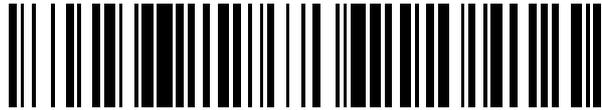


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 726**

51 Int. Cl.:

**A61M 1/36** (2006.01)

**B01J 20/28** (2006.01)

**B01J 20/32** (2006.01)

**B01D 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2007 PCT/US2007/006101**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2007 WO07103572**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07752778 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 1993600**

54 Título: **Eliminación extracorpórea de partículas microvesiculares**

30 Prioridad:

**09.03.2006 US 780945 P**

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

**07.01.2020**

73 Titular/es:

**AETHLON MEDICAL, INC. (100.0%)  
9635 Granite Ridge Drive, Suite 100  
San Diego, CA 92123, US**

72 Inventor/es:

**ICHIM, THOMAS y  
TULLIS, RICHARD H.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 736 726 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

Eliminación extracorpórea de partículas microvesiculares

## 5 Campo de la Invención

La presente invención se refiere al campo de los métodos y dispositivos terapéuticos para la eliminación extracorpórea de partículas microvesiculares, útiles, por ejemplo, para revertir la supresión inmunitaria en un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un paciente con cáncer) a través de medios extracorpóreos.

10

## Antecedentes de la Invención

El control inmunológico de la neoplasia ha sido un tema de intensa investigación que se remonta a los días de William Coley, quien a principios del siglo XX informó potente inducción de remisión del tumor a través de la administración de varios extractos bacterianos inmunoestimulantes no específicos, que se conocieron como "Toxinas de Coley" (1). Las sugerencias sobre la capacidad para inducir respuestas inmunológicas anticancerígenas provinieron también de experimentos en la década de 1920 que demuestran que la vacunación con células tumorales no viables aumenta una "resistencia" específica al desafío secundario, aunque en ese momento, no se conocía el concepto de emparejamiento del MHC y era posible que la resistencia secundaria fuera solo un producto de la sensibilización alogénica (2). Aunque el campo de la inmunoterapia del cáncer ha sido muy controvertido a lo largo del siglo XX, algunos autores afirman que las respuestas inmunológicas son necesarias para el crecimiento del tumor (3), la época de la biología molecular ha demostrado que, de hecho, las respuestas inmunitarias son capaces de controlar que inicien tumores, así como en algunos casos que inhiban el crecimiento de tumores establecidos.

15

20

25

30

35

Demostrado originalmente en el sistema murino, el concepto de una respuesta antitumoral productiva se asoció a un perfil de citoquinas que se denomina Th1, mientras que una respuesta antitumoral ineficaz se asoció a Th2. El método prototípico para evaluar la actividad de Th1 fue mediante la cuantificación de la citoquina IFN- $\gamma$  (4). A nivel epigenético, se conoce que la estructura de la cromatina de las células Th1 y Th2 es distinta, de este modo se proporciona una base sólida en la que una vez que una célula T *naïve* se ha diferenciado en una célula Th1 o Th2, las partes silenciadas y activadas de la cromatina pasan a células de progenie, de este modo el fenotipo es estable (5). La activación de los factores de transcripción que inducen múltiples genes GATA-3 (6), STAT6 (7, 8) en células Th2, y T-bet (9), y STAT4 (10) en células Th1, se asocia a tales cambios de cromatina. En consecuencia, se han realizado estudios usando ratones inactivados para STAT6 como modelo de una respuesta inmunitaria que carece de influencias de Th2, que predomina, de este modo, mediante Th1. Los tumores que se administran a animales inactivados para STAT6 se rechazan espontáneamente (11), o la inmunidad a ellos se logra con una potencia mucho mayor en comparación con los animales de tipo salvaje (12). Además, se observa una resistencia mayor a la metástasis mediada inmunológicamente (13). De acuerdo con el equilibrio Th1/Th2, los ratones que carecen de STAT4 desarrollan tumores acelerados en un modelo de carcinogénesis que se induce químicamente (14).

40

45

50

55

En la situación clínica, se establece bien la correlación entre respuestas inmunitarias suprimidas y una incidencia mayor de cáncer. Por ejemplo, la deficiencia inmunológica natural, como la anomalía congénita del síndrome de Chediak-Higashi, en la que los pacientes tienen una función anormal de las células asesinas naturales, se asocia a una respuesta inmunitaria debilitada global. En esta población, la incidencia global de tumores malignos es 200-300 veces mayor que en la población general (15). En otro ejemplo, se investigó en un estudio epidemiológico un polimorfismo específico del gen del receptor de IL-4 que se conoce se asocia a respuestas aumentadas de Th2. El análisis de regresión multivariada mostró que el genotipo específico de la IL-4R que se asocia a la actividad aumentada de Th2 era un factor pronóstico independiente para una supervivencia más corta del cáncer y un grado histopatológico más avanzado (16). Además de las anomalías genéticas innatas, los regímenes inmunosupresores que se usan para el efecto anti rechazo post-trasplante se asocian a una inhibición selectiva de las respuestas Th1 (17-19). En apoyo del concepto de que la supresión de la inmunidad Th1 se asocia a la aparición del cáncer, la incidencia de cáncer en la población post-trasplante aumenta notablemente en comparación con los controles que viven en condiciones ambientales similares (20-25). En términos de la supresión inmunitaria que se asocia a la enfermedad, los pacientes que se infectan por el VIH tienen también una predisposición marcada a una variedad de tumores, especialmente, pero que no se limitan a linfomas, como un resultado de la inmunodeficiencia (26).

60

65

Aunque los ejemplos anteriores apoyan una relación entre la supresión inmunitaria (o la desviación de Th2) y el cáncer, se documenta también la situación opuesta de la estimulación inmunitaria que resulta en una respuesta anticancerígena. Numerosos ensayos clínicos que usan enfoques específicos de antígenos, como la vacunación con antígenos tumorales solos (27, 28), antígenos tumorales que se unen a inmunógenos (29, 30), antígenos tumorales que se administran solos (31) o en combinación con moléculas coestimuladoras mediante métodos virales (32), los antígenos tumorales que se cargan en células dendríticas *ex vivo* (33-35), o la administración de células T reactivas a tumores que se generan *in vitro* (36), han demostrado todos algunos efectos clínicos. Desafortunadamente, hasta la fecha, no existe un método seguro, reproducible y de aplicación en masa para inducir terapéuticamente la regresión de tumores establecidos, o la metástasis a través de la inmunoterapia. Los agentes inmunoterapéuticos aprobados, como la administración sistémica de citoquinas, se asocia a efectos adversos graves, así como respuestas mediocres y aplicabilidad a un subconjunto de pacientes muy limitado.

En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de desarrollar una inmunoterapia exitosa capaz de estimular respuestas inmunitarias específicas que solo se dirijan al tejido neoplásico, o componentes del tejido huésped cuya actividad sea necesaria para la progresión de la neoplasia (es decir, endotelio). El desarrollo de una inmunoterapia tan exitosa se ve obstaculizada por la supresión del sistema inmunitario del huésped por parte del cáncer. Los experimentos que se realizaron en la década de 1970 demostraron la existencia de "factores de bloqueo" inmunológicos que inhibían específicamente las respuestas de los linfocitos al antígeno. Parte de este trabajo inicial implicó el cultivo de linfocitos autólogos con células tumorales autólogas en presencia de un suero sano de terceros. Este cultivo dio como resultado una inhibición del crecimiento del tumor autólogo como resultado de los linfocitos. Los linfocitos de terceros no inhibieron el crecimiento del tumor. Curiosamente, cuando se añadió suero autólogo a los cultivos, no se observó inhibición mediada por los linfocitos del crecimiento tumoral. Estos experimentos dieron lugar al concepto de "factores de bloqueo" específicos del antígeno y se encontraron en el cuerpo de pacientes con cáncer que incapacitan la inmunidad exitosa del tumor (37-39).

Se observó una demostración más reciente de la supresión tumoral de la función inmunitaria en experimentos que muestran que la función de las células T se suprime en términos de incapacidad para secretar interferón gama debido a una división del componente crítico de transducción del receptor de células T, la cadena TCR-zeta. Originalmente, la división de la cadena zeta se identificó en las células T con tendencia a sufrir apoptosis. Aunque se ha presentado una amplia variedad de explicaciones para la división de la cadena zeta, se postuló que una causa particular eran las microvesículas que secretan los tumores.

Desde principios de la década de 1980 se conocen la microvesículas que secretan las células tumorales. Se estimó que tenían entre 50 y 200 nanómetros de diámetro y se asociaban a una variedad de efectos inhibidores inmunitarios. Específicamente, se demostró que tales microvesículas no solo podían inducir la apoptosis de las células T, sino que también podían bloquear diversos aspectos de la señalización, proliferación, producción de citoquinas y citotoxicidad de las células T. Aunque surgió mucho interés en dichas microvesículas, se desarrollaron pocas aplicaciones terapéuticas, ya que no se habían caracterizado a nivel molecular.

La investigación que se presenta identificó independientemente otro tipo de estructuras similares a las microvesiculares, que se denominaron "exosomas". Definidos originalmente como pequeños (es decir, 80-200 nanómetros de diámetro), los exosomas se observaron inicialmente en los reticulocitos en proceso de maduración. Posteriormente, se descubrió que los exosomas son un método potente de comunicación de células dendríticas con otras células presentadoras de antígenos. Se observó que los exosomas que secretan las células dendríticas contenían niveles extremadamente altos de MHC I, MHC II, moléculas coestimuladoras y varias moléculas de adhesión. Además, los exosomas de células dendríticas contienen antígenos que dicha célula dendrítica había engullido previamente. La capacidad de los exosomas para actuar como "células presentadoras de mini-antígenos" ha estimulado a los investigadores del cáncer a impulsar las células dendríticas con antígenos tumorales, recolectar los exosomas que la célula dendrítica que se pulsa secreta con antígenos tumorales y usar estos exosomas para la inmunoterapia. Se vio que tales exosomas eran capaces de erradicar tumores establecidos cuando se administraban en varios modelos murinos. La capacidad de los exosomas dendríticos para preparar poderosamente el sistema inmunitario provocó la pregunta de si los exosomas pueden tener también un papel inductor de tolerancia o supresor inmunitario. Ya que se ha establecido que el exosoma tiene una alta concentración de antígenos tumorales, surgió la pregunta de si los exosomas pueden inducir un proceso de activación de células T abortivas que conduce a la anergia. Específicamente, se conoce que numerosas células tumorales expresan el ligando de la molécula Fas que induce la apoptosis de células T.

El ligando Fas es una proteína de membrana integral de tipo II que pertenece a la familia del TNF cuya expresión se observa en una variedad de tejidos y células, tales como los linfocitos activados y la cámara anterior en el ojo. El ligando Fas induce la muerte celular apoptótica en varios tipos de células, células blanco a través de su receptor correspondiente, CD95/APO1. El ligando Fas no solo juega papeles importantes en la homeostasis de los linfocitos activados, sino que también se ha implicado en establecer un estado de privilegio inmunitario en los testículos y en los ojos, así como en un mecanismo mediante el cual los tumores escapan de la muerte inmunomediada. En consecuencia, dada la expresión del ligando Fas en una variedad de tumores, nosotros y otros hemos buscado, y hemos demostrado con éxito que el ligando Fas se expresa en exosomas que secretan las células tumorales (40).

