



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102012902016576
Data Deposito	25/01/2012
Data Pubblicazione	25/07/2013

Classifiche IPC

Titolo

METODO PER ISOLARE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI.

Metodo per isolare cellule tumorali circolanti

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per isolare cellule tumorali
5 circolanti da un campione di sangue o suo derivato e ad un kit per isolare dette cellule.

DESCRIZIONE DELLA TECNICA PRECEDENTE

Nei pazienti affetti da tumori, è nota la presenza nel circolo periferico, in
particolare nel sangue, di cellule tumorali circolanti (CTC). Le CTC sono cellule assenti
10 nei soggetti sani e comunque rare nei pazienti affetti da patologie non neoplastiche.
Molti studi sperimentali sono riportati in letteratura circa le procedure per isolare e
selezionare le Cellule Tumorali Circolanti (CTC). Procedure comunemente adottate
prevedono, ad esempio, l'utilizzo di sorter e/o macchinari come la citofluorimetria
convenzionale in cui l'isolamento avviene mediante anticorpi specifici che riconoscono
15 marcatori selezionati sulle CTC (Terstappen et al 1998), o con la citofluorimetria vitale,
ad oggi realizzata però esclusivamente nell'animale di laboratorio e che consiste
nell'iniezione di ligandi fluorescenti capaci di riconoscere le cellule tumorali che sono
successivamente quantificate durante il loro passaggio nei vasi sanguigni superficiali
(He et al 2007). Tale tecnica nell'uomo è ancora in fase di sviluppo anche se l'uso dei
20 ligandi specifici ha dato già dei risultati incoraggianti (He et al 2009). La quantificazione
delle CTC può essere anche condotta utilizzando sfere immunomagnetiche
(Zieglschmid et al 2005) o con ricercati sistemi d'immagine mediante apparecchiature
microscopiche digitali (Hisieh et al 2006, Kraeft et al 2004 e Krivacic et al 2004). In
particolare, per le CTC sono stati descritti sistemi di microscopia digitale automatica
25 (Mesker et al 2006).

La presenza di cellule tumorali epiteliali è stata dimostrata nel sangue periferico
di pazienti sottoposti a chemioterapia ad alte dosi (Weaver et al 1998, Ross et al 1993)
attraverso saggi d'immunochimica e mediante test di messa in coltura cellulare
(Pedrazzoli et al 2000). In particolare, la procedura descritta da Pedrazzoli et al.
30 suggerisce la possibilità di utilizzare colture cellulari per individuare le CTC.

La problematica maggiore associata all'isolamento e, quindi, anche alla successiva quantizzazione e/o caratterizzazione delle cellule tumorali epiteliali è il basso numero in cui queste cellule sono presenti nel sangue. In particolare, si stima che in un paziente con metastasi originate da un tumore solido ci sia una cellula CTC ogni 10^8 cellule presenti in un campione di sangue. Nel 2010 il gruppo di lavoro di Lu (Lu et al 5 2010) riporta una procedura di arricchimento per CTC, isolate da pazienti con cancro alla mammella, che prevede la loro coltivazione *in vitro* per un tempo massimo di 12 ore.

La tecnica standard utilizzata nella maggior parte dei laboratori, consiste 10 nell'isolamento delle CTC dopo separazione del campione di sangue su opportuno gradiente. In particolare, per il gradiente è usato di solito un copolimero sintetico ramificato di alto peso molecolare molto idrosolubile ($d=1.077$ g/mL) sintetizzato a partire da saccarosio e epicloridrina il cui nome commerciale è Ficoll®. Tale procedura prevede il recupero della fase con un valore di gradiente tra $1.057-1.069$ Kg/m³ 15 ritenuta essere la fase in cui sono presenti le cellule mononucleate comprese, quindi, le cellule tumorali circolanti (CTC).

Il recupero della particolare fase di cui sopra per il recupero delle CTC, è fortemente radicata nella pratica del tecnico del settore, come indicato e riportato in qualsiasi manuale di laboratorio (Lu et al 2009, Paterlini-Brechot et al 2007, indicare la 20 referenza per esteso)

Dallo stato della tecnica noto emerge, *in primis*, una problematica su tutte e cioè quella di ottenere da un lato un numero sufficiente di CTC da un campione di sangue e dall'altra di isolare una frazione che rispetti la reale eterogeneità di tale popolazione cellulare.

