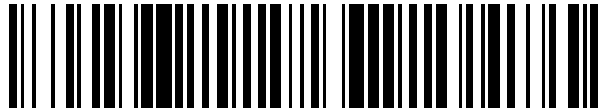


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 718**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 09722163 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2276569**

54 Título: **Kits para la recolección de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre**

30 Prioridad:

18.03.2008 IT UD20080058

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.09.2013

73 Titular/es:

**THANKSTEM S.R.L. (100.0%)
Via Manzini, 21
33100 Udine (UD), IT**

72 Inventor/es:

**POLETTINI, MARCO y
GAMBACURTA, ALESSANDRA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 718 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kits para la recolección de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un kit para la recolección de sangre, preferentemente de tipo periférico, para la producción de células madre adultas.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, el uso de células madre en terapia ha tenido una amplia aprobación debido a los éxitos obtenidos en el tratamiento de enfermedades que hasta ahora se consideraban incurables.

No obstante, los procedimientos conocidos para obtener células madre son largos, laboriosos y costosos.

10 Las células madre pluripotenciales (PSC) son una fuente disponible no solo para investigación sino también para la creación de fármacos y para trasplantes (Wagers A. J. et al., 2002; Griffith L. G. et al., 2002).

Existen células madre embrionarias y adultas: las primeras derivan de blastocistos de 8 días de edad, mientras que las adultas se pueden obtener principalmente de médula ósea, tejido adiposo o tejido muscular, sangre periférica y de cordón umbilical.

15 La definición de célula madre está en constante evolución y, en estos momentos, no hay un consenso general ni procedimiento convencional para aislarlas o identificarlas. Para todas estas células, embrionarias (ME) y adultas, se han identificado diversos marcadores genéticos, tanto hematopoyéticos (HSC) como mesenquimatosos (MSC) (Kuwana M. et al., 2003), algunos de los cuales son comunes a muchos tipos de células (Condomines M. et al., 2006; Kang W. J. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2003; Rabinovitch M. et al., 1976).

20 En la actualidad, la investigación está más orientada hacia el uso de células madre aisladas de tejido embrionario, fetos y cordón umbilical, lo cual está creando problemas legales y éticos.

Por encima de todo, hasta hoy, el uso de estas células tiene varias contraindicaciones, tales como: riesgo de infección, riesgo de rechazo en caso de trasplante y, en algunos mamíferos tales como los caballos, el desarrollo de teratomas.

25 Para superar estos problemas, en la terapia "in vivo" se conoce el uso de células madre autólogas, aisladas preferentemente de médula ósea, tejido adiposo o sangre periférica. Comenzando a partir de las células madre adultas, existe una etapa de diferenciación "in vitro" (o "ex vivo") de las células madre en la línea celular deseada por medio de factores específicos de inducción de la diferenciación, y una etapa posterior de trasplante "in vivo" de la línea celular diferenciada obtenida. En estos procedimientos, existe la desventaja de fenómenos de rechazo, ya que
30 las células diferenciadas, reintroducidas en el organismo afectado, no son reconocidas como células propias, puesto que pierden los factores de autoreconocimiento durante la etapa de diferenciación inducida in vitro.

En el ser humano, la obtención de las células madre de sangre periférica implica su purificación a través de un procedimiento denominado aféresis o leucoaféresis. Las células se extraen de la sangre, se recogen y después se inoculan en los pacientes inmediatamente después de la quimioterapia o la radioterapia.

