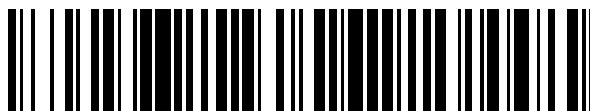


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 478**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08802298 .3**
96 Fecha de presentación: **17.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2198287**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO Y/O AISLAMIENTO DE CÉLULAS EN FASE SÓLIDA.**

30 Prioridad:
17.09.2007 EP 07018205
09.05.2008 EP 08008770

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

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 2 374 478 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

Procedimiento de enriquecimiento y/o aislamiento de células en fase sólida

5 La presente invención se refiere a un procedimiento en fase sólida para asilar y/o enriquecer células predeterminadas de una muestra. Dichos procedimientos se utilizan por ejemplo para predeterminar, asilar y enriquecer células como células fetales de una muestra de sangre periférica materna; células tumorales de una muestra de fluido corporal o células madre de una muestra fluida o fluidizada de tejido corporal o fluido corporal.

10 La detección y análisis de células raras en sangre, médula ósea y otras muestras se vuelve una necesidad importante en los diagnósticos: La detección de células tumorales circulantes, incluyendo células madre tumorales y células madre en transición epitelio-mesénquima (EMT), y cáncer residual mínimo es particularmente útil en oncología para el pronóstico mejorado, detección temprana del avance de la enfermedad y monitoreo de terapia. Otras solicitud de dichas técnicas es la detección y análisis de células fetales en la sangre materna que permite el diagnóstico prenatal efectivo y no invasivo de anomalías genéticas y cromosómicas en los estadios tempranos de desarrollo fetal.

15 El análisis de ADN en base a PCR o el perfil de expresión en base a RT-PCR son tecnologías sensible y fáciles de manipular para la detección y análisis de dichas células raras. Sin embargo, estas tecnologías son afectadas por el hecho, que los leucocitos contaminantes como fuente de señales de fondo específicas debido a la expresión ilegítima o expresión endógena de antígenos asociados al tumor, están reduciendo la especificidad de la detección de las células raras: por ejemplo células tumorales circulante. En forma similar, la genotipificación de ADN no es posible si las células tumorales asiladas o fetales no son suficientemente puras.

20 El enriquecimiento de células de muestras corporales es una tarea importante en muchas aplicaciones terapéuticas, también, además de las aplicaciones diagnósticas, ya que los anticuerpos monoclonales (u otros ligandos y especificadores) están disponibles ahora, que permiten la separación de muchos tipos de células particulares de fuentes con poblaciones celulares mixtas tales como sangre, médula ósea y otros tejidos. Las terapias en base a células son un campo en crecimiento que coloca las demandas graves en la selectividad de cualquier técnica de aislamiento celular que sea útil para ese propósito. La ingeniería de injerto de células madre y la inmunoterapia de cáncer son una de las aplicaciones más importantes en la terapia celular. Pueden utilizarse células madre autólogas enriquecidas de sangre o médula ósea para soportar los regímenes de quimioterapia de altas dosis para una variedad de tumores malignos.

Existe una gran demanda de una alta pureza de células aisladas con tecnologías de enriquecimiento celular.

30 La utilidad de los productos de células madre enriquecidas es deteriorada por células malignas contaminantes que podrían ser una fuente de metástasis y recaídas tardías. Una contaminación con células T es la principal causa de una enfermedad de injerto contra huésped y es la razón primaria de falla de trasplante. De ese modo, una mejora de la eficacia de las tecnologías de enriquecimiento celular terapéutico existentes es un tema principal que debe ser tratado en forma urgente.

35 Existen diversas técnicas disponibles para el enriquecimiento de células de sangre y otras muestras. La selección celular mediante tecnología FACS es un procedimiento muy específico que puede aplicarse para enumerar y recolectar células raras para el uso adicional y análisis. Sin embargo, este procedimiento no es aplicable aún en forma rutinaria a las muestras o grandes volúmenes de sangre completa y para preparaciones celulares a gran escala. Se han desarrollado diversos procedimientos inmunquímicos para el enriquecimiento de células de muestras de fluido mediante la utilización de adsorción en fase sólida como por ejemplo mediante inmunocaptura. Los anticuerpos monoclonales (u otros ligandos adecuados como, por ejemplo, aptámeros u otros especificadores) pueden inmovilizarse en superficies sólidas como sefarsa, vidrio, látex o cuentas de plástico u otras superficies para aplicaciones por lote o columnas de flujo pasante. Aunque el manipuleo de estos dispositivos es relativamente conveniente, la recuperación y pureza obtenidas con dichos dispositivos es insuficiente en muchos casos. El uso de cuentas magnéticas etiquetadas con anticuerpos se volvió bastante eficiente, demostrando buenos índices de recuperación y un índice de enriquecimiento de 4-5 \log_{10} . No obstante, esta pureza aún es demasiado baja para el perfil de expresión, especialmente si el marcador molecular de interés no está sobreexpresado en las células diana en comparación con las células nucleadas potencialmente contaminantes como leucocitos o células madre eritropoyéticas. Además, los experimentos de tipificación genética a base de ADN para diferenciar células maternas de células fetales o células normales de células tumorales, en general, no son posibles en dichas muestras. Por ello, incrementar la eficacia o purificación celular con dispositivos inmunquímicos en fase sólida o dispositivos similares es una necesidad urgente, no sólo para aplicaciones diagnósticas, sino también para aplicaciones terapéuticas.

Existen varias razones para la unión no específica o captura de células no deseadas durante el enriquecimiento celular:

55 1. Aunque los anticuerpos monoclonales (u otros ligandos y especificadores seleccionados) deben exhibir una alta especificidad hacia el antígeno (o receptor) elegido para la separación celular, aún debe haber unión no específica considerable a estructuras de receptores o antígenos similares.

2. Otra razón para capturar células no deseadas pueden ser las interacciones física (interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o simplemente captura mecánica) con o sin la estructura de fase sólida /anticuerpo (ligando o especificador).