Tale problema è stato essenzialmente affrontato, come in precedenza descritto, 25 cercando di arricchire il campione cellulare isolato mediante passaggi in coltura. In particolare, tale metodologia sfrutta la maggiore capacità proliferativa che contraddistingue le cellule tumorali rispetto alle cellule ematologiche normali permettendo, quindi, l'aumento esponenziale del loro numero in colture cellulari a 30 discapito delle cellule normali. Tuttavia, trattandosi di una linea cellulare primaria, un

suo arricchimento è legato al fatto che, la crescita/duplicazione cellulare può essere ottenuta soltanto nell'arco di pochi giorni a causa della breve emivita che caratterizza le colture primarie stesse *in vitro*.

Seppure tecniche più sofisticate siano state sviluppate (sorter/citofluorimetria) allo scopo di ottenere un numero sufficiente di CTC, esse presentano comunque diversi svantaggi come l'elevato costo dei macchinari, ingombro degli stessi, utilizzo da parte di personale tecnico specializzato, quindi, in altre parole sono tecniche verosimilmente non impiegate nella maggior parte dei laboratori con strumentazione di base. Inoltre, queste metodiche utilizzano anticorpi monoclonali o un pool di anticorpi monoclonali diretti contro un particolare antigene o gruppo di antigeni espressi dalle CTC, ne consegue che, CTC che non esprimono tali antigeni, ma che sono comunque presenti in circolo, sono escluse dalla selezione e, quindi, non presenti nel campione isolato che, pertanto non risulta essere rappresentativo dell'eterogeneità della reale popolazione di cellule tumorali presenti in circolo di un soggetto.

Scopo della presente invenzione è proporre una soluzione nuova ed originale ai problemi sopra evidenziati presenti nello stato della tecnica nota.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

-La figura 1 riporta la tabella 1 e la tabella 2 in cui è indicata rispettivamente la stima di cellule tumorali circolanti ottenute con la metodica tradizionalmente utilizzata per isolare cellule CTC dal sangue e il numero di cellule CTC isolate con la metodica qui descritta.

-le figure 2: (a), (b), (c), (d), (e), (f) rappresentano colture primarie di CTC derivate dal sangue di pazienti affetti da carcinoma del colon (a) della mammella (b) e del polmone (c) mentre (d), (e), (f) colture primarie derivate in uguali condizioni sperimentali dal sangue di soggetti sani.

- la figura 3 mostra l'espressione della calpaina-2 in cellule tumorali di polmone (PT), cellule tumorali circolanti di polmone (CTC) isolate secondo il metodo qui divulgato, prima (C1) e dopo (C2) rimozione chirurgica del campione.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

I vantaggi principali associati al metodo d'isolamento delle CTC qui descritto, sono la possibilità di ottenere a) un numero sufficiente di cellule tumorali circolanti e b) un campione di CTC isolate rappresentativo della loro eterogeneità. Quest'ultimo aspetto
5 è particolarmente vantaggioso dal momento che, la popolazione di cellule tumorali circolanti isolata risulterà così rispecchiare verosimilmente la composizione originale del tumore primitivo che la genera, composizione che può essere costituita, ad esempio, da cellule staminali tumorali, differenziate e apoptotiche che con il metodo tradizionale basato sul prelievo della fase del gradiente di Ficoll tra 1.057-1.069 Kg/m³
10 non era possibile ottenere.

La popolazione di CTC isolata secondo la presente divulgazione, può essere successivamente posta in coltura permettendone, così l'ulteriore aumento di numero oltre che evidenziandone il fenotipo proliferante. Le cellule CTC isolate e coltivate come di seguito descritto possono poi essere utilizzate per ulteriori caratterizzazioni
15 fenotipiche e molecolari.