35 En la aféresis, que dura de 6 a 8 horas, se extrae la sangre de la vena de un brazo o de una vena del cuello o pecho, y se pasa por una máquina que retira las células madre. La sangre purificada de este modo vuelve al paciente, mientras que las células obtenidas se conservan mediante refrigeración en nitrógeno líquido (Condomines M. et al., 2006; Kang W.J. et al., 2006). Esta técnica, aparte de ser dolorosa, también es extremadamente estresante para el paciente. Por encima de todo, la técnica no proporciona una discriminación real y/o purificación de las células madre en circulación. Las principales técnicas de purificación conocidas son:

- uso de factores de crecimiento o derivados de plaquetas (TGF-B, VEGF), pero los costes económicos de la extracción de estas son prohibitivas (Hou M. et al, 2006);
- aislamiento de células madre extraídas de la médula ósea, que permite purificar y, por tanto, usar para terapia aproximadamente el 15% de las células contenidas en el material extraído;
- 45 - aislamiento de células madre de tejido adiposo, que requiere una extracción quirúrgica previa de cantidades considerables de tejido del donante y no permite la administración intravenosa;
- IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1) conocido como Tendotrofina (Fiedler J. et al., 2006);
- UBM (matriz de vejiga urinaria): esta es un derivado del cerdo, que contiene citoquinas (pero no células nucleadas), que inducen cicatrización de la herida pero no la regeneración de la zona con la lesión (Zhang YS et al.,
50 2005).

Otro procedimiento conocido se describe en el artículo de Zhao Y. et al. "A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells" y en el documento WO-A-2004/043990. Este es un procedimiento para preparar células madre derivadas de monocitos, que comprende las etapas de aislar monocitos de sangre periférica, ponerlos en contacto con componente mitogénico y, posteriormente, cultivar los monocitos de sangre periférica en condiciones adecuadas para la propagación de las células.

Este procedimiento, que inicialmente requiere una etapa de aislar el monocito y, después, una etapa de expansión en un medio de cultivo, es muy largo, aproximadamente 15-20 días, para obtener un número significativo de células madre, y no permite obtener células madre pluripotenciales, es decir, no especializadas, adecuadas para inocular directamente y tras un periodo corto de tiempo en el paciente.

De nuevo en el marco de la preparación de células madre a partir de monocitos, también se conocen los documentos WO-A-2005/046570, WO-A- 2007/131200 y WO-A-03/083092. No obstante, ya que tienen que llevar a cabo una purificación preliminar de la sangre con el fin de aislar únicamente una fracción celular, es decir, los monocitos y una posterior expansión con el fin de obtener las células madre deseadas, los procedimientos descritos en estos documentos llevan mucho tiempo, de nuevo en el orden de 15-40 días, con el fin de obtener una cantidad aceptable de las células madre.

A la luz de lo anterior, existe una necesidad obvia de perfeccionar un procedimiento de expansión, o división y purificación de células madre adultas a partir de fuentes fácilmente accesibles, en particular la sangre, preferentemente sangre periférica, que también permite obtener células madre adecuadas para tratamiento farmacológico.

Asimismo, existe una obvia necesidad de comenzar la producción de células madre de sangre, preferentemente periférica, en el menor tiempo posible, para poder intervenir urgentemente en el paciente.

Por tanto, la finalidad de la presente invención es conseguir un kit para la obtención de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre pluripotenciales, para permitir un inicio rápido de la producción de células madre pluripotenciales.

El solicitante ha concebido, probado y dado forma a la presente invención para superar los inconvenientes del estado de la técnica y obtener estos y otros propósitos y ventajas.

Sumario de la invención

La presente invención se expone y caracteriza en la reivindicación independiente, mientras que las reivindicaciones adjuntas describen otras características de la invención o variantes de la idea principal de la invención.

Un procedimiento para el crecimiento y la purificación in vitro de células madre de sangre, preferentemente sangre periférica, desarrollado por los presentes inventores y descrito en la solicitud de patente internacional. El documento WO 2008/034370 (en la técnica anterior bajo el Artículo 54(3) EPC) en nombre de la presente solicitud, que se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia, permite obtener células madre pluripotenciales adultas y comprende una primera etapa que tiene dos subetapas:

a) una primera subetapas de crecimiento de las células madre de sangre periférica, después de extraer la sangre, por medio de tratamiento in Vitro con MCSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) en una concentración comprendida entre 8-15 nM, preferentemente 10 nM;

b) una segunda subetapas de purificación, preferentemente por medio de fraccionamiento en un gradiente de Ficoll.

