



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

DOMANDA NUMERO	102006901436786
Data Deposito	28/07/2006
Data Pubblicazione	28/01/2008

Titolo

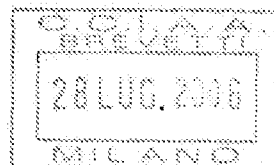
**METODO PER LA PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI MULTIPOTENTI,RELATIVI KIT E
USI IN CAMPO MEDICO.**

DESCRIZIONE del brevetto per invenzione industriale

a nome: METAPONTUM AGROBIOS S.r.l.

di nazionalità: italiana

con sede: METAPONTO MT



MI 2006A 001498

La presente invenzione concerne un nuovo metodo per la produzione di cellule staminali multipotenti relativi kit e usi in campo medico.

La ricerca sulle cellule staminali multipotenti e totipotenti (Conrad C, et al., 2005) apre nuove e interessanti prospettive applicative di terapia cellulare e ingegneria tissutale. Resta ancora da definire, però, quale sorgente cellulare staminale sia più idonea a scopo applicativo.

L'impiego di popolazioni staminali embrionali (ES) ha, recentemente, stimolato un crescente interesse scientifico in campo medicale. Tali cellule, sebbene caratterizzate da alta capacità replicativa, pluripotenzialità differenziativa ed espansione in vitro a lungo termine, sono, però, di limitato impiego terapeutico perchè sollevano molti problemi etici (Kiatpongsan S, et al., 2006).

Numerose evidenze sperimentali hanno messo in luce che sono identificabili fonti alternative di cellule staminali nell'individuo adulto; queste, seb-

bene dotate della capacità di differenziare solo in un limitato numero di tipi cellulari, non comportano, però, problematiche di tipo etico. Tra le sorgenti di cellule staminali adulte, si ricordano il midollo osseo (Saulnier N, et al., 2005), l'epitelio seminifero della gonade maschile (Cyranoski D. et al., 2006) gli epitelii (Janes SM, et al., 2002), sangue periferico, sangue cordonale (Saulnier N et al., 2005) e tessuto adiposo (Strem BM, et al., 2005).

Le cellule staminali adulte sono, però, di difficile reperibilità, poiché numericamente limitate; inoltre non possono essere coltivate in vitro a lungo termine poiché, dopo alcune divisioni cellulari, tendono a perdere le caratteristiche di multipotenzialità.

Accanto a queste sorgenti fisiologiche di cellule staminali, negli ultimi anni se ne è aggiunta un'altra molto promettente, ottenibile per modificazione del programma genetico di cellule differenziate (F. Santos, et al., 2002; A.J. Peter, et al., 2001; R. Wolf, et al., 2001; J.C. Gutierrez, et al., 2000; T.H. Bestor, 2000; C. Stewart, et al., 1982; R.D. Palmiter, et al., 1982; D. Binischkiewicz, et al., 2002; M.F. Chan, et al., 2001; M. Okano, et al., 1999). I ricercatori Wilmut e Campbell (Shiels PG, et

al., 1999; Eyestone WH, et al., 1999) e successivamente Yanagimachi e collaboratori (Wakayama T, et al., 2001) hanno stabilito con chiarezza, utilizzando modelli animali, che il nucleo di cellule somatiche del tutto differenziate può essere riprogrammato se trasferito nel citoplasma di una cellula uovo. Non sono stati ancora completamente delucidati i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di de-programmazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica. E' però chiaro che durante tale processo la cromatina si decondensa, la struttura a nucleosomi si destabilizza e le proteine regolatrici si dissociano dalla fibra di DNA influenzando così sull'espressione genica (T. Haaf, et al., 2000).

Altre osservazioni sperimentali hanno messo in luce che, nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, si hanno a livello del genoma numerose modificazioni epigenetiche di metilazione dei residui di citosina a seguito delle quali si ha un cambiamento del fenotipo cellulare e il "commitment" della cellula verso una specifica linea differenziativa (F. Santos, et al., 2002; A.J. Peter, et al., 2001; R. Wolf, et al., 2001; J.C. Gutierrez, et al., 2000; Jetsch A. et al., 2006; Szyf M, et al., 1989; Keshhet I, et al., 1985). In tale ottica, si è sviluppata l'idea di poter ri-

programmare una qualunque cellula completamente differenziata modificando parzialmente o completamente lo stato di metilazione del suo genoma, mediante trattamento con fattori specifici,.

Taranger e collaboratori (Taranger CK, et al., 2005) hanno dimostrato infatti che cellule epiteliali 293T possono de-differenziare fino ad esprimere marker tipici dello stato embrionale dopo trattamento di 1 ora con l'estratto di cellule NCCIT, isolate da teratoma. L'analisi quantitativa di espressione genica e lo studio di microarray eseguite sulle colonie mantenute in coltura per 23 passaggi hanno rivelato che la transizione al fenotipo cellulare pluripotente coinvolge una dinamica stimolazione di centinaia di geni tipici delle cellule NCCIT (tra i quali OCT4 (Ovitt CE, et al., 1998), SOX2 (M.V. Zappone, et al., 2000), NANOG (K. Mitsui, et al., 2003)) e un calo di espressione di geni caratterizzanti delle cellule 293T oltre che di generici indicatori di differenziamento, quali, ad esempio, laminine di tipo A.

Inoltre, da evidenze sperimentali è risultato che un agente demetilante, la 5' Aza 2' citidina (5-AzaC), un analogo della citosina, può causare una demetilazione estesa dei residui di 5-metilcitosina (M. Vlahovic, et al., 1999) e ridurre l'attività DNA me-

tiltransferasica (Tsuji-Takayama K, et al., 2004; Karpf AR, et al., 1999; U. Aapola, et al., 2001; X. Cheng, 1995; L.R. Silverman, et al., 1993; Simonsson, S., e Gurdon, 2004; Flaszka, M., et al., 2003).

