

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 234**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2013 E 13756090 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2780024**

54 Título: **Vacuna antitumoral**

30 Prioridad:

26.08.2012 EP 12181821

17.09.2012 US 201261744008 P

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

13.10.2016

73 Titular/es:

XAX KFT. (100.0%)

Gyopár köz 5

2071 Páty, HU

72 Inventor/es:

ANDOCS, GABOR;

SZÁSZ, ANDRAS;

SZÁSZ, OLIVÉR y

ILURI, NORA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 586 234 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).

Vacuna antitumoral**Descripción**

5 La presente invención se relaciona con una vacuna compuesta por al menos un estimulante inmune no específico y ondas de radiofrecuencia utilizando el acoplamiento capacitivo; y con un método, especialmente un método de vacunación *in-situ* e *in vivo* para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis aún en estados celulares diseminados, que no pueden ser detectados por los métodos de imagenología actualmente disponibles o para la prevención de la recaída de la enfermedad del cáncer, y especialmente para permitir y apoyar al sistema inmune del propio paciente a reconocer y matar las células del cáncer y construir una memoria para prevenir la recaída en una enfermedad del cáncer.

15 La presente invención utiliza los propios antígenos específicos tumorales únicos del paciente. Sin embargo, estos antígenos no son reconocibles - están escondidos - para las células inmunes y las reacciones consecuentes. Esto previene la malignidad contra el ataque inmune, y el cuerpo reconoce al tumor como su propia reparación del tejido. El sistema inmune es silenciado contra las células tumorales. La presente invención proporciona una vacuna, capaz de liberar a los antígenos tumorales que son reconocidos por el antígeno que está presente en las células (APC) para iniciar la reacción inmune específica contra la malignidad. Es un efecto especial proporcionado por la vacuna de la inventiva, que expone principalmente a los antígenos escondidos, que promueve el reconocimiento por medio de las APC (especialmente, células dendríticas) y, que prepara dichas APC y al sistema inmune completo para incrementar una reacción inmune específica para erradicar al tumor. Por consiguiente, la vacuna de la presente invención genera un proceso natural.

25 De manera breve, la muerte celular inmunogénica ocasionada por la vacuna de la presente invención, ocasiona la activación del sistema inmune adaptable para combatir contra las células del cáncer. El estimulante inmune, como un componente de la vacuna de la inventiva, soporta esta batalla de modo que el efecto es completamente sistémico provocando memoria de largo plazo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 **Definiciones**

35 El término "células tumorales escondidas" o "tumor no inmunogénico", como se utiliza en este documento, comprende al tumor y células tumorales que evaden la detección del sistema inmune al disminuir la expresión, o al no expresar a los antígenos tumorales específicos (TSA) sobre su superficie. Las células tumorales escondidas comprenden a las "células tumorales latentes", las células diseminadas y las micrometástasis. Las células tumorales latentes no muestran un carácter maligno durante el estudio y son quimioresistentes, pero no resistentes al calor. Las células diseminadas están circulando en el torrente sanguíneo a baja concentración. Su presentación y concentración de antígeno bajas en la sangre, vuelven su detección imposible. Las micrometástasis, generalmente, son las partes más peligrosas e invisibles del desarrollo maligno. La resolución de los sistemas de imagenología utilizados actualmente, permite la detección de las micrometástasis solo después de que han formado agregados compuestos de algunos millones de células.

45 El término "vacunación-*in vivo*", como se utiliza en esta solicitud, significa que los antígenos necesarios para la inmunización, son generados en el cuerpo del paciente. Para la mayoría de las vacunas antitumorales se están utilizando antígenos producidos de manera artificial o los antígenos del propio paciente preparados utilizando condiciones de laboratorio *in vitro*, y se reinyectan al paciente. Sin embargo, en la presente invención, los antígenos apropiados necesarios para la inmunización, son generados *in vivo*, es decir, por el cuerpo del paciente. Por lo tanto, el método de vacunación de la presente invención, también, puede llamarse método de vacunación *in vivo*.

