



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 269**

51 Int. Cl.:
G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08802299 .1**

96 Fecha de presentación : **17.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2201361**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Detección de hemocitoblastos tumorales y células tumorales en la transición epitelio-mesenquima en fluidos corporales de pacientes de cáncer.**

30 Prioridad: **17.09.2007 EP 07018205**
09.05.2008 EP 08008770

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **ADNAGEN AG.**
Ostpassage 7
30853 Hannover-Langenhagen, DE

72 Inventor/es: **Hauch, Siegfried y**
Albert, Winfried

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 269 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

Detección de hemocitoblastos tumorales y células tumorales en la transición epitelio-mesénquima en fluidos corporales de pacientes de cáncer.

5 La biología de las células tumorales circulantes (CTC) se puede evaluar mediante diferentes procedimientos biológicos (RT-PCR, PCR en tiempo real, tecnología de micro-chip). La determinación de genes expresados en exceso que son dianas farmacéuticas (receptor de estrógenos, receptor de progesterona, EGFR, HER2) podría ser de ayuda en el contexto de estrategias personalizadas para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la determinación global de las rutas de transducción de la señal alteradas en el metabolismo de la célula cancerosa puede llevar a una mejor comprensión de la forma en la que las células tumorales son capaces de escapar al sistema inmunitario y desarrollar resistencia contra el tratamiento farmacológico. Algunos hallazgos clave en tejido tumoral primario sugieren que el potencial metastásico de un tumor se basa en la presencia de un número de células tumorales tipo hemocitoblasto que se han identificado como una fuente activa de diseminación metastásica. Se ha encontrado que los hemocitoblastos del cáncer detectados en el tejido tumoral primario son relevantes para el resultado clínico después del tratamiento. En consecuencia, se puede asumir que dichos hemocitoblastos tumorales se han diseminado desde el tumor primario hasta la circulación, y se escapan de la terapia debido a sus propiedades como hemocitoblastos hasta que alcanzan su órgano de acogida en el que actúan como semilla para la formación de una metástasis. Se ha encontrado que los hemocitoblastos cancerosos, enriquecidos desde el tumor primario, muestran una tinción positiva para el marcador CD44 de hemocitoblastos, pero negativa para el CD24. Más recientemente, también se ha encontrado que ALDH1 era un marcador específico de los hemocitoblastos cancerosos. Hay algunas pruebas de que las células tumorales circulantes podrían identificarse parcialmente como hemocitoblastos cancerosos debido a similitudes tales como una mayor resistencia a la quimioterapia y menor proliferación durante la circulación. Se ha informado de hallazgos similares para las células tumorales diseminadas en la médula ósea donde se han demostrado células tumorales con un fenotipo similar al de los hemocitoblastos. No existen resultados experimentales equivalentes para las CTC.

25 Además, junto al concepto de hemocitoblasto canceroso, se ha teorizado que las células tumorales diseminadas en la circulación pueden experimentar cambios en el fenotipo, que se conocen como transición epitelio-mesénquima (EMT). Estas células tienen menor apoptosis y resistencia a fármacos. Esto les permite viajar hasta el punto de la metástasis y evita que se vean afectadas por los tratamientos convencionales. Se sabe que las EMT se producen en desarrollos embrionarios en los que las células epiteliales deben escaparse de las restricciones estructurales impuestas por la arquitectura del tejido. Esto lo consiguen adoptando un fenotipo más adecuado al movimiento de la célula. La progresión de los carcinomas a enfermedad invasiva y metastásica muestra una importante similitud con este proceso. Las células tumorales epiteliales anteriores que se podían convertir al fenotipo mesenquimal podían, de este modo, escaparse del tejido tumoral primario y desarrollar resistencia contra las pautas terapéuticas convencionales, como el tratamiento antihormonal, ya que pierden las dianas terapéuticas relevantes durante dicha transformación (hallazgo de los inventores). Por otra parte, también sería posible que la expresión de dianas terapéuticas potenciales, como el receptor Her2, pudiera inducirse en dichas células, incluso si se encontrara que el tumor primario era negativo para dichas dianas.

40 Debido a que dicho acto de metastatización necesita la diseminación de hemocitoblastos tumorales o células tumorales que presenten EMT, la detección y caracterización de CTC que muestren un metabolismo tipo EMT o hemocitoblasto podría ser una potente herramienta diagnóstica para la determinación temprana de fracaso terapéutico o el riesgo potencial de resistencia a una intervención terapéutica dada. Hay muchos marcadores moleculares que son útiles para determinar células con un carácter potencial de hemocitoblasto, o de esas células que se encuentran en EMT (Tabla 1).

Tabla 1: Ejemplos de marcadores para detectar y caracterizar células en EMT y hemocitoblastos tumorales.

| Marcadores relevantes para caracterizar células en EMT | Marcadores relevantes para caracterizar el fenotipo de hemocitoblasto |
|--|---|
| Integrina alfa V beta 6 | FGF2 |
| N-caderina | BMI1 |
| Vimentina | ALDH1 |
| Fibronectina | CD44 |
| Snail1, Snail2 | CD24 |

(continuación)

| Marcadores relevantes para caracterizar células en EMT | Marcadores relevantes para caracterizar el fenotipo de hemocitoblasto |
|--|---|
| Twist1 | KRT19 |
| Goosecoide | Twist1 |
| FOXC2 | BRCA1 |
| SOX 10 | PTEN |
| MMP-2, MMP3, MMP9 | MSI1 |
| Beta catenina | CD34 |
| SMAD | NOTCH |
| NK kappa-beta | Jagged1 |
| Akt2 | |
| PI3K alfa | |
| c-kit | |
| CD133 | |
| VEGF | |
| NOTCH | |
| E-caderina | |
| Ciclina D | |
| TGF β | |
| Mesotelina | |
| SIP1 | |