Debido a la capacidad de los exosomas para mediar en una variedad de señales inmunológicas, se propuso que en el sistema modelo, al comienzo del proceso neoplásico, los exosomas que secretan los tumores induzcan selectivamente la apoptosis de las células T específicas del antígeno, a través de la activación del receptor de células T, que a su vez aumenta la expresión de Fas en la célula T, posteriormente, la molécula de ligando Fas en el exosoma induce apoptosis. Este proceso puede ocurrir por una interacción directa entre el exosoma tumoral y la célula T, o puede ocurrir indirectamente por exosomas tumorales que se unen a las células dendríticas, y luego, posteriormente, cuando las células T se unen a las células dendríticas en áreas linfáticas, el exosoma en realidad se une mediante células dendríticas y usa la adhesión de células dendríticas/moléculas coestimuladoras para formar una interacción estable con las células T e inducir la apoptosis. En el contexto de pacientes con cáncer más avanzados, donde los exosomas alcanzan concentraciones sistémicas más altas, la inducción de la apoptosis de células T ocurre de una manera dependiente del MHC I, no específica al antígeno, sino al ligando Fas.

El reciente reconocimiento de que los exosomas que los tumores secretan son idénticos a las microvesículas que los tumores secretan, que se describieron en la década de 1980, (41), ha estimulado una amplia variedad de investigaciones sobre la capacidad supresora de dichas microvesículas. Específicamente, las microvesículas inmunosupresoras se identificaron no solo en pacientes con cáncer (42, 43), sino también en situaciones de embarazo (44-46), tolerancia al trasplante (47, 48) y tolerancia oral (49, 50).

Los métodos anteriores para inducir inmunidad anticancerígena se han centrado en la estimulación de respuestas inmunitarias innatas o específicas, sin embargo, se ha realizado relativamente poco trabajo clínico en términos de deprimir las funciones inmunitarias de los pacientes con cáncer. Específicamente, un paciente con cáncer que tiene exosomas inductores de tolerancia tiene pocas posibilidades de aumentar una respuesta inmunitaria antitumoral exitosa. Esta puede ser una de las causas de los resultados mediocres, si no directamente deficientes, de la inmunoterapia actual.

Otros han intentado activar del sistema inmunitario de los pacientes con cáncer usando la eliminación extracorpórea de "factores de bloqueo". Específicamente, Lentz en la patente de los Estados Unidos N° 4,708,713 describe un método extracorpóreo para eliminar proteínas de aproximadamente 200 kDa, que se asocian a la supresión inmunitaria. Aunque Lentz ha generado resultados muy prometedores usando este enfoque, el enfoque es: a) no selectivo para inhibidores específicos; b) teóricamente daría como resultado la pérdida de citoquinas inmunoestimulantes; c) no es aplicable en gran escala; y d) no tendría ningún efecto contra las microvesículas, que los tumores secretan, que son mucho más grandes de 200 kDa. Además, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2005/0265996, Lentz describe la eliminación de proteínas receptoras específicas de la sangre usando anticuerpos, citoquinas o péptidos que se unen específicamente a los receptores.

Las propiedades que se descubrieron recientemente de las microvesículas, en general, y de las microvesículas tumorales, específicamente, las han convertido en un objetivo muy prometedor para la eliminación extracorpórea. Las propiedades tales como la expresión aumentada del MHC I, el ligando Fas, la afinidad aumentada hacia las lectinas y el contenido modificado de esfingomiélin permitiendo el uso de dispositivos extracorpóreos para lograr su eliminación selectiva. Además, el tamaño de las microvesículas permitiría la eliminación no selectiva ya sea sola o como una de una serie de pasos en la eliminación selectiva.

#### Resumen de la Invención

En este documento se divulgan métodos de estimulación inmunitaria y/o de activación inmunitaria usando técnicas extracorpóreas para eliminar las microvesículas de la circulación como se define en las reivindicaciones.

En este documento se divulgan también métodos para eliminar microvesículas de la circulación de un sujeto que lo necesita (por ejemplo, pacientes con cáncer), activando, de este modo, la supresión inmunitaria presente en dichos sujetos. Por consiguiente, aquí se enseña el uso de diversos dispositivos extracorpóreos y métodos para producir dispositivos extracorpóreos para su uso en la eliminación del contenido de microvesículas en sujetos que lo necesitan. El propio tumor puede elaborar dichas microvesículas, o las pueden generar células no malignas bajo la influencia de tumores solubles o interacciones dependientes del contacto. Dichas microvesículas pueden suprimir directamente el sistema inmunitario del huésped mediante la inducción de la apoptosis de las células T, la inhibición de la proliferación, la incapacidad, la anergia, la desviación en la capacidad de producción de citoquinas o la división de la cadena zeta del receptor de las células T, o alternativamente dichas microvesículas pueden suprimir indirectamente el sistema inmunitario a través de la modificación de la función de otras células inmunológicas como las células dendríticas, las células NK, las células NKT y las células B. Dichas microvesículas pueden suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral del huésped ya sea de una manera específica al antígeno o no específica al antígeno, o ambas.

Uno de los objetivos de la presente divulgación es proporcionar un tratamiento eficaz y relativamente benigno para el cáncer.

Otro objetivo es proporcionar una terapia adyuvante y/o neoadyuvante para usar junto con los tratamientos contra el cáncer que se usan actualmente que requieren una respuesta inmunitaria funcional para la eficacia.

Otro objetivo es proporcionar una terapia adyuvante y/o neoadyuvante para usar junto con los tratamientos contra el cáncer que se usan actualmente, que estimulan la respuesta inmunitaria de un sujeto que la necesita de una manera específica al antígeno.

Otro objetivo es proporcionar una terapia adyuvante y/o neoadyuvante para usar junto con los tratamientos para el cáncer que se usan actualmente, que estimulan la respuesta inmunitaria de un sujeto que lo necesita de una manera no específica al antígeno.

Otro objetivo es proporcionar mejoras en el tratamiento extracorpóreo del cáncer a través de la selección del novedoso blanco de las microvesículas que se asocian a tumores.

Otro objeto es proporcionar perlas u otros tipos de partículas que puedan formar una matriz fuera de un filtro de fibra hueca, teniendo dicho componente de matriz un tamaño mayor que los poros de dicho filtro de fibra hueca, y dichas perlas u otros tipos de partículas que se unen a agentes que captan las microvesículas.

5 Otro objetivo es proporcionar mejoras en el tratamiento extracorpóreo del cáncer a través de la selección del novedoso blanco de las microvesículas que se asocian a tumores que contienen propiedades únicas que no se encuentran en las microvesículas que se encuentran en pacientes sin cáncer.

10 Otro objetivo es proporcionar dispositivos de afinidad específica mejorados, en particular dispositivos de inmunoadsorción y métodos útiles para la eliminación de microvesículas que se asocian al cáncer, de pacientes con cáncer. Específicamente, los dispositivos de inmunoadsorción usan proteínas con afinidad a los componentes de las microvesículas que se asocian al tumor. Dichas proteínas incluyen anticuerpos tales como anticuerpos contra el ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II o proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas, contribuyendo a la supresión inmunitaria que se encuentra en un paciente con cáncer. Dentro de la invención se contemplan proteínas que actúan como ligandos para las proteínas microvesiculares, dichas proteínas pueden existir actualmente o se pueden generar mediante medios *in silico* que se basan en cualidades conocidas de proteínas específicas de microvesículas.

20 De acuerdo con un aspecto particular de la presente invención, se proporcionan dispositivos para tratar el cáncer que se basan en la utilización de la adsorción de afinidad específica de microvesículas que se asocian al estado canceroso. Los adsorbentes de afinidad que se usan de acuerdo con la presente invención son inmunoadsorbentes y adsorbentes químicos de afinidad específica no se basan en el sistema inmunitario. Más específicamente, la adsorción se puede lograr con base en las propiedades específicas de las microvesículas que se asocian al cáncer, una de las cuales es la afinidad preferencial a las lectinas y otros compuestos que se unen al azúcar.

30 En una realización particular, la invención proporciona un dispositivo para el tratamiento extracorpóreo de sangre o una fracción de sangre tal como el plasma. Este dispositivo tiene un circuito de circulación de sorbente, que se adhiere y retiene las microvesículas, y un circuito de circulación sanguínea a través del cual las células sanguíneas fluyen sin impedimentos. El dispositivo se puede construir en diversas variaciones que serían claras para un experto en la técnica. Específicamente, el dispositivo se puede construir como un sistema cerrado de manera que no se necesita un depósito de acumulación y el sistema de circulación de sorbente acumula las microvesículas, mientras que permite que la materia que no es microvesícula fluya nuevamente hacia el sistema de circulación sanguínea y posteriormente se devuelva al paciente. Alternativamente, el dispositivo puede usar un depósito acumulador que se conecta al circuito de circulación de sorbente y se conecta de tal manera que se descarte el líquido de desecho, pero el fluido que repona el volumen se inserta nuevamente en el sistema de circulación sanguínea, de modo que la sangre purificada sustancialmente de microvesículas que se reintroduce en dicho paciente se asemeja a un hematocrito de homología significativa con la sangre que se extrajo de dicho paciente.

#### 40 Descripción Detallada de la Realización Preferida

Para los propósitos de avanzar y aclarar los principios de la invención que se divulga en el presente documento, se hará referencia a ciertas realizaciones y se usará un lenguaje específico para describir dichas realizaciones. No obstante, se entenderá y se aclarará que no se pretende, de este modo, limitar el alcance de la invención. Las alteraciones, modificaciones adicionales y aplicaciones de los principios de la invención tal como se describen en el presente documento sirven solo como una realización específica, sin embargo, un experto en la técnica a la que se refiere la invención entenderá que las siguientes son, de hecho, solo realizaciones específicas con propósitos ilustrativos, y derivarán tipos de aplicaciones similares tras leer y entender esta divulgación.

50 En este documento se proporcionan métodos para eliminar partículas microvesiculares de un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos:

- a) establecer un sistema de circulación extracorpóreo que comprende poner en contacto la sangre entera o componentes de la misma con un singular o una pluralidad de agentes capaces de unirse a microvesículas que se encuentran dentro de dicha sangre o componentes de la misma; y
- b) devolver dicha sangre o componentes de la misma a la sangre original, conteniendo sustancialmente dicha sangre o componentes sanguíneos menos partículas inmunosupresoras en comparación con la sangre o los componentes sanguíneos que residen originalmente en la sangre.

60 Los métodos son útiles, por ejemplo, para eliminar la represión de la respuesta inmunitaria, que incluye la restauración de uno o más de las siguientes: función de células T, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de células B. Las aplicaciones que se prefieren actualmente de los métodos incluyen la restauración de uno o más de las siguientes: función de células T, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta, y de células B incluye la prevención de la apoptosis; se prefiere especialmente que la restauración de uno o más de las siguientes: función de células T, células asesinas

naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de células B incluye restauración y/o dotación de actividad capaz de inhibir la progresión del cáncer.

5 Inhibir la progresión del cáncer como se contempla en el presente documento se logra de varias maneras, por ejemplo, mediante una o más de las siguientes: citólisis directa de células tumorales, inducción directa de apoptosis de células tumorales, inducción de citólisis de células tumorales a través de la estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inducción de apoptosis de células tumorales a través de la estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inhibición de la metástasis de células tumorales, inhibición de la proliferación de células tumorales e inducción de senescencia en la célula tumoral.

10 Las células tumorales de ejemplo que se contemplan para el tratamiento en el presente documento se seleccionan del grupo de cánceres que consisten en: sarcomas de tejido blando, riñón, hígado, intestino, leucemia, linfomas y cánceres de cerebro, esófago, cuello uterino, hueso, pulmón, endometrio, vejiga, mama, laringe, colon/recto, estómago, ovario, páncreas, glándula suprarrenal y próstata.