Tali vantaggi che, si traducono in caratteristiche qualitative e quantitative del campione isolato, quali, ricchezza ed eterogeneità, permettono di eseguire in maniera più accurata dal punto di vista diagnostico i successivi studi/analisi di interesse.

Quindi, in ultim'analisi, analisi/studi più accurati del campione isolato possono
20 essere condotte grazie alla particolare fase del gradiente recuperata in accordo al metodo qui divulgato, caratterizzato da passaggi operativi effettuabili con strumentazione tecnica di base presente in ogni laboratorio di analisi/ricerca. In particolare, il metodo descritto nella presente domanda di brevetto si caratterizza, come dettagliato successivamente, nella scelta di recuperare, dopo separazione su
25 gradiente Ficoll®, la fase con un valore di densità compreso tra circa 1.080-1.090 (kg/m³) che, sorprendentemente ha mostrato essere ricca di una popolazione eterogenea di cellule tumorali circolanti. Il metodo qui descritto permette di recuperare un numero di CTC maggiore di quello ottenibile con il metodo descritto nello stato della tecnica nota (recupero al valore di gradiente tra 1.050-1.069 Kg/m³). In particolare, il
30 esperimenti condotti in parallelo su aliquote di sangue di uno stesso paziente

oncologico hanno evidenziato che numero di CTC isolate con la metodica qui descritta è di circa 1 cellula tumorale circolante per 10^5 CTC per ml di sangue contro circa 1 cellula tumorale circolante per 10^8 CTC per ml di sangue con la metodica nota.

Con la metodica qui descritta si ottiene una concentrazione di CTC nel campione
5 analizzato di circa 10^3 volte. Inoltre, la presente metodica permette di ottenere una popolazione di CTC isolata estremamente rappresentativa dell'eterogeneità che tali cellule effettivamente mostrano.

La presenza numerosa e specifica di CTC in detta fase da recuperare consente, di conseguenza, di ottenere cellule tumorali circolanti significativamente meno
10 contaminate dai diversi componenti del sangue, rispetto a quanto ottenibile mediante un isolamento delle stesse utilizzando la fase descritta in letteratura e avente un valore di gradiente tra 1.050-1.070 Kg/m³. Quest'aspetto (minore contaminazione) è estremamente vantaggioso tenuto conto che, le CTC costituiscono una fonte di DNA tumorale importante e utile per successive analisi/studi il cui risultato risente in maniera
15 negativa della presenza di DNA di cellule diverse dalle CTC derivanti dal medesimo campione di sangue.

L'isolamento delle CTC con il metodo qui descritto è possibile in ogni stato della malattia tumorale e con una resa cellulare che, verosimilmente aumenta con la
20 progressione della malattia. In particolare, la quantificazione delle CTC e la loro importanza diagnostica è stata oggetto di diversi studi riportati in letteratura (Cristofanelli et al. 2005)

Dunque, per quanto sopra detto, è qui descritto un metodo per isolare le cellule tumorali circolanti dal circolo generale in pazienti affetti da cancro, caratterizzato da elevata sensibilità e riproducibilità.

25 Un primo oggetto della presente descrizione è dunque un metodo per isolare cellule tumorali circolanti da un campione di sangue o suo derivato come definito dalla rivendicazione 1.

Un secondo oggetto della presente invenzione è un kit per isolare cellule tumorali circolanti da un campione di sangue o suo derivato come definito dalla rivendicazione
30 9.

Caratteristiche preferite degli oggetti della presente descrizione sono riportate nelle relative rivendicazioni dipendenti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

5 E' qui divulgato un metodo per isolare una popolazione di cellule tumorali circolanti da un campione di sangue, o un suo derivato. Per cellule tumorali circolanti si intende cellule normalmente non presenti nel sangue periferico di soggetti sani, con fenotipo e genotipo caratteristici della cellula neoplastica.

Le CTC sono dunque, per loro intrinseca natura presenti in un paziente affetto o
10 potenzialmente affetto da tumore dove per potenzialmente affetto si intende un paziente a cui non è stato ancora diagnosticata la patologia tumorale ma che concretamente già sviluppato un tumore di qualsiasi tipo (ad esempio pancreatico, ovarico, al seno ecc) e, preferibilmente, un tumore solido.