Nelle cellule embrionali, sono stati identificati 4 enzimi di DNA citosin metiltransferasi, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3l (Shiels PG, et al., 1999; Eyestone WH, et al., 1999; Wakayama T, et al., 2001). Dnmt1 è il principale enzima che mantiene lo stato di metilazione durante la replicazione del DNA. La sua inattivazione in modelli murini è risultata nella perdita dell'imprinting genomico e ha portato precocemente a letalità l'embrione. Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3l, che catalizzano principalmente la metilazione de novo, sono molto attivi nelle cellule staminali embrionali e ne promuovono il differenziamento in vitro.

Utilizzata come efficace agente chemioterapico nel trattamento di leucemie (Yang AS, et al., 2006), la 5-AzaC si è rivelata un utile mezzo sperimentale per lo studio della metilazione del DNA nel differenziamento cellulare e nei meccanismi di attivazione genica (J.G. Herman, et al., 1994; K. Yoshiura, et al., 1995; Y.L. Ottaviano, et al., 1994; C.M. Bender, et al., 1998). Per esempio, la 5-AzaC è risulta-

ta intervenire nell'induzione del differenziamento in senso miogenico di cellule staminali multipotenti isolate da cordone ombelicale, midollo osseo e tessuto adiposo (Lin Y, et al., 2006). Altri studi riportano anche dati relativi alla sua attività modulante sullo sviluppo embrionale in ragione di effetti proliferogeni e differenziativi (Tsuji-Takayama K, et al., 2004). Inoltre, corpi embrioidi differenziati in vitro e trattati per 6 ore con 5-AzaC (1 μ M) hanno ripristinato la modalità di crescita in colonia tipica delle cellule staminali e la sensibilità al fattore di inibizione della leucemia (LIF).

L'azione demetilante della 5-Azacitidina, con conseguente ripristino di multipotenzialità cellulare, è stata ampiamente dimostrata e verificata anche nelle piante, monocotiledoni (frumento) e dicotiledoni (pomodoro), in WO2005003344.

L'analisi morfologico/funzionale e lo studio di espressione genica hanno portato a concludere che la 5-AzaC reverte lo stato differenziato delle cellule embrionali, organizzate in corpi embrioidi, a quello fenotipicamente attribuibile alle cellule staminali pluripotenti indifferenziate esprimenti marker tipici quali SSEA-1, fosfatasi alcalina, Oct4, Nanog e SOX2.

Altri e numerosi studi hanno riportato la riat-

tivazione in cellule somatiche mediante trattamento con 5-AzaC di geni silenziati quali VHL, E-caderina, recettore di estrogeno e p16. Anche i geni della famiglia STAT, che svolgono un importante ruolo nel mantenimento dello stato indifferenziato delle cellule staminali embrionali (ES) e della loro capacità di auto-replicazione per trasduzione del segnale LIF, sono probabilmente target di agenti demetilanti. Karpf e collaboratori (Karpf AR, et al., 1999) hanno osservato che i geni STAT silenziati nelle cellule tumorali del colon vengono riattivati per trattamento con la 5-AzaC, accompagnati dal ripristino della sensibilità cellulare all'interferone alfa (INF- α).

Sembrerebbe dunque che il trattamento con 5'Aza 2' citidina possa avere effetto sulla proliferazione, differenziamento o de-differenziamento di tipi cellulari diversi, appartenenti ad organismi animali o vegetali e a diverso stadio di sviluppo (embrionale, adulto, etc.).

Alla luce di quanto sopra esposto risulta evidente la necessità di potere disporre di un metodo per la produzione di cellule staminali multipotenti a partire da una fonte cellulare autologa inesauribile, di facile reperibilità e priva di alcuna problematicità etica. E' altresì auspicabile che il metodo sia

facilmente controllabile, riproducibile, e soprattutto che non conduca a trasformazione neoplastica delle stesse cellule.

Gli autori della presente invenzione hanno ora realizzato un metodo per la produzione di cellule staminali multipotenti che soddisfa tutte le esigenze precedentemente descritte e che consente di superare tutti gli svantaggi dei metodi già noti nello stato dell'arte. Infatti gli autori hanno individuato vantaggiose fonti alternative di cellule somatiche altamente differenziate da destinare alla medicina generativa, che o sottoposte ad un trattamento demetilante a concentrazioni opportune rappresenta una fonte inesauribile di cellule staminali multipotenti autologhe, facilmente reperibili. La riprogrammazione di tale fonte di cellule somatiche rappresenta una importante soluzione al problema della scarsità di donatori di midollo osseo e non presenta alcuna problematicità di natura etica.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per la produzione di cellule staminali multipotenti a partire da cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori comprendente la fase di trattamento demetilante di dette cellule con 5' Aza 2' citidina ad una concen-

trazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e multipotente e/o la riduzione dell'espressione dei marker di fase differenziativa tardiva.

Secondo una forma preferita di realizzazione del metodo secondo l'invenzione quando detto metodo viene condotto a partire da precursori di cellule somatiche adulte di mammifero comprende le seguenti fasi:

a) induzione del differenziamento di detti precursori in cellule mature mediante:

i) coltura dei precursori di dette cellule fino al raggiungimento della massima confluenza;

ii) trattamento con fattori differenzianti;

iii) coltura in terreno di mantenimento privo di agenti induttivi differenziativi fino a quando si verifica l'espressione di marker di fase differenziativa tardiva;

b) trattamento demetilante delle cellule mature altamente differenziate con 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e/o la riduzione dell'espressione dei marker di fase differenziativa tardiva.

Secondo forme preferite di realizzazione

dell'invenzione le cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori sono scelte tra adipociti, condrociti e cellule della muscolatura liscia o scheletrica.

In una forma particolarmente preferita di realizzazione dell'invenzione dette cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori sono adipociti o precursori di adipociti e detti marker di fase differenziativa tardiva sono marker adipogenici, preferibilmente scelti tra leptina e GLUT-4 o una loro combinazione.