La muestra de sangre se introduce en tubos de ensayo que contienen heparina y MCSF.

La primera subetapas de crecimiento puede tener una duración variable de acuerdo con las condiciones en las que se lleva a cabo el tratamiento in vitro, los inventores han verificado experimentalmente que una duración del tratamiento in Vitro con MCSF comprendido entre 24 y 96 horas, de forma ventajosa entre 48 y 72 horas, conduce a una estabilización del crecimiento, con identificación de los marcadores de células madre CD 90, CD 90/34, CD34 y CD117. Esta condición se considera la óptima.

La purificación de la segunda subetapas está destinada, fundamentalmente, a destruir los corpúsculos rojos.

La segunda etapa, que usa los semiproductos obtenidos en la etapa b), proporciona:

c) crecimiento de las células madre de sangre periférica, purificadas en la etapa b) por medio de tratamiento in vitro con MCSF en una concentración comprendida entre 35-55 nM, preferentemente 50 nM, más preferentemente 45 nM.

Con estas concentraciones de MCSF, las células mantienen el fenotipo de las células madre pluripotenciales adultas.

Esta segunda etapa puede tener una duración que varía entre 24 y 96 horas, preferentemente entre 48 y 72 horas.

Se ha observado que, por el contrario, el uso de MCSF a una concentración superior a 55 nM (por ejemplo 70 nM) ya tras 24 horas, las células no mantienen el fenotipo de las células madre pluripotenciales.

5 En particular, la etapa a) de división y crecimiento previo en suspensión con MCSF después de la extracción de sangre permite incrementar el porcentaje de células madre. La etapa posterior b) permite obtener células madre pluripotenciales que, una vez administradas al paciente, se diferencian directamente in vivo sin producir fenómenos de rechazo o infección.

10 La eficacia de esta producción se confirma mediante la presencia de marcadores de células madre CD90, CD90/34, CD34 y CD 117, y por el hecho de que las células madre no pierden los factores de autoreconocimiento tras la división o expansión. Dichas células madre no dan efectos colaterales, tales como fenómenos de rechazo, infección, desarrollo de teratomas, una vez administradas al paciente, y se pueden diferenciar "in vivo" y comportarse como células madre pluripotenciales.

15 Los inventores han visto que las células cultivadas de este modo mediante división o expansión, una vez inyectadas localmente o por vía intravenosa, adquieren "in vivo" (y no "in vitro", como en procedimientos conocidos en la técnica actual por medio de factores de crecimiento adecuados y/o estímulos químicos (Gulati R. et al., 2003; Katz R. L. et al., 2002; Okazaki T. et al., 2005)) todas las características morfológicas y químicas de células macrófágicas, linfocíticas, epiteliales, endoteliales, neuronales y hepáticas, de acuerdo con las necesidades y patologías de los organismos vivos tratados. El procedimiento es menos invasivo que otros procedimientos usados hasta ahora para obtener células madre, indoloro (al contrario que la aféresis) y económico.

20 Por último, la posibilidad de obtener estas células fácilmente, y, después, de ser capaces de conservarlas durante un tiempo prolongado, por ejemplo refrigeradas en nitrógeno líquido, hace de las células obtenidas con el procedimiento de acuerdo con la invención adecuadas para trasplantes autólogos y para el tratamiento de muchas enfermedades (lesiones de varios tipos, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas e inflamatorias crónicas).

25 De acuerdo con una característica de la presente invención, un kit para obtener sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre pluripotenciales de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, comprende un primer recipiente capaz de contener la sangre extraída, tal como un tubo de ensayo, que contiene un anticoagulante y la sustancia MCSF. Normalmente, el primer recipiente está hecho de vidrio.

Con el presente kit es posible obtener la sangre, preferentemente sangre periférica, para iniciar rápidamente el crecimiento y la producción de células madre por medio del procedimiento descrito anteriormente y, por tanto, hacer la producción de las mismas más rápida.