Il metodo qui divulgato comprendente i seguenti passaggi operativi. Innanzitutto il
15 campione di sangue o suo derivato è separato su un gradiente di Ficoll.

Per derivato del sangue si intende nella presente descrizione, un derivato ottenuto dal sangue, ad esempio, per filtrazione e/o separazione naturale come nel caso del plasma, del liquido pleurico o ascitico.

La separazione di un campione di sangue con Ficoll è convenzionalmente effettuata
20 dal tecnico del settore nel suo lavoro quotidiano e descritta in qualsiasi manuale di laboratorio, pertanto non necessita in questa sede di ulteriori approfondimenti. Preferibilmente, tale separazione è effettuata mediante centrifugazione. In una forma di realizzazione della presente invenzione, il primo passaggio del metodo di isolamento delle cellule CTC è ottenuto mediante centrifugazione a circa per 20 minuti a 4°C.

25 Come conseguenza dell'operazione appena descritta le diverse componenti del campione di interesse si separeranno lungo il gradiente secondo il loro specifico valore di densità. L'inventore del presente metodo ha sorprendente individuato una fase del gradiente di Ficoll lungo la quale preferenzialmente si concentrano le CTC. Tale fase del gradiente di Ficoll corrispondente alla fase con valore di densità compreso tra circa
30 1.080 e 1.090 (kg/m^3), fase che non è stata mai descritta o suggerita in letteratura

come utile a isolare cellule tumorali circolanti. In particolare, lo stato della tecnica anteriore indica come valore utile allo scopo di cui sopra, un valore compreso tra 1.050-1.070 (kg/m³).

Dunque, il secondo passaggio del metodo qui descritto consiste nel prelevare dal campione separato su Ficoll, come precedentemente indicato, la fase con valore di densità compreso tra 1.080 e 1.090 (kg/m³). Opzionalmente, la fase così prelevata può essere diluita con un'opportuna soluzione, in cui per opportuna si intende una soluzione che non induce alcun tipo di alterazione chimico/fisica alla porzione di campione fin qui separato ed prelevato. Esempi di tali soluzioni sono tampone fosfato salina oppure una soluzione di citrato standard di soluzione salina (CSD), soluzione di lavaggio stringente (pH 7,0 a 71 °C, 0,06 M di NaCl, 6 mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O)

Successivamente, la fase del gradiente prelevata è sottoposta ad ulteriore separazione, preferibilmente mediante centrifugazione. In una forma di realizzazione della presente invenzione, tale centrifugazione è condotta a circa 1.500 rpm preferibilmente per 10 minuti ed a temperatura ambiente.

Il sedimento così ottenuto è infine recuperato. Tale sedimento corrisponde alle cellule tumorali circolanti, dunque alle CTC di un paziente e presenti in circolo.

In particolare, il metodo d'isolamento come qui definito si caratterizza per una resa relativamente al numero di CT isolate che è di circa 10⁵ cellule circolanti tumorali/ml di sangue o suo derivato.

Preferibilmente, le cellule circolanti tumorali sono cellule tumorali epiteliali. Per cellule tumorali epiteliali si intende cellule appartenenti ad un tessuto di tipo epiteliale, caratterizzato da una architettura geometrica e da un fenotipo specifico e ben differenziato.

Secondo una forma preferita di realizzazione del metodo oggetto della presente divulgazione, le cellule tumorali circolanti derivano da un tumore di tipo solido.

In generale, un tumore di tipo solido, è un tumore caratterizzato da un tessuto tumorale compatto con dei limiti e confini (la cui risoluzione è dipendente dal grado di infiltrazione) rispetto al tessuto circostante.

Il tumore di tipo solido da cui le CTC derivano è, preferibilmente, un tumore scelto nel gruppo comprendente: tumore al seno, tumore all'ovaio, tumore al polmone, tumore alla prostata, tumore al colon e tumori del sistema nervoso centrale pancreas, ovaio, ecc.