Secondo una forma preferita di realizzazione del metodo secondo l'invenzione quando detto metodo viene condotto a partire da precursori di adipociti, esso comprende le seguenti fasi:

a) induzione del differenziamento in adipociti maturi di detti precursori mediante:

i) coltura dei precursori degli adipociti fino al raggiungimento della massima confluenza;

ii) trattamento con fattori differenzianti, preferibilmente scelti tra insulina, isobutilmetilxantina, desametasone, indometacina o una loro combinazione;

iii) coltura in terreno di mantenimento privo di agenti induttivi adipogenici fino a quando si verifica l'espressione di leptina o di GLUT-4;

b) trattamento demetilante delle cellule adipose mature altamente differenziate con 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e/o la riduzione dell'espressione dei marker adipogenici di fase differenziativa tardiva, preferibilmente scelti tra leptina e GLUT-4 o una loro combinazione. Preferibilmente, detti marker tipici dello stato embrionale indifferenziato possono essere scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina o una loro combinazione.

Preferibilmente, la concentrazione di impiego della 5' Aza 2' citidina può essere scelta tra 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M e 175 μ M.

In una forma di realizzazione preferita detta coltura in terreno di mantenimento privo di agenti induttivi adipogenici della fase iii) ha una durata di 7-10 giorni.

Secondo una forma preferita di realizzazione il metodo dell'invenzione comprende ulteriormente una fase di induzione del differenziamento in senso osteogenico (100 nM dexametasone, 10 mM β -glicerofosfato, 0,05 mM acido ascorbico-2-fosfato), condrogenico ($2,0 \times 10^{-4}$ M acido ascorbico-2-fosfato, 1 ng/ml TGF β 1) o mioge-

nico (20% Siero Bovino Fetale (FBS), 10% Siero di cavallo, 1% estratto embrionale di pollo).

La presente invenzione si riferisce all'uso delle cellule autologhe ottenibili con il metodo per la preparazione di un medicamento per il trapianto e/o la sostituzione cellulare in seguito a lesione, patologia o invecchiamento fisiologico.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione si riferisce ad una composizione farmaceutica comprendente le cellule autologhe ottenibili con il metodo come sopra definito, come principio attivo, insieme ad uno o più adiuvanti e/o eccipienti fisiologicamente accettabili.

Costituisce oggetto ulteriore dell'invenzione un kit per l'induzione della staminalità multipotente a partire da adipociti di mammifero, detto kit essendo comprendente le seguenti componenti:

- a) 5' Aza 2' citidina;
- b) marker tipici dello stato embrionale indifferenziato scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina.

Secondo una forma alternativa di realizzazione della presente invenzione quando la fonte cellulare di partenza sono i precursori degli adipociti di mammifero il kit per l'induzione della staminalità

multipotente, comprende le seguenti componenti:

- a) 5' Aza 2' citidina;
- b) marker tipici dello stato embrionale indifferenziato scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina;
- c) fattori differenzianti scelti tra insulina, isobutilmetilxantina, desametasone e indometacina.

Infine l'invenzione si riferisce all'uso della 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M per l'induzione della staminalità multipotente a partire da cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori. Secondo forme preferite di realizzazione dell'invenzione le cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori utilizzate possono essere scelte tra adipociti, condrociti e cellule della muscolatura liscia o scheletrica. La concentrazione di 5' Aza 2' citidina è preferibilmente scelta tra 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M e 175 μ M.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1, mostra il risultato di una PCR

semiquantitativa relativo all'espressione del gene Ob (leptina) di popolazioni di adipociti trattate con 175 μ M 5-Azacitidina;

le figure 2-6 le immagini di microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100x) delle popolazioni cellulari dopo 10 giorni di trattamento con 5-Azacitidina (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 175 μ M) e adipociti maturi controllo, rispettivamente;

le figure 7 e 8 mostrano le immagini di microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100x) delle colture trattate con 5-Azacitidina a concentrazioni pari a 250 μ M e inferiori a 0,1 μ M, rispettivamente.

ESEMPIO 1

Sono stati valutati gli effetti dell'agente demetilante 5-Azacitidina (diverse concentrazioni) sulla capacità di cellule adipose mature di retrovertire allo stato indifferenziato e riprogrammarsi, dopo stimolazione adeguata, in senso differenziativo multilineare (ad esempio, in senso osteogenico, condrogenico e miogenico).

MATERIALI E METODI

Sviluppo di un adeguato modello cellulare in vitro

Preadipociti umani e cellule di linea embrionale 3T3-L1 sono seminati alla densità di 5×10^3 cellule/cm² e coltivati in piastre Petri in terreno proli-

ferativo (DMEM-F12, 10% Fetal Calf Serum (FCS), 1% antibiotico-fungizone (AF)) fino al raggiungimento della confluenza cellulare massima. L'induzione differenziativa è ottenuta per trattamento di 48 ore in terreno specifico composto da DMEM, 10% Siero Fetale Bovino (FBS), 1% AF e fattori specifici differenzianti (insulina, isobutilmetilxantina, desametasone, indometacina). Il raggiungimento della forma matura differenziata (fenotipo univacuolare) è ottenuto dopo coltura di 7-10 giorni in terreno di mantenimento, privo di agenti induttivi adipogenici. Studi di immunofluorescenza verificano l'espressione della leptina, ormone tipicamente espresso dagli adipociti di fase adulta.

Trattamento 5-AzaC

Le cellule adipose mature sono mantenute in coltura con DMEM, 10% FBS, 1% AF per due settimane, in stimolazione continua di 5'Azacitidina alle concentrazioni molari di 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M, 175 μ M, 250 μ M. La dose ottimale di 5'Azacitidina è compresa tra 0,1 μ M - 175 μ M e le concentrazioni particolarmente efficaci sono quelle tra 100 μ M e 175 μ M. A dosi $\geq$ 250 μ M il trattamento demetilante non è più idoneo per la produzione di cellule multipotenti a partire da cellule altamente

differenziato poiché diviene un trattamento chemoterapico che induce le cellule all'apoptosi piuttosto che a retrovertire allo stato indifferenziato come mostrato nella Figura 7 dove si osserva un alto tasso apoptotico (trattamento delle colture con 5'Azacitidina a concentrazione 250 μ M). A dosi < 0,1 μ M come mostrato nella Figura 8 non si osservano segni di danno cellulare e/o proliferazione cellulare nelle cellule trattate.