5 3. Los antígenos o receptores diana elegidos para el enriquecimiento celular también podrían estar expresados en algunas células no diana presentes en la muestra (por ejemplo, a través de la expresión ilegítima o endógena)

10 Con el fin de mejorar el desempeño de los procedimientos de enriquecimiento actuales, estos procedimientos podrían adaptarse para obtener mejor especificidad mediante la selección de un anticuerpo, ligando o especificador más específico hacia la diana de superficie celular elegida (véase los puntos 1 y 2 más arriba) mientras que el remanente no específico de células no diana no puede impedirse fácilmente (véase el punto 3 más arriba). Elegir cuentas magnéticas como vehículos para anticuerpos, ligandos o receptores en vez de columnas de flujo pasante rellenas con cuentas o elegir cuentas de poliestireno en vez de sefaroza son ejemplos de mejoras posibles. Sin embargo, la mayoría de los intentos de mejoras técnicas no llevaron a las puridades requeridas en muchos casos, y aún existe una necesidad urgente de otra reducción de la cantidad de células no diana capturadas o unidas en forma no específica, preferentemente mediante el ajuste de las condiciones de unión que evitan las interacciones físicas.

15 Demel et al. (J. Exp. Clin. Cancer Res., 23(3): 465-468, 2004) emplea una mezcla lista para usar de anticuerpos unidos a cuentas inmunomagnéticas ("AdnaTestBreastCancerSelect" por AdnaGen) para la purificación de células tumorales de una muestra sanguínea. Las cuentas se lavaron dos veces con PBS y finalmente con tampón de lavado/lisado de (DynaL, Noruega). Se concluye que los ensayos relevantes para células tumorales en sangre se necesitan en forma urgente para superar los problemas de especificidad ya que las consecuencias diagnósticas y aún terapéuticas dependen de ensayos confiables.

20 Zieglschmid et al. (Anticancer Res., 25: 1803-1810, 2005) emplea cuentas inmunomagnéticas acopladas a cinco diferentes anticuerpos monoclonales para el enriquecimiento de células tumorales de una muestra sanguínea. Las cuentas se lavaron con PBS y después se lavaron con tampón de lavado en conformidad con el protocolo de Dynal (Noruega).

25 Es objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado de aislamiento y/o enriquecimiento en base a tecnología en fase sólida, que elimine exitosamente o reduzca células no diana capturadas o unidas en forma no específica durante la captura en fase sólida.

30 Este objeto se soluciona mediante el procedimiento aislamiento en fase sólida y/o enriquecimiento utilizando ligandos, receptores, antígenos o anticuerpos inmovilizados en una superficie sólida en conformidad con la reivindicación 1. Las mejoras del procedimiento inventivo se proporcionan en las reivindicaciones 2 a 7. Además, las reivindicaciones 8 a 13 proporcionan los usos del procedimiento de aislamiento en fase sólida y/o enriquecimiento en conformidad con la invención.

35 La presente invención permite, por primera vez, en uso de procedimientos de captura de ligandos o inmunocaptura en fase sólida para aplicaciones importantes, por ejemplo perfil de expresión de genotipos, que requieren poblaciones celulares purificadas obtenidas de poblaciones celulares mixtas como sangre, médula ósea o muestras similares. El procedimiento inventivo elimina exitosamente o reduce las células no diana capturadas o unidas en forma no específica durante la inmunocaptura en fase sólida o captura de ligandos en fase sólida.

40 El uso de polioles para la estabilización de proteínas en general es conocido y está descrito. Por ejemplo, frecuentemente se utiliza glicerol para la criopreservación de células, y efectivamente se utilizan otros polioles como manitol para la conservación de preparaciones de glóbulos rojos. Los polioles (por ejemplo sorbitol, sacarosa, trehalosa) son conocidos por ser útiles para la protección de células bacterianas y eucarióticas durante el secado o procedimientos de choque con calor.

45 A diferencia de estos usos conocidos de polioles en la técnica anterior, los inventores observaron, para su gran sorpresa, que los polioles no sólo pueden utilizarse para la conservación de muestras sin que también son capaces de reducir drásticamente las señales de fondo causadas por células no diana capturadas o unidas en forma no específica al ser utilizados en procedimientos de enriquecimiento celular de captura de ligandos o inmunocaptura en fase sólida; mientras que, al mismo tiempo, la recuperación de células diana no fue afectada. Puede especularse que las interacciones de polioles con estructuras proteicas hidrofóbicas aumenta la especificidad de las interacciones antígeno/ligando (ligando o especificador/receptor) en fase sólida posiblemente mediante la reducción de la unión hidrofóbica no específica y mediante la estabilización de las estructuras secundarias y terciarias de los anticuerpos, ligandos o especificadores y antígenos o receptores, potenciando de ese modo la afinidad de unión y reduciendo las interacciones no específicas.

50 Al añadir polioles a la muestra durante los procedimientos inventivos de enriquecimiento celular en fase sólida, durante el contacto de la muestra con la fase sólida o en una etapa de lavado posterior de la fase sólida, pudo observarse que la cantidad de células no diana capturadas o unidas en forma no específica se redujo en un 99%, por ejemplo, al utilizar un tampón de lavado inventivo de 50 % (V/V) glicerol/PBS en una manera según se describe, por ejemplo, en el Manual of the AdnaTestBreastCancerSelect (AdnaGen AG, Langenhagen, Alemania) utilizando

anticuerpos contra antígenos asociados a tumores y epiteliales (EPCAM, MUC1, HER2) conjugados con cuentas magnéticas. Además, resultó que la recuperación de células diana no fue afectada y la concentración de las células diana fue muy baja. La adición de polioles, preferentemente glicerol, a las muestras antes del procedimiento de enriquecimiento celular redujo sustancialmente la carga celular no diana o unida en forma no específica. Esto también pudo observarse en concentraciones inferiores de glicerol, por ejemplo, 1 a 10 % (V/V). A continuación, se proporcionan algunos ejemplos del procedimiento inventivo.