5 Hasta la fecha, no se ha podido demostrar si la detección de hemocitoblastos que muestren propiedades de CTC o de EMT es un marcador pronóstico o predictivo debido a su potencial tumorigénico. Aunque se han publicado experimentos de perfilado de expresión sobre las CTC, no hay datos disponibles que permitan caracterizar las células o hemocitoblastos tumorales en circulación en EMT tras enriquecimiento inmunomagnético de células CTC tras enriquecimiento a partir de sangre con la especificidad requerida. Esto se ha demostrado como un importante desafío ya que la detección y caracterización de este tipo de células en la sangre se complica por el hecho que los marcadores moleculares útiles para dicho objetivo también se expresan en linfocitos B activados y en otras células mononucleares. Un enriquecimiento en CTC mediante, por ejemplo, estrategias inmunomagnéticas solo es posible si los marcadores escogidos a ese fin son más bien específicos de tumores y muestran un nivel bajo de expresión ilegítima en células mononucleares de la sangre.

10 Sin embargo los genes, necesarios para la detección de los hemocitoblastos tumorales o células en EMT, se encuentran ampliamente expresados en células mononucleares de la sangre no tumorales. El atrapamiento no específico de dichas células conduce a un elevado fondo no específico que evita la detección de marcadores en hemocitoblastos CTC/células en EMT.

15 Es por tanto el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de aislamiento, enriquecimiento y/o detección en fase sólida para aislar, enriquecer y/o detectar hemocitoblastos tumorales y/o células tumorales, en el que dichas células tumorales se encuentran en la transición epitelio-mesénquima, así como usos para el mismo.

20 Este objeto se resuelve mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y los usos de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 12. Otras mejoras del procedimiento inventivo se proporcionan en las correspondientes

reivindicaciones dependientes.

La presente invención utiliza un aditivo recientemente desarrollado, en concreto para un tampón de lavado (documento EP 07 018 205.0 de Adnagen AG, Langenhagen), para permitir la eliminación de células contaminantes no diana en el enriquecimiento de CTC y, de este modo, aumentar de forma sustancial la pureza de las CTC enriquecidas. El tampón de lavado de la presente invención contiene un poliol, usado en particular antes, durante y/o después de poner en contacto la muestra con una superficie sólida para la separación de las células deseadas de la muestra. El poliol debe comprender o consistir en al menos uno entre el grupo que comprende sorbitol, sacarosa, trehalosa, manitol, fructosa, maltitosa, lactitol, xilitol y glicerol en una cantidad (V/V o P/V) de al menos un 1%, preferiblemente de al menos un 10%, preferiblemente de al menos un 20% preferiblemente de al menos un 30%, preferiblemente de al menos un 50%, preferiblemente de al menos un 60% en la disolución tampón.

De forma sorprendente, se ha encontrado que el enriquecimiento inmunomagnético de CTC combinado con dicho poliol, en particular como componente de un tampón de lavado, permite la detección de marcadores de células en EMT en una pequeña cantidad (5 células) de células de cáncer de ovario cultivadas diseminadas en 5 ml de muestras de sangre procedentes de un donante sano. Adicionalmente, las CTC con propiedades de hemocitoblasto tumoral así como las células que expresan marcadores EMT se pueden detectar específicamente en sangre de pacientes con cáncer metastásico. De forma aún más sorprendente, se ha encontrado que los pacientes con CTC que muestran hemocitoblastos detectables y marcadores EMT, son resistentes a la terapia y tienen una supervivencia global reducida en comparación a pacientes que no expresan o expresan un exceso de dichos marcadores.

La selección o enriquecimiento de células tumorales procedentes de la muestra y la detección de las células deseadas puede realizarse de acuerdo con el procedimiento descrito en el EP 02 732 726.1 presentado por Adnagen AG, Langenhagen, Alemania. La memoria descriptiva del documento EP 02 732 726.1 así como la memoria descriptiva del documento EP 07 018 205.0 se incorporan a esta solicitud por referencia. Como alternativa, la selección, enriquecimiento y/o detección se puede realizar con otros procedimientos de acuerdo con la reivindicación 1, por ejemplo utilizando el kit Cell Search™ de Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA, EE.UU.

Se describen en lo siguiente algunos ejemplos de la presente invención.

En el presente documento,

la fig. 1 muestra una introducción esquemática de la preparación y análisis de la muestra;

la fig. 2 muestra la detección de los marcadores EMT en 5 ml de una muestra de sangre sembrada con células 5 IGROV;

la fig. 3 muestra la influencia de diferentes polioles en el tampón de lavado sobre el fondo de leucocitos;

la fig. 4 muestra el efecto de los polioles sobre el fondo de leucocitos para el aislamiento de hemocitoblastos tumorales y células en EMT y posterior detección de la expresión de los marcadores relevantes;

la fig. 5 muestra la expresión de marcadores EMT y de hemocitoblastos tumorales en muestras de pacientes en relación con la presencia de CTC; y

la fig. 6 muestra la expresión de marcadores EMT y de células tumoral en pacientes en relación con la respuesta a la terapia (PD: dolencia progresiva; PR: remisión parcial/sin cambio)

Procedimiento a modo de ejemplo para enriquecer y detectar CTC (véase la Fig. 1)

El enriquecimiento inmunomagnético de células tumorales mediante antígenos asociados a células epiteliales y tumorales se llevó a cabo mediante el kit de ensayo *AdnaTest BreastCancerSelect* (Adnagen AG, Langenhagen, Alemania) comprendiendo tres anticuerpos diferentes con unión específica a antígenos EMA (antígeno de la membrana epitelial, MUC-1 y EpCAM (antígeno epitelial humano).