Espressione di leptina: condizioni sperimentali di reazione PCR

Per amplificare il cDNA ottenuto dalle colture 5-Aza trattate e non, sono stati utilizzati:

- termociclatore Amplifier Eppendorf;
- primer specifici disegnati mediante ausilio del programma PrimerQuest (<http://biotools.idt.com>) e consultazione di Nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

I primer sono stati acquistati da New England Biolabs.

Condizioni di amplificazione: 95°C per 10 minuti (daturazione iniziale), 30 cicli di 95°C per 30 secondi (denaturazione), 52°C per 45 secondi (annealing), 72 °C per 45 secondi (estensione), 72°C per 10

minuti (estensione finale). La miscela di reazione è stata preparata con: 1 μ l di cDNA, 1 μ l di dNTPs Mix (10 mM), 1,25 μ l di soluzione $MgCl_2$ (25 mM), 1,25 μ l di buffer 10X, 0,2 μ l di Ampli Taq Gold (5U/ μ l) (Applied Biosystem), 1 μ l di primer senso e 1 μ l di primer antisenso specifici (10 pM), 8 μ l di H_2O RNase free in un volume finale di 12,5 μ l.

RISULTATI

Analisi morfologica delle colture trattate e di controllo mediante microscopia ottica

I risultati preliminari evidenziano nelle cellule trattate con agente demetilante 5-AzaC un evidente cambiamento della morfologia della piastra; è osservato, infatti, soprattutto a concentrazioni 1-10 μ M e superiori a 100 μ M, che, alla progressiva scomparsa di cellule globose, raggruppate in grandi cluster e caratterizzate da un voluminoso vacuolo lipidico, si associa la comparsa di elementi cellulari di forma più allungata con o senza vacuoli lipidici sparsi a livello citoplasmatico. Sono di seguito riportate le immagini di microscopia ottica delle popolazioni cellulari dopo 10 giorni di trattamento 5-AzaC. Si allegano le immagini di microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100x) delle popolazioni di controllo e quelle trattate con 5-Azacitidina.

Determinazione della crescita cellulare

Mediante misura della 5'-bromo-2'decossiuridina (BrdU) incorporata nelle cellule adipose 5-Azacitidina-trattate, è osservata proliferazione cellulare. Poiché è noto in letteratura che le cellule adipose mature non sono dotate di capacità proliferativa, sembra interessante caratterizzare meglio la frazione cellulare di morfologia fibroblastoide che compare solo nei campioni trattati e non nei controlli.

Determinazione dell'apoptosi cellulare

Mediante l'utilizzo del kit TACS Klenow In Situ Apoptotic Detection sono stati osservati fenomeni apoptotici sia nei campioni trattati che nei controlli dopo 24 ore, 48 ore, 72 ore dal trattamento con 5-Azacitidina. Nella seguente tabella sono riportati i risultati relativi ai campioni di adipociti trattati con 125 μ M, 150 μ M, 175 μ M.

Tabella 1

TEMPO	CONTROLLO	TRATTATO 125 μ M	TRATTATO 150 μ M	TRATTATO 175 μ M
24 ore	10%	15%	22%	38%
48 ore	12%	15%	28%	41%
72 ore	10%	10%	10%	10%

Indagine semiquantitativa (PCR) e quantitativa (RT-PCR)

L'espressione dei marker adipogenici di fase tardiva (leptina, GLUT-4), di fase precoce (PPAR- γ , CEBP- α) e di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1, fosfatasi alcalina) è stata valutata mediante PCR e RT-PCR.

I risultati preliminari mettono in luce una riduzione dell'espressione dei marker adipogenici di fase differenziativa tardiva. Nella Figura 1 è riportato il risultato di PCR semiquantitativa relativo all'espressione del gene Ob (leptina) di popolazioni di adipociti trattate con 175 μ M 5-Azacitidina.

BIBLIOGRAFIA

- Conrad C, Huss R. J Surg Res. 2005 Apr; 124(2):201-8.
- Kiatpongsan S, Tannirandorn Y, Virutamasen P. J Med Assoc Thai. 2006 Jan;89(1):111-7.
- Saulnier N, Di Campli C, Zocco MA, Di Gioacchino G, Novi M, Gasbarrini A. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2005 Nov-Dec;9(6):315-24.
- Cyranoski D. Nature. 2006 Mar 30;440(7084):586-

7.

- Janes SM, Lowell S, Hutter C. J Pathol. 2002 Jul; 197(4):479-91.
- Strem EM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Keio J Med. 2005 Sep; 54(3):132-41.
- F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean. Dev. Biol. 2002; 241:172-182.
- A.J. Peter, T. Daiya. Science 2001;293:1068-1070.
- R. Wolf, W. Dean, J. Walter. Science 2001; 293:1089-1093.
- J.C. Gutierrez, S. Callejas, S. Borniquel, A. Martin-Gonzalez. Int. Microbiol. 2000; 3:139-146.
- T.H. Bestor. Hum. Mol. Genet. 2000; 9:2395-2402.
- C. Stewart, H. Stuhlmann, D. Jahner, R. Jaenisch. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982; 79:4098-4102.
- R.D. Palmiter, H.Y. Chen, R.L. Brinster. Cell 1982; 29:701-710.
- D. Binischkiewicz, J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggan, D. Humpherys, M.A. Mastrangelo, Z. Jun, J. Walter, R. Jaenisch. Mol. Cell. Biol. 2002; 22:2124-2135.
- M.F. Chan, R. van Amerongen, T. Nijjar, E. Cup-

- pen, P.A. Jones, P.W. Laird. Mol. Cell. Biol. 2001; 21:7587-7600.
- M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, E. Li. Cell 1999; 99:247-257.
 - Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH. Wilmut I, Waddington D, Colman A, Schnieke AE. Cloning. 1999; 1(2):119-25.
 - Eyestone WH, Campbell KH. J Reprod Fertil Suppl. 1999; 54:489-97.
 - Wakayama T, Yanagimachi R. Mol Reprod Dev. 2001 Apr; 58(4):376-83.
 - T. Haaf, M. Schmid. Cytogenet. Cell Genet. 2000; 91:113-123.
 - F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean. Dev. Biol. 2002; 241:172-182.
 - A.J. Peter, T. Daiya. Science 2001; 293:1068-1070.
 - R. Wolf, W. Dean, J. Walter. Science 2001; 293:1089-1093.
 - J.C. Gutierrez, S. Callejas, S. Borniquel, A. Martin-Gonzalez. Int. Microbiol. 2000; 3:139-146.
 - Jetsch A. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;301:203-25.
 - Szyf M, Schimmer BP, Seidman JG. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Sep; 86(18):6853-7.