50 El término "vacunación *in-situ*", como se utiliza aquí, significa que la inmunización; es decir, el reconocimiento de los ATS específicos, es procesado en realidad en el tumor. En la mayoría de las vacunas antitumorales "clásicas", los antígenos son colocados en el cuerpo lejos del lugar de las acciones moleculares activas esperadas. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, el proceso de inmunización se lleva a cabo *in-situ*; es decir, en el lugar del tumor. Por lo tanto, el método de vacunación de la presente invención, también, puede ser llamado método de vacunación *in-situ*.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "hipertermia corporal moderada" se refiere al calentamiento del cuerpo completo a una temperatura de 38°C a 39°C. También es conocida por la persona con experta en la técnica como un "calentamiento corporal en el intervalo de la fiebre", y generalmente, se utiliza para estimular al sistema inmune. Se pueden diferenciar tres tipos de hipertermia corporal:

- 65 - La hipertermia corporal suave se refiere al calentamiento corporal a una temperatura de aproximadamente 38°C;
- La hipertermia corporal moderada es como se definió anteriormente;

- La hipertermia corporal extrema se refiere al calentamiento corporal a una temperatura de 40°C a 41°C, que puede a veces aumentar hasta 42°C.

Como se utiliza aquí, el término "personas con riesgo elevado de cáncer" se refiere a la gente que han nacido con una susceptibilidad marcadamente elevada al cáncer, como resultado de la herencia de mutaciones genéticas. Una mutación genética puede ser suficiente para incrementar enormemente la susceptibilidad de una persona a uno o más tipos de cáncer, y esta susceptibilidad puede pasarse de generación en generación. La herencia de tales mutaciones tiene como resultado familias, en las que un número de individuos desarrollan un cierto tipo (s) de cáncer. Los genes conocidos asociados con el cáncer hereditario, incluyen los genes aberrantes BRCA1 y BRCA2 que incrementan el riesgo de cáncer de seno y el gen HNPCC que está ligado al cáncer de colon. Además, el término "personas con riesgo elevado de cáncer", también, se refiere a la gente que desarrolló o que probablemente, desarrolló algunas mutaciones por exposición a carcinógenos ambientales, que tengan, por lo tanto, un riesgo elevado para contraer cáncer. La exposición a los factores de riesgo para desarrollar cáncer, puede incluir la exposición repetida o prolongada a la radiación, el uso de tabaco, la exposición a químicos cancerígenos y la infección con un virus oncogénico, como el virus del papiloma humano (VPH). Los químicos y la radiación que son capaces de detonar el desarrollo del cáncer son llamados "carcinógenos". Los carcinógenos actúan al iniciar una serie de alteraciones genéticas ("mutaciones"), y al estimular la proliferación de las células. Puede haber un retraso de varias décadas entre la exposición a un carcinógeno y la aparición del cáncer. Este periodo entre la exposición y la aparición de la enfermedad, es el tiempo de retardo. Por lo tanto, es un aspecto de la presente solicitud, tratar a las personas con riesgo elevado de desarrollar cáncer ocasionado por la exposición a carcinógenos en o alrededor del final del tiempo de retardo. Por lo tanto, para esta categoría de gente, una vacuna de conformidad con la presente invención es, particularmente, importante.

Métodos basados en la radiofrecuencia y el Cáncer

Actualmente, un método que utiliza corriente de radiofrecuencia para el tratamiento del cáncer es el método de ablación por radiofrecuencia (RFA), que es un poco diferente del de la presente invención. El método por RFA es un método invasivo que utiliza RF para destruir la lesión por medio de calor. El método RFA aplica "sensores" en forma de agujas (véase Figura 1), que son insertadas por vía intratumoral dentro del tumor sólido, y la corriente local aplicada se vuelve tan grande que el tumor se quema, de ese modo, se ocasiona la necrosis enérgica.