Estos anticuerpos contra los antígenos asociados a células epiteliales y tumorales se conjugaron con perlas magnéticas (Dynabeads) para la unión con las células tumorales en la sangre periférica. Las células unidas a las perlas magnéticas se recuperaron en un concentrador de partículas magnéticas, se lavaron varias veces en PBS o en una composición tampón de acuerdo con la presente invención.

Se llevaron a cabo etapas de lavado para eliminar células mononucleares y eritrocitos de la sangre con un tampón de lavado constituido por glicerol al 10-50% (V/V) y manitol al 1-10% (P/V) en tampón PBS(solución salina tamponada con fosfato): 9 g de NaCl, 0,23 g de Na₂HPO₄, 1,15 g de Na₂HPO₄ por l de agua; pH 7,2-7,4); glicerol al

23% (V/V); manitol al 5% (W/V).

Para verificación; se llevó a cabo la evaluación de marcadores de hemocitoblastos tumorales o de marcadores de células tumorales en EMT mediante el kit *AdnaTest BreastCancerSelect* (Adnagen AG, Langenhagen, Alemania). De este modo, las células enriquecidas se lisaron para análisis posterior mediante el ensayo RT-PCR con el kit de ensayo *AdnaTest BreastCancerSelect* (Adnagen AG, Langenhagen, Alemania) que contenía cebadores para la amplificación de las secciones de las secuencias de ADN correspondientes a Ga733-2, MUC1 y Her2. El ADNc obtenido con el kit *AdnaTest BreastCancerSelect* se ensayó mediante PCR para determinar la presencia de CTC (o células tumorales dispersas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y, adicionalmente, de la expresión de Twist, Akt2, PI3KCA (multiplex) y ALDH1 (singleplex) para la evaluación de marcadores de relacionados con EMT y hemocitoblastos tumorales. Con este fin, el ADNc se amplificó con HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Alemania) usando cebadores multiplex. Las condiciones de la PCR se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la PCR

| Configuración de la PCR para EMT | Condiciones de la PCR |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 12,5 µl de mezcla HotStarTaq | Templado a 60°C (30 s) |
| 6,125 µl de agua | Alargamiento a 72°C (45 s) |
| 4 µl de ADNc | Desnaturalización a 94°C (30 s) |
| Cebador Aktin (0,1 µM) | Número de ciclos: 36 |
| Cebador PI3Kα (0,1 µM) | |
| Cebador Akt2 (0,25 µM) | |
| Cebador Twist (0,25 µM) | |

Ejemplo 1:

La especificidad y recuperación de la prueba (véase la Fig. 2) se evaluaron mediante la detección de células diana (0 o 5 células IGROV-1 (línea celular de cáncer de células ovario, humano; consultar Cancer Res 1985; 45; 4970-4979; PMID 3861241; diseminadas en 5 ml de sangre de donante sano) con el kit *AdnaTest BreastCancerDetect*.

Tres genes asociados con células en EMT (multiplex: Twist, Akt2, PI3KCA) y el gen ALDH1 relacionados el hemocitoblasto tumoral se analizaron mediante PCR en configuración multiplex. La identificación de los marcadores de las células en EMT y/o la identificación de los marcadores de hemocitoblastos tumorales se consideró como positiva si al menos se detectó un marcador en la muestra. Se utilizaron como control muestras de donante sano sin células tumorales diseminadas para determinar la especificidad.

Aplicando un valor de corte de una concentración de amplicón de 0,2 ng/µl, ninguna de 10 muestras HD dio positivo para ninguno de los transcritos analizados, pero las 5 células IGROV diseminadas se detectaron como positivas en 9 de las 10 muestras dando como resultado una recuperación del 90%.

Ejemplo 2:

Se analizaron tres marcadores relacionados con propiedades de EMT (Twist, Akt2, PI3KCA) en CTC obtenidas a partir de pacientes con cáncer de mama metastásico previamente confirmados mediante el kit *AdnaTest BreastCancerSelect* y el kit *AdnaTest Breast- CancerDetect* como CTC positivas (consultar la tabla 3). Puede demostrarse claramente que al menos uno o más de los marcadores fueron detectable en 8 de las 12 pacientes CTC positivas (66%) pero solo en el 12,5 % de las pacientes CTC negativas, indicando una relación de la expresión del marcador de EMT respecto a la presencia de CTC. Este análisis indica además que una cantidad sustancial de las CTC encontradas en la sangre de las pacientes con cáncer mostraron propiedades de EMT. Esto lleva a la conclusión de que la células CTC que expresan marcadores de EMT son una indicación de poblaciones de células resistentes a la terapia y, por tanto, de un pronóstico inferior.