- Keshhet I, Yisraeli J, Cedar H. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 May; 82(9):2560-4.
- Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, Hakelien AM, Boquest AC, Collas P. Mol Biol Cell. 2005; 16(12):5719-35.
- Ovitt CE, Scholer HR. Mol Hum Reprod. 1998 Nov; 4(11):1021-31.
- M.V. Zappone, R. Galli, R. Catena, N. Meani, S. De Biasi, E. Mattei, C. Tiveron, A.L. Vescovi, R. Lovell-Badge, S. Ottolenghi. Development 2000; 127:2367-2382.
- K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka. Cell 2003; 113:631-642.
- M. Vlahovic, F. Bulic-Jakus, G. Juric-Lekic, A. Fusic, S. Maric, D. Serman. Int. J. Dev. Biol. 1999; 43:843-846.
- Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, Orita K. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 8; 323(1):86-90.
- Karpf AR, Peterson PW, Rawlins JT, Dalley BK, Yang Q, Albertsen H, Jones DA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Nov; 96(24):14007-12.
- U. Aapola, R. Lyle, K. Krohn, S.E. Antonarakis, P. Peterson. Cytogenet. Cell Genet. 2001;92:122-126.

- X. Cheng. Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5:4-10.
- L.R. Silverman, J.F. Holland, R.S. Weinberg, B.P. Alter, R.B. Davis, R.R. Ellison, E.P. Demakos, C.J. Cornell, R.W. Carey, C. Schiffer, E. Frei III, O.R. McIntyre. Leukemia (Baltimore) 1993; 7:21-29.
- Simonsson, S., and Gurdon. J. Nat. Cell Biol. 2004; 6:984-990.
- Flaszka, M., Shering, A. F., Smith, K., Andrews, P. W., Talley, P., and Johnson, P. A. Cloning Stem Cells 2003; 5:339-354.
- Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. Cancer Res. 2006 May; 66(10):5495-503.
- J.G. Herman, F. Latif, Y. Weng, M.I. Lerman, B. Zbar, S. Liu, D. Samid, D.S. Duan, J.R. Gnarra, W.M. Linehan, S.B. Baylin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91:700-9704.
- K. Yoshiura, Y. Kanai, A. Ochiari, Y. Shimoyama, T. Sugimura, S. Hirohashi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92:7416-7419.
- Y.L. Ottaviano, J.P. Issa, F.F. Parl, H.S. Smith, S.B. Baylin, N.E. Davidson. Cancer Res. 1994; 54:2552-2555.
- C.M. Bender, M.M. Pao, P.A. Jones. Cancer Res.

1998; 58:95-101.

- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, Zheng X, Chen X, Yan Z, Tian W. Mol Cell Biochem. 2006 May 23.

- Tsuji-Takayama K, Inoue T, Ijiri Y, Otani T, Motoda R, Nakamura S, Orita K. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 8; 323(1):86-90.

- Cellini Francesco, Cifarelli RosaAnna Gallitelli Maria; Mango Teresa; Lauria Giuseppe; Semeraro Lucia. METHOD FOR THE ISOLATION OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS IN PLANTS 13.01.2005. WO2005003344

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la produzione di cellule staminali multipotenti a partire da cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori comprendente la fase di trattamento demetilante di dette cellule con 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e multipotente e/o la riduzione dell'espressione dei marker di fase differenziativa tardiva.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di essere realizzato a partire da precursori di cellule somatiche adulte di mammifero e di comprendere le seguenti fasi:

a) induzione del differenziamento di detti precursori in cellule mature mediante:

i) coltura dei precursori di dette cellule fino al raggiungimento della massima confluenza;

ii) trattamento con fattori differenzianti;

iii) coltura in terreno di mantenimento privo di agenti induttivi differenziativi fino a quando si verifica l'espressione di marker di fase differenziativa tardiva;

b) trattamento demetilante delle cellule mature alta-

mente differenziate con 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e/o la riduzione dell'espressione dei marker di fase differenziativa tardiva.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui dette cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori sono scelte tra adipociti, condrociti e cellule della muscolatura liscia o scheletrica.

4. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui dette cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori sono adipociti o precursori di adipociti e detti marker di fase differenziativa tardiva sono marker adipogenici.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4 quando dipendente dalla 2, comprendente le seguenti fasi:

a) induzione del differenziamento in adipociti maturi di detti precursori mediante:

i) coltura dei precursori degli adipociti fino al raggiungimento della massima confluenza;

ii) trattamento con fattori differenzianti;

iii) coltura in terreno di mantenimento privo di agenti induttivi adipogenici fino a quando si verifica l'espressione di leptina o di GLUT-4;

b) trattamento demetilante delle cellule adipose mature altamente differenziate con 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M fino alla comparsa di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato e/o la riduzione dell'espressione dei marker adipogenici di fase differenziativa tardiva.

6. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-5, in cui la concentrazione di 5' Aza 2' citidina è scelta tra 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M e 175 μ M.

7. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 4-6, in cui detti marker tipici dello stato embrionale indifferenziato sono scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina o una loro combinazione.

8. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 4-7, in cui detti marker adipogenici di fase differenziativa tardiva sono scelti tra leptina e GLUT-4 o una loro combinazione.

9. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 5-8, in cui detti fattori differenzianti della fase ii) sono scelti tra insulina, isobutilmetilxantina, desametasone, indometacina o una loro combinazione.

10. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 5-9, in cui detta coltura della fase iii) ha una durata di 7-10 giorni.

11. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 1-10, comprendente ulteriormente una fase di induzione del differenziamento in senso osteogenico, condrogenico o miogenico.