15 Los agentes capaces de unirse a las microvesículas que se contemplan para su uso en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: a) un singular o una pluralidad de especies de anticuerpos; b) un singular o pluralidad de proteínas (por ejemplo, lectinas); c) un singular o pluralidad de aptámeros, d) una superficie que restringe selectivamente del paso las microvesículas, y e) una superficie con adhesión selectiva a las microvesículas.

20 Los anticuerpos que se contemplan para su uso en el presente documento tienen una especificidad para proteínas que se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II y las proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria en un paciente con cáncer. Los anticuerpos que se prefieren actualmente son específicos para el ligando Fas, el MHC I y similares.

25 Las proteínas de unión que se contemplan para su uso en este documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: Fas, Receptor de células T, extractos de proteína que se aíslan de células T, extractos de proteína que se aíslan de células dendríticas y proteínas que se conoce poseen afinidad por proteínas de unión que se encuentra en las microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria.

30 Las superficies que se contemplan para su uso en el presente documento que restringen selectivamente el paso de dichas microvesículas tienen típicamente tamaños de poros en el intervalo de aproximadamente 20-400 nanómetros de tamaño, con superficies que tienen poros con un tamaño que se prefiere en el intervalo de aproximadamente 40-300 nanómetros de tamaño, con superficies que tienen poros con un tamaño que se prefiere especialmente en el intervalo de aproximadamente 50-280 nanómetros de tamaño.

35 Las superficies con adhesión selectiva a las microvesículas que se contemplan para su uso en este documento se pueden recubrir con un único compuesto, o una pluralidad de compuestos que se unen a partículas que se enriquecen en esfingomielina y con un nivel más bajo de fosfatidilcolina que se encuentra en las membranas celulares de las células no malignas.

40 En este documento se divulga también, los agentes capaces de unirse a las microvesículas se inmovilizan en una membrana porosa de fibra hueca. Por ejemplo, los agentes capaces de unirse a las microvesículas se inmovilizan en el exterior poroso de la membrana de fibra hueca.

45 De acuerdo con los métodos y dispositivos existentes para el tratamiento extracorpóreo de la sangre, se pueden integrar (en todo o en parte) con los métodos que se describieron anteriormente para aumentar la eliminación *ex vivo* de las microvesículas de una manera fisiológicamente aplicable. Por ejemplo, los métodos existentes para el tratamiento extracorpóreo de la sangre se pueden seleccionar de uno o más de los siguientes: a) hemofiltración; b) hemodiálisis; y c) hemodiafiltración. Un método existente que se prefiere actualmente para el tratamiento extracorpóreo de la sangre comprende la aféresis seguida de filtración.

50 De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporcionan dispositivos médicos útiles para la eliminación de microvesículas, que se asocian al cáncer, de la sangre de un paciente con cáncer, comprendiendo dicho dispositivo:

55 a) un conducto de admisión a través del cual entra la sangre de un paciente con cáncer que necesita tratamiento; b) un singular o una pluralidad de matrices capaces de adherirse a las microvesículas causantes de la supresión inmunitaria que se asocia al cáncer; y c) un sistema para la reintroducción de dicha sangre en el paciente que lo necesite, a través del cual, dicha sangre se reintroduce en condiciones fisiológicamente aceptables.

60

65

En un aspecto del dispositivo médico que se describió anteriormente, las matrices rodean una pluralidad de filtros de fibra hueca. Preferiblemente, los filtros de fibra hueca tienen un diámetro de tamaño suficiente para permitir el paso de las células sanguíneas a través del lumen y la difusión de partículas entre 80 y 300 nanómetros de tamaño.

- 5 En otro aspecto del dispositivo médico que se describió anteriormente, un agente de unión a microvesículas reacciona químicamente con un sustrato de alto peso molecular y se coloca en el exterior de dichas fibras huecas para unir líquidos de células no sanguíneas que penetran a través de los poros de dichas fibras huecas. Los agentes de unión a microvesículas de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes: a) un singular o una pluralidad de especies de anticuerpos; b) un singular o una pluralidad de proteínas (por ejemplo, lectinas); c) un singular o una pluralidad de aptámeros, d) una superficie que restringe selectivamente del paso las microvesículas, y e) una superficie con adhesión selectiva a las microvesículas.

15 Los anticuerpos de ejemplo que se contemplan para su uso en el presente documento tienen una especificidad para proteínas que se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II y proteínas que se encontraron presentes en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria en un paciente con cáncer. Los anticuerpos que se prefieren actualmente son específicos para el ligando Fas, el MHC I y similares.

20 Las proteínas de ejemplo que se contemplan para su uso en el dispositivo de la invención se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: Fas, Receptor de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células dendríticas y proteínas que se conoce poseen afinidad por proteínas de unión que se encuentran en microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria.

25 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para potenciar la respuesta anticancerígena mediada inmunológicamente que se obtiene mediante la vacunación de antígenos tumorales, comprendiendo dichos métodos:

- 30 a) inmunizar a un sujeto que lo necesite usando un único o una combinación de antígenos tumorales;  
 b) eliminar las microvesículas inmunosupresoras de los sueros de dicho sujeto mediante medios extracorpóreos; y  
 c) ajustar la cantidad de eliminación de microvesículas inmunosupresoras que se basan en la estimulación inmunitaria que se desea.

35 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto que lo necesita a través de la eliminación de partículas microvesiculares que se encuentran en la circulación sistémica de dicho sujeto, comprendiendo dichos métodos:

- 40 a) establecer un sistema de circulación extracorpóreo que comprende poner en contacto la sangre entera o componentes de la misma con un único o una pluralidad de agentes capaces de unirse a microvesículas que se encuentran dentro de dicha sangre o componentes de la misma; y  
 b) devolver dicha sangre o componentes de la misma al sujeto, conteniendo sustancialmente dicha sangre o componentes sanguíneos menos partículas inmunosupresoras en comparación con la sangre o componentes sanguíneos que residen originalmente en dicho sujeto.

45 Mejorar la respuesta inmunitaria como se contempla en el presente documento incluye uno o más de los siguientes: aumento de la función de células T, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de células B. En una realización que se prefiere actualmente, el aumento de la función de una o más de las células T, células asesinas naturales (NK), las células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de células B incluye la prevención de la apoptosis. En otra realización preferida, el aumento de la función de una o más de las células T, células asesinas naturales (NK), célula T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de las células B incluye la mejora y/o la dotación de actividad capaz de inhibir la progresión del cáncer.

55 Inhibir la progresión del cáncer que se contempla en el presente documento se logra de varias maneras, por ejemplo, mediante citólisis directa de células tumorales, inducción directa de apoptosis de células tumorales, inducción de citólisis de células tumorales a través de la estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inducción de apoptosis de células tumorales a través de la estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inhibición de la metástasis de células tumorales, inhibición de la proliferación de células tumorales e inducción de senescencia en la célula tumoral.

60 Las células tumorales que se contemplan para el tratamiento de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo de cánceres que consisten en: sarcomas de tejido blando, riñón, hígado, intestino, recto, leucemias, linfomas y cánceres de cerebro, esófago, cuello uterino, hueso, pulmón, endometrio, vejiga, mama, laringe, colon/recto, estómago, ovario, páncreas, glándula suprarrenal y próstata.

65 Los agentes capaces de unirse a las microvesículas que se contemplan para su uso en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: a) un singular o una pluralidad de especies de

anticuerpos; b) un singular o una pluralidad de proteínas (por ejemplo, lectinas); c) un singular o una pluralidad de aptámeros, d) una superficie que restringe selectivamente del paso las microvesículas, y e) una superficie con adhesión selectiva a las microvesículas.

5 Los anticuerpos que tienen especificidad para las proteínas que se contemplan para su uso en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II, y proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas, que contribuyen a la supresión inmunitaria que se encuentra en un paciente con cáncer Los anticuerpos que se prefieren actualmente son  
10 específicos para el ligando Fas, el MHC I y similares.

Las proteínas que se contemplan para su uso en este documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: Fas, Receptor de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células dendríticas y proteínas que se conoce poseen afinidad por las proteínas de unión  
15 que se encuentran en las microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria.

Las superficies que restringen selectivamente el paso de dichas microvesículas que se contemplan para su uso en el presente documento tienen típicamente un tamaño de poro en el intervalo de aproximadamente 20-400 nanómetros en tamaño, con tamaños de poros que se prefieren en el intervalo de aproximadamente 40-300 nanómetros en tamaño, y tamaños de poros que se prefieren específicamente en el intervalo de aproximadamente 50-280  
20 nanómetros en tamaño.

Las superficies con adhesión selectiva a las microvesículas que se contemplan para su uso en el presente documento se recubren con una variedad de agentes, por ejemplo, un único compuesto o una pluralidad de compuestos que se unen a partículas que se enriquecen en esfingomielina y con un nivel más bajo de fosfatidilcolina como se encuentra en las membranas celulares de células no malignas.  
25

En un aspecto, los agentes que se describieron anteriormente capaces de unirse a microvesículas se inmovilizan en una membrana porosa de fibra hueca, por ejemplo, en el exterior poroso de la membrana de fibra hueca.  
30

En otro aspecto de la invención, los dispositivos de tratamiento extracorpóreo de la sangre se integran (en todo o en parte) para aumentar la eliminación *ex vivo* de las microvesículas de una manera fisiológicamente aplicable. Los métodos existentes de ejemplo para el tratamiento extracorpóreo de la sangre se seleccionan de uno o más de los siguientes: a) hemofiltración; b) hemodiálisis; y c) hemodiafiltración. Un método existente que se prefiere  
35 actualmente para el tratamiento extracorpóreo de la sangre comprende la aféresis seguida de filtración.

De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto que lo necesita a través de la eliminación de partículas microvesiculares que se encuentran en la circulación sistémica de dicho sujeto, comprendiendo dichos métodos:  
40

a) establecer un sistema de circulación extracorpóreo que comprende poner en contacto la sangre entera o componentes de la misma con un único o una pluralidad de agentes capaces de unirse a las microvesículas que se encuentran dentro de dicha sangre o componentes de la misma, uniéndose a su vez dichos agentes a una pluralidad de objetos;  
45

b) realizar un paso de filtración tal que dichos objetos de un tamaño definido se capturen dentro de dicho sistema de circulación extracorpóreo; y

c) devolver dicha sangre o componentes de la misma al sujeto, conteniendo sustancialmente dicha sangre o componentes sanguíneos menos partículas inmunosupresoras en comparación con la sangre o los componentes sanguíneos que residen originalmente en dicho sujeto.  
50

Mejorar la respuesta inmunitaria que se contempla en el presente documento incluye uno o más de los siguientes: aumento de la función de células T, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), células T gama-delta y de las células B. Se prefiere actualmente que el aumento de la función de una o más de las células T gama-delta, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT) y de células B incluya la prevención de la apoptosis. Se prefiere también actualmente que el aumento de la función de una o más de las células T, célula asesina natural (NK), célula T asesina natural (NKT) célula T gama-delta y de las células B incluya la mejora y/o la dotación de actividad capaz de inhibir la progresión del cáncer.  
55

Inhibir la progresión del cáncer que se contempla en el presente documento se logra mediante uno o más de los siguientes procedimientos: citólisis directa de células tumorales, inducción directa de apoptosis de células tumorales, inducción de citólisis de células tumorales a través de estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inducción de apoptosis de células tumorales a través de estimulación de respuestas antitumorales intrínsecas del huésped, inhibición de la metástasis de células tumorales, inhibición de la proliferación de células tumorales e inducción de senescencia en las células tumorales.  
60

65

Las células tumorales que se contemplan para el tratamiento de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo de cánceres que consisten en: sarcomas de tejido blando, riñón, hígado, intestino, recto, leucemias, linfomas y cánceres de cerebro, esófago, cuello uterino, hueso, pulmón, endometrio, vejiga, mama, laringe, colon/recto, estómago, ovario, páncreas, glándula suprarrenal y próstata.

