72 ± 0,07	0,17 ± 0,02
Citotossicita %	9 ± 4	72 ± 6

È chiaro che al kit per la raccolta di sangue, preferibilmente sangue periferico, per la produzione di cellule staminali fin qui descritto possono essere apportate modifiche e/o aggiunte di parti, 5 senza per questo uscire dall'ambito del presente trovato.

È anche chiaro che, sebbene il trovato sia stato descritto con riferimento ad esempi, un esperto del ramo potrà realizzare altre forme equivalenti di 10 kit per la raccolta di sangue, preferibilmente sangue periferico, per la produzione di cellule staminali, aventi le caratteristiche espresse nelle rivendicazioni e quindi rientranti nell'ambito di protezione da esse definito.

RIVENDICAZIONI

1. Kit per la raccolta di sangue, preferibilmente sangue periferico, per la produzione di cellule staminali pluripotenti **caratterizzato dal fatto che** 5 comprende almeno un primo contenitore (12), atto al contenimento del sangue prelevato, il quale contiene un anticoagulante e la sostanza MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor).
2. Kit come nella rivendicazione 1, **caratterizzato** 10 **dal fatto che** la concentrazione di MCSF nel primo contenitore (10) è compresa tra circa 2 e 20 nM.
3. Kit come nella rivendicazione 2, **caratterizzato** 15 **dal fatto che** la concentrazione di MCSF nel primo contenitore (10) è compresa tra circa 8 e 10 nM.
4. Kit come nella rivendicazione 1, 2 o 3, **caratterizzato dal fatto che** l'anticoagulante è eparina, oppure EDTA.
5. Kit come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto che** comprende 20 un elemento di chiusura (22) per il primo contenitore (12).
6. Kit come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti **caratterizzato dal fatto che** comprende, inoltre, almeno un secondo contenitore (18, 20) realizzato con almeno la parete interna in un mate- 25

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedale, 6/2 - 33100 UDINE

riale che impedisce l'adesione delle cellule staminali.

7. Kit come nella rivendicazione 6, **caratterizzato dal fatto che** detto materiale è a base di materiale 5 plastico tipo polipropilene (PP), trattato agli infrarossi e/o mediante raggi gamma.

8. Kit come nella rivendicazione 6 o 7, **caratterizzato dal fatto che** comprende un elemento di chiusura (24) per ciascun contenitore (18, 20).

10 9. Kit per la raccolta di sangue, preferibilmente sangue periferico, per la produzione di cellule staminali, sostanzialmente come descritto, con riferimento agli annessi disegni.

p. THANKSTEM S.r.l.

15 LF/SL 17.03.2008

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedale, 6/2 - 33100 UDINE

1/1

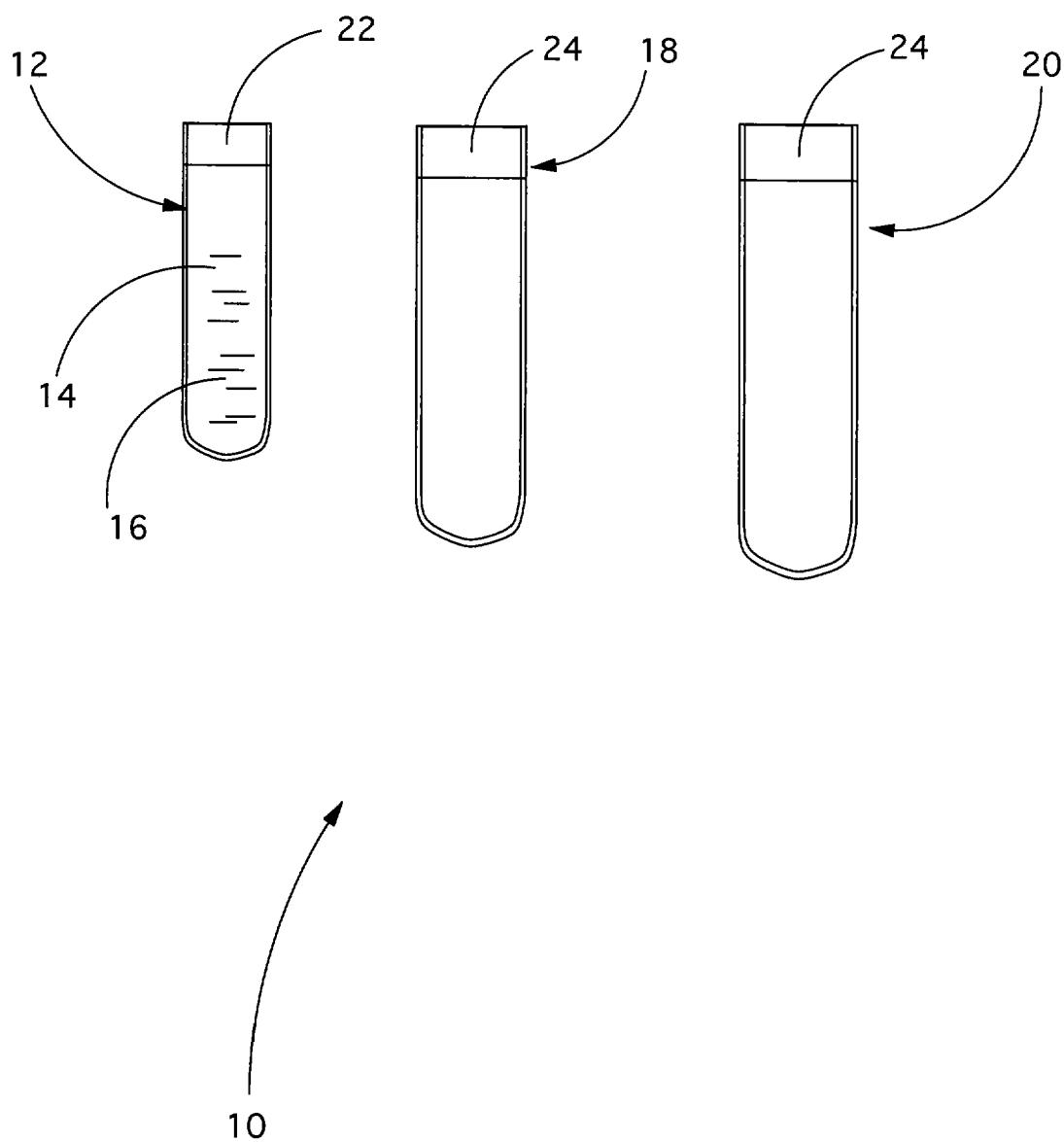


Fig. 1