12. Uso delle cellule autologhe ottenibili con il metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 11, per la preparazione di un medicamento per il trapianto e/o la sostituzione cellulare in seguito a lesione, patologia o invecchiamento fisiologico.

13. Composizione farmaceutica comprendente le cellule autologhe ottenibili con il metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 11, come principio attivo, insieme ad uno o più adiuvanti e/o eccipienti fisiologicamente accettabili.

14. Kit per l'induzione della staminalità multipotente a partire da adipociti maturi di mammifero, detto kit essendo comprendente le seguenti componenti:

a) 5' Aza 2' citidina;

b) anticorpi o primer per la rilevazione dei marker tipici dello stato embrionale indifferenziato scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina e/o i marker adipogenici di fase precoce PPAR- γ o CEBP- α e/o i marker adipogenici di fase tardiva leptina o GLUT-4.

15. Kit per l'induzione della staminalità multipo-

tente a partire da precursori di adipociti di mammifero, detto kit essendo comprendente le seguenti componenti:

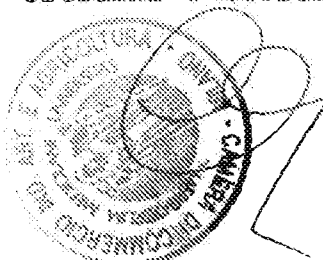
- a) 5' Aza 2' citidina;
- b) anticorpi o primer per la rilevazione di marker tipici dello stato embrionale indifferenziato scelti tra OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1 e fosfatasi alcalina e/o i marker adipogenici di fase precoce PPAR- γ o CEBP- α e/o i marker adipogenici di fase tardiva leptina o GLUT-4;
- c) fattori differenzianti scelti tra insulina, isobutilmetilxantina, desametasone e indometacina.

16. Uso della 5' Aza 2' citidina ad una concentrazione compresa tra 0,1 μ M e 175 μ M per l'induzione della staminalità multipotente a partire da cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori.

17. Uso della 5' Aza 2' citidina secondo la rivendicazione 16, in cui dette cellule somatiche adulte di mammifero altamente differenziate o loro precursori sono scelte tra adipociti, condrociti e cellule della muscolatura liscia o scheletrica.

18. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 16-17 in cui la concentrazione di 5' Aza 2' citidina è scelta tra 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M e 175 μ M.

Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.



CA/

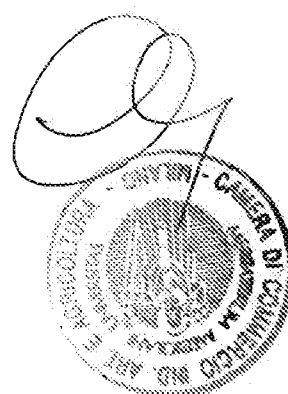
I MANDATARI
(firma)

(per sé e per gli altri)

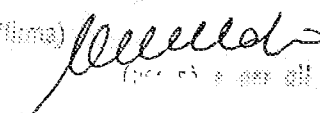


Fig 1

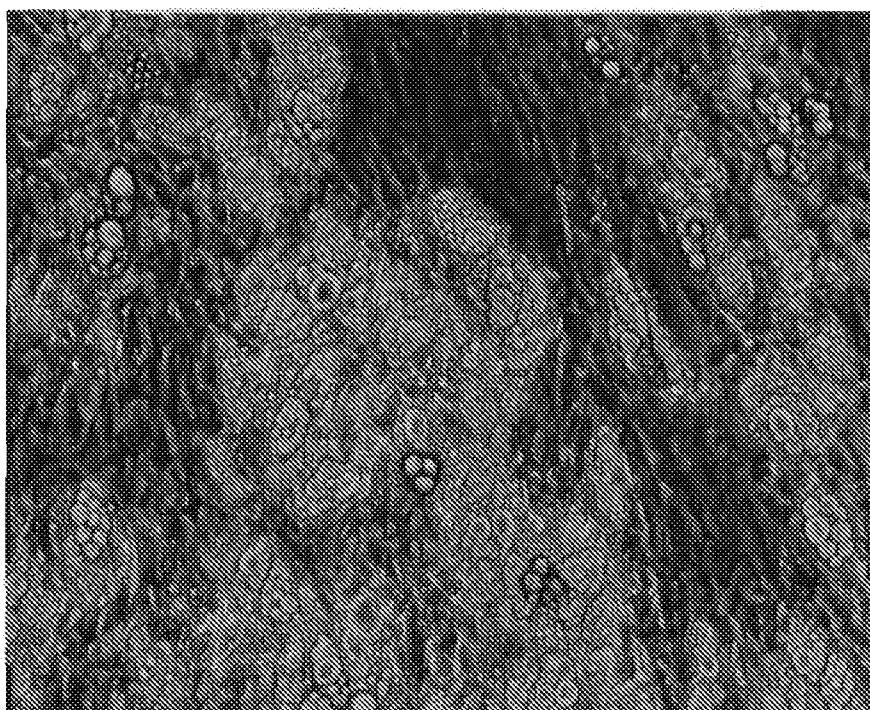
MT 2006 A 00 1498



MANDATARI

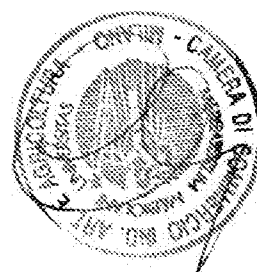
(firma) 
(per sé e per gli altri)