En estos ejemplos,

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

la fig. 2 muestra el efecto de diferentes concentraciones de glicerol en el tampón de lavado AdnaTestBreastCancerSelect en los niveles de ARNm de CD45;

la fig. 3 muestra en la figura 3a el efecto de un tampón de lavado que contiene 20 % de glicerol y 5 % de manitol en la recuperación de células tumorales 2 MCF7 inoculadas en 5 ml de sangre de dadores saludables y la figure 3b la reducción de los niveles de ARNm de CD45 debido al tampón de lavado modificado;

la fig. 4 muestra el efecto de glicerol añadido a las muestras sanguíneas en la unión no específica de leucocitos;

la fig. 5 muestra 5 muestras sanguíneas de dadores saludables, analizadas por duplicado en cuanto a la expresión del receptor de estrógeno (ER) con el ensayo AdnaTestBreastCancerDetect seguido por la amplificación por PCR del ARNc de ER desarrollado para este fin. ER se amplificó en todas las muestras si solo se utilizó PBS durante la etapa de lavado de cuentas. Las concentraciones de amplicones promedio fueron 0,15 ng/μl. Esta actividad no específica de fondo desapareció cuando se utilizó PBS/glicerol para el lavado;

la fig. 6 muestra la influencia de diferentes polioles en el tampón de lavado en el trasfondo leucocitario;

la fig. 7 muestra la dependencia de la pureza de células madre CD34 (+)- purificadas a través de cuentas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD34 en la concentración de glicerol en el tampón de lavado: y

la fig. 8 muestra el efecto de polioles en el trasfondo leucocitario para el aislamiento de células madre tumorales y células EMT y la posterior detección de la expresión del marcador relevante.

Los Ejemplos 1-4 se han llevado a cabo en conformidad con las instrucciones de los fabricantes para la detección de CTC.

Ejemplo 1

Se procesaron 5 ml de muestras sanguíneas obtenidas de dadores saludables con AdnaTest BreastCancerSelect seguido por una determinación posterior de la expresión de ARNm de CD45. Después de la inoculación de las muestras sanguíneas con las cuentas magnéticas de AdnaTest BreastCancerSelect, se llevaron a cabo las etapas posteriores de lavado con tampón PBS sin o con la adición de diferentes cantidades de glicerol (0-50 % (V/V)) (véase la fig. 2). Los niveles de ARNm de CD45 se reducen con las concentraciones crecientes de glicerol según lo que se muestra en la fig. 1. Esto indica la desaparición de los leucocitos contaminantes como fuente de la expresión del ARNm de CD45.

Ejemplo 2

Se inocularon células de cáncer de mama 2 MCF7 en 5 ml de sangre extraída de dadores saludables. Las células tumorales recubiertas con AdnaTest BreastCancerSelect se analizaron posteriormente en cuanto a marcadores de ARNm asociado a tumores utilizando AdnaTestBreastCancerDetect. Esto fue seguido por un PCR de CD45 para estimar la reducción de la contaminación leucocitaria. Después de la inoculación de las muestras sanguíneas con cuentas magnéticas AdnaTest BreastCancerSelect, se llevaron a cabo las etapas de lavado con PBS que contenía 20 % (V/V) de glicerol y 5 % (P/V) de manitol. Según lo que se muestra en la fig. 3a, la recuperación de las células inoculadas no fue deteriorada por el tampón de lavado modificado. Sorprendentemente, las concentraciones de ARN, de actina y CD45 se redujeron al mismo tiempo que las concentraciones de amplicones de los marcadores asociados a tumores aumentaban, indicando una reducción de los leucocitos contaminantes y un producción mayor de ARNm de células tumorales (fig. 3b).

Ejemplo 3

Se añadió glicerol en diferentes concentraciones (0-1% (V/V)) a 5 ml de muestras sanguíneas de dadores saludables. Las muestras se analizaron utilizando AdnaTestBreastCancerSelect/Detect seguido por una determinación posterior de la expresión de ARNm de CD45. La cantidad de CD45 se reduce con concentraciones crecientes de glicerol, lo que indica una cantidad inferior de leucocitos capturados o unidos según lo que se muestra

en la fig. 4.

El ensayo RT-PCR que trata la expresión del receptor de estrógeno (ER) y el receptor de progesterona (PR) en células tumorales circulantes se desarrolló para la inclusión en AdnaTest BreastCancerSelect/Detect. Debido a que el ensayo de la expresión de ER muestra un trasfondo relativamente alto debido a los leucocitos capturados o unidos que expresan ER, el mismo es incapaz de exceder una especificidad de 80 % en el nivel de sensibilidad analítica requerido (es decir, 1 o 2 células tumorales en 5 ml de sangre). Esta actividad de fondo (aproximadamente 0,15 ng/μl en promedio), responsable de la reducción de la especificidad, puede eliminarse si se utiliza PBS que contiene 30 % (V/V) de glicerol en la etapa de lavados según lo que se muestra en la fig. 5.

Ejemplo 4

Se determinó el efecto de los diferentes polioles en el tampón de lavado sobre la expresión de CD45 en la sangre de dadores saludables para mostrar la capacidad de los diferentes polioles de minimizar el trasfondo no específico.

Se procesaron 5 ml de muestras sanguíneas obtenidas de dadores saludables con AdnaTestBreastCancerSelect seguido por una RT-PCR de CD45. Se llevaron a cabo las etapas de lavado con tampón PBS que contenía uno de dichos tres polioles (sorbitol (10 % P/V), fructosa (10 % P/V), glicerol (10 % V/V)). Se utilizó tampón PBS sin aditivo como control y para un lavado final adicional en todas las muestras antes de la lisis celular y RT-PCR. La detección de la expresión de CD45 es un indicador para la selectividad en la etapa de separación seguida por la detección de CD45 como marcador para las células leucocitarias residuales. Según lo que se muestra en la fig. 6, todos los polioles causaron una reducción de CD45. El sorbitol y la fructosa causaron aproximadamente 15 % y el glicerol aproximadamente 35 % de reducción del trasfondo leucocitario. Obviamente, tal como se muestra con estos tres polioles arbitrariamente seleccionados, todos los polioles son apropiados para la presente invención.

