

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 419**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2012 E 12000156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2615180**

54 Título: **Método para la cuantificación, caracterización genética cualitativa y caracterización de la expresión génica de células predeterminadas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2015

73 Titular/es:

**ADNAGEN GMBH (100.0%)
Ostpassage 7
30853 Hannover-Langenhagen, DE**

72 Inventor/es:

HAUCH, SIEGFRIED

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 529 419 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

Método para la cuantificación, caracterización genética cualitativa y caracterización de la expresión génica de células predeterminadas

5 En la presente invención, se proporciona un método para la caracterización genética cualitativa y/o la caracterización de la expresión génica de células predeterminadas en una muestra líquida que contiene tales células. Según la invención, un parámetro determinado para una mezcla de células predeterminadas y otras células se puede corregir de modo que solo se obtiene la contribución de las células predeterminadas al parámetro. La presente invención permite de este modo la determinación selectiva de perfiles de expresión génica y/o el número de copias de ADN y ARN en células predeterminadas, con alta precisión, a pesar de que dichas células predeterminadas están presentes en una mezcla con otras células. Además, la presente invención proporciona un método para la cuantificación selectiva de células predeterminadas en una mezcla de células predeterminadas y otras células.

10 Cuando se emplean inmunoperlas o técnicas de enriquecimiento celular comparables, para el enriquecimiento de células raras (por ejemplo, células tumorales circulantes = CTC) en fluidos corporales, tales como muestras de sangre, se observa con frecuencia un número de al menos 1000-10000 células contaminantes, no diana, nucleadas, presentes en la muestra enriquecida.

15 La obtención de perfiles moleculares de células raras en la sangre (por ejemplo, CTC) es limitado debido a la presencia de leucocitos contaminantes. El nivel de expresión de fondo de los leucocitos se puede estimar utilizando muestras de donantes sanos. Sin embargo, los leucocitos, incluso los de voluntarios sanos, siempre pueden diferir en su composición molecular y en su activación y/o estado de expresión. En concreto, el nivel intracelular o el número de copias intracelulares de ciertos ARNs en los leucocitos (su transcriptoma) es diferente no solo entre personas sanas y enfermas, sino también entre las personas sanas.

20 Esta diferencia es cada vez más importante, si las muestras de donantes sanos se utilizan como una referencia para muestras obtenidas a partir de pacientes que padecen una enfermedad como el cáncer, ya que el cáncer puede causar la presencia de leucocitos activados y una composición de leucocitos que difiere en gran medida en los leucocitos de personas sanas. En consecuencia, para una determinación correcta de la cantidad o el transcriptoma de ciertas células predeterminadas, la señal obtenida debe ser corregida restándola de una referencia ideal.

25 Se ha descubierto en experimentos con células predeterminadas que rara vez están presentes en fluidos corporales, tales como CTC, que la extracción selectiva de dichas células con inmunoperlas que comprenden anticuerpos contra dichas células, solo es efectiva hasta un cierto grado de pureza. Se ha observado que las muestras extraídas selectivamente, al final todavía contenían aproximadamente 1000 células distintas (por ejemplo, leucocitos u otras células nucleadas) como una contaminación cruzada. Experimentos repetidos indicaron que las células contaminantes no se pueden eliminar más por debajo de este límite. Se supone que la unión inespecífica de las células contaminantes (por ejemplo, leucocitos) a las inmunoperlas es la responsable de este efecto, es decir, la unión de las células contaminantes a las inmunoperlas no está causada por interacciones físicas específicas sino inespecíficas, las cuales se producen durante cada etapa de extracción y no se pueden evitar. Etapas adicionales de lavado redujeron la unión inespecífica, pero también redujeron la unión específica, conduciendo a una pérdida de sensibilidad.

30 Ante el problema de la contaminación cruzada como un problema inherente al procedimiento de purificación, el número de marcadores asociados a tumores es muy limitado. La razón es que la señal de fondo es tan alta que el marcador asociado a un tumor tiene que estar muy hiperexpresado en las células predeterminadas (por ejemplo, CTC) en comparación con las células contaminantes (por ejemplo, leucocitos). Por ejemplo, una proporción de 1 célula predeterminada (por ejemplo CTC) frente a 1000-10000 células contaminantes (por ejemplo, leucocitos) requeriría una hiperexpresión de al menos 1.000 veces hasta 10.000 veces, del marcador asociado al tumor en las células predeterminadas, en comparación con las células contaminantes, para tener un diagnóstico fiable. Por lo general, esta proporción desventajosa de las células predeterminadas frente a las células contaminantes plantea restricciones significativas en la detección en términos de relación señal-ruido. Como consecuencia, la elección de los genes y los métodos para la elaboración de un perfil de expresión génica, están gravemente limitados (véase también O'Hara et al., Clin. Chem. (2004) 50: 5).