5 Ulteriore oggetto della presente descrizione è un kit per isolare una popolazione di cellule tumorali circolanti da un campione di sangue o da un suo derivato comprendente: almeno una provetta in cui la fase con un valore di densità compresa tra circa 1.080 e 1.090 (kg/m^3) è evidenziata, ed almeno una soluzione per effettuare un gradiente di Ficoll. Preferibilmente tale provetta è una provetta sterile di capacità
10 idonea a contenere una quantità di campione di sangue o suo derivato sufficiente ad effettuare la separazione secondo il metodo di cui sopra. La provetta si caratterizza per avere la regione corrispondente alla fase del gradiente di Ficoll compresa tra circa 1.080 e 1.090 (kg/m^3) delimitata in maniera visibile così da permettere e guidare l'operatore verso un corretto isolamento delle cellule cellulari tumorali secondo il
15 metodo qui rivendicato. L'assenza di un'evidenziazione della fase 1.080 e 1.090 (kg/m^3) sulla provetta comporterebbe il prelievo di fasi caratterizzate dalla presenza di componenti del sangue, come ad esempio, linfociti e monociti, con conseguente contaminazione del campione di CTC ottenuto. Appare evidente che la quantità dell'aliquota della soluzione per effettuare un gradiente di Ficoll sarà scelta tenuto
20 conto della capacità e del numero della provetta compresa nel kit di cui sopra.

Il kit può, ulteriormente comprendente almeno un mezzo operativo utile ad effettuare l'isolamento delle cellule tumorali circolanti secondo il metodo qui divulgato. Pertanto tali mezzo può essere scelto nel gruppo comprendente una: provetta, pipetta, provetta con EDTA, siringa, ago tampone fosfato salino e acqua sterile.

25

Esempi

Selezione dei pazienti e raccolta campione di sangue periferico

I criteri di eleggibilità dei pazienti da cui è stato prelevato un campione di sangue periferico comprendono le seguenti caratteristiche:

30 - pazienti affetti da tumore solido localizzato non sottoposti a trattamento anticancro;

- pazienti affetti da cancro metastatico prima del trattamento anticancro p sottoposti a terapia un anno prima;

- pazienti per i quali l'analisi istologica della massa di tumore primaria era negativa o < 20% per una componente neuro-endocrina

5 Come campioni controlli sono stati utilizzati campioni di sangue periferico di genitori sani dei pazienti selezionati come sopra dettagliato.

5 ml di sangue da ogni paziente o soggetto sano sono raccolti in provette contenenti EDTA. I campioni sono gentilmente invertiti per circa 10 volte e mantenuti a temperatura ambiente ed il successivo processamento è effettuato entro 4 ore dal
10 prelievo di sangue. Ai 5 ml di campione di sangue è aggiunto 10 ml di tampone di diluizione (PBS1X, tampone fosfato salino) e successivamente la miscela è centrifugata a 1.500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Il sedimento ottenuto è risospeso con PBS1x per ottenere 4 ml di o multipli da 4 ml. E' opportuno aggiungere al campione così processato un inibitore di lisi cellulare.

15 Separazione delle cellule tumorali circolanti, presenti nel campione di sangue, mediante gradiente di densità.

Predisporre un gradiente di densità Ficoll® come noto al tecnico del settore o come descritto nelle istruzioni dello specifico fornitore (ad esempio GE Healthcare). Applicare 4 ml del campione processato, come precedentemente descritto, su 3 ml di
20 gradiente di densità. In seguito, centrifugare a 700 g per 20 minuti a 4°C al fine di ottenere la separazione delle cellule presenti nel campione di sangue nelle fasi del gradiente corrispondenti al loro densità. Prelevare la fase del gradiente con densità compresa tra circa 1.080-1.090 (kg/m³) e corrispondente alla fase in cui sono presenti le CTC. Trasferire tale fase contenente CTC e diluire 1:1 con PBS1X. Infine,
25 centrifugare a 1500 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e recuperare il sedimento comprendente le cellule tumorali circolanti. Un confronto tra numero di cellule tumorali circolanti isolate per ml di sangue rispetto ad 1 ml di sangue del medesimo paziente ma non processato come appena descritto, mostra un rapporto di 10³ (10⁸ CTC del campione non processato/10⁵ CTC campione processato).