5 Los agentes capaces de unirse a las microvesículas que se contemplan para su uso en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: a) un singular o una pluralidad de especies de anticuerpos; b) un singular o pluralidad de proteínas (por ejemplo, lectinas); c) un singular o una pluralidad de aptámeros, d) una superficie que restringe selectivamente del paso las microvesículas, y e) una superficie con adhesión selectiva a las microvesículas.

15 La pluralidad de objetos que se contemplan para su uso en el presente documento comprende perlas que se fabrican a un tamaño o intervalo de tamaños específicos de una manera tal que dichos agentes capaces de unirse a microvesículas se pueden conjugar con dicha pluralidad de objetos. Preferiblemente, tales perlas tienen un intervalo de tamaño que se define para restringir su movimiento fuera de dicho sistema de circulación extracorpóreo, por ejemplo, las perlas tienen un intervalo de tamaño mayor que los poros de fibras huecas que se usan en sistemas extracorpóreos para restringir su movimiento fuera de dichos sistemas extracorpóreos. En un aspecto, tales perlas poseen propiedades que responden a un campo electromagnético, de tal manera que posteriormente de que dichas perlas entren en contacto con dichas microvesículas, dichas perlas se pueden eliminar o secuestrar mediante dicho campo electromagnético para evitar sustancialmente el movimiento de dichas perlas fuera de dicho sistema extracorpóreo.

25 Ejemplos de perlas que se contemplan para su uso en este documento son MACS™ perlas solas o que se conjugan con compuestos para permitir que dichas perlas formen complejos con dichos agentes capaces de unir microvesículas, Dynal™ perlas solas o que se conjugan con compuestos para permitir que dichas perlas formen complejos con dichos agentes capaces de unirse a microvesículas, y similares.

30 Los anticuerpos que se contemplan para su uso en el presente documento tienen una especificidad para proteínas que se seleccionan de un grupo que consiste en uno o más de los siguientes: ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II, y las proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria en un paciente con cáncer. Los anticuerpos que se prefieren actualmente son específicos para el ligando Fas, el MHC I y similares.

35 Las proteínas que se contemplan para su uso en este documento se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: Fas, Receptor de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células T, extractos de proteínas que se aíslan de células dendríticas y proteínas que se conoce poseen afinidad por las proteínas de unión que se encuentran en las microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria.

40 Las superficies que restringen selectivamente el paso de dichas microvesículas se encuentran generalmente en el intervalo de aproximadamente 20-400 nanómetros de tamaño, con microvesículas que se prefieren actualmente en el intervalo de aproximadamente 40-300 nanómetros de tamaño, y microvesículas que se prefieren especialmente en el intervalo de aproximadamente 50-280 nanómetros de tamaño.

45 Las superficies de ejemplo con adhesión selectiva a las microvesículas se recubren con un único compuesto, o una pluralidad de compuestos que se unen a partículas que se enriquecen en esfingomiélin y con un nivel más bajo de fosfatidilcolina que se encuentra en las membranas celulares de las células no malignas.

50 De acuerdo con esto, los agentes capaces de unirse a las microvesículas se pueden inmovilizar en una membrana porosa de fibra hueca, por ejemplo, en el exterior poroso de la membrana de fibra hueca.

55 De acuerdo con esto, los métodos y dispositivos existentes para el tratamiento extracorpóreo de la sangre, se pueden integrar (en todo o en parte) con los métodos que se describieron anteriormente para aumentar la eliminación *ex vivo* de las microvesículas de una manera fisiológicamente aplicable. Los métodos de ejemplo que se contemplan para su uso en el presente documento incluyen: a) hemofiltración; b) hemodiálisis; y c) hemodiafiltración, con un método preferido que incluye aféresis seguida de filtración.

60 De acuerdo con esto, la eliminación extracorpórea de microvesículas se puede realizar a través de la adhesión selectiva de dichas microvesículas a matrices o sustratos que se conjugan a agentes que poseen mayor afinidad a las microvesículas con un alto contenido de azúcar, en comparación con las microvesículas de un menor contenido de azúcar.

65 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para la eliminación extracorpórea de microvesículas de un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método pasar la sangre entera de dicho sujeto, o componentes sanguíneos separados, a través de un sistema capaz de unir y retener selectivamente microvesículas con base en uno o más de

su tamaño, carga, afinidad hacia las lectinas o afinidad hacia las moléculas que se conoce están presentes en dichas microvesículas.

5 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para la eliminación extracorpórea de microvesículas de un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos pasar la sangre entera de dicho sujeto, o componentes sanguíneos separados, a través de un sistema capaz de unir y retener las microvesículas de forma no selectiva con base en una o más de su tamaño, carga, afinidad hacia las lectinas, o afinidad hacia las moléculas que se conoce están presentes en dichas microvesículas.

10 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para la eliminación extracorpórea de microvesículas de un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos pasar la sangre entera de dicho sujeto, o componentes sanguíneos separados, a través de un sistema capaz de unir y retener selectivamente microvesículas con base en las similitudes entre las propiedades de las microvesículas y las membranas de las células cancerosas.

15 De acuerdo con esto, se proporcionan métodos para la eliminación extracorpórea de microvesículas de un sujeto que lo necesite, comprendiendo dichos métodos pasar la sangre entera de dicho sujeto o componentes de la sangre separados a través de un sistema capaz de unir y retener las microvesículas de forma no selectiva con base en las similitudes entre las propiedades de las microvesículas y las membranas de células cancerosas.

20 Cuando se llevan a cabo los métodos que se describieron anteriormente, las similitudes entre las microvesículas y las membranas de las células cancerosas que se asocian al cáncer incluyen la capacidad de unirse a una lectina o una pluralidad de lectinas. La referencia a las lectinas en este documento incluye GNA, NPA, Concanavalina A y cianovirina, con una lectina que se prefiere actualmente que es Concanavalina A.

25 En este documento se divulgan métodos que se pueden usar para el tratamiento extracorpóreo de la sangre o una fracción de la sangre para la eliminación de microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria en un paciente con cáncer. La sangre corre a través de un circuito de circulación extracorpórea que usa un cartucho de fibra hueca con las membranas de dichas fibras huecas que tienen permeabilidad suficiente para que las microvesículas que se encuentran en la sangre se eliminen a través de la membrana de las fibras huecas y hacia un área fuera de las  
30 fibras que contiene un sustrato que se une a un único o pluralidad de agentes capaces de adherirse a dichas microvesículas de manera tal que dichas microvesículas se unen a dicho agente y no vuelvan a entrar sustancialmente en las fibras huecas. Dentro del conocimiento de un experto en la técnica están disponibles numerosos tipos de sistemas de fibra hueca. La selección de dicho sistema de fibra hueca depende del volumen de sangre que se desee y la velocidad de paso de dicho volumen de sangre a través del sistema de fibra hueca.  
35 Específicamente, se pueden usar cartuchos de fibra hueca que tengan longitudes de 250 mm y que contengan 535 fibras huecas, que Amicon suministra, y que tengan las dimensiones de la fibra: I.D. 180 micras y O.D. 360 micras y el área de superficie de contacto total en el cartucho es de 750 cm<sup>2</sup>. Alternativamente, se puede usar el cartucho de filtro de fibra hueca "Plasmaflux P2" (que se vende en Fresenius) o los cartuchos Plasmart PS60 (que se vende en Medical srl). Ambrus y Horvath describen estos y otros sistemas de fibra hueca en la patente de los Estados Unidos  
40 N° 4,714,556. Se pueden usar también cartuchos de fibra hueca, como los que Tullis describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20040175291. Además, dichos cartuchos de fibra hueca y cartuchos de afinidad se consideran en general en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,714,556, 4,787,974 y 6,528,057.

45 Independientemente del sistema de fibra hueca que se use, el concepto necesario para la aplicación de la presente invención es que dichos filtros de fibra hueca son necesarios para permitir el paso de las células sanguíneas a través del interior de dicha fibra hueca, y permitir la difusión de microvesículas hacia el exterior. Con el fin de permitir tal difusión, los poros en la membrana de la fibra hueca deben tener un diámetro suficiente para permitir que las partículas tengan el intervalo desde el tamaño de 20 nanómetros hasta 500 nanómetros de diámetro. Más específicamente, los poros en la membrana de la fibra hueca deben ser de un diámetro suficiente para permitir que  
50 las partículas tengan un intervalo desde el tamaño de 50 nanómetros hasta 300 nanómetros de diámetro. Incluso más específicamente, los poros en la membrana de la fibra hueca deben tener un diámetro suficiente para permitir que las partículas tengan el intervalo desde el tamaño de 80 nanómetros hasta 200 nanómetros de diámetro. Durante la experimentación con diferentes fibras huecas, un experto en la técnica encontraría útil usar partículas de intervalos de tamaño similares a los de las microvesículas con el fin de calibrar y cuantificar la capacidad de varios  
55 tamaños de poros de filtros huecos. Un método para realizar esto es a través de la utilización de MACS™ disponible comercialmente. Perlas (Milteny Biotech), que tienen un tamaño de 60 nanómetros. Están disponibles también para este propósito perlas fluorescentes, de látex, esféricas que tienen el intervalo en tamaño desde 25 a 1000 nm (por ejemplo, de Duke Scientific (Palo Alto, CA)).

60 El sustrato o matriz que se usará para poner en práctica la presente invención debe permitir una permeación suficiente del flujo para que los componentes sanguíneos no celulares que entran en el espacio exterior a la fibra hueca se distribuyan por todo el material del sustrato o matriz, de modo que se haga un contacto sustancial entre las microvesículas que permean el filtro de fibra hueca y el agente de unión a la microvesícula que se une al sustrato o matriz. Un experto en la técnica conoce sustratos o matrices adecuados. Dichos sustratos o matrices incluyen gel de sílice, dextrano, agarosa, polímeros de nailon, polímeros de ácido acrílico, copolímeros de etileno y anhídrido del ácido maleico, aminopropil-sílice, aminocelita, perlas de vidrio, silicatos que contienen tierra de diatomeas u otros  
65

5 sustratos o matrices que se conocen en la técnica. Ejemplos de tales se describen en las siguientes patentes: Patente de los Estados Unidos N° 4,708,713 de Lentz, Patente de los Estados Unidos N° 5,667,684 de Motomura, Patente de los Estados Unidos N° 5,041,079 de Takashima *et. al.*, y Patente de los Estados Unidos N° 3,925,152 de Porath y Janson. Los agentes que se unen a dicho sustrato se eligen con base en la afinidad conocida a las microvesículas que se asocian al cáncer. Dichos agentes pueden ser capaces de unirse de forma no específica a dichas microvesículas, ya que la unión se produce tanto de microvesículas que no se asocian a tumores como de microvesículas que se asocian a tumores, o, a la inversa, dichos agentes pueden mostrar un cierto grado de selectividad para los exosomas que se derivan de tumores.

10 En una realización, dichos agentes se unen de manera no específica a todas las microvesículas debido a la expresión común de moléculas tales como el MHC I en microvesículas que se asocian a afecciones de neoplasia, y microvesículas que no. Específicamente, un agente que se uniría a ambos tipos de microvesículas sería un anticuerpo específico para las regiones no polimórfas del MHC I. Por lo tanto, en la realización de la invención, en la que se busca la eliminación no selectiva de microvesículas, los anticuerpos anti-MHC I se unirían a dicho sustrato  
15 elegido, y la combinación se colocaría para residir fuera de los filtros de fibra hueca para permitir la unión de dichas microvesículas al sustrato, sin embargo, las células sanguíneas y otros componentes de la sangre no se eliminarán durante el paso de la sangre a través del sistema revestido que contiene dichos filtros de fibra hueca, sustrato exterior y agente de unión de microvesículas.