35 Por lo tanto, para la mayoría de los genes que van a ser marcadores potenciales de enfermedades, un análisis preciso de la expresión génica apenas es posible si dicho gen se expresa tanto en las células predeterminadas como en las células contaminantes. En la técnica anterior, el análisis de la expresión génica de células predeterminadas en mezclas celulares está afectado por ello por un cierto error que se obtiene a partir de una señal de las células que no son las células predeterminadas (= el fondo o la referencia).

40 En relación con la contaminación de CTC con leucocitos, algunos grupos han tratado de mejorar la relación entre señal y ruido mediante una estrategia llamada de enriquecimiento negativo (Liu et al, J. Transl. Med. (2011), 9: 70). Dicha estrategia tiene por objetivo reducir la contaminación con leucocitos en una muestra de CTC y leucocitos (relación de aproximadamente $1:10^3-10^4$) mediante el agotamiento de los leucocitos con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD45⁺. La estrategia tiene la desventaja de que las células predeterminadas también se unen al anticuerpo anti-CD45⁺ y se agotan también, y por lo tanto no se obtiene ninguna señal verdadera de las células

predeterminadas.

El problema subyacente de la invención es proporcionar la señal verdadera (por ejemplo, el nivel celular verdadero de ARNm y/o el recuento del número de copias de ADN) de las células predeterminadas en una muestra de células predeterminadas y otras células (contaminantes). En otras palabras, la presente invención tiene por objeto eliminar las variaciones en los resultados que son inherentes a los métodos de la técnica anterior.

5 El problema de la técnica anterior se resuelve por el método para la caracterización genética cualitativa y/o la caracterización de la expresión génica de células predeterminadas según la reivindicación 1, el método para la cuantificación de células predeterminadas según la reivindicación 5, el método para el diseño de una terapia contra el cáncer según la reivindicación 14 y el método para pronosticar un cáncer según la reivindicación 15.

10 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la caracterización genética cualitativa y/o la caracterización de la expresión génica de células predeterminadas en una muestra líquida que contiene tales células, que comprende

a) extraer selectivamente al menos una parte de las células predeterminadas de la muestra, formando una suspensión celular cs_0 ; y

15 b) repetir la etapa de extracción a) n veces con la misma muestra de la etapa a), con $n \geq 1$, formando al menos una suspensión de células cs_n ;

c) determinar un perfil de expresión génica g_{ep_0} y/o un primer recuento del número de copias cnc_0 de al menos un ADN y/o ARN con al menos una parte de la suspensión celular cs_0 ;

20 d) determinar al menos otro perfil de expresión génica g_{ep_n} y/o un recuento adicional del número de copias cnc_n de al menos un ADN y/o ARN con al menos una parte de al menos otra suspensión celular cs_n ;

e) calcular el perfil de expresión génica de las células predeterminadas $g_{ep}(P)$ de al menos un ADN y/o ARN predeterminado restando g_{ep_n} de g_{ep_0} y/o el recuento del número de copias de las células predeterminadas $cnc(P)$ de al menos un ADN y/o ARN predeterminado restando cnc_n de cnc_0 ; y

25 f) evaluar las características genética cualitativas y/o de la expresión génica de las células predeterminadas procedentes de $g_{ep}(P)$ y/o $cnc(P)$.

En el primer aspecto de la invención, el al menos un ARN se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en ARNm, ARNnc, ARNr, ARNt, ARNsn, ARNsno, ARNmi, ARNds y ARN vírico. Por otra parte, el al menos un ADN se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en ADN celular, ADN vírico y ADN bacteriano. En este sentido, el ADN celular es cualquier ADN que se produce naturalmente dentro de las células biológicas. Por lo tanto, la expresión "ADN celular" comprende ADN de organismos procedentes de los tres reinos de células vivas, es decir, células eucariotas, células bacterianas y/o células arqueas.