30 La principal ventaja de la presente invención es, por tanto, que obtiene una cantidad suficiente de células madre pluripotenciales en un tiempo muy limitado, incluso en únicamente 48 horas, en comparación con los procedimientos conocidos en la técnica actual, operando directamente sobre sangre entera. Por tanto, el kit para obtener sangre de acuerdo con la presente invención se propone como una solución rápida y eficaz para obtener células madre pluripotenciales directamente de la sangre, preferentemente de sangre periférica.

35 Normalmente, la concentración de MCSF en el tubo de ensayo del kit de acuerdo con la presente invención varía de aproximadamente 2 a 20 nM, preferentemente de aproximadamente 8 a 10 nM.

Normalmente, como anticoagulante se usa heparina o EDTA.

La presencia del anticoagulante es esencial para prevenir el inicio de la coagulación de la sangre, mientras que el MCSF es responsable del procedimiento de creamiento y expansión de las células madre.

40 El kit comprende uno o más recipientes, aparte del primer recipiente, tal como un tubo de ensayo. Estos últimos están hechos de, preferentemente, de al menos la pared interna de un material, por ejemplo material plástico tal como polipropileno (PP), tratada con rayos infrarrojos o gamma, que previene la adhesión de las células madre a la pared y, por tanto, su agregación, que es un estado que se ha estimado que se debe evitar.

45 Normalmente, para estos último, es un segundo recipiente para contener las células madre, obtenidas para uso intravenoso y un tercer recipiente, de tamaño diferente, para uso local.

Las células madre que se producen en dichos recipientes se pueden usar inmediatamente o se pueden conservar, en nitrógeno líquido, de modo que se puedan usar después cuando surja la necesidad.

50 De acuerdo con otra variante, dichos recipientes, tanto el usado para extraer la sangre, que contiene el anticoagulante y el MCSF, como los usados para la conservación, se pueden identificar con un número de serie, común, secuencial o generado de acuerdo con un criterio predeterminado, con el fin de facilitar la identificación dentro del laboratorio en el que se preparan las células madre y en el momento del envío.

Para una identificación inequívoca, es posible usar códigos de barras y/o marcas RFID, leer o leer/escribir, aplicado a los recipientes, en colaboración con lectores ópticos o electromagnéticos relativos.

La primera subetapas de crecimiento del procedimiento descrito anteriormente se inicia, preferentemente, inmediatamente después de obtener la muestra de sangre, de modo que la sangre no se coagule entretanto.

5 Con las palabras “inmediatamente después”, queremos decir el menor tiempo posible entre la extracción de la sangre y su coagulación, para prevenir la coagulación de la sangre e iniciar la expansión de las células madre en el menor tiempo posible tras la extracción de la sangre.

En otras palabras, “inmediatamente después” hace referencia al hecho de que el crecimiento de las células madre se inicia inmediatamente después de extraer la sangre del paciente, teniendo en cuenta que, para la presente invención, es esencial que dicho proceso de expansión se inicie antes de que la sangre se coagule.

10 De hecho, la sangre recién extraída del paciente se introduce en el tubo de ensayo con el anticoagulante y el MCSF. El anticoagulante bloquea el inicio de la coagulación, mientras que la presencia simultánea del MCSF permite el rápido inicio del proceso de expansión y garantiza la minimización de los tiempos para el inicio del tratamiento del paciente.

15 Esta definición también incluye el caso en el que se extrae del paciente la muestra de sangre, preferentemente periférica, se añade anticoagulante para bloquear la coagulación de la sangre que se somete a un proceso de conservación que no altere su capacidad para producir células madre.

Cuando es necesario, la sangre se saca del lugar en el que se ha almacenado y se somete al proceso de expansión para las células madre como se ha descrito anteriormente, es decir añadir el MCSF, obtener muy rápido la cantidad necesaria de las células madre.