20 Con el fin de lograr la eliminación no específica de microvesículas, otra realización de la invención es el uso de filtros de fibra hueca del tamaño suficiente de los poros, en el lado del filtro de fibra hueca para que salgan las microvesículas, mientras que no permite que las células sanguíneas salgan, y pasar una solución continua sobre dichos filtros de fibra hueca con el fin de eliminar dichas microvesículas que se filtran a través de los lados de los filtros de fibra hueca. En tal situación, sería crítico reintroducir nuevamente los otros componentes sanguíneos que  
25 escaparon del filtro de fibra hueca, como la albúmina, dentro de la sangre purificada con microvesículas, antes de devolver la sangre al sujeto.

30 Alternativamente, el cartucho de fibra hueca se puede sellar como se describe en Ambrus. En tal sistema, tanto la difusión como la convección hacen que los fluidos sanguíneos (exclusivos de las células sanguíneas) pasen a través de los poros de las fibras huecas y entren en contacto con las moléculas de captura que se unen a la matriz de fase sólida. Los fluidos (por ejemplo, plasma) regresan a la circulación en el extremo distal del cartucho a través de un proceso que se conoce como flujo de Starling. En este sistema, no hay una pérdida significativa de fluidos sanguíneos y, por lo tanto, no es necesario reemplazar los componentes sanguíneos.

35 En las situaciones en las que se desea una eliminación sustancialmente específica de las microvesículas que se asocian a tumores, dicho agente que se une a dicho sustrato fuera de dichos filtros de fibra hueca posee afinidad por las moléculas que se encuentran específicamente en dichas microvesículas que se asocian a tumores. Dicho agente puede ser un anticuerpo para la molécula del Ligando Fas, puede ser una proteína Fas recombinante, o puede dirigirse al MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I,  
40 complejos de péptidos del MHC I, y proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria en un paciente con cáncer. Otra realización de la invención aprovecha la similitud de las membranas tumorales con las microvesículas tumorales y la alta concentración que se conoce de manosa y otros azúcares en las membranas tumorales en comparación con las membranas de células no malignas.

45 En una situación en la que las microvesículas que se asocian a tumores se deben retirar, con un cierto grado de selectividad, de la circulación sistémica de un sujeto que lo necesite, dicho agente que se une a la matriz o al sustrato puede ser una lectina. Tullis en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20040175291 describe las metodologías específicas para el uso de lectinas en la eliminación de virus y estas metodologías se pueden usar también en parte o en su totalidad para poner en práctica la presente invención. En diversas realizaciones de la  
50 invención, es importante que dichos sistemas incluyan medios para mantener la sangre en condiciones similares a las que se encuentran en el huésped, de modo que, tras devolver dicha sangre al huésped, no se produzcan reacciones adversas. En otras palabras, está dentro del alcance de la invención usar tecnologías que los expertos en la técnica conocen para mantener la sangre en concentraciones de iones fisiológicos, osmolalidad, pH, hematocrito, temperatura y flujo, con el fin de evitar daños que se causen al sujeto, posterior a la reinfusión de  
55 sangre tratada como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen bien dichas tecnologías.

60 En este documento se divulga un sistema para la eliminación extracorpórea de microvesículas; ya sea eliminando selectivamente las microvesículas que se asocian a tumores, o microvesículas de manera no selectiva que se encuentran en sujetos sanos, así como en sujetos que portan tumores. La invención comprende varios componentes que interactúan, cuyo objetivo principal es la formación de un circuito funcional capaz de agotar las microvesículas con el fin de activar o, en algunos casos, aumentar la respuesta inmunitaria de un paciente con cáncer. Más específicamente, se usa un medio para separar la sangre de un sujeto que lo necesita (por ejemplo, un paciente con  
65 cáncer) en plasma y elementos celulares. Los medios apropiados para tal separación están disponibles comercialmente y el experto en la materia los conoce bien. Estos incluyen, por ejemplo, el Sistema Exorim, el sistema de Aféresis Hemocare de Fresenius y el Sistema de Prisma Gambo. El plasma purificado a través de dichos

medios de separación se ejecuta luego sobre una serie de medios de filtración, poseyendo dichos medios de filtración una mayor afinidad hacia las microvesículas que se asocian al tumor en comparación con otras moléculas. Dichos medios de filtración incluyen, en algunas realizaciones, agentes de unión a microvesículas inmovilizados a un sustrato.

5 Dichos agentes de unión a microvesículas incluyen, entre otros, anticuerpos, proteínas o compuestos con afinidad selectiva hacia las microvesículas que se asocian al cáncer o que no se asocian. Los ejemplos de dichos agentes incluyen anticuerpos contra el ligando Fas, el MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, complejos de péptidos del MHC I, complejos de péptidos del MHC II o proteínas que se encuentran presentes en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria que se encuentra en un paciente con 10 cáncer, así como a las lectinas como la conconavalina A, la fitohemaglutinina, la GNA, la NPA y la cianovirina. Dicho sustrato se selecciona de los sustratos que se conoce se usaron anteriormente en los que, estos incluyen, por ejemplo, SEPHAROSE™ fabricado por Amersham-Biosciences, Upsala, Suecia, así como partículas o perlas de acrilamida y agarosa. Los sustratos que se usaron deben tener las propiedades de poder unir estrechamente el agente de unión de microvesículas, la capacidad de producirse de forma estéril y ser compatibles con diálisis 15 estándar/sondas extracorpóreas.

En otras realizaciones, el agente capaz de unirse a las microvesículas que se asocian al tumor o que no se asocian al tumor se inmoviliza en una membrana de filtro o en una sonda de diálisis capilar, donde el plasma pasa adyacente 20 o a través de las membranas a las que se une dicho agente capaz de unir las microvesículas que se asocian al tumor o que no se asocian al tumor. Los filtros adecuados incluyen los que se mencionaron anteriormente con respecto a la separación de componentes sanguíneos. Estos pueden ser los mismos filtros, que tienen agentes inmovilizados capaces de unirse a las microvesículas (ya sean tumores que se asocian o que no se asocian, o se pueden disponer en secuencia, de modo que el primer filtro divida los componentes sanguíneos y el filtro 25 secundario, terciario y adicional elimine uno o más de los componentes de dichas microvesículas que se asocian al cáncer). La conjugación del agente capaz de unirse a la microvesícula que se asocia al tumor o que no se asocia a dicho sustrato se puede lograr mediante numerosos medios que se conocen en la técnica. Dichos medios incluyen avidina-estreptavidina, acoplamiento de bromuro de cianógeno, el uso de un enlazador tal como un enlazador de polietilenglicol. En la invención se proporciona también un medio para devolver la sangre junto con plasma purificado 30 sustancialmente de microvesículas que se asocian a tumores a dicho sujeto. Los medios preferidos son los que un experto en la técnica elige con base en la aplicación que se desea, la extensión de la eliminación de microvesículas que se desea, la condición del paciente, el método extracorpóreo que se elige y el agente de unión a la microvesícula que se elige.

35 En una realización de la invención, la eliminación extracorpórea de microvesículas se realiza en un paciente con cáncer con el fin de acelerar la velocidad de proliferación y activación de células T específicas a tumores. En la técnica se conoce que los tumores contienen antígenos que son específicos al tumor (por ejemplo, el producto p210 de bcr-abl en la CML), que se expresan en otros tejidos, pero se expresan en exceso en células cancerosas (por ejemplo, tirosinasa), o se expresan en forma embrionaria y se vuelven a expresar en el cáncer (por ejemplo, telomerasa). Se ha demostrado que la vacunación contra tales antígenos induce una respuesta inmunitaria y, en algunos casos, la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL). Desafortunadamente, a pesar del gran esfuerzo en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, la traducción clínica ha sido lenta, ya que la mayoría de las vacunas contra el cáncer no demuestran eficacia en la configuración a doble ciego. Para aumentar la eficacia de las vacunas contra el cáncer, es importante que el paciente con cáncer tenga un entorno inmunológico en el que se pueda producir una 45 activación adecuada de las células T. Se conoce que hay un gran número de microvesículas en la circulación de pacientes con una amplia variedad de tumores diferentes histológicamente, que incluyen melanoma (52), de ovario (53), colorrectal (54) y de mama (55). De manera importante, se conoce que tales microvesículas inducen la supresión de la inmunidad a través de mecanismos directos tales como la inducción de la muerte de células T a través de la expresión de FasL (52), a través de mecanismos indirectos como la estimulación de la actividad de las células supresoras mieloides (54). De hecho, se conocen numerosos mecanismos para la supresión de la inmunidad de células T mediante las microvesículas que el cáncer secreta (56-59). En consecuencia, un paciente con cáncer se trata con una vacuna terapéutica contra el cáncer antes, simultáneamente o después de someterse a la eliminación extracorpórea de exosomas. Dicha vacuna contra el cáncer se puede usar para estimular la respuesta inmunitaria a los antígenos que se encuentran exclusivamente en el tumor, a los antígenos que se encuentran en los 50 tejidos no malignos, pero a mayor concentración en el tumor, o los antígenos cuya presencia se requiere para la funcionalidad tumoral. En una realización específica de la invención, la vacunación tumoral se realiza en péptidos, polipéptidos, glicoproteínas, peptidomiméticos o combinaciones de los mismos. La vacunación tumoral se puede realizar en el contexto de una terapia celular, como, por ejemplo, la administración de células dendríticas que se pulsan con antígenos tumorales o lisados tumorales. Las vacunas tumorales se conocen comúnmente en la técnica y se describen en las siguientes revisiones (60-64). Los ejemplos de antígenos tumorales que se pueden usar en la práctica de la presente invención incluyen CDK4/ma MUM-1/2, MUM-3, Miosina/m, Redox-perox/m, MART-2/m, Actina/4/ma, ELF2-M, CASP-8/ma, HLA-A2R170J, HSP70-2/ma, CDKN2A, CDC27a, TPI, LDLR/FUT Fibronectina/m, RT-PTP-K/ma, BAGE, GAGE, MAGE, telomerasa, y tirosinasa, y sus fragmentos.

65 En una realización específica, una paciente con cáncer de ovario se selecciona para el tratamiento con vacunación contra el cáncer. Dicho plasma de la paciente se evalúa en cuanto al contenido exosómico con base en los métodos

que se conocen en la técnica, como se describe, por ejemplo, en el siguiente estudio (65). En un método específico, se realiza el siguiente procedimiento: el plasma que se trata con ETDA se purifica de la sangre periférica mediante centrifugación a 500 g durante media hora. La separación de los desechos celulares se realiza mediante una segunda centrifugación a 7.000 g durante media hora adicional. Los exosomas se recogen posteriormente mediante centrifugación a 100.000 g durante 3 horas, que se sigue de un paso de lavado en PBS en las mismas condiciones. Usando este procedimiento, se detectan aproximadamente 0,5-0,6 ug/ml de proteína exosómica de voluntarios sanos como se visualiza mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) (66). En contraste, el plasma de los pacientes con cáncer contiene típicamente un rendimiento exosómico más alto, que oscila entre 200 y 500 ug/ml. Esto está de acuerdo con los estudios que describen altas concentraciones de "vesículas de membrana" que se encuentran en circulación sistémica en pacientes con cáncer (65). Para la práctica de la invención, se seleccionan pacientes con alto contenido exosómico en comparación con voluntarios sanos. Por ejemplo, se pueden tratar mediante la invención los pacientes con contenido exosómico por encima de dos veces la concentración de exosomas en voluntarios sanos. En otra realización, se tratan pacientes con contenido exosómico 10 veces mayor que el contenido exosómico de voluntarios sanos. En otra realización de la invención, los pacientes con mayor contenido exosómico que los voluntarios sanos que tienen apoptosis espontánea de células T se seleccionan para el tratamiento. Los protocolos para la evaluación de la apoptosis espontánea de células T se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por el grupo de Whiteside (67). La evaluación de la actividad inmunosupresora del exosoma se puede cuantificar mediante el cultivo de exosomas purificados del plasma del paciente con una línea de células T que expresan Fas, tal como el clon Jurkat E6.1 (ATCC Manassas, VA). Estas células se pueden cultivar en condiciones estándar usando el método que describe Andreola *et. al.* (52) con el fin de desarrollar un ensayo estandarizado. En resumen, se siembran  $10^6$ /ml de células Jurkat en placas de 24 pocillos con FBS RPMI 1640 al 10% y se cultivan conjuntamente con concentraciones crecientes de exosomas de voluntarios sanos, así como pacientes con cáncer. La apoptosis de células Jurkat se puede cuantificar mediante la evaluación de la tinción con anexina-V usando citometría de flujo.