30

En cuanto al primer aspecto de la invención, el perfil de expresión génica y/o el primer recuento del número de copias de al menos un ADN y/o ARN, se puede determinar mediante RT-PCR, qRT-PCR y/o por tecnología de microchips.

35 Según una realización preferida del primer aspecto de la invención, la caracterización genética cualitativa y/o de la expresión génica comprende o consiste en una caracterización de los genes implicados en el metabolismo.

Para evaluar determinados genes en la caracterización genética cualitativa y/o de la expresión génica de acuerdo con el primer aspecto de la invención, se pueden emplear ciertos marcadores moleculares que son específicos para dichos genes. Preferiblemente, los marcadores moleculares se seleccionan a partir del grupo que consiste en Pi3K, Akt, Twist and ALDH.

40

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para la cuantificación de células predeterminadas en una muestra líquida que contiene tales células, en donde el método comprende las etapas de

a) extraer selectivamente al menos una parte de las células predeterminadas a partir de la muestra, formando una suspensión celular cs_0 ; y

45 b) repetir la etapa de extracción a) n veces con la misma muestra de la etapa a), con $n \geq 1$, formando al menos una suspensión celular cs_n ;

c) determinar un primer recuento del número de copias cnc_0 de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado con al menos una parte de la suspensión celular cs_0 ;

50 d) determinar al menos un recuento adicional del número de copias cnc_n de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado con al menos una parte de al menos otra suspensión celular cs_n ;

e) calcular el recuento del número de copias del ADN de las células predeterminadas y/o de al menos un gen predeterminado de las células predeterminadas restando cnc_n de cnc_0 ; y

f) correlacionar el recuento resultante del número de copias con el número de células predeterminadas que están presentes en la muestra líquida.

5 Los dos métodos de acuerdo con el primer y el segundo aspecto de la invención representan soluciones equivalentes para el problema técnico particular de proporcionar la señal verdadera de células predeterminadas en una muestra de células predeterminadas y otras células (contaminantes). Al llevar a cabo las etapas del método equivalentes, los métodos de acuerdo con el primer y el segundo aspecto de la invención, eliminan ambos las variaciones en los resultados que son inherentes a los métodos de la técnica anterior. Por lo tanto, el primer y el segundo aspecto de la invención están unificados por un concepto inventivo general.

10 Ambos aspectos de la presente invención emplean una ventaja, que la contaminación inespecífica de las células contaminantes en una muestra es aleatoria y que las células contaminantes están en exceso sobre las células predeterminadas. Esto asegura que la contaminación aparecerá una y otra vez en una segunda, tercera extracción y hasta n extracciones de la muestra. Usando esta estrategia en enriquecimientos repetidos, utilizando la misma muestra, se genera una muestra que comprende las células contaminantes, pero carece de las células predeterminadas. El resultado de la diferencia calculada entre la primera etapa de extracción de la muestra y la muestra que carece de las células predeterminadas, representa el resultado de células predeterminadas puras.

15 El primer y el segundo aspecto de la invención tienen varias ventajas sobre la técnica anterior. En primer lugar, los métodos permiten restar una referencia ideal, es decir, una referencia de la misma persona el mismo día. La referencia tiene básicamente la misma composición que la sonda de la muestra excepto que carece de células predeterminadas (que se han extraído). Esto se traduce en una alta precisión del resultado y de los valores que están más próximos a los valores verdaderos, es decir, los valores solo de las células predeterminadas.

20 En segundo lugar, los dos aspectos de la invención se pueden llevar a cabo cada uno, en una escala de tiempo reducido que disminuye el peligro de cambios en la calidad de la muestra o incluso la destrucción de la muestra. Dado que los posibles cambios en la muestra original afectan igualmente a la muestra y a la referencia (excepto en el contenido de células predeterminadas que es idéntico), el riesgo de falsos valores altos o falsos valores bajos se reduce al mínimo.

25 En tercer lugar, una variación entre las personas y entre las muestras está completamente descartada ya que tanto la muestra como el fondo (referencia) se obtienen realmente a partir de una muestra, una persona y también al cabo de un corto período de tiempo. Una realización preferida del primer y el segundo aspecto de la invención, requiere incluso que en cada extracción de la muestra, después de la primera extracción de la muestra, se utilice la misma fase sólida (por ejemplo, inmunoperlas) que se utilizó en la primera extracción (por supuesto después de eluir las células unidas antes de cada nuevo uso). Por lo tanto, los errores que se basan en variaciones entre los lotes y/o dentro de un lote de una fase sólida (por ejemplo, inmunoperlas) se reducen al mínimo.