Tabla 3. La detección de marcadores EMT se restringe a muestras CTC(+).

| Estado CTC | EMT(+) | EMT(-) | Total |
|------------|--------|--------|-------|
| (+) | 8 | 4 | 12 |
| (-) | 2 | 14 | 16 |

Ejemplo 3:

Un marcador relacionado con las propiedades de hemocitoblasto tumoral (ALDFI1) se analizó en CTC obtenidas a

partir de pacientes con cáncer de mama metastásico previamente confirmados mediante el kit *AdnaTest BreastCancerSelect* y el kit *AdnaTest Breast- CancerDetect* como CTC positivas (CTC(+)). Puede demostrarse que la expresión de ALDH1 estuvo presente en 5 de las 9 pacientes CTC positivas (55%) pero solo en el 20% de las pacientes CTC negativas indicando una relación específica entre la expresión del marcador del hemocitoblasto tumoral con la presencia de CTC (consultar la tabla 4). Como en el ejemplo 2, se puede concluir que una cantidad sustancial de las CTC procedentes de la sangre de las pacientes con cáncer mostraron propiedades de hemocitoblasto tumoral y es un indicador del potencial metastásico.

Tabla 4. La detección de ALDH1 se restringe a muestras CTC(+).

| Estado CTC | ALDH1+ | ALDH1- | Total |
|------------|--------|--------|-------|
| (+) | 5 | 4 | 9 |
| (-) | 2 | 8 | 10 |

10 Ejemplo 4:

Se determinó la influencia de diferentes polioles en el tampón de lavado sobre el fondo de leucocitos utilizando sorbitol, fructosa y glicerol como ejemplos de polioles (consultar la fig. 3).

Se procesaron muestras de sangre de 5 ml obtenidas de donantes sanos con *AdnaTestBreastCancer Select* seguido por RT-PCR sobre CD45. Las etapas de lavado se realizaron con tampón PBS que contenía uno de dichos tres polioles (sorbitol (P/V), fructosa (P/V), glicerol (V/V)) a una concentración del 10 %. El tampón PBS sin aditivos se utilice como control y para un lavado final adicional de cada muestra antes de la lisis celular y la RT-PCR. Como se muestra en la fig. 3, todos los polioles ocasionaron una reducción en las CD45. Sorbitol y fructosa produjeron aproximadamente un 15 % de reducción y el glicerol aproximadamente 35 % de reducción sobre el fondo de leucocitos.

20 Obviamente, como se muestra con estos tres polioles seleccionados arbitrariamente, todos los polioles son adecuados para la presente invención.

Ejemplo 5

La detección de células en EMT y de marcadores de células tumorales se ve impedida por las elevadas señales de fondo producidas por leucocitos contaminantes.

25 Para determinar el efecto del tampón *AdnaWash*, que contiene los polioles glicerol (23% V/V) y manitol (5% P/V) en PBS, se procesaron muestras de donantes sanos con los reactivos *AdnaTest BreastCancerSelect* de acuerdo con las instrucciones y sin adición de dicho tampón. El ADNc obtenido a partir de dichas muestras fue analizado mediante PCR para determinar los marcadores de células en EMT PI3KCA y Akt2 así como para el marcador de ALDH1 del hemocitoblasto tumoral.

30 La fig. 4 muestra que los polioles disminuyen las señales de los leucocitos que interfieren con el análisis de los marcadores de células en EMT (Akt2, PI3KCA, SIP1) y de los hemocitoblastos tumorales (BMI1, ALDH1) debido a la retirada de los leucocitos atrapados que se confirmó por la disminución en la señal de la actina.

35 Mediante este ejemplo se demuestra que los leucocitos atrapados expresan marcadores de células en EMT y de los hemocitoblastos tumorales y producen señales de fondo fuertes e inaceptables. Estas señales pueden reducirse eficazmente con un tampón de lavado que contiene poliol lo que permite un análisis específico de estos marcadores en las CTC. Sin embargo, no se reduce la recuperación de las CTC.

Ejemplo 6

40 Células tumorales circulantes como indicador de mal pronóstico y fracaso de la terapia expresan en exceso marcadores de células en EMT y de hemocitoblastos, cuando se comparan muestras de pacientes con cáncer de mama metastásico CTC positivas y CTC negativas.

Las muestras se procesaron con los reactivos *AdnaTest BreastCancerSelect* de acuerdo con las instrucciones, pero usando *AdnaWash* como tampón de lavado. El ADNc obtenido a partir de dichas muestras fue analizado mediante PCR para determinar los marcadores de células en EMT Twist, Akt2, PI3KCA así como para los marcadores del hemocitoblasto tumoral ALDH1 y BMI1.

45 Como se muestra en la fig. 5, los marcadores de células en EMT y de hemocitoblastos tumorales se expresan más frecuentemente en muestras CTC(+) que son indicadores de resistencia a la terapia y mal pronóstico en el cáncer

de mama metastásico que las muestras CTC(-).

5 Como los marcadores de células en EMT y de hemocitoblastos tumorales se correlacionan con los positivos en CTC, pueden considerarse como potencialmente terapéuticos o pronósticos ya que están asociados con un pronóstico inferior y una fuente de metástasis. Estos marcadores expresados en exceso pueden servir como marcadores derivados para clasificar pacientes para terapias personalizadas.

Ejemplo 7

10 El marcador de células en EMT Twist y los marcadores de hemocitoblastos tumorales ALDH1 y BMI1 se analizaron en pacientes con cáncer de mama metastásico y se correlacionaron con la respuesta a la terapia. Las muestras se procesaron con los reactivos *AdnaTest BreastCancerSelect* de acuerdo con las instrucciones, pero usando *AdnaWash* como tampón de lavado. El ADNc obtenido a partir de dichas muestras fue analizado mediante PCR para determinar los marcadores de células en EMT Twist, así como para los marcadores del hemocitoblasto tumoral ALDH1 y BMI1.