Ejemplo 5

En este ejemplo, se determina la pureza de las células madre CD34 positivas de sangre de cordón después del enriquecimiento inmunomagnético dependiendo de la concentración de glicerol en el tampón de lavado (véase la fig. 7).

Se resuspendieron las células mononucleares (MNC), $3,48 \times 10^8$ células; 91×10^8 células y $2,59 \times 10^8$ células, obtenidas de sangre de cordón en 1 ml de tampón PBS que contenía diversas concentraciones de glicerol (V/V), 5 % (P/V) de manitol y 0,1 % de BSA. Después de añadir las cuentas magnética (Dynal) con anticuerpos anti-CD34 acoplados a las mismas, se incubó la suspensión durante 30 minutos en agitador superior a temperatura ambiente.

Después de la incubación, la suspensión celular de las cuentas se lavó 3 veces con 1 ml de tampón PBS que contenía diversas concentraciones de glicerol (V/V) y 5 % (P/V) de manitol y 0,1 % (P/V) de BSA seguido por la lisis de los complejos celulares de las cuentas en 200 μl de tampón de lisis (Dynal). Después del aislamiento y la transcripción inversa de ARNm, el ADNc resultante se analizó mediante PCR en cuanto a las transcripciones de CD45 (para determinar los leucocitos capturados) y CD34 (para determinar las células madre enriquecidas). Se calculó una relación de la señal de PCR cuantificada para determinar la pureza relativa de las células madre en relación con la concentración de glicerol en el tampón de lavado.

Según lo que se muestra en la fig. 7, los tampones de lavado PBS que contenían glicerol/manitol aumentan significativamente la pureza de la fracción de CD34 (fracción de células madre) con la creciente concentración de glicerol en el tampón de lavado en comparación con el tampón de lavado sin ningún poliol.

Ejemplo 6

La detección de EMT y marcadores de células tumorales es impedida por las altas señales de fondo producidas por los leucocitos contaminantes.

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 dadores saludables con reactivos de AdnaTestBreastCancerSelect en conformidad con la instrucción, con y sin la adición de este buffer. El ADNc obtenido de estas muestras se analizó mediante PCR en cuanto a los marcadores de EMT PI3KCA, SIP1 y Akt2 así como en cuanto a los marcadores de células madre tumorales ALDH1 y BMI1.

Según lo que se muestra en la fig. 8, los polioles reducen las señales de leucocitos que interfieren con el análisis de los marcadores de EMT (Akt2, PI3KCA, SIP1) y los marcadores de células madre tumorales (BMI1, ALDH1) debido a la eliminación de los leucocitos capturados que es confirmada por la reducción de la señal de actina.

Mediante este ejemplo se demuestra que los leucocitos capturados expresan los marcadores de EMT y células madre y producen fuertes señales de fondo inaceptables. Estas señales podrían reducirse en forma eficaz con un tampón de lavado que contiene poliol, permitiendo un análisis específico de estos marcadores en CTC. Sin embargo, la recuperación de CTC no se redujo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento en fase sólida para aislar y/o enriquecer células predeterminadas de una muestra que contiene dichas células predeterminadas mediante la unión de las células predeterminadas a una superficie sólida, en el que los ligandos, receptores, antígenos o anticuerpos son inmovilizados en la superficie sólida, que son capaces de unirse específicamente a las células predeterminadas y en el que la muestra entra en contacto con la superficie sólida y después es retirada de la superficie sólida en una etapa de lavado,
- caracterizado porque** la muestra contiene un poliol al menos durante una etapa de contacto la muestra con la superficie sólida y de lavado.
- 10 2. El procedimiento en conformidad con la reivindicación precedente, **caracterizado porque** antes o durante el contacto de la muestra con la superficie sólida, se añade un poliol a la muestra.
3. El procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** se utiliza un tampón de lavado, que contiene un poliol, para lavar la superficie sólida en la etapa de lavado después de contactar la muestra con la superficie sólida.
- 15 4. El procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el poliol se añade a la muestra o está contenido en el tampón de lavado en una concentración final (P/V o V/V) de al menos 1 %, preferentemente al menos 10%, preferentemente al menos 20 %, preferentemente al menos 30%, preferentemente al menos 50%, preferentemente al menos 60% de poliol.
- 20 5. El procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** como poliol, al menos se añade uno de los polioles en el grupo de polioles que comprende sorbitol, sacarosa, trehalosa, manitol, fructosa, maltit, lactitol, xilitol y glicerol a la muestra.
6. El procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la superficie sólida es al menos una del grupo que comprende una superficie de gel, superficie de sefarosa, superficie de vidrio, superficie de látex, superficie de cerámica, superficie de metal y superficie de plástico.
- 25 7. El procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la superficie sólida es la superficie de cuentas magnéticas.
8. El uso de un procedimiento en conformidad con una de las reivindicaciones precedentes para el aislamiento o enriquecimiento de células predeterminadas contenidas en una muestra.
9. El uso en conformidad con la reivindicación precedente para el aislamiento o enriquecimiento de células raras de una muestra.
- 30 10. EL uso en conformidad con la reivindicación 8 para el aislamiento o enriquecimiento de células fetales de una muestra de sangre periférica materna.
11. El uso en conformidad con la reivindicación 8 para el aislamiento o enriquecimiento de células tumorales de suspensiones celulares incluyendo al menos una del grupo que comprende sangre periférica, médula ósea, orina, ascitis, esputo y similares de un paciente.
- 35 12. El uso en conformidad con la reivindicación 8 para el aislamiento o enriquecimiento de células madre de una muestra de fluido corporal y/o de una muestra tisular y/o similar de un ser humano.
13. El uso en conformidad con la reivindicación 8 para el aislamiento o enriquecimiento de células madre tumorales y/o células EMT de una muestra de fluido corporal y/o de una muestra tisular y/o similar.