30 De acuerdo con el segundo aspecto de la invención, el recuento del número de copias de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado, se puede determinar mediante qPCR y/o por tecnología de microchips.

En el primer y/o el segundo aspecto de la invención, la extracción en la etapa b) se puede repetir 1-10 veces, preferiblemente 1-6 veces, lo más preferiblemente 1-2 veces.

35 Además, en el primer y/o el segundo aspecto de la invención, la extracción selectiva de al menos una parte de las células predeterminadas de la muestra se realiza preferiblemente empleando reactivos de extracción idénticos en la etapa a) y b).

40 En una realización preferida del primer y/o el segundo aspecto de la invención, la etapa a) se efectúa poniendo en contacto la muestra al menos una vez con una fase sólida que se une preferentemente a las células predeterminadas. Posteriormente, las células no unidas se pueden retirar de la fase sólida, preferiblemente mediante lavado de la fase sólida con al menos un tampón. Finalmente, las células unidas a la fase sólida se pueden eluir de la fase sólida, preferiblemente mediante lavado de la fase sólida con al menos un tampón adicional. La persona experta sabe qué tampones se pueden usar para el lavado y/o la elución de las células predeterminadas a partir de una fase sólida.

45 La fase sólida en el primer y/o el segundo aspecto de la invención se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en polímeros, plásticos, cerámicas, vidrios, metales, sefrosa, agarosa y látex. Lo más preferiblemente, la fase sólida comprende o consiste en perlas magnéticas. La fase sólida puede comprender anticuerpos y/o derivados de anticuerpos que se inmovilizan preferentemente sobre la superficie.

50 En una realización preferida adicional del primer y/o el segundo aspecto de la invención, la muestra líquida comprende o consiste en sangre periférica, médula ósea, orina, ascitis y esputo de un paciente. Opcionalmente, la muestra líquida comprende o consiste en una muestra de tejido de un organismo.

55 Además, en una realización preferida del primer y/o el segundo aspecto de la invención, las células predeterminadas

se seleccionan a partir del grupo que consiste en células madre tumorales y células tumorales en transición epiteliomesénquima, preferiblemente células tumorales circulantes (CTC).

5 La invención proporciona además un método para diseñar una terapia contra el cáncer, que comprende realizar el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que las células predeterminadas son CTC y adaptar la terapia del cáncer basándose en la evaluación en la última etapa del método del primer aspecto de la invención.

Finalmente, la invención proporciona un método para pronosticar el cáncer, que comprende realizar el método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, en el que las células predeterminadas son CTC y proporcionar un pronóstico para el cáncer basándose en el número de CTC que se determina en la última etapa del método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

10 En una realización preferida del método para pronosticar el cáncer, el método de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se realiza una primera vez y al menos otra vez posteriormente. Un buen pronóstico se proporciona si el número de CTC es menor que la primera vez al menos una vez más posteriormente. Un pronóstico malo se proporciona si el número de CTC es mayor que la primera vez al menos una vez más posteriormente.

15 Según una realización más preferida del primer y/o del segundo aspecto de la invención, todas las etapas del método del primer y/o del segundo aspecto de la invención se llevan a cabo *in vitro*.

Haciendo referencia a las siguientes figuras y ejemplos, el objeto de acuerdo con la invención se va a explicar con más detalle sin limitar dicho objeto a las realizaciones especiales que se muestran en esta memoria.

20 La Fig. 1 muestra señales del marcador después de la primera extracción y de la segunda extracción de una muestra que comprende 0, 10 o 100 células tumorales IGROV1, así como el perfil de la expresión génica calculado para las células tumorales IGROV1.