15 Como se muestra en la fig. 6, Twist, ALDH1 y BMI1 se expresan en muestras obtenidas con el *AdnaTest Breast-CancerSelect* seguido por RT-PCR. Se puede demostrar que las pacientes que no responden a una terapia dada expresan en exceso los marcadores investigados más frecuentemente que las que responden a la terapia (PD="dolencia progresiva"; PR="remisión parcial o bien detención del progreso").

20 Como los marcadores de células en EMT y de hemocitoblastos Twist, ALDH1 y BMI1 se expresan principalmente en las CTC, se correlacionan adicionalmente con fracasos en la terapia del cáncer de mama metastásico si se analiza con el procedimiento utilizado en la presente invención. Los marcadores de células en EMT y de hemocitoblastos tumorales pueden, por tanto, considerarse un marcador derivado de la respuesta a la terapia, pero también como una diana terapéutica para evaluar las CTC con el fenotipo cambiado como fuentes de formación metastásica..

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Procedimiento en fase sólida para aislamiento, enriquecimiento y/o detección para aislar, enriquecer y/o detectar hemocitoblastos tumorales y/o células tumorales en transición epitelio-mesénquima como células predeterminadas procedentes de una muestra de fluido corporal que contiene dichas células predeterminadas para al menos uno del grupo que comprende estadificación, pronóstico y guía terapéutica.
- comprendiendo dicho procedimiento una etapa de selección para la selección o enriquecimiento de dichas células predeterminadas procedentes de la muestra en el que la muestra se pone en contacto con una superficie sólida para la unión preferente de dichas células predeterminadas a la superficie sólida y posteriormente la muestra se retira de la superficie sólida en una etapa de lavado,
- 10 **caracterizado porque,**
- 15 en dicha etapa de selección para la selección o enriquecimiento preferente en células tumorales, la muestra contiene un poliol durante al menos uno de entre poner en contacto la muestra con la superficie sólida y la etapa de lavado y en una etapa de detección que detecta en dichas células, que preferentemente se han seleccionado o enriquecido mediante dicha etapa de selección, la presencia o ausencia de expresión de al menos un marcador asociado con al menos uno del grupo que comprende hemocitoblastos tumorales y células tumorales en transición epitelio-mesénquima.
- 2.** Procedimiento de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado porque** la etapa de selección comprende una selección inmunológica dirigida a la selección o enriquecimiento preferente en células tumorales.
- 20 **3.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** antes, durante o después de poner en contacto la muestra con la superficie sólida, se añade un poliol a la muestra o fase sólida, en particular como un componente de un tampón de lavado.
- 4.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el poliol se añade a la muestra o fase sólida o está presente en la muestra en una concentración final (V/V o p/V) de al menos 1 %, preferiblemente de al menos un 10 %, preferiblemente de al menos un 20 %, preferiblemente de al menos un 30 %, 25 preferiblemente de al menos un 50 %, preferiblemente de al menos un 60 % de poliol.
- 5.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho poliol comprende o es al menos uno del grupo de polioles que comprende sorbitol, sacarosa, trehalosa, manitol, fructosa, maltitosa, lactitol, xilitol y glicerol.
- 30 **6.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la superficie sólida es al menos una del grupo que comprende una superficie de gel, una superficie de sefarosa, una superficie de vidrio, una superficie de látex, una superficie cerámica, una superficie metálica y una superficie de plástico.
- 7.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la superficie sólida es la superficie de perlas magnéticas.
- 35 **8.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se inmovilizan ligandos o anticuerpos sobre la superficie sólida, que son capaces de unirse específicamente a las células predeterminadas.
- 9.** Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho fluido corporal es al menos uno del grupo que comprende sangre periférica, médula ósea, orina, ascites, esputo y similares procedentes de un paciente.
- 40 **10.** Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para aislar, enriquecer y/o detectar células predeterminadas contenidas en una muestra.
- 11.** Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para estadificación y/o pronóstico y/o guía en la terapia de tumores.
- 45 **12.** Uso de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 para ayudar a desarrollar fármacos nuevos contra células tumorales tipo hemocitoblasto y/o células tumorales en EMT y/o ayudar a definir nuevos fármacos dirigidos a terapias.