30 Analisi del campione di CTC isolato

Le cellule tumorali circolanti ottenute come precedentemente dettagliato, sono state caratterizzate dal punto di vista fenotipico mediante lo studio dell'espressione di specifici marker tumorali. In particolare, sono state analizzate le seguenti proteine: calpaina-2 (tumore al polmone), Epcam (espresso nella maggior parte dei tumori differenziati) e fibronectina (presente nelle cellule tumorali che presentano il fenomeno della transizione epitelio-mesenchimale, cioè cellule tumorali che nel tessuto tumorale svolgono anche il ruolo di supporto o stromale al tessuto epiteliale maligno) mediante citofluorimetria.

Cellule tumorali circolanti e origine della lesione tumorale.

10 Cellule tumorali prelevate da campione di tumore al polmone (PT), cellule tumorali circolanti (CTC) ottenute da campioni di sangue, isolate come precedentemente descritto, prima (C1) e dopo (C2) rimozione chirurgica del tumore sono poste in coltura per 3 settimane (definire nello specifico le condizioni di coltura) e successivamente raccolte e lisate per ottenere estratti proteici totali. L'espressione del marker di tumore metastatico calpaina-2 è stata valutata mediante Western Blotting usando un anticorpo anti-Calpain 2 [1E8] (ab713) su SDS-page al 7%. Come mostrato in figura 3, le CTC prima della rimozione chirurgica del tumore (C1) mostrano un'espressione della calpaina-2, identificabile come da istruzione del fornitore dalla banda di 80KDa e 83KDa, quantitativamente paragonabile a quelle delle cellule direttamente prelevate dal tumore (PT), espressione che decresce significativamente dopo 7 e 20 giorni dal trattamento chirurgico.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per isolare una popolazione di cellule tumorali circolanti da un campione di sangue, o un suo derivato, ottenuto da un paziente affetto o potenzialmente affetto da tumore comprendente i seguenti passaggi:
- 5
- a) separare detto campione di sangue o suo derivato su un gradiente di Ficoll;
 - b) prelevare dal campione separato la fase con valore di densità compreso tra 1.080 e 1.090 (kg/m^3);
 - c) diluire la fase prelevata;
 - 10 d) centrifugare la fase prelevata e diluita; e
 - e) recuperare il sedimento ottenuto.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule tumorali circolanti sono cellule epiteliali.
- 15
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui dette cellule tumorali circolanti derivano da un tumore di tipo solido
4. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui detto tumore solido è scelto nel
- 20 gruppo comprendente: tumore al seno, tumore al polmone, tumore alla prostata, tumore al colon e tumori del sistema nervoso centrale.
5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il campione di detto derivato del sangue è un campione di plasma, liquido pleurico o ascitico.
- 25
6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detto passaggio a) di separazione è effettuato mediante centrifugazione.
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui detta centrifugazione è effettuata a
- 30 700g per 20 minuti a 4°C.

8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui detta centrifugazione al punto d) è effettuata a 1.500 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente.

5

9. Kit per isolare una popolazione di cellule tumorali circolanti da un campione di sangue o da un suo derivato da un paziente affetto o potenzialmente affetto da tumore comprendente: almeno una provetta in cui la fase con un valore di densità tra 1.080 e 1.090 (kg/m^3) è evidenziata, ed almeno un'aliquota di una soluzione per effettuare un gradiente di Ficoll.

10

10. Kit secondo la rivendicazione 9, ulteriormente comprendente almeno un mezzo scelto nel gruppo comprendente una: provetta, pipetta, provetta con EDTA, siringa, ago, aliquota con tampone fosfato salino e aliquota di acqua sterile.