25 La Figura 1 (A) muestra la señal del marcador tumoral (= recuentos del número de copias = cnc) de Pi3K, Akt y Twist, determinada con tres suspensiones celulares diferentes cs_0 que se obtuvieron a través de una primera extracción de células IGROV1 procedentes de tres muestras de sangre de donantes sanos. La primera muestra no contenía ninguna célula IGROV1 ("0"), a la segunda muestra, se añadieron 10 células IGROV1 ("10") y a la tercera muestra se añadieron 100 células IGROV1 ("100"). (B) La señal del marcador tumoral (= cnc) de Pi3K, Akt y Twist se determinó para tres suspensiones celulares diferentes cs_1 que se obtuvieron mediante una segunda extracción de las células IGROV1 procedentes de las mismas muestras de sangre que en la primera extracción. (C) Las señales de los marcadores tumorales de Pi3K, Akt y Twist que pertenecen solo a las células IGROV1 (= cnc (P)) se calcularon restando cada gcp_1 de cada gcp_0 para la muestra "0", "10" y "100", respectivamente.

30 Ejemplo 1: Caracterización cualitativa de la expresión génica de CTC en una muestra que contiene CTC y leucocitos

35 Los AdnaTests emplean una técnica basada en inmunoperlas para enriquecer las células tumorales circulantes (CTC) procedentes de la sangre de pacientes con cáncer, seguido de una caracterización mediante determinación molecular de tales células empleando perfiles de expresión génica con marcadores asociados a tumores. Sin embargo, incluso si el enriquecimiento es bastante eficaz, las muestras contienen finalmente aproximadamente 1000 leucocitos u otras células nucleadas como contaminación cruzada.

40 De acuerdo con una realización de la invención, se analizan todos los CTC más aproximadamente 1000 leucocitos contaminantes en una primera etapa de enriquecimiento. Se emplea la misma muestra de sangre después de esta primera etapa de enriquecimiento y se extrae de nuevo con las mismas inmunoperlas, se captura la misma cantidad y composición de leucocitos contaminantes, pero ninguna célula tumoral más. De este modo, el segundo enriquecimiento es la muestra en blanco perfecta y se puede restar de la primera muestra para tener acceso matemáticamente a un perfil de expresión que solo se puede dedicar a las CTC, si las hay.

Ejemplo 2: Determinación cuantitativa de las células IGROV1 en una muestra de sangre

45 En un ejemplo adicional de la invención, las células predeterminadas eran células tumorales IGROV1 y la muestra líquida era una muestra de 5 ml de sangre de una persona sana. En primer lugar, tres muestras distintas de 5 ml de sangre fueron adicionadas con 0, 10 o 100 células tumorales IGROV1. A continuación, al menos una parte de las células tumorales IGROV1 se extrajo selectivamente de la muestra, formando tres suspensiones celulares diferentes cs_0 . En segundo lugar, la etapa de extracción se repitió para cada una de las tres muestras, una vez más formando tres suspensiones celulares adicionales cs_1 . En tercer lugar, los tres recuentos del número de copias de la primera extracción (cnc_0 de "0", "10" y "100") y los tres recuentos del número de copias de la segunda extracción (cnc_1 de "0", "10" y "100") de los marcadores celulares Pi3K, Akt y Twist se determinaron mediante qRT-PCR (véase la Figura 1A y 1B). Por último, el recuento del número de copias $cnc(P)$ de Pi3K, Akt y Twist se calculó matemáticamente restando cada cnc_1 de su respectivo cnc_0 (véase la Figura 1C).