Los pacientes que muestran números elevados de exosomas y/o células T apoptóticas, y/o que poseen exosomas capaces de inducir la apoptosis de células T se seleccionan para la eliminación extracorpórea de dichos exosomas. En una realización preferida, la sangre patentada se pasa por un circuito extracorpóreo durante un tiempo suficiente para reducir sustancialmente la carga de exosomas. La reducción de la carga de exosoma se cuantifica como se describe anteriormente. Se puede establecer una correlación entre la concentración de exosomas y la apoptosis espontánea de células T. Cuando se logra la reducción de la concentración de exosomas en el plasma y la apoptosis espontánea de células T, dicho paciente se puede inmunizar con una vacuna tumoral. Alternativamente, a los pacientes se les puede realizar una eliminación de exosomas sin inmunización con una vacuna tumoral para permitir que se activen las respuestas antitumorales endógenas. Alternativamente, los pacientes se pueden tratar con un inmunoestimulador no específico, dicho inmunoestimulador puede ser una molécula pequeña (por ejemplo, dipéptido muramilo, timosina, guanosina 7,8 disustituida, imiquimod, lipopolisacárido desintoxicado, isatoribina o alfa-galactosilceramida), una proteína (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-8, IL-12, IL15, IL-18, IL-21, IL-23, IFN-a, b, g, TRANCE, TAG-7, CEL-1000, complejos de la pared celular bacteriana, o LIGHT), o un ácido nucleico inmunogénico (por ejemplo, ARN interferente corto que se dirige al ARNm de proteínas inmunosupresoras, oligonucleótidos CpG, Poly IC, oligonucleótidos no metilados, plásmido que codifica moléculas inmunoestimuladoras, o ADN purificado con cromatina). Dichos inmunoestimulantes no específicos se conocen en la técnica y en algunos casos ya están en uso clínico. Dichos inmunoestimulantes no específicos en uso clínico incluyen interleucina-2, interferón gama, interferón alfa, BCG o ciclofosfamida de dosis baja.

En otra realización, la eliminación extracorpórea de exosomas se realiza junto con la quimioterapia con el fin de activar la supresión inmunitaria que los exosomas causan, mientras que al mismo tiempo permite que dicha quimioterapia realice funciones inhibitorias directas del tumor. Alternativamente, la eliminación extracorpórea de exosomas se puede usar para eliminar el aumento de exosomas que la muerte de células tumorales causa durante el uso de quimioterapia. Se conocen en la técnica numerosos tipos de quimioterapias que se pueden usar en el contexto de la presente invención, que incluyen: agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas como benzodopa, carbocadona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminasas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, como aclacinomisina, actinomycin, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, iaduricibina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de la purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de la pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida;

ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxíurea; lentinán; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manustustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosida ("AraC"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE® Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilmitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

En una realización, la frecuencia y la duración del tratamiento extracorpóreo se realizan con base en la cantidad de tiempo (o volumen de sangre) necesario para la reducción de la concentración exosómica a un nivel significativo que se correlaciona con la reducción de la apoptosis espontánea de células T. En una realización, una reducción de la apoptosis espontánea de células T en aproximadamente un 20% en comparación con los valores de tratamiento pre-extracorpóreo se juzga como suficiente. En otra realización, una reducción de la apoptosis espontánea de células T en aproximadamente un 50% en comparación con los valores de tratamiento pre-extracorpóreo se juzga como suficiente. En otra realización, una reducción de la apoptosis espontánea de células T en aproximadamente el 90% en comparación con los valores de tratamiento pre-extracorpóreo se juzga como suficiente.

Aunque la evaluación de la apoptosis espontánea de células T se usa en algunas realizaciones para juzgar la frecuencia y/o el tiempo y/o el volumen de sangre necesario para el tratamiento extracorpóreo, se pueden usar otros medios para medir las respuestas inmunitarias. Por ejemplo, la restauración de la producción de citoquinas (68), la proliferación de células T (69) o la expresión de la cadena TCR-zeta (70) se conocen en la técnica y se describen en las referencias.

Un experto en la técnica apreciará que estos métodos y dispositivos se adaptan y se pueden adaptar para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas que se mencionaron, así como los inherentes a los mismos. Los métodos, procedimientos y dispositivos que se describen en este documento son de ejemplo y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención. A los expertos en la técnica se les ocurrirán cambios en la misma y otros usos que se incluyen dentro del espíritu de la invención y se definen mediante el alcance de la divulgación.

## Ejemplos

Existen numerosos métodos de conjugación de anticuerpos con sustratos que se usan para empaquetar el Cartucho de Fibra Hueca. En los ejemplos, la unión de proteínas y otros agentes de unión químicos se realiza generalmente usando variaciones de las técnicas de glutaraldehído que Ambrus y Horvath describen en la Patente de los Estados Unidos N° 4,714,556.

### Ejemplo 1

Preparación de GNA que se Acopla Covalentemente a la Agarosa usando Bromuro de Cianógeno

Se usó agarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr) para el acoplamiento directo de acuerdo esencialmente con Cuatrecasas, *et. al.* (Cuatrecasas, Wilchek y Anfinsen, Proc Natl Acad Sci USA 61(2): 636-643, 1968). En resumen, se agrega 1 ml de GNA a una concentración de 10 mg/ml en 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub> pH 9.5 a 1 ml de agarosa activada con CNBr (Sigma, St. Louis, MO) y se deja reaccionar durante la noche en el frío. Se debe tener cuidado de mantener un pH alcalino para evitar la posible liberación de gas HCN. Cuando se completa la reacción, se aspiran los materiales que no han reaccionado y la agarosa que se acopla a lectina se lava extensamente con PBS frío estéril. La matriz de afinidad de lectina agarosa se almacena en frío hasta que esté lista para su uso. Alternativamente, la agarosa GNA está disponible comercialmente en Vector Labs (Burlingame, CA).

### Ejemplo 2

Preparación de un Anticuerpo que se Acopla Covalentemente a Perlas de Vidrio a través de la base de Schiff y la Reducción con Cianoborohidruro

La matriz de afinidad se preparó mediante una modificación del método de Hermanson (Hermanson, Bioconjugate Techniques: 785, 1996). El anticuerpo monoclonal anti-VIH se disolvió en una concentración de proteína final de 10 mg/ml en 0,1M de borato de sodio, pH 9,5, se agrega a las perlas de vidrio de sílice derivatizadas con aldehído (BioConnexant, Austin, TX). La reacción es más eficiente a pH alcalino, pero tendrá un pH de 7-9 y se realiza normalmente con un exceso de proteína de 2 a 4 veces en los sitios de acoplamiento. A esta mezcla se le añaden 10 ul de 5M de NaCNBH<sub>3</sub> en 1N de NaOH (Aldrich, St Louis, MO) por ml de reacción de acoplamiento y la mezcla se deja reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Al final de la reacción, el aldehído que queda sin reaccionar sobre las superficies de vidrio se cubre con 20 ul de etanolamina 3M pH 9.5 por ml de reacción. Después

de 15 minutos a temperatura ambiente, la solución de reacción se decanta y las proteínas no unidas y los reactivos se eliminan lavando extensamente en PBS. La matriz se almacena en el refrigerador hasta que esté lista para su uso.

5 Ejemplo 3

Preparación de un Anticuerpo Especifico al Exosoma que se Acopla Covalentemente al Chromosorb (Tierra de Diatomeas) Usando Glutaraldehído

10 La preparación de tierra de diatomeas aminada se lleva a cabo usando  $\gamma$ -aminopropil trietoxisilano (GAPS) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) y malla Chromosorb 60/80. Aunque se pueden usar otros grados de tierra de diatomeas, a menudo se usa Chromosorb de este tamaño de malla (200-300 micrones de diámetro) para evitar que partículas pequeñas entren en la muestra a través de los tamaños de poro más grandes disponibles que se encontraron en cartuchos de fibra hueca que se usaron para la separación de plasma (~0,5 micras).

15 Se preparó Amino Chromosorb mediante suspensión en un exceso de solución acuosa al 5% de GAPS en una reacción durante la noche. El Chromosorb aminado se lavó con agua y etanol sin exceso de reactivo y se secó durante la noche en un horno de secado para producir un polvo blanquecino. Luego se suspendió un gramo de polvo en 5 ml de glutaraldehído al 5% (Sigma) por 30 minutos. El exceso de glutaraldehído se eliminó mediante filtración y se lavó con agua hasta que no quedó ningún aldehído detectable en el lavado usando el reactivo de Schiff (Sigma Chemical). La torta de filtración se volvió a suspender luego en 5 ml de tampón de acoplamiento de borohidruro de Sigma que contenía 2-3 mg/ml del anticuerpo y se dejó que la reacción transcurriera durante la noche a 4 grados C. Al final de la reacción, se lavó el exceso de anticuerpo y el aldehído restante reaccionó con la etanolamina como se describe. Después del lavado final en PBS estéril, el material se almacenó en frío hasta que estuvo listo para su uso.

25 Ejemplo 4

Preparación de un Anticuerpo Especifico al Anti-Ligando Fas que se Acopla Covalentemente a Perlas de Poliacrilato Usando Glutaraldehído y Azida

30 Se disuelve el anticuerpo anti-Ligando Fas (ratón antihumano NOK-1 como lo describe Kayagaki *et. al.* en la Patente de los Estados Unidos N° 6,946,255) en una concentración de 50-200 mg/ml con albúmina de suero humano en un medio acuoso tamponado con fosfato de pH 7.0. Se agrega glutaraldehído a una concentración de 0,05-10% a la solución que luego se incuba por 1-24 horas, pero preferiblemente 12 horas, a 4 grados C. El exceso de glutaraldehído que permanece en la mezcla de reacción se elimina mediante la adición de glicina, u otros compuestos adecuados que se conocen en la técnica, para la solución al final de la incubación. Esta solución se diafiltra luego a través de una membrana que tiene un valor retentivamente mínimo de 500.000 de peso molecular. El producto portador de anticuerpos diafiltrados se disuelve en solución salina o fluido de diálisis. Para obtener un polímero reactivo que actúe como un sustrato para dicho anticuerpo anti-Ligando Fas, las perlas de polímero de ácido poliacrílico (# 1 micras de diámetro) se activan mediante el procedimiento de azida (51). Las relaciones de anticuerpo a poliéster reactivo se seleccionan para evitar una reacción excesiva. Si esta relación se ajusta adecuadamente, el espaciamiento del anticuerpo a lo largo de la cadena del polímero permitirá una unión del anticuerpo con el antígeno que se encuentra en la microvesícula sin impedimentos estéricos adversos y se pretende que el conjugado del anticuerpo permanezca soluble.