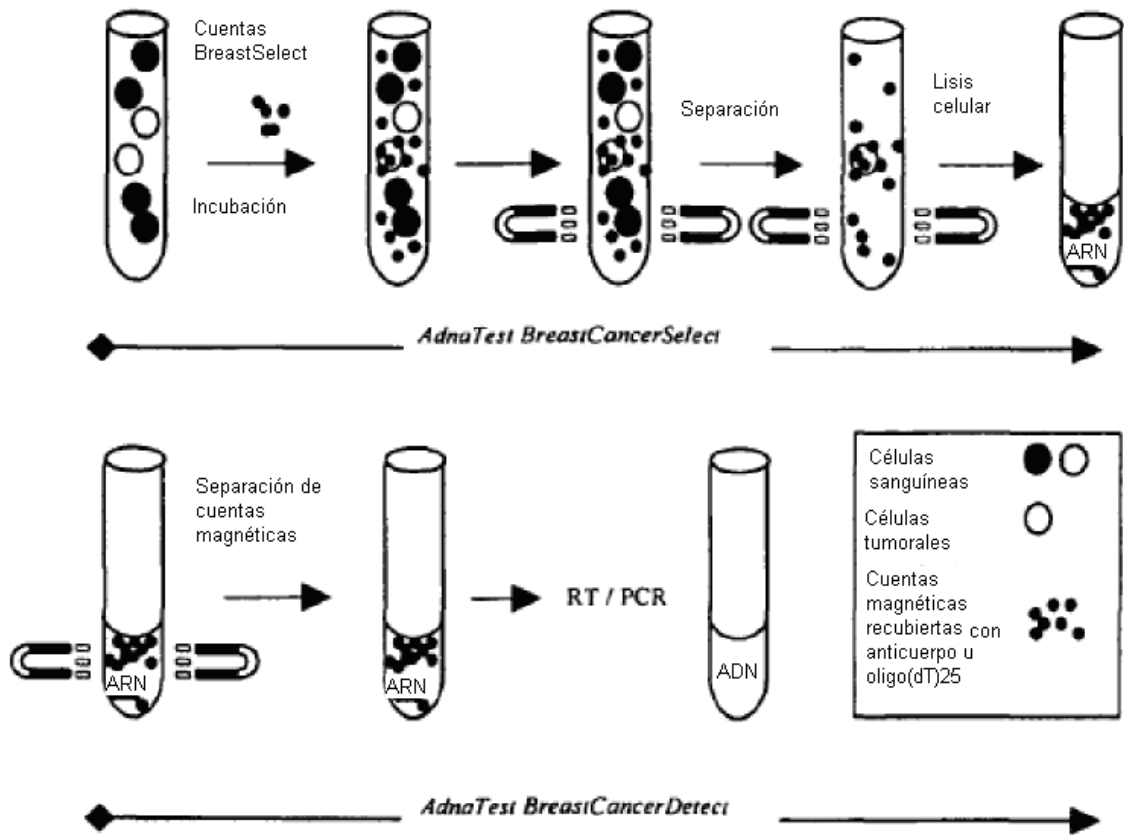


Fig. 1

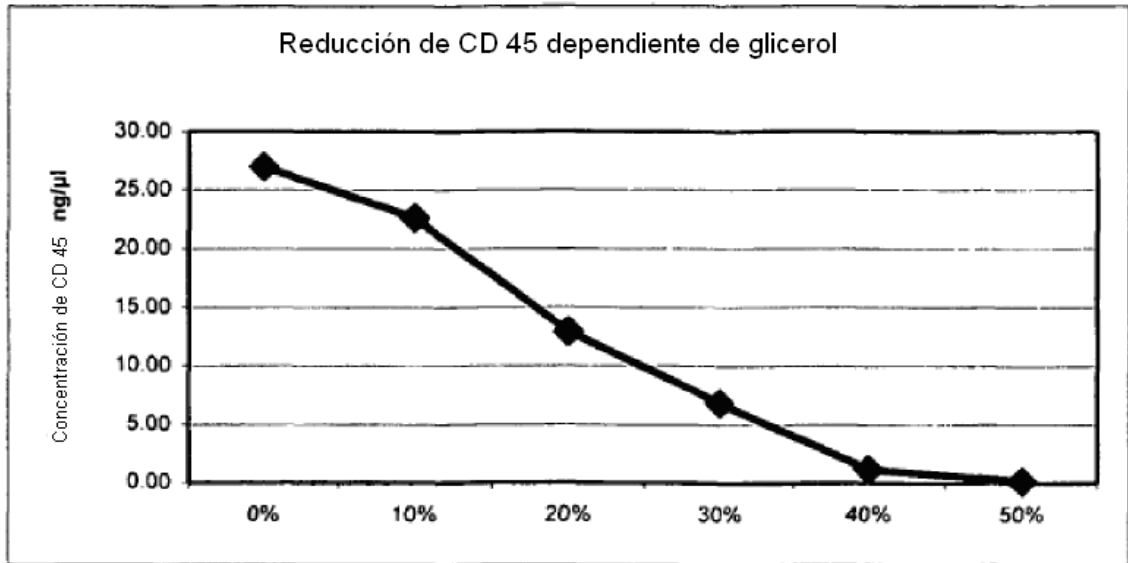


Fig. 2