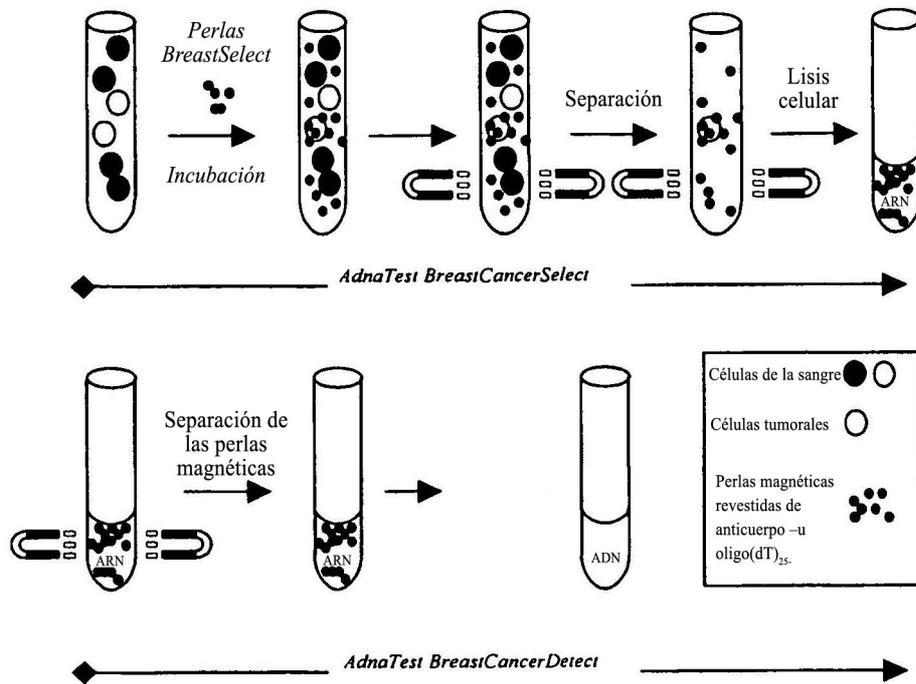


Fig. 1

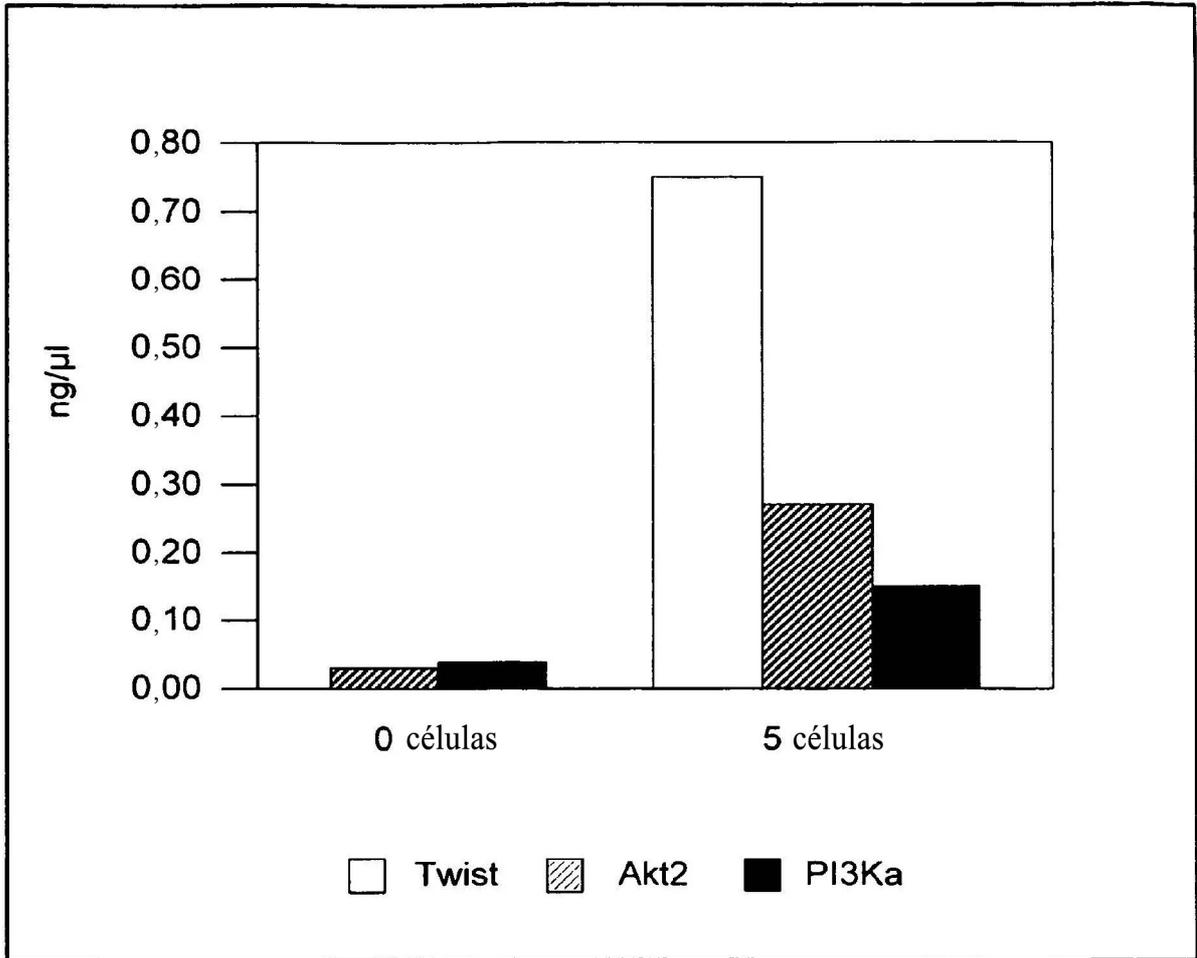


Fig. 2