45 Dichos conjugados de anticuerpos anti-Ligando Fas se cargan posteriormente en un cartucho de filtro de fibra hueca, en el exterior de dichas fibras huecas. Luego se sellan los puertos de llenado externos. Esto permite el paso de los componentes de las células sanguíneas a través del lumen de dichas fibras huecas. El plasma sanguíneo que contiene las microvesículas, circula y se difunde a través de los poros en las fibras huecas en el espacio extraluminal donde entra en contacto con los conjugados del anticuerpo-poliacrilato. El plasma que se trata en el interior del cartucho se vuelve a difundir hacia la circulación general, dejando que las microvesículas se unan al anticuerpo anti-Ligando FAS insolubilizado.

55 Ejemplo 5

Tratamiento del Paciente Usando un Anticuerpo Especifico Anti-Ligando Fas que se Acopla Covalentemente a Perlas de Poliacrilato del Ejemplo 4

60 Un paciente con cáncer colorrectal no extirpable en etapa IV presenta una capacidad suprimida para producir interferón gama posterior a la estimulación *ex vivo* con anti-CD3 de células mononucleares de sangre periférica. Con el fin de eliminar la capacidad de la respuesta inmunitaria de dichos pacientes para producir interferón gama, dicho paciente se trata con un dispositivo extracorpóreo capaz de eliminar microvesículas que contribuyen, al menos en parte, a la producción suprimida de interferón gama. Dicho dispositivo médico se fabrica como en el Ejemplo 4:

65 El filtro de fibra hueca modificado se conecta a una máquina de diálisis venovenosa y se conecta a la circulación de dicho paciente por un período de tiempo necesario para eliminar las microvesículas que se asocian a la supresión de

la producción de interferón gama. El acceso vascular se obtiene a través de un catéter de doble lumen en la vena subclavia o femoral. Para esta aplicación específica, el hemofiltro de fibra hueca se conecta a una bomba de rodillo de sangre de flujo controlado, la tasa de flujo de sangre ( $Q_b$ ) se establece en 100 a 400 ml/min, (más preferiblemente a 200 a 300 ml/min, dependiendo de la estabilidad cardiovascular del paciente). El circuito de diálisis se mantiene en anticoagulación con una infusión continua de heparina en la extremidad aferente. El tiempo de coagulación activado (ACT) se mide cada hora, y la infusión de heparina se ajusta para mantener el ACT entre 160 y 180 segundos. Dicho paciente se monitoriza con base en la concentración de microvesículas que expresan el Ligando Fas en circulación, así como mediante la capacidad de dichos linfocitos del paciente para producir interferón gama en respuesta a la estimulación mitogénica o de anticuerpos.

Tras el aumento de la producción de interferón gama, a dicho paciente se le puede administrar una vacuna tumoral con el objetivo de estimular específicamente al antígeno respuestas inmunitarias del huésped en un entorno propicio a la eliminación inmunomediada de los tumores primarios y/o metastásicos.

#### Ejemplo 6

##### Eliminación de Exosomas de la Sangre Usando Plasmaféresis

La eliminación selectiva de exosomas de la sangre se puede lograr usando plasmaféresis combinada con captura por afinidad usando cualquiera de las matrices que se describen en los Ejemplos 1-5. La plasmaféresis se realiza usando sea métodos de separación centrífuga o de separación de plasma por fibra hueca. El circuito sanguíneo se mantiene en anticoagulación con una infusión continua de heparina en la extremidad aferente. El tiempo de coagulación activado (ACT) se mide cada hora, y la infusión de heparina se ajusta para mantener el ACT entre 160 y 180 segundos.

El plasma que se obtiene del paciente se puede descartar y reemplazar con una combinación de solución salina normal y plasma fresco de donantes sanos (es decir, intercambio de plasma). Alternativamente, el plasma que contiene las microvesículas se puede bombear a 60-100 ml/min sobre la matriz de afinidad que captura los exosomas. El plasma eliminado se puede volver a infundir en el paciente. Se ha descrito un sistema similar (la columna ProSORBA) para la eliminación de complejos de inmunoglobulina de pacientes con artritis reumatoide resistente a medicamento (71, 72). La eliminación de las microvesículas se puede monitorizar con base en la concentración de microvesículas que expresan el ligando Fas que permanece en circulación.

#### Ejemplo 7

##### Acoplamiento Directo de un Aptámero Específico para Exosomas Tumorales a las Fibras Huecas

En dispositivos que se basan en fibra hueca, se obtiene un contacto más íntimo con la sangre mediante el acoplamiento directo del agente de captura a las fibras huecas. Los aptámeros son piezas cortas de ADN sintético y sus derivados químicos que se unen a antígenos específicos (es decir, anticuerpos de ADN). El proceso para generar aptámeros se describe en detalle en la Patente de los Estados Unidos N° 5,567,588 (1996; expedida a Gold *et. al.*). En este ejemplo, se describe el aislamiento de aptámeros de ADN específicos de la proteína del Ligando Fas y la producción de matrices de afinidad de aptámero que se acopla a fibra hueca. La proteína del Ligando Fas purificada se acopla químicamente a la agarosa usando la agarosa Amino-Link (Pierce Chemical Co.). El Gel de Acoplamiento AminoLink es un soporte al 4% de agarosa entrecruzado, que se activa para formar grupos funcionales aldehído que desarrolla un enlace estable, en forma de una amina secundaria, entre el gel y la proteína con eficiencias de acoplamiento de 85% entre pH 4-10. En este ejemplo, se aplican 2 ml de proteína del Ligando Fas (1 mg/ml en tampón de acoplamiento) al gel AminoLink por 7 horas a 4 grados C. Luego, la proteína sin reacción se lava con 25 volúmenes de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y el material de producto se almacena en frío hasta su uso.

A continuación, se preparan oligonucleótidos de ADN, típicamente de 80 nucleótidos de largo, que contienen los siguientes elementos. Primero, un sitio cebador de PCR de 20 nucleótidos en los extremos 5' y 3' y un segmento de 40 bases en el medio de la molécula que se prepara con una mezcla aleatoria de bases. Esto genera una gran cantidad de especies de ADN de las cuales se puede seleccionar el aptámero específico (es decir, el anticuerpo de ADN). El ADN capaz de unirse selectivamente a la proteína objetivo del Ligando Fas se selecciona luego mediante múltiples rondas de unión al Ligando Fas inmovilizado que se intercala con la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre los fragmentos recuperados. El material final con alta selectividad para el Ligando Fas se puede clonar y secuenciar para obtener una secuencia de consenso. Las copias de la secuencia de consenso se sintetizan luego químicamente con los grupos amino terminales 5' o 3' y se acoplan a una fase sólida tal como se describe en el Ejemplo 3.

En este ejemplo específico, el aptámero específico al FasL que se sintetiza químicamente, que contiene una amina terminal se debe acoplar directamente a las fibras huecas de polisulfona *in situ* en un cartucho separador de plasma. Para lograr esto, el cartucho se expone primero a una solución de 4% de albúmina de suero humano (HSA) que reacciona durante la noche a 4 grados C. La HSA que se adsorbe luego se entrecruza con glutaraldehído. El exceso

de glutaraldehído se lava brevemente con agua. Luego, el cartucho se llena con tampón de acoplamiento de cianoborohidruro Sigma que contiene 2-3 mg/ml del aptámero FasL aminado y se hace reaccionar durante la noche a 4 grados C. Al final de la reacción, se lava el exceso de aptámero y el aldehído remanente sin reacción, reacciona con la etanolamina. Después del lavado final en PBS estéril, el cartucho se secó en aire estéril, se empaquetó y se esterilizó usando irradiación gama (25-40 kGy) y se almacenó en un área fresca y oscura hasta que estuvo listo para su uso.

Los expertos en la técnica reconocen que los aspectos y realizaciones de la invención que se exponen en el presente documento se pueden practicar por separado o conjuntamente entre sí. Por lo tanto, las combinaciones de realizaciones separadas están dentro del alcance de la invención como se describe en el presente documento. Todas las patentes y publicaciones que se mencionan en la memoria son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a los que pertenece la invención. De este modo, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede reemplazar con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de la descripción y no de la limitación, y no hay ninguna intención de que el uso de tales términos y expresiones indique la exclusión de equivalentes de las características que se muestran y describen o partes de las mismas. Se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la presente invención. De este modo, se debe entender que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos que se describen en el presente documento, y que tales modificaciones y variaciones se consideran estar dentro del alcance de esta invención como se define mediante las reivindicaciones.

#### Referencias

1. Wiemann, B., and Starnes, C.O. 1994. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 64:529-564.
2. Woglom, W. 1929. *Cancer Rev.* 4:129.
3. Ichim, C.V. 2005. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 3:8.
4. Romagnani, S. 1992. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 98:279-285.
5. Sanders, V.M. 2005. Epigenetic regulation of Th1 and Th2 cell development. *Brain Behav Immun.*
6. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16:3-10.
7. Curiel, R.E., Lahesmaa, R., Subleski, J., Cippitelli, M., Kirken, R.A., Young, H.A., and Ghosh, P. 1997. Identification of a Stat-6-responsive element in the promoter of the human interleukin-4 gene. *Eur J Immunol* 27:1982-1987.
8. Lederer, J.A., Perez, V.L., DesRoches, L., Kim, S.M., Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. 1996. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med* 184:397-406.
9. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
10. Murphy, K.M., Ouyang, W., Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Guler, M.L., Gorham, J.D., Gubler, U., and Murphy, T.L. 1999. T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent and Stat4-independent phases. *Curr Top Microbiol Immunol* 238:13-26.
11. Kacha, A.K., Fallarino, F., Markiewicz, M.A., and Gajewski, T.F. 2000. Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol* 165:6024-6028.
12. Ostrand-Rosenberg, S., Grusby, M.J., and Clements, V.K. 2000. Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol* 165:6015-6019.
13. Ostrand-Rosenberg, S., Clements, V.K., Terabe, M., Park, J.M., Berzofsky, J.A., and Dissanayake, S.K. 2002. Resistance to metastatic disease in STAT6-deficient mice requires hemopoietic and nonhemopoietic cells and is IFN-gamma dependent. *J Immunol* 169:5796-5804.