20 Un procedimiento para obtener la muestra y conservar la sangre, preferentemente periférica, por tanto entra dentro del campo de la presente invención, siendo dicho procedimiento capaz de producir células madre en bancos de sangre adecuados y su posterior uso, cuando es necesario, para la producción de células madre pluripotenciales, añadiendo MCSF.

Normalmente, después de sacar la sangre de donde se almacena, se introduce en un tubo de ensayo que ya contiene el MCSF en una concentración de 2 a 20 nM, preferentemente de 8 a 10 nM.

25 Esto permite evitar el complejo y caro procedimiento de conservar células madre, que proporciona, por ejemplo, el uso de nitrógeno líquido como se ha mencionado en lo que antecede, y, en su lugar, usar solo las técnicas convencionales de conservar sangre.

Descripción detallada de una forma de realización preferente

30 Con referencia a la figura 1 adjunta, un kit 10 para obtener sangre periférica de acuerdo con la presente invención, para la producción de células madre pluripotenciales, comprende un primer tubo de ensayo 12, hecho de cristal, que contiene la sustancia MCSF 14 y, en este caso, heparina 16.

La concentración de MCSF en el tubo de ensayo 11 varía de aproximadamente 8 a 10 nM.

El kit comprende otros dos tubos de ensayo 18 y 20, hechos de material plástico tal como polipropileno (PP), tratados con rayos infrarrojos o gamma.

35 Un segundo tubo de ensayo 18 está destinado para conservar las células obtenidas para uso intravenoso y un tercer tubo de ensayo 20 para uso local.

Es importante que los tubos de ensayo 12, 18 y 20 garanticen la esterilidad de su contenido.

Todos los tubos de ensayo 12, 18 y 20 se proporcionan con un tapón respectivo 22, 24 para cerrarlos.

Los tapones 22, 24 pueden ser a presión, a rosca o de otro tipo.

40 El tapón 22 del recipiente 12 puede ser, por ejemplo, del tipo de presión.

El tapón 24 de cada uno de los tubos de ensayo 18 y 20 puede ser, por ejemplo, del tipo de rosca.

Los tamaños del segundo tubo de ensayo 18 son: Altura 115 mm, diámetro 17 mm, espesor 0,3 mm, capacidad 12 ml, mientras que los tamaños del tercer tubo de ensayo 20 son: altura 110 mm, diámetro 30 mm, espesor 0,3 mm, capacidad 40 ml.

45 Tras la expansión por medio del MCSF de acuerdo con la presente invención, las células aisladas de sangre periférica actúan “in vivo” como células madre pluripotenciales (CMP) y son adecuadas para resolverse en el curso de unos pocos meses lesiones o enfermedades incurables, o solo curables lentamente con procedimientos y/o fármacos clásicos.

Materiales y procedimientos

Obtención de muestras:

5 Cada muestra de sangre periférica, aproximadamente 0,5-7 ml, se extrajo de caballos y perros de las extremidades inferiores e inmediatamente se introdujeron en tubos de ensayo que contienen una cantidad adecuada de heparina y MCSF (10 nM).

En cada caso se pueden usar otros anticoagulantes, tales como EDTA.

En este punto se lleva a cabo la primera subetapas del tratamiento in vitro, en la que se realiza la división y el crecimiento previo de las células madre, gracias al MCSF.

Purificación:

10 Las muestras de sangre se diluyeron a 1:5 en PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene NH₄Cl (200 mM), para producir la lisis de los corpúsculos rojos, se centrifugaron a 10.000 g, se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron de nuevo a 200 g. Las células nucleadas obtenidas se incubaron durante 7-12 horas a 37 °C, preferentemente durante 10-12 horas, y se purificaron mediante fraccionamiento de un gradiente de Ficoll, después se aislaron y se lavaron tres veces con medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY).