REIVINDICACIONES

1. Método para la caracterización genética cualitativa y/o de la expresión génica de células predeterminadas en una muestra líquida que contiene tales células, que comprende:
 - 5 a) extraer selectivamente al menos una parte de las células predeterminadas a partir de la muestra, formando una suspensión celular cs_0 ; y
 - b) repetir la etapa de extracción a) n veces con la misma muestra de la etapa a), con $n \geq 1$, formando al menos una suspensión celular cs_n ;
 - c) determinar un perfil de expresión génica gcp_0 y/o un primer recuento del número de copias cnc_0 de al menos un ADN y/o ARN con al menos una parte de la suspensión celular cs_0 ;
 - 10 d) determinar al menos otro perfil de expresión génica gcp_n y/o un recuento adicional del número de copias cnc_n de al menos un ADN y/o ARN con al menos una parte de al menos otra suspensión celular cs_n ;
 - e) calcular el perfil de expresión génica de las células predeterminadas $gcp(P)$ de al menos un ADN y/o ARN predeterminado restando gcp_n de gcp_0 y/o el recuento del número de copias de las células predeterminadas $cnc(P)$ de al menos un ADN y/o ARN predeterminado restando cnc_n de cnc_0 ; y
 - 15 f) evaluar las características genéticas cualitativas y/o de la expresión génica de las células predeterminadas procedentes de $gcp(P)$ y/o $cnc(P)$.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el al menos un ARN se selecciona a partir del grupo que consiste en ARNm, ARNnc, ARNr, ARNt, ARNsn, ARNsno, ARNmi, ARNds y ARN vírico y/o el al menos un ADN se selecciona a partir del grupo que consiste en ADN celular, ADN vírico y ADN bacteriano.
- 20 3. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el perfil de expresión génica y/o el primer recuento del número de copias de al menos un ADN y/o ARN se determina mediante RT-PCR, qRT-PCR y/o mediante tecnología de microchip.
4. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la caracterización genética cualitativa y/o de la expresión génica comprende o consiste en una caracterización de los genes implicados en el metabolismo.
- 25 5. Método para la cuantificación de células predeterminadas en una muestra líquida que contiene tales células, que comprende
 - a) extraer selectivamente al menos una parte de las células predeterminadas desde la muestra, formando una suspensión celular cs_0 ; y
 - 30 b) repetir la etapa de extracción a) n veces con la misma muestra de la etapa a), con $n \geq 1$, formando al menos una suspensión celular cs_n ;
 - c) determinar un primer recuento del número de copias cnc_0 de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado con al menos una parte de la suspensión celular cs_0 ;
 - d) determinar al menos un recuento adicional del número de copias cnc_n de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado con al menos una parte de al menos otra suspensión celular cs_n ;
 - 35 e) calcular el recuento del número de copias del ADN de las células predeterminadas y/o de al menos un gen predeterminado de las células predeterminadas restando cnc_n de cnc_0 ; y
 - f) correlacionar el recuento resultante del número de copias con el número de células predeterminadas que están presentes en la muestra líquida.
6. Método según la reivindicación precedente, en el que el recuento del número de copias de al menos un ADN y/o al menos un gen predeterminado está determinado por qPCR y/o por tecnología de microchip.
7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la extracción en la etapa b) se repite 1-10 veces, preferiblemente 1-6 veces, lo más preferiblemente 1-2 veces.
8. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la extracción selectiva de al menos una parte de las células predeterminadas de la muestra se lleva a cabo mediante el uso de reactivos de extracción idénticos en la etapa a) y b).
- 45 9. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) se efectúa poniendo en contacto la muestra al menos una vez con una fase sólida que se une preferentemente a las células predeterminadas, eliminando posteriormente las células no unidas de la fase sólida, preferiblemente lavando la fase sólida con al menos un tampón y eliminando posteriormente las células unidas de la fase sólida, preferiblemente lavando la fase

sólida con al menos un tampón adicional.

10. Método según la reivindicación precedente, en el que la fase sólida se selecciona a partir del grupo que consiste en polímeros, plásticos, cerámicas, vidrios, metales, sefarosa, agarosa y látex, preferiblemente la fase sólida son perlas magnéticas.
- 5 11. Método según una de las reivindicaciones 9-10, en el que la fase sólida comprende anticuerpos y/o derivados de anticuerpos, preferiblemente inmovilizados sobre la superficie.
12. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra líquida comprende al menos partes de sangre periférica, médula ósea, orina, ascitis y esputo de un paciente.
- 10 13. Método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las células predeterminadas se seleccionan a partir del grupo que consiste en células madre tumorales y células tumorales en transición epitelio-mesénquima, preferiblemente células tumorales circulantes (CTC).
14. Método para diseñar una terapia contra el cáncer, que comprende
 - i) llevar a cabo el método según la reivindicación 1-4 y 7-13, en el que las células predeterminadas son células tumorales circulantes (CTC); y
 - 15 ii) adaptar la terapia contra el cáncer basándose en la evaluación.
15. Método para pronosticar un cáncer, que comprende
 - i) llevar a cabo el método según la reivindicación 5-13, en el que las células predeterminadas son células tumorales circulantes (CTC); y
 - ii) proporcionar un pronóstico para el cáncer basándose en el número de CTC.
- 20 16. Método según la reivindicación anterior, en el que la etapa i) se lleva a cabo una primera vez y al menos una vez más posteriormente y un pronóstico bueno se proporciona si el número de CTC es menor al menos una vez posterior adicional que la primera vez y/o un pronóstico malo se proporciona si el número de CTC es mayor al menos una vez posterior adicional que la primera vez.

Figura 1