Dichas condiciones son evitadas de manera estrictas en la presente invención. El método RFA es un procedimiento médico donde parte del sistema de conducción eléctrica del corazón, tumor u otro tejido disfuncional son ablacionado utilizando el calor generado a partir de la corriente alterna de alta frecuencia para tratar un trastorno médico. Una ventaja de la corriente de RF (sobre la AC de baja frecuencia o los pulsos de DC utilizados previamente) es que, no estimula directamente los nervios o el músculo cardíaco, y por lo tanto, puede ser utilizada frecuentemente sin la necesidad de anestesia general. Los procedimientos RFA son realizados con la guía de imágenes (tales como, detección por rayos X, escaneo por CT o ultrasonido), por un especialista del dolor intervencionista, tal como un anestesiólogo, radiólogo intervencionista o electrofisiólogo cardíaco, una subespecialidad de los cardiólogos.

Otro procedimiento médico que utiliza corriente de radiofrecuencia para el tratamiento del cáncer, es la estimulación intravascular con radiofrecuencia pulsada (véase WO 2011/078676). Este método es útil para el tratamiento tanto de tumores sólidos como tumores de transmisión sanguínea, e involucra la inserción de un electrodo tipo aguja con una impedancia menor a 1000 Ω en un vaso sanguíneo y la liberación de una señal eléctrica de pulsos de corriente en un intervalo de radiofrecuencia con un voltaje de 10 - 80 V en ráfagas de pulsos con una duración de 0.1 - 100 μ s, y una frecuencia de ráfagas de 1/s - 20/s. Se establece que la estimulación intravascular pulsada por radiofrecuencia es La estimulación intravascular por radiofrecuencia es invasiva y lleva al calentamiento de la sangre en todo el cuerpo. Además, la respuesta inmune inducida por medio de la estimulación intravascular por radiofrecuencia no es específica. Por lo tanto, ninguna reacción inmune se dirige a las células tumorales "escondidas", las que no son afectadas por dicho procedimiento médico.

También, el documento WO 2011/078676 describe la posibilidad de utilizar la estimulación intravascular con radiofrecuencia pulsada en combinación con la vacuna. Sin embargo, para esto en el documento WO 2011/078676, el papel de la estimulación intravascular con radiofrecuencia pulsada es para estimular al sistema inmune, de modo que las reacciones inmunes inducidas por la terapia de vacunación se ven amplificadas. En nuestro conocimiento, hasta el presente, están en desarrollo varias vacunas anticancerígenas por las compañías, pero solo un producto, obtuvo la aprobación completa (por la FDA) para el cáncer de próstata de etapa final. Provenge® (o sipuleucel-T), es una inmunoterapia para el cáncer de próstata que consiste de una mezcla de las células sanguíneas del propio paciente que han sido incubadas "ex vivo" con la proteína de fusión PAP-GM-CSF. Hasta el momento, no se ha desarrollado ninguna vacuna anticancerígena contra células tumorales "escondidas". Por lo tanto, el método descrito en WO 2011/078676 no proporciona ninguna información de cómo la radiofrecuencia pulsada aplicada de una manera no invasiva, podría proporcionar una memoria y respuesta inmune sistémica contra las células cancerosas, y cómo podría utilizarse como una terapia de vacunación.

Sistema inmune y el cáncer

El sistema inmune es una estructura compleja y sus procesos protegen al organismo contra irregularidades y enfermedades. Tiene dos subsistemas básicos, el sistema inmune innato y el adaptativo. El sistema inmune innato se encuentra en casi todos los objetos vivos, o desarrolla memoria inmune y la acción (respuesta) no es específica ni inmediata. Las principales estructuras celulares del sistema inmune innato, son los macrófagos (capaces de fagocitar), los mastocitos (que liberan promotores de la inflamación); los granulocitos (un grupo de tres tipos de células que responden a la inflamación), células dendríticas (células inmunes adaptativas, que presentan antígenos), células asesinas naturales (destruyen células infectadas con patógenos). El sistema adaptativo encontrado en gnotósmos (vertebrados con mandíbula), tienen una memoria inmunológica, y usualmente, un tiempo de retardo para la respuesta. Los principales grupos de células que pertenecen al sistema adaptativo son las células-β, que están produciendo anticuerpos para neutralizar a los invasores; y las células T especializadas en destruir a las células infectadas o coordinar la respuesta inmune.

Uno de los papeles del sistema inmune es identificar y destruir a los tumores. El reconocimiento es posible debido a los antígenos tumorales específicos o a los antígenos tumorales asociados sobre la superficie de las células tumorales, pero no están presentes sobre las células sanas. Cualquier proteína producida en una célula tumoral que tiene una estructura alterada debido a la mutación genética, puede actuar como un antígeno tumoral. De otra manera, las proteínas que son producidas normalmente en muy bajas cantidades, pero cuya producción es incrementada en las células tumorales, pueden desencadenar una respuesta inmune. Un ejemplo de dicha proteína es la enzima tirosinasa. Debido a que estas proteínas son proteínas endógenas, una respuesta inmune es inusual, pero si la densidad del antígeno sobre la membrana celular es lo suficientemente alta, las células cancerosas pueden ser reconocidas y destruidas por las células T específicas.

Otra clase importante de antígenos tumorales, son las proteínas producidas normalmente solo en las etapas tempranas del desarrollo embrionario antes del sistema inmune sea desarrollado completamente de modo que no se puede desarrollar una autotolerancia contra estas proteínas o antígenos. Además, las células infectadas por oncovirus, por ejemplo, el VEB y el VPH, contienen ADN viral, el cual es transcrito y la proteína resultante o el ADN como tal, pueden ocasionar una respuesta inmune.

La respuesta inmune específica a las células tumorales, utiliza células T. Frecuentemente, las células tumorales expresan un número reducido de estructuras reconocibles, o incluso esconden las estructuras reconocibles, las cuales pueden ser reconocidas por las APC. Algunos tumores inhiben la respuesta inmune, por ejemplo, al secretar el TGF-β. De manera adicional, la tolerancia inmunológica puede desarrollarse y no dirigir ninguna reacción inmune adicional contra las células cancerosas. También, el tumor puede producir paradójicas como macrófagos que promueven el crecimiento tumoral en algunos casos.

Una formulación teórica básica presenta una inmunovigilancia, bloqueo de la carcinogénesis y mantiene en vigor la homeostasis celular. El proceso mediante el cual, un individuo es protegido contra el desarrollo del cáncer por su propio sistema inmune, es llamado inmunoedición. La inflamación puede ser uno de los mayores promotores del desarrollo tumoral en los sujetos ancianos.

Las terapias anticancerígenas actuales están dirigidas primordialmente a los llamados "estándares dorados", tales como las quimioterapias (productos farmacéuticos), radioterapia (haz ionizante), cirugía y sus combinaciones. Están emergiendo nuevos métodos para el tratamiento del cáncer, entre los que es una prometedora: la inmunoterapia.

En las quimioterapias (hipertermia corporal en combinación con quimioterapia), es importante el papel de las proteínas acompañantes. Las acompañantes (como proteínas de estrés y proteínas de choque térmico), son proteínas altamente conservadas, que están presentes en casi cada célula viva, y asisten en el plegamiento no covalente y desdoblamiento y ensamblaje o desmontaje de otras estructuras macromoleculares. Virtualmente, las acompañantes se encuentran en todos los organismos vivos, a pesar de su etapa en la evolución. Ubicadamente, las acompañantes son expresadas bajo condiciones normales y patofisiológicas, pero cualquier tipo de cambio en el equilibrio dinámico de la vida celular (estrés ambiental, como calor, procesos patógenos diversos, enfermedades, etc.) regula, sobre todo activa, su síntesis. La excreción de acompañantes es una "respuesta al estrés" de las células para adaptarse ellas mismas a los nuevos retos. Como consecuencia del crecimiento celular incrementado, y por lo tanto la expresión de proteínas incrementada de las células malignas, las acompañantes moleculares son altamente expresadas en las células cancerosas y son esenciales para la supervivencia de estos tipos celulares. Las proteínas de choque térmico (HSP) son un grupo de acompañantes que tienen una expresión incrementada cuando las células están expuestas a temperaturas elevadas o a otros estados de estrés. Además, se observó la inducción de diversas HSP (HSP27, HSP70, y HSP90) en numerosas metástasis y la homóloga HSP90, GRP94 puede actuar como un mediador de la generación de la metástasis. Además, las proteínas de estrés y de choque térmico son inducidas por cada método de tratamiento oncológico, lo que quiere decir eliminar la malignidad. Por lo tanto, la síntesis intensiva de acompañantes fue detectada después de la hipertermia convencional, quimioterapia, radioterapia y aun de la terapia fotodinámica. En la ruta de adaptación al estrés, generalmente, la inducción o sobreexpresión de las proteínas de estrés, proporciona protección efectiva de la célula contra la apoptosis. Sin embargo, la expresión extracelular de las proteínas de estrés, actúa opuestamente, y también, señala al sistema inmune un defecto de la célula real. Además, también, el tratamiento térmico puede conducir a una resistencia multifármacos.

Los efectos no dependientes de la temperatura (principalmente, estrés por campo electromagnético), también, podrían producir la síntesis de acompañantes. La manifestación de HSP en las biopsias de los tejidos cancerosos podría arrojar una buena indicación clínica a una respuesta al tratamiento.

Por otro lado, las estimulaciones de la acompañante HSP70 para congelar el equilibrio dinámico real (el "estatus-quo"), y así tratar de reestablecer la comunicación celular en los electrolitos extracelulares. Es sabido la expresión de la HSP70 acompañante sobre la membrana celular contra las apoptóticas, señala y mejora las reacciones inmunes. La HSP participa en la activación de supresor tumoral p53, y ha sido asociada con la proteína de retinoblastoma del supresor tumoral.

La relocalización en la membrana de HSP70 promueve la apoptosis, y tiene un papel muy importante (más que otras acompañantes) en el "fluido" membranal para mantenerla funcional. La localización membranal específica del tumor de HSP70, principalmente, en los microdominios ricos en colesterol de la membrana, tiene como resultado la activación eficiente de las células NK en la respuesta inmune. Un campo electromagnético de banda ancha (0.2 - 20 MHz) incrementó la expresión de HSP70. La producción del mismo incremento de la expresión de HSP70 debido a la temperatura, requeriría una perturbación de 14 ordenes de magnitud mayor, lo que explica la gran ventaja del efecto independiente de la temperatura de los campos eléctricos sobre las dependientes de la temperatura con respecto a la expresión de HSP70. El papel de la HSP70 extracelular es un tópico de interés que ha incrementado en las reacciones inmunes globales de los biosistemas.

La lisis celular y la liberación de toxinas características de la necrosis celular podría ocasionar, por supuesto, límites al proceso de distorsión. Sin embargo, la muerte celular apoptótica o cualquier otra acción inmune sistémica sería más natural y liberaría al sistema de complicaciones tóxicas. Tanto la apoptosis inducida térmicamente y la activación de las células asesinas naturales son adecuadas para resolver esta tarea.

Por lo tanto, sería altamente útil en el tratamiento del cáncer proporcionar una posibilidad para apoyar al sistema inmune a reconocer de manera fácil a las células tumorales, y especialmente, a las células tumorales no inmunogénicas que expresan un número reducido de estructuras reconocibles o que esconden las estructuras, las que podrían ser reconocibles por las APC. También, esta posibilidad permitiría el tratamiento exitoso de las metástasis y pacientes, quienes han desarrollado metástasis, las cuales, normalmente, son incurables.

El objetivo de la presente invención es proporcionar la posibilidad dicente.

Este objetivo se resuelve mediante la enseñanza de las reivindicaciones independientes. Otras características ventajosas y formas de realización son evidentes de la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones dependientes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis en un paciente que padece cáncer o para la prevención de la recaída de una enfermedad cancerígena en un paciente que haya sido tratado exitosamente, al administrar al paciente un estimulante inmune no específico junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.

Por lo tanto, un paciente con cáncer primario y/o con metástasis o un paciente después de un tratamiento exitoso contra el cáncer, que tenga el riesgo de una recaída, es tratado local o sistémicamente con un estimulante inmune no específico y además recibe un tratamiento con hipertermia con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. El tratamiento de hipertermia con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, puede ser aplicado una vez al día o cada segundo día o una vez a la semana, o es aplicado según se necesite o como sea programado por un médico, y normalmente, toma de una a varias horas por sesión.

Como se utiliza en el presente documento, el término "acoplamiento capacitivo" se refiere al hecho de que la energía electromagnética es liberada hacia la carga utilizando el dominio de campo eléctrico que forma el arreglo tipo capacitor. La carga, en este caso el paciente a tratar, es una parte del capacitor, y actúa como el material dieléctrico con pérdidas del capacitor. Los electrodos son iguales por su impedancia. El método utilizado en la presente invención tiene el acoplamiento capacitivo "conductor", el dominio de la parte de conducción de la función dieléctrica en el material dieléctrico imperfecto, la producción del efecto Joule en la mayoría. Cuando los electrodos están conectados libremente, el acoplamiento se vuelve más y más radiactivo, por lo tanto pierde su capacidad de efecto Joule.

La combinación del estimulante inmune no específico y el tratamiento con hipertermia con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, de conformidad con la presente invención, permite al sistema inmune propio del paciente reconocer las células de cáncer primario y la metástasis y las células cancerígenas con metástasis y las células de cáncer únicas formadas durante la recaída y después de su reconocimiento para matar a estas células

cancerígenas de manera efectiva. Por lo tanto, una modalidad favorecida de la presente invención se refiere a un método de vacunación *in-situ* e *in vivo* para un paciente, quien sufre de cáncer o que fue tratado por cáncer exitosamente con o sin el método de conformidad con la presente invención o de personas con riesgo incrementado de padecer cáncer.

5 En el presente método de tratamiento contra el cáncer y la metástasis o la prevención de recaídas en el cáncer, se administraron ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador que comprende al menos un electrodo y un contraelectrodo, caracterizado porque el paciente es el material dieléctrico intermedio.

10 Una de las ventajas del estimulante inmune no específico para uso en tratamiento no invasivo y para uso en la prevención del cáncer no invasiva cuando se usa en asociación con ondas de radiofrecuencia usando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador es que la administración de ondas de radiofrecuencia no requiere el uso de antenas como en el arreglo de RF con acoplamiento radiactivo. Otra ventaja significativa con respecto al estado de la técnica, es que las ondas de radiofrecuencia administradas no incrementan la temperatura corporal del paciente o
15 la temperatura del área tratada.

Preferentemente, las ondas de radiofrecuencia son administradas sistemáticamente utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.

20 El estimulante inmune no específico es seleccionado preferentemente del grupo que consiste o que comprende de preparaciones bacterianas, lipopolisacáridos, extracto de Bacillus Calmette-Guérin, Picibanil, Ancer, Xiao-Aiping, Leukine® (sargramostim; factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos recombinante), bacterias muertas *Corynebacterium parvum* y su extracto, citocinas, hipertermia moderada corporal completa, agentes agonistas del receptor TLR, cualquier agente sintético o natural que actúa por la vía TLR, ipilimumab, compuestos
25 herbales (equinacea, etc.), y Levimasol.

El estimulante inmune no específico utilizado en asociación con las ondas de radiofrecuencia de acuerdo con la presente invención es útil especialmente para la vacunación de personas con riesgo incrementado para desarrollar cáncer, debido a que este método genera una memoria del sistema inmune para reconocer células cancerígenas, y
30 especialmente porque, las células cancerígenas que intentan escapar del sistema inmune al esconder los antígenos antitumorales específicos.

Además, estimulante inmune no específico utilizado en asociación con las ondas de radiofrecuencia de acuerdo con la presente invención es extremadamente útil para la vacunación de los pacientes, que fueron putativamente
35 tratados de manera exitosa de una enfermedad cancerígena, como es sabido que existe una alta probabilidad de una recaída en el cáncer. Por consecuencia, el término "recaída" se refiere al regreso de una enfermedad cancerígena o de los signos y síntomas de una enfermedad cancerígena después de un periodo de mejora en el que no podría ser detectado el cáncer. La probable recaída ocurre porque algunas de las células cancerosas originales sobrevivieron al tratamiento inicial. A veces, esto es debido a que las células cancerosas proliferaron hacia otras
40 partes del cuerpo y eran demasiado pequeñas para ser detectadas durante el seguimiento, tomando lugar inmediatamente después del tratamiento (micrometástasis). El invento de la combinación de estimulante y ondas de radiofrecuencia aplicadas de forma no invasiva usando acoplamiento capacitivo podría proporcionar una memoria y una respuesta inmune sistémica contra las células cancerosas, especialmente también, contra las células proliferadas y podría ser utilizado como una terapia de vacunación. Por lo tanto, el método antes descrito, particularmente, es útil para prevenir la recaída después del tratamiento exitoso de manera putativa de un
45 tratamiento anticancerígeno con o sin el método de conformidad con la presente invención.

El estimulante inmune no específico utilizado en asociación con ondas de radiofrecuencia aplicado no invasivamente usando acoplamiento capacitivo de acuerdo con la presente invención es adecuado para el tratamiento del cáncer
50 primario y su metástasis y para la prevención de la recaída de un cáncer, caracterizado porque el cáncer, el cáncer primario, la metástasis o las células cancerosas son seleccionados a partir del grupo que consiste en: adenocarcinoma, melanoma coroidal, leucemia aguda, neurinoma acústica, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, tumor desmoide, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de seno, linfoma de Bukitt, cáncer corpus (carcinoma endometrial), síndrome CUP (carcinoma de sitio primario desconocido), cáncer colorectal, cáncer de intestino delgado, tumores de intestino delgado, cáncer ovarico, carcinoma endometrial, ependimoma, tipos de cáncer epitelial, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer gástrico, cáncer de la vesícula biliar, carcinomas de la vesícula biliar, cáncer cervical, cervix, glioblastomas, tumores ginecológicos; tumores de oreja, nariz y garganta, neoplasias hematológicas, leucemia de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, leucemia
60 de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, cáncer de piel testicular, tumores cerebrales (gliomas), metástasis cerebral, cáncer de testículos, tumor de la hipófisi, carcinoides, sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeal, tumor de células germinales, cáncer de hueso, carcinoma colorectal, tumores de cabeza y cuello, Tumores del área de la oreja, nariz y garganta), carcinoma de colon, craneofaringiomas, cáncer oral (cáncer en el área de la boca y sobre los labios), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de hígado, metástasis de hígado, leucemia, tumor de parpado, cáncer de pulmón, cáncer de nódulos linfáticos (Hodgkin/no Hodgkin), linfomas, cáncer de estómago, melanoma maligno, neoplasia maligna, tumores malignos del tracto gastrointestinal, carcinoma de seno, cáncer

- rectal, meduloblastomas, melanoma, meningiomas, enfermedad de Hodgkin, micosis fungoides, cáncer nasal, neurinoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, linfomas de no Hodgkin, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásticos, osteosarcomas, carcinoma ovarico, carcinoma pancreático, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de células escamosas de la cabeza y del cuello (SCCHN, por sus siglas en inglés), cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma rectal, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma tiroideo, enfermedad de Schneeberger, cáncer de esófago, espinaliomas, linfoma de células T (micosis fungoiges), timoma, tumores urológicos, carcinoma urotelial, cáncer de vulva, aparición de verruga, tumores de tejido blando, sarcoma de tejidos blanco, tumor de Wilm, carcinoma cervical y cáncer de lengua. Particularmente, adecuados para el tratamiento son, por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, cáncer pancreático, cáncer bronquial, cáncer de seno, cáncer colorectal, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de laringe, melanoma maligno, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga y cáncer de células renales. La invención de conformidad con la presente solicitud, es adecuada especialmente para el tratamiento de tumores o de cáncer no inmunogénico.
- 15 Preferentemente, el estimulante inmune no específico para uso en tratamiento no invasivo de de cáncer primario y su metástasis en un paciente que tiene cáncer o para uso no invasivo en la prevención de recaídas de una enfermedad cancerígena en un paciente que fue tratado exitosamente al administrarse no invasivamente al paciente Xiao-Aiping con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.
- 20 Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un estimulante inmune no específico para uso no invasivo en la prevención del cáncer en una persona con incremento del riesgo de desarrollo de cáncer, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es usado en asociación con las ondas de radiofrecuencia usadas de forma no invasiva utilizando un acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.
- 25 Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de un estimulante inmune no específico para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y su metástasis, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado junto con las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Además, la presente invención se refiere al uso de un estimulante inmune no específico para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que padezca cáncer o para la prevención de la recaída de una enfermedad cancerosa en un mamífero, que fue tratado exitosamente de manera putativa de una enfermedad cancerosa, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Por consiguiente, el estimulante inmune no específico activa numerosas reacciones inmunes no específicas, y convierte el efecto local de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, en efecto sistémico.
- 35 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un estimulante inmune no específico para la preparación de una vacuna para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis en un paciente, que padece cáncer, o para la prevención de la recaída en la enfermedad cancerosa en un paciente, que fue tratado exitosamente de una enfermedad cancerosa, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado al paciente junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.
- 40 Esta vacuna es especialmente útil para la vacunación *in-situ*, y preferiblemente, para los tipos de cáncer mencionados anteriormente.
- 45 Preferiblemente, el Xiao-Aiping en asociación con ondas de radiofrecuencia aplicadas de forma no invasiva utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador es útil para el tratamiento de cáncer primario o para la prevención de remisiones de la enfermedad cancerosa en una persona que fue tratada exitosamente de una enfermedad cancerosa o para la prevención de cáncer en una persona que tiene riesgo elevado de desarrollar cáncer.
- 50 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un estimulante inmune no específico para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para la prevención de la recaída en la enfermedad cancerosa cuando se utiliza asociado a ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un estimulante inmune no específico para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para uso no invasivo en la prevención de la recaída en la enfermedad cancerosa, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Además, la presente invención se refiere al estimulante inmune no específico para el tratamiento de un mamífero que padece cáncer o para la prevención de la recaída en una enfermedad cancerosa en un mamífero, que fue tratado exitosamente de manera putativa de una enfermedad cancerosa, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Por consiguiente, el estimulante inmune no específico activa numerosas reacciones inmunes no específicas, y convierte el efecto local de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, en efecto sistémico.
- 60 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a Xiao-Aiping para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para la prevención de la recaída en la enfermedad cancerosa, cuando es utilizado junto
- 65

con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Por lo tanto, una modalidad favorecida de la presente invención se refiere a Xiao-Aiping para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para uso no invasivo en la prevención de la recaída en la enfermedad de cáncer, caracterizado porque Xiao-Aiping es administrado junto con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Además, la presente invención se refiere a Xiao-Aiping para uso en el tratamiento no invasivo de un mamífero que tenga cáncer o para uso no invasivo en la prevención de la recaída en una enfermedad cancerosa en un mamífero, quien fue exitosamente tratado de manera putativa de una enfermedad cancerosa, caracterizado porque el estimulante inmune no específico es administrado junto con ondas de radiofrecuencia de forma no invasiva utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.

Sorprendentemente, se encontró que los estimulantes inmunes no específicos comunes son altamente útiles para el tratamiento del cáncer primario y su metástasis cuando se utiliza junto con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Los inventores podrían demostrar que las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador solo, no tendría ningún efecto sobre el tumor o la metástasis a mucha distancia. La administración del estimulante inmune (LPS, Xiao-Aiping) no tuvo ningún efecto sobre la regresión tumoral. Sin embargo, la administración del estimulante inmune no específico junto con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo, proporciona un efecto abscopal, y tiene como resultado la reducción de los tumores situados lejos del sitio de administración. Por lo tanto, las