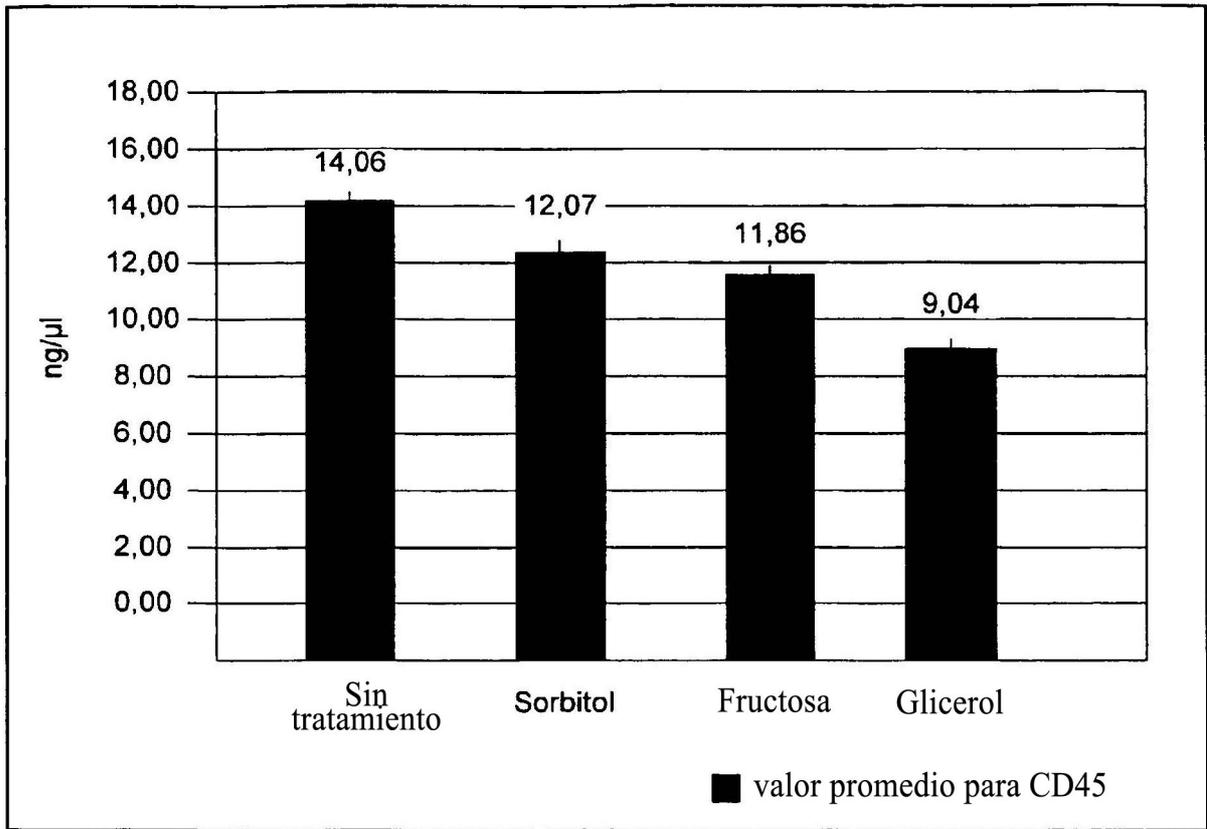


Fig. 3

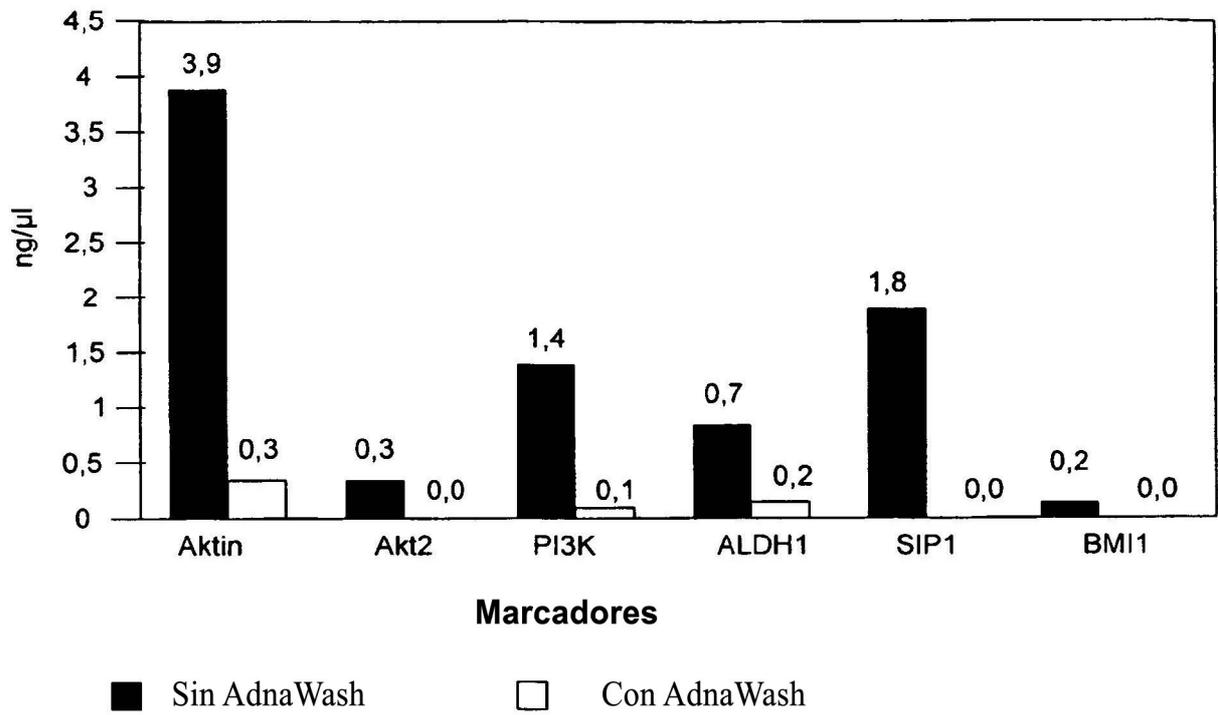


Fig. 4