Microscopia ottica



5' azacitidina 1 μ M

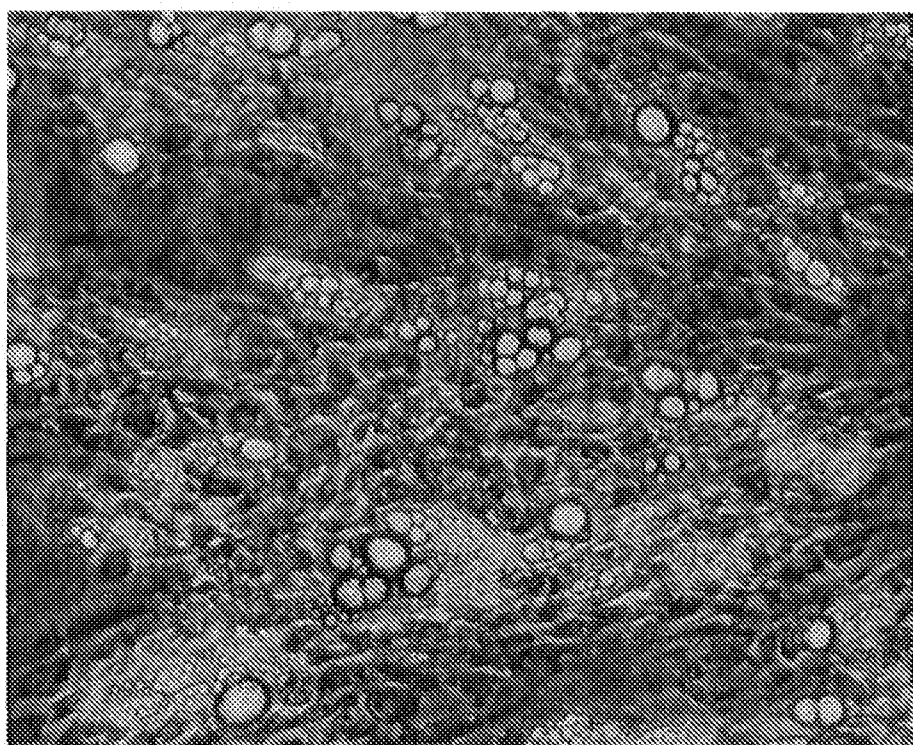
Fig. 2



MI 2006 A 00 1498

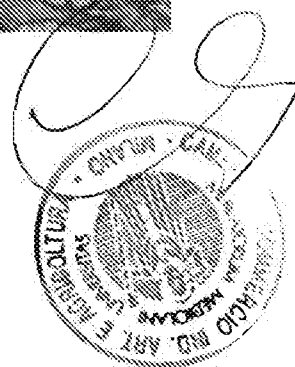
1 MANDATARI
[Signature]
19/05/2006

Microscopia ottica



5' azacitidina 10 μ M

Fig. 3

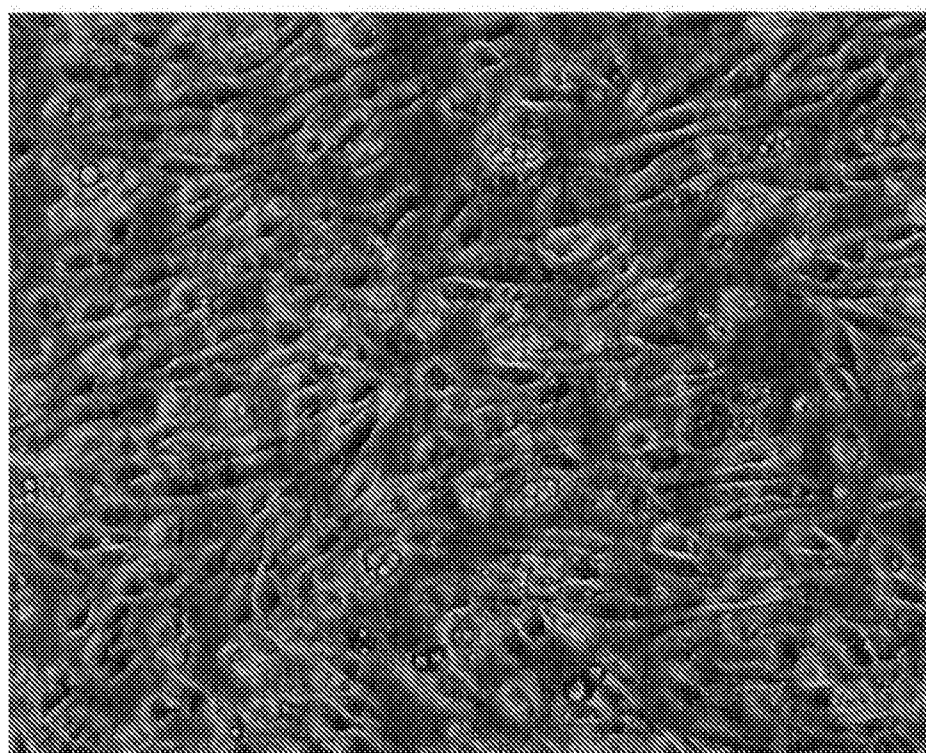


MI 2006A 00 1498

I. MANOSTARI
(firma)

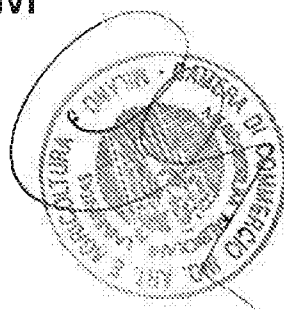
Per chi è per gli altri

Microscopia ottica



5' azacitidina 100 μ M

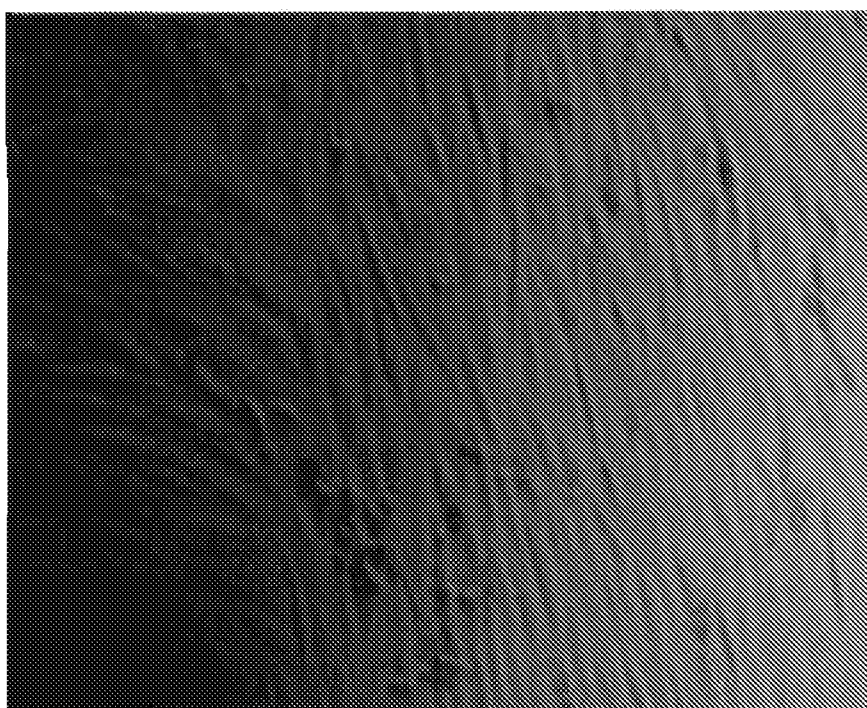
Fig. 4



MI 2006A 001498

I MANDARINI:
(firma) *[Signature]*
(per sé e per gli allievi)