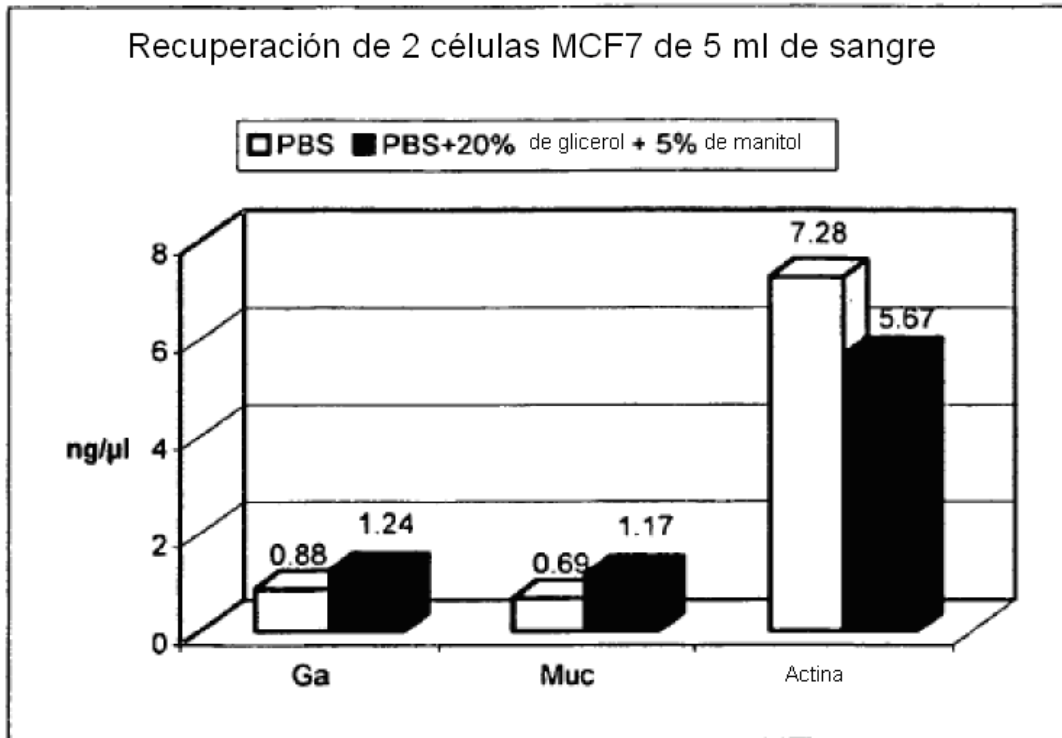


Fig. 3a

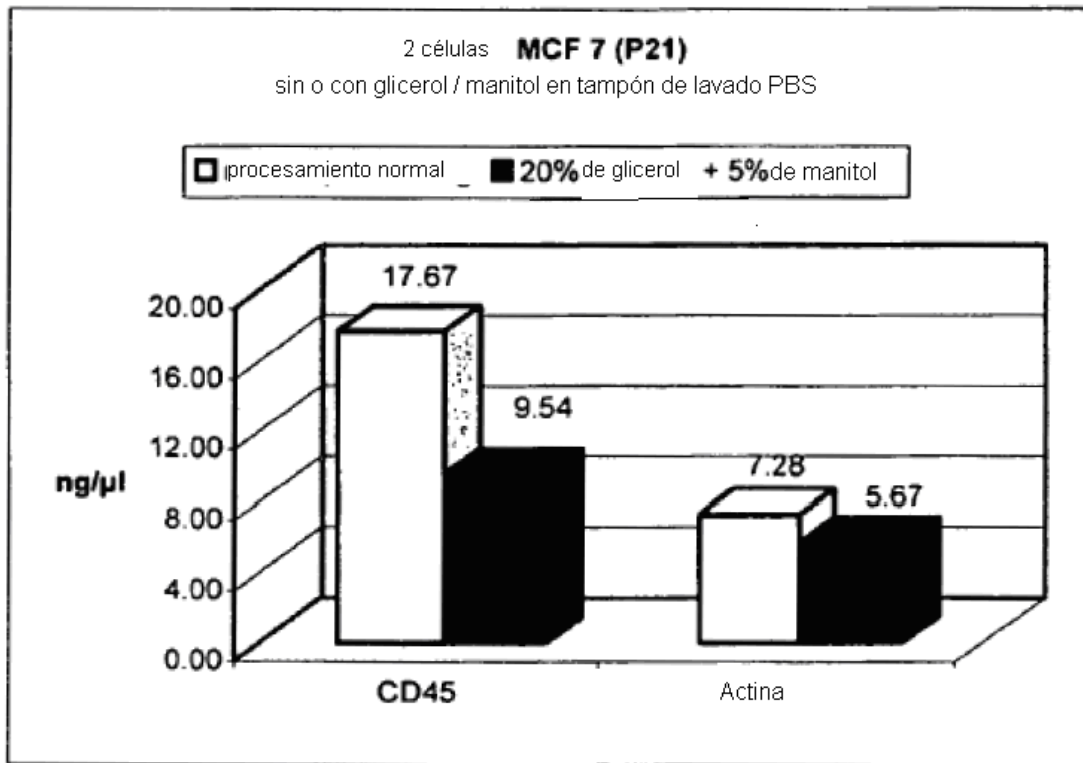


Fig. 3b

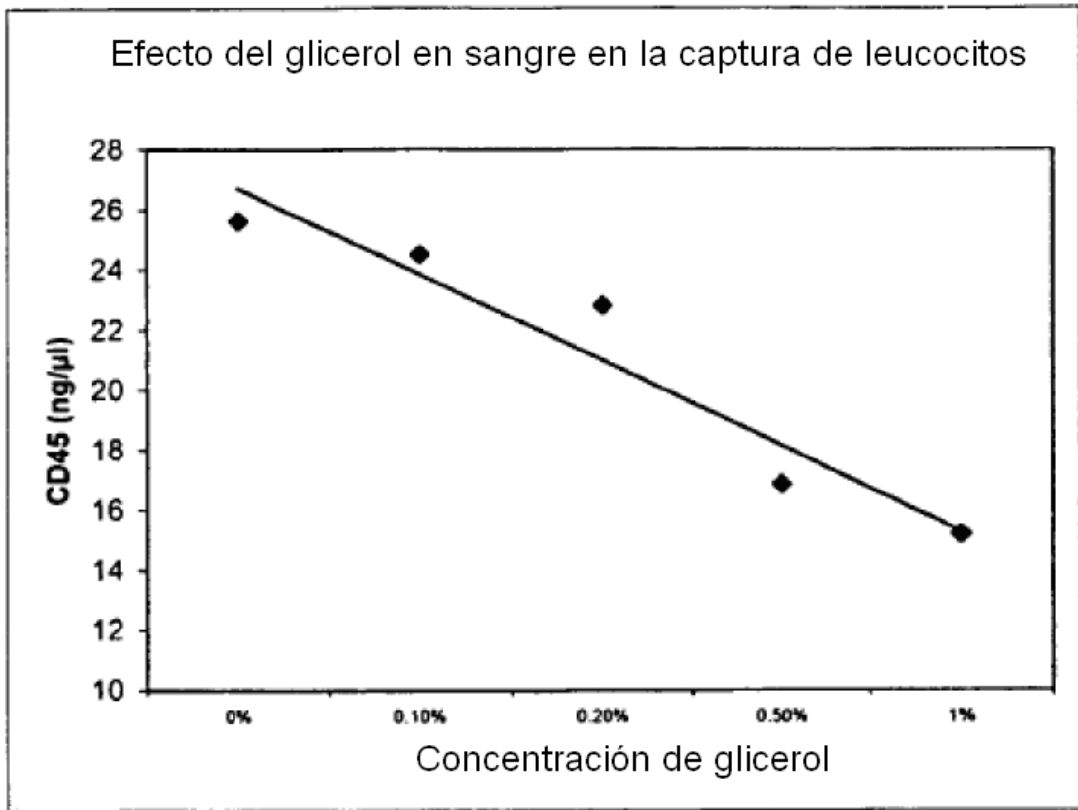