15 Una vez purificadas, las células se incubaron otras 24 – 72 horas en presencia de 50 ng/ml de MCSF 45 nM, para obtener células con aproximadamente 95 % de las células con un fenotipo CD90 (determinado por medio de análisis citofluorométrico usando un citómetro de flujo FACScan - Becton Dickinson) y después se expandieron para obtener el número de células necesario para tratamientos locales o se centrifugaron a 10.000 g y se suspendieron en PBS a una concentración de 90x10³ células/ml para tratamientos intravenosos.

20 Inmunotinción:

Para el citofenotipado, las células se lavaron en PBS y después se fijaron sobre un portaobjetos en formaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a 20°C.

25 Para identificar las proteínas intracelulares se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,5% durante 5 minutos a 20°C y después se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios diluidos en PBS que contiene 1% de BSA (para bloquear los sitios antigénicos específicos). Tras tres lavados sucesivos, los portaobjetos se incubaron durante 45 minutos con el conjugado de anticuerpos secundarios con el fluorocromo más adecuado: FITC o tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITC) o Cy5.

Todos los anticuerpos secundarios se desarrollaron usando un burro como huésped mediante Jackson ImmunoResearch.

30 Las inmunocitoquímicas se llevaron a cabo a temperatura de 4°C y en un atmósfera saturada de humedad. Después de tres lavados, se montó el portaobjetos usando "gelvatol_PBS".

Después, se adquirieron las imágenes de fluorescencia por medio de un microscopio de fluorescencia usando un patrón interno e inmunofluorescencia directa contra gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (anticuerpos policlonales de oveja producidos por Cortex Biochem, San Leandro, CA).

35 Como controles negativos y con el fin de calibrar los niveles básicos de fluorescencia, se usaron portaobjetos incubados con anticuerpos específicos del mismo isotipo que las muestras a las que se hace referencia.

El procedimiento recién descrito se usó para identificar todos los marcadores (CD90, CD90/34, CD34 y CD 117) y los marcadores se indican en la tabla siguiente.

Tabla: Caracterización de las células tratadas con MCSF (PSC) y micropagos aislados de sangre periférica.

Antígenos de superficie	Intensidad de la fluorescencia negativa	
	PSC	Macrófagos
MAC-1	76 ± 18	84 ± 15
CD14	126 ± 29	157 ± 19
CD34	77 ± 16	15 ± 5
CD45	143 ± 26	165 ± 38
Producción de citoquinas		

ES 2 421 718 T3

IL-1	82 ± 27	83 ± 12
IL-6	43 ± 22	67 ± 14

IL10	7 ± 8	58 ± 7
TNF-	25 ± 16	67 ± 16
Indicadores funcionales		
Fagocitosis	187 ± 23	195 ± 26
Estimulación de linfocitos, Abs540	0,72 ± 0,07	0,17 ± 0,02
% de citotoxicidad	9 ± 4	72 ± 6

Está claro que se pueden realizar modificaciones y/o adiciones de partes del kit para obtención de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre como se ha descrito anteriormente en el presente documento, sin desviarse del campo y el alcance de la presente invención.

- 5 También está claro que, aunque la presente invención se ha descrito con referencia a los ejemplos específicos, un experto en la técnica podrá, ciertamente, conseguir muchas otras formas equivalentes del kit para obtención de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre, que tenga las características expuestas en las reivindicaciones y, por tanto, que estén comprendidas dentro del campo de protección definido por las mismas.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Kit para la recolección de sangre, preferentemente sangre periférica, para la producción de células madre pluripotenciales, que comprende al menos un primer recipiente (12) capaz de contener la sangre extraída, que contiene un anticoagulante y la sustancia MCSF (factor estimulante de las colonias de macrófago) y al menos un segundo recipiente (18, 20) fabricado con al menos la pared interna de un material que previene la adhesión de las células madre.
2. Kit de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho material es material de plástico, tal como polipropileno (PP) tratado con rayos infrarrojos y/o gamma.
- 10 3. Kit de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** comprende un elemento de cierre (24) para cada recipiente (18, 0).
4. Kit de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, **caracterizado porque** , la concentración de MCSF en el primer recipiente (12) está comprendida entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 20 nM.
5. Kit de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** , la concentración de MCSF en el primer recipiente (12) está comprendida entre aproximadamente 8 nM y aproximadamente 10 nM.
- 15 6. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el anticoagulante es heparina, o EDTA.
7. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende un elemento de cierre (22) para el primer recipiente (12).