14. Zhang, S.S., Welte, T., and Fu, X.Y. 2001. Dysfunction of Stat4 leads to accelerated incidence of chemical-induced thymic lymphomas in mice. *Exp Mol Pathol* 70:231-238.
- 5 15. Kobayashi, N. 1985. Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 15 Suppl 1:307-312.
- 10 16. Nakamura, E., Megumi, Y., Kobayashi, T., Kamoto, T., Ishitoya, S., Terachi, T., Tachibana, M., Matsushiro, H., Habuchi, T., Kakehi, Y., et al. 2002. Genetic polymorphisms of the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with an increasing risk and a poor prognosis of sporadic renal cell carcinoma in a Japanese population. *Glin Cancer Res* 8:2620-2625.
17. Amirzargar, A., Lessanpezeski, M., Fathi, A., Amirzargar, M., Khosravi, F., Ansari-pour, B., and Nikbin, B. 2005. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 37:2985-2987.
- 15 18. Daniel, V., Naujokat, C., Sadeghi, M., Wiesel, M., Hergesell, O, and Opelz, G. 2005. Association of circulating interleukin (IL)-12- and IL-10-producing dendritic cells with time posttransplant, dose of immunosuppression, and plasma cytokines in renaltransplant recipients. *Transplantation* 79:1498-1506.
- 20 19. Kim, W.U., Cho, M.L., Kim, S.I., Yoo, W.H., Lee, S.S., Joo, Y.S., Min, J.K., Hong, Y.S., Lee, S.H., Park, S.H., et al. 2000. Divergent effect of cyclosporine on Th1/Th2 type cytokines in patients with severe, refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27:324-331.
- 25 20. Gerlini, G., Romagnoli, P., and Pimpinelli, N. 2005. Skin cancer and immunosuppression. *Crit Rev Oncol Hematol* 56:127-136.
21. Pluygers, E., Sadowska, A., Chyczewski, L., Niklinski, J., Niklinska, W., and Chyczewska, E. 2001. The impact of immune responses on lung cancer and the development of new treatment modalities. *Lung Cancer* 34 Suppl 2:S71-77.
- 30 22. Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L., et al. 1995. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 60:183-189.
- 35 23. Khauli, R.B. 1994. Genitourinary malignancies in organ transplant recipients. *Semin Urol* 12:224-232.
24. Penn, I. 1994. Depressed immunity and the development of cancer. *Cancer Detect Prev* 18:241-252.
25. Penn, I. 1994. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl*:99-109.
- 40 26. Grulich, A.E., Wan, X., Law, M.G., Coates, M., and Kaldor, J.M. 1999. Risk of cancer in people with AIDS. *Aids* 13:839-843.
- 45 27. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., et al. 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-230.
28. Liu, M.A., and Ulmer, J.B. 2005. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet* 55:25-40.
- 50 29. Wang, H.H., Mao, C.Y., Teng, L.S., and Cao, J. 2006. Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5:22-27.
30. Facciponte, J.G., MacDonald, I.J., Wang, X.Y., Kim, H., Manjili, M.H., and Subject, J.R. 2005. Heat shock proteins and scavenger receptors: role in adaptive immune responses. *Immunol Invest* 34:325-342.
- 55 31. Garcia-Hernandez, E., Gonzalez-Sanchez, J.L., Andrade-Manzano, A., Contreras, M.L., Padilla, S., Guzman, C.C., Jimenez, R., Reyes, L., Morosoli, G., Verde, M.L., et al. 2006. Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Ther*.
- 60 32. Garnett, C.T., Greiner, J.W., Tsang, K.Y., KudoSaito, C., Grosenbach, D.W., Chakraborty, M., Gulley, J.L., Arlen, P.M., Schlom, J., and Hodge, J.W. 2006. TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des* 12:351-361.
33. Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J.L., Kohler, G., Noppen, C., Herr, W., Spagnoli, G.C., Cerundolo, V., and Lindemann, A. 2000. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 86:385-392.
- 65

34. Loveland, B.E., Zhao, A., White, S., Gan, H., Hamilton, K., Xing, P.X., Pietersz, G.A., Apostolopoulos, V., Vaughan, H., Karanikas, V., et al. 2006. Mannan-MUC1-pulsed dendritic cell immunotherapy: a phase I trial in patients with adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 12:869-877.
- 5 35. Mu, L.J., Kyte, J.A., Kvalheim, G., Aamdal, S., Dueland, S., Hauser, M., Hammerstad, H., Waehre, H., Raabe, N., and Gaudernack, G. 2005. Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 93:749-756.
- 10 36. Huang, J., Khong, H.T., Dudley, M.E., El-Gamil, M., Li, Y.F., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. 2005. Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. *J Immunother* 28:258-267.
- 15 37. Sjogren, H.O., Hellstrom, I., Bansal, S.C., Warner, G.A., and Hellstrom, K.E. 1972. Elution of "blocking factors" from human tumors, capable of abrogating tumor-cell destruction by specifically immune lymphocytes. *Int J Cancer* 9:274-283.
38. Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., and Sjogren, H.O. 1970. Serum mediated inhibition of cellular immunity to methylcholanthrene-induced murine sarcomas. *Cell Immunol* 1:18-30.
- 20 39. Sjogren, H.O., Hellstrom, I., Bansal, S.C., and Hellstrom, K.E. 1971. Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1372-1375.
40. Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L., and Min, W.P. 2005. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ Tcell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 35:169-173.
- 25 41. Whiteside, T.L. 2005. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer* 92:209-211.
42. Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., and Whiteside, T.L. 2005. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 11:1010-1020.
- 30 43. Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., Lyons, K.S., Stanson, J., and Whiteside, T.L. 2003. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 9:5113-5119.
- 35 44. Frangsmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., and Mincheva-Nilsson, L. 2005. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 11:35-41.
- 40 45. Taylor, D.D., Akyol, S., and Gercel-Taylor, C. 2006. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176:1534-1542.
- 45 46. Mincheva-Nilsson, L., Nagaeva, O., Chen, T., Stendahl, U., Antsiferova, J., Mogren, I., Hernestal, J., and Baranov, V. 2006. Placenta-Derived Soluble MHC Class I Chain-Related Molecules Down-Regulate NKG2D Receptor on Peripheral Blood Mononuclear Cells during Human Pregnancy: A Possible Novel Immune Escape Mechanism for Fetal Survival. *J Immunol* 176:3585-3592.
- 50 47. Morelli, A.E. 2006. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant* 6:254-261.
- 55 48. Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., and Cuturi, M.C. 2003. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76:1503-1510.
49. Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. 2003. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 52:1690-1697.
- 60 50. Ostman, S., Taube, M., and Tselmo, E. 2005. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* 116:464-476.
- 65 51. Erlanger, B.F. 1980. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey. *Methods Enzymol* 70:85-104.

52. Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., et al. 2002. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasLbearing microvesicles. *J Exp Med* 195:1303-1316.
- 5 53. Abrahams, V.M., Straszewski, S.L., Kamsteeg, M., Hanczaruk, B., Schwartz, P.E., Rutherford, T.J., and Mor, G. 2003. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* 63:5573-5581.
54. Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G., and Rivoltini, L. 2006. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 66:9290-9298.
- 10 55. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L.A., Wysoczynski, M., and Ratajczak, M.Z. 2006. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* 46:1199-1209.
- 15 56. Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. 2005. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 92:305-311.
57. Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R.P., Grizzle, W.E., et al. 2006. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 176:1375-1385.
- 20 58. Riteau, B., Faure, F., Menier, C., Viel, S., Carosella, E.D., Amigorena, S., and Rouas-Freiss, N. 2003. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol* 64:1064-1072.
- 25 59. Clayton, A., and Tabi, Z. 2005. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol Dis* 34:206-213.
60. Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., and Castelli, C. 2007. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol* 178:1975-1979.
- 30 61. Mocellin, S., Lise, M., and Nitti, D. 2007. Tumor immunology. *Adv Exp Med Biol* 593:147-156.
62. Hoos, A., Parmiani, G., Hege, K., Sznol, M., Loibner, H., Eggermont, A., Urba, W., Blumenstein, B., Sacks, N., Keilholz, U., et al. 2007. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J Immunother* 30:1-15.
- 35 63. Dalgleish, A., and Pandha, H. 2007. Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines. *Adv Cancer Res* 96:175-190.
- 40 64. Copier, J., and Dalgleish, A. 2006. Overview of tumor cell-based vaccines: *Int Rev Immunol* 25:297-319.
65. Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., Lyons, K.S., Stanson, J., and Whiteside, T.L. 2003. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 9:5113-5119.
- 45 66. Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., and Bonnerot, C. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 17:879-887.
67. Whiteside, T.L. 2004. Methods to monitor immune response and quality control. *Dev Biol (Basel)* 116:219-228; discussion 229-236.
- 50 68. Oldford, S.A., Robb, J.D., Codner, D., Gadag, V., Watson, P.H., and Drover, S. 2006. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol* 18:1591-1602.
- 55 69. Marana, H.R., Silva, J.S., Andrade, J.M., and Bighetti, S. 2000. Reduced immunologic cell performance as a prognostic parameter for advanced cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 10:67-73.
70. Kiaii, S., Choudhury, A., Mozaffari, F., Kimby, E., Osterborg, A., and Mellstedt, H. 2005. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): comparison of indolent and progressive disease. *Med Oncol* 22:291-302.
- 60 71. Jones, F., H. Snyder and J. Balint (1998). Method for treatment of rheumatoid arthritis. USA, Cypress Bioscience, Inc., San Diego, CA.
- 65

72. Snyder, H. W., Jr., J. P. Balint, Jr. and F. R. Jones (1989). "Modulation of immunity in patients with autoimmune disease and cancer treated by extracorporeal immunoadsorption with PROSORBA columns." *Semin Hematol* 26(2 Suppl 1): 31-41.
- 5 73. Cuatrecasas, P., M. Wilchek and C. B. Anfinsen (1968). "Selective enzyme purification by affinity chromatography." *Proc Natl Acad Sci USA* 61(2): 636-43.
74. Gold, L. (1995). "The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds." *Harvey Lect* 91: 47-57.
- 10 75. Gold, L. and S. Ringquist (1996). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Solution SELEX. USA, University Research Corporation (Boulder, CO).
- 15 76. Hermanson, G. T. (1996). *Bioconjugate Techniques*: 785.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un dispositivo médico para la eliminación de partículas microvesiculares inmunosupresoras de la sangre entera o un componente de la misma, comprendiendo dicho dispositivo:
- a) un conducto de admisión a través del cual entra la sangre entera o un componente de la misma;
  - b) un agente capaz de unirse y eliminar partículas microvesiculares inmunosupresoras que se encuentran dentro de dicha sangre o componente de la misma, en el que dicho agente comprende una lectina y dicho agente está configurado para poner en contacto dicha sangre o componente de la misma;
  - 10 c) un sistema para la reintroducción de la sangre contactada o componente de la misma en un sujeto, a través del cual dicha sangre contactada o componente de la misma se reintroduce en condiciones fisiológicamente aceptables, dicha sangre contactada o componente de la misma contiene sustancialmente menos partículas microvesiculares inmunosupresoras en comparación con la sangre entera o el componente de la misma que entra en el conducto de admisión; y
  - 15 d) un agente adicional capaz de unirse a partículas microvesiculares inmunosupresoras seleccionadas de un grupo que consiste en: a) un anticuerpo; b) una proteína; c) un aptámero; d) una superficie que restringe selectivamente del paso las microvesículas, y e) una superficie con adhesión selectiva a las microvesículas.
- 20 2. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en el que dicho agente rodea una pluralidad de membranas porosas de fibra hueca que tienen un diámetro de lumen de tamaño suficiente para permitir el paso de células sanguíneas a través del lumen, y un diámetro de poro de tamaño suficiente de los poros en el lado de filtro de fibra hueca para que las microvesículas salgan, mientras que no permite que salgan las células sanguíneas.
- 25 3. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en el que el agente está unido a una pluralidad de perlas.
4. El dispositivo médico de la reivindicación 3, en el que las perlas tienen un intervalo de tamaño mayor que los poros de las fibras huecas.
- 30 5. El dispositivo médico de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la lectina se selecciona del grupo que consiste en GNA, NPA, Conconavalina A, cianovirina y fitohemaglutinina.
- 35 6. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene una especificidad por una proteína o un complejo proteico seleccionado del grupo que consiste en el ligando Fas, MHC I, MHC II, CD44, fosfatasa alcalina placentaria, TSG-101, un complejo de péptidos del MHC I, un complejo de péptidos del MHC II y una proteína presente en el exterior de las microvesículas que contribuyen a la supresión inmunitaria encontrada en un paciente con cáncer.
- 40 7. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en Fas, Receptor de células T, extractos de proteínas aislados de células T, extractos de proteínas aislados de células dendríticas y proteínas que se conoce poseen afinidad por las proteínas de unión encontradas en las microvesículas que se asocian a la supresión inmunitaria.