Fig. 4

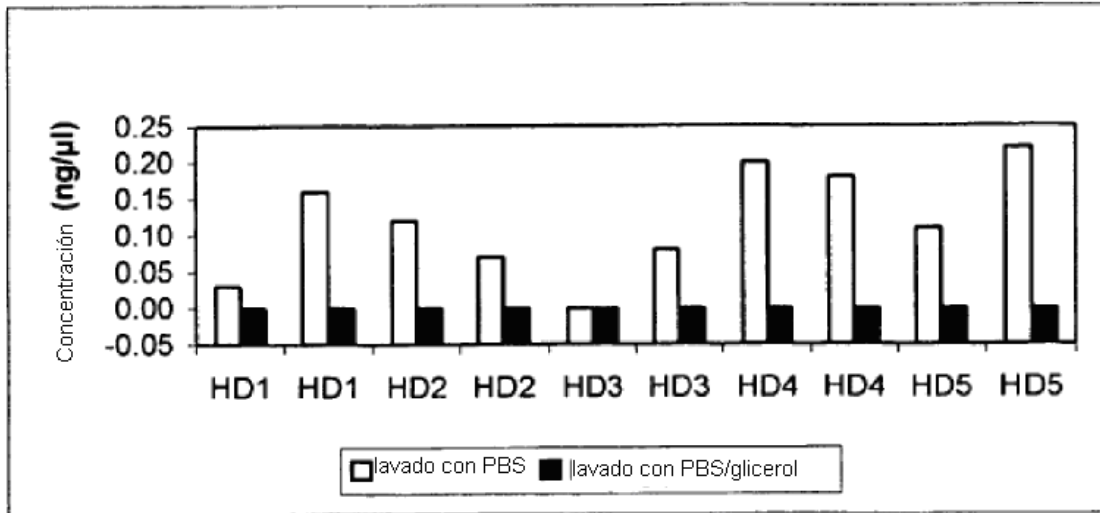


Fig. 5

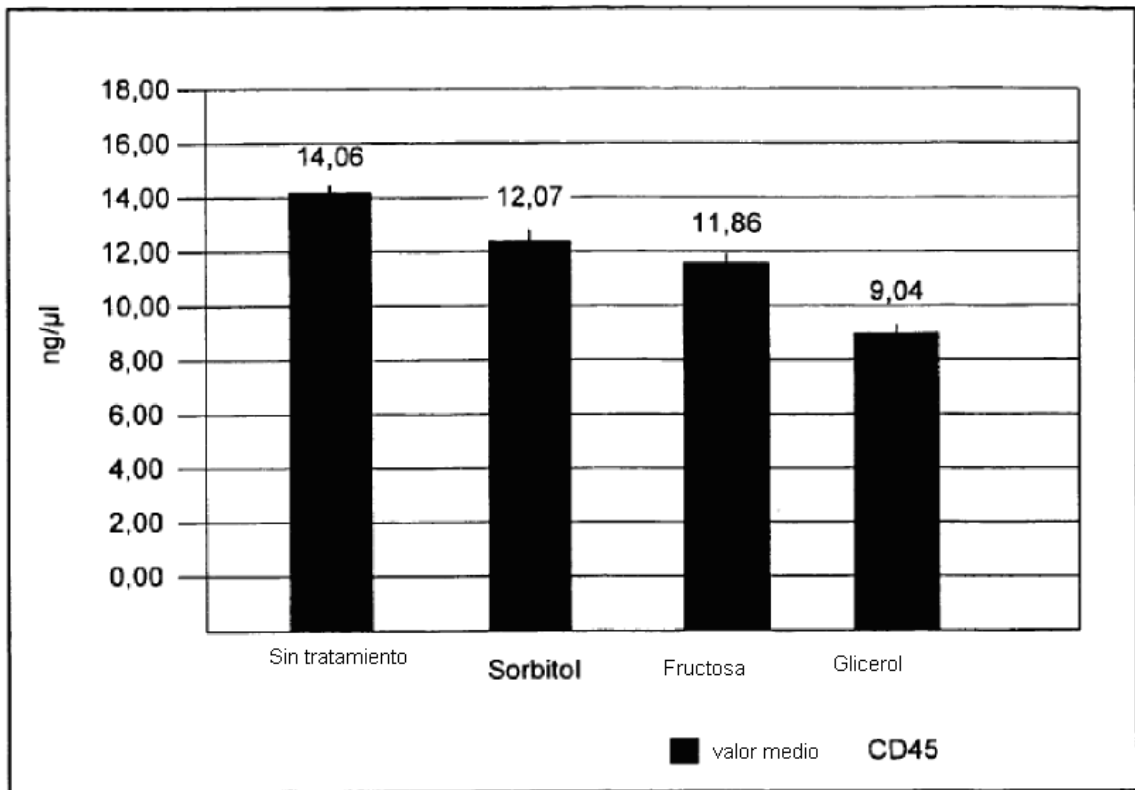