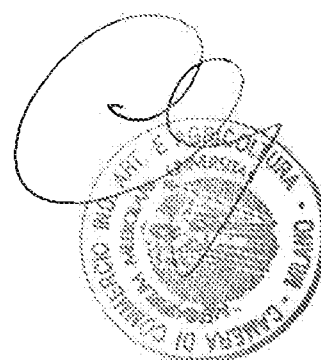
Microscopia ottica



5' azacitidina 175 μ M

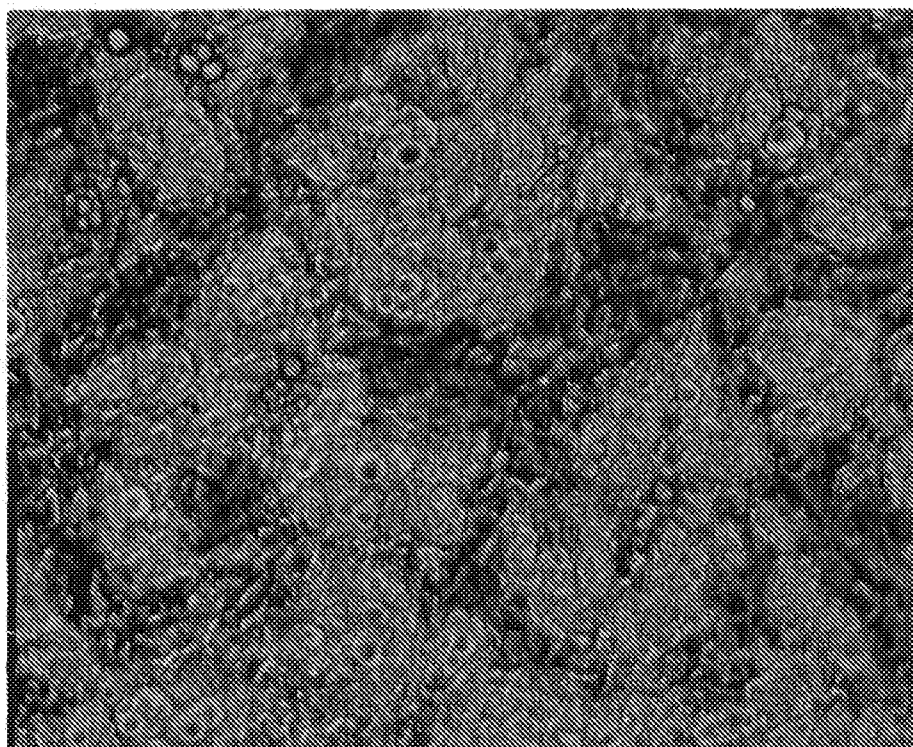
Fig. 5

MI 2006 A 00 1498



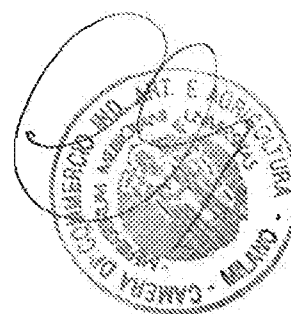
MANOSSEI
(libro)
Data di ricezione: 10/01/2007

Microscopia ottica



5' azacitidina-Controlllo

Fig. 6



MI 2006 A 00 1498

12/01/2007

[Handwritten signature]

12/01/2007

Fig. 7

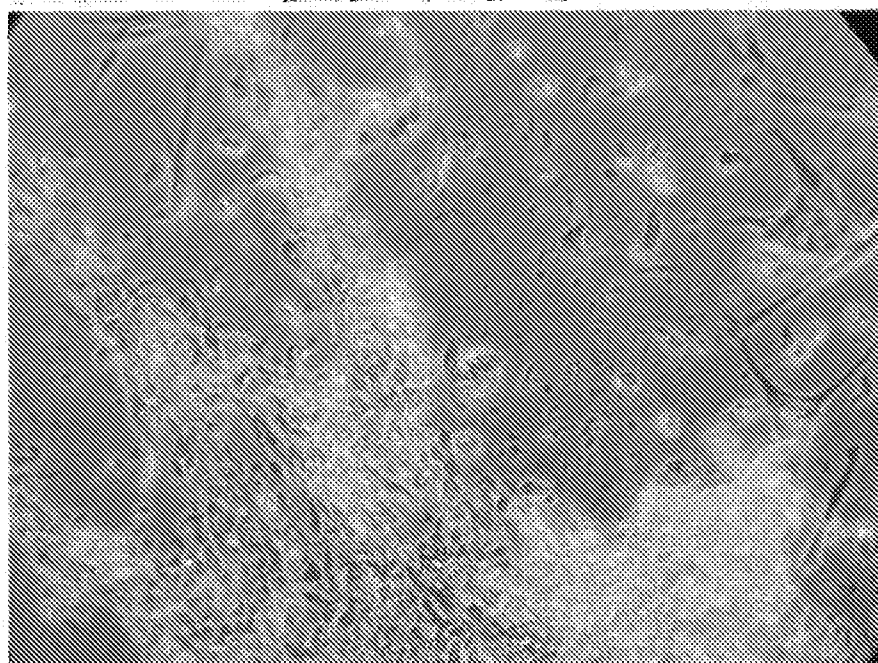


Fig. 8