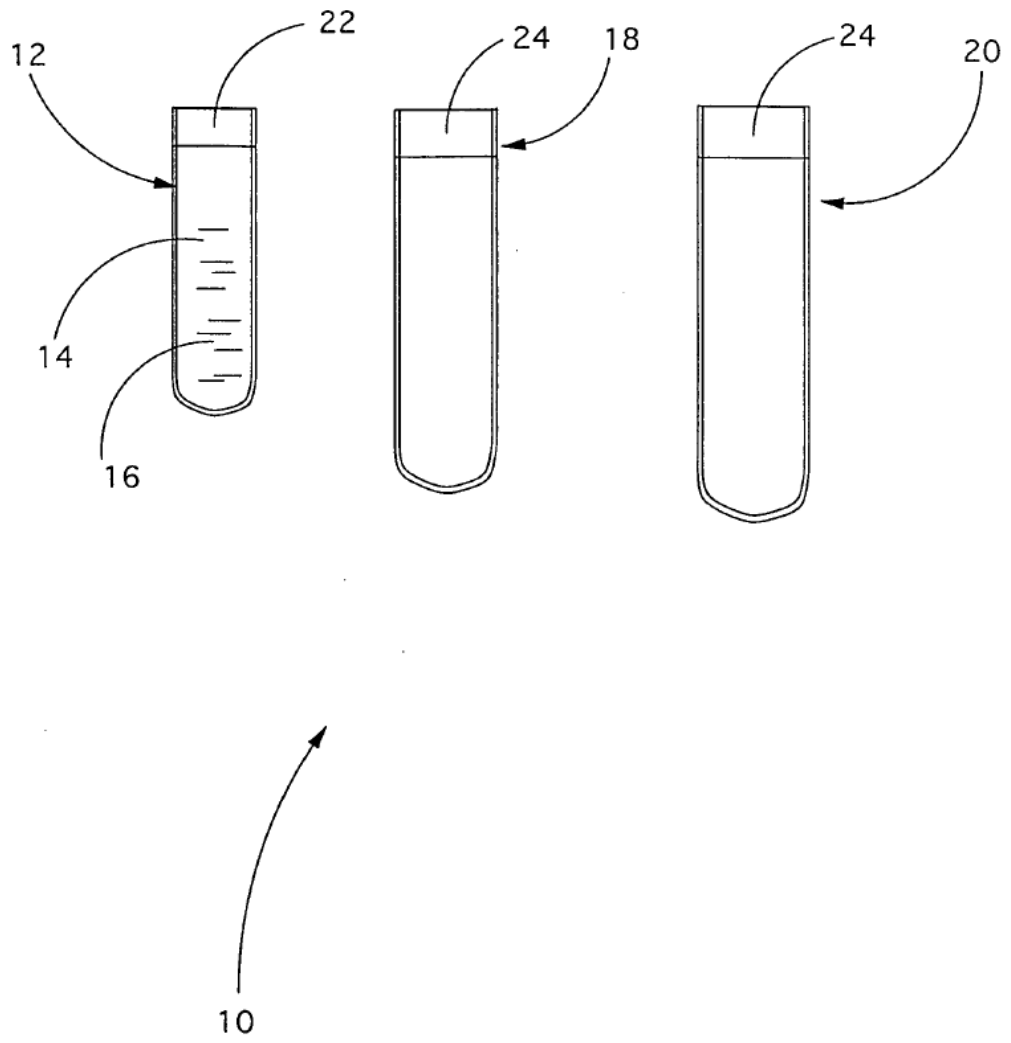


Fig. 1