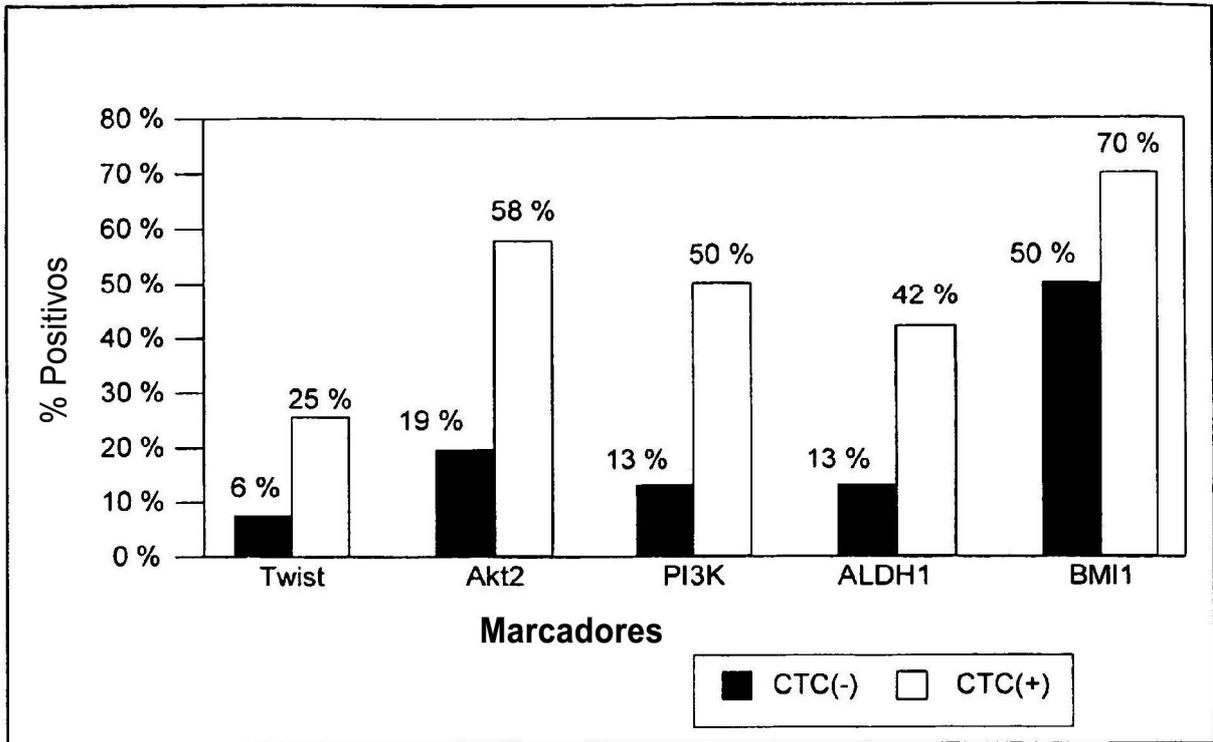


Fig. 5

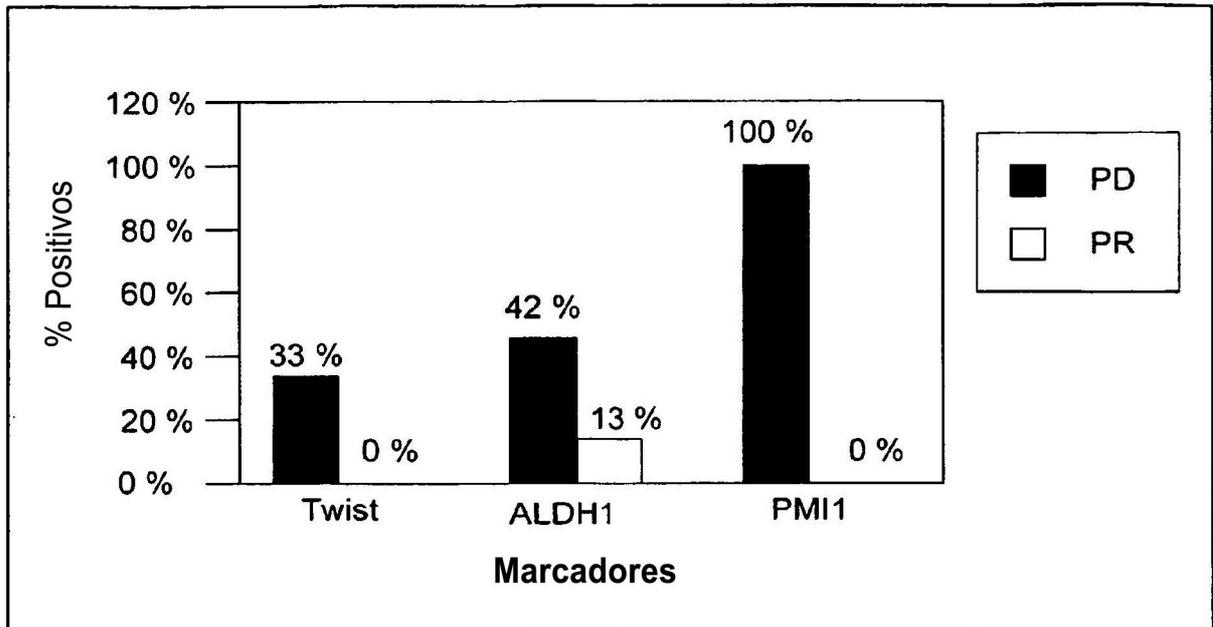


Fig. 6