15

Tabella 1

Tipi di cellule	Numero medio cellule/per ml di sangue fresco (%)	Valore gradiente di densità (kg/m³)
Eritrociti	5,000,000,000 (da 4,4 to 5,9 x10 ⁹) (94%)	1092
Leucociti - Linfociti	2,400,000 (da1,2-3,5 x10 ⁶) (0.04%)	1050-1069
Leucociti - Monociti	300,000 (0-0,5 x10 ⁶) (0,005%)	1050-1069
Leucociti- Granulociti	4,000,000 (da1,4-6,6 x10 ⁶) (0.07%)	1087
Piastrine	295,000,000 (da150- a 440 x10 ⁶) (5,5%)	1040
Totale	5,302,000,000	
Cellule Tumorali Circolanti	?? (da0.2 a 1000)	1057-1069

Tabella 2

Tipi di cellule	Media di cellule/per ml di mezzo di coltura	Marker usati
Eritrociti	2-10%	CD35
Leucociti-Linfociti	4-6%	CD4-CD8-CD56
Leucociti-Monociti	1-8%	CD31
Leucociti-Granulociti	2-1%	CD31
Piastrine	0-2%	CD60
CTC Epcam+(CD45-)	3,4-7%	Epcam
CTC Citocheratina+(CD45)	0-1%	Citocheratina in base al tessuto tumorale primitivo

FIGURA 1/3

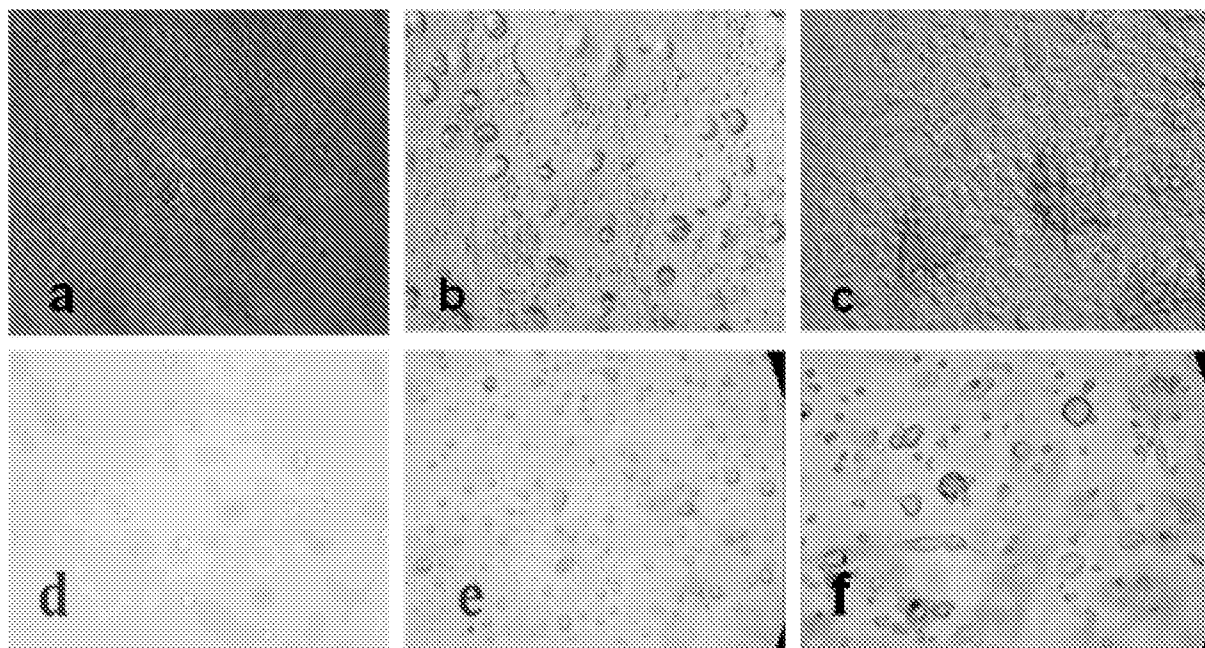


FIGURA 2/3

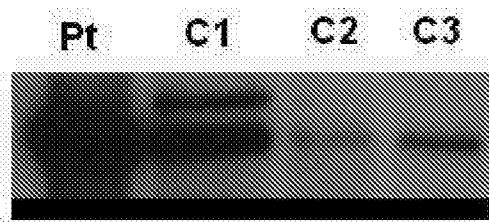


FIGURA 3/3