Fig. 6

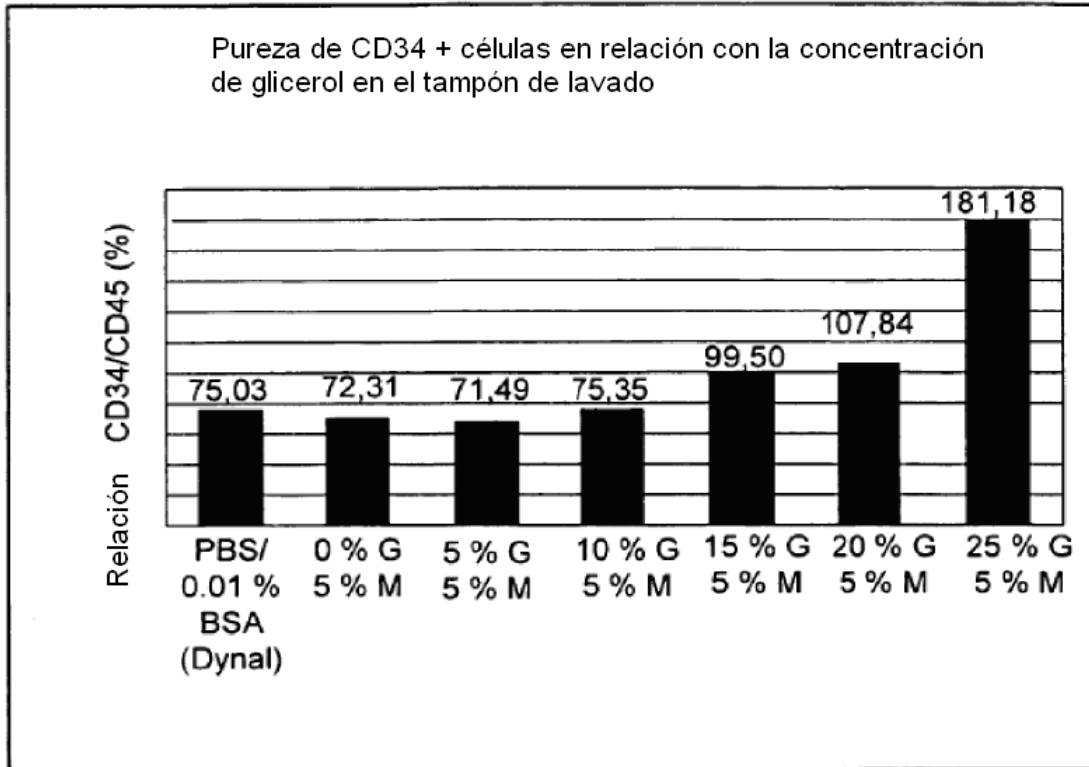


Fig. 7

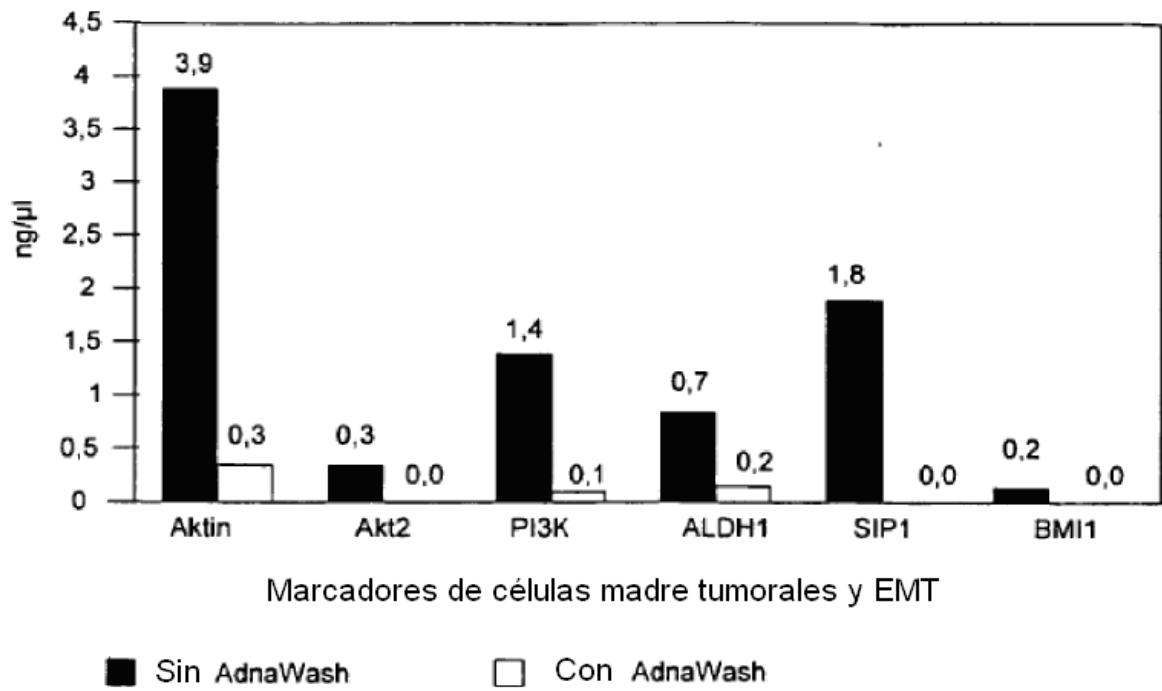


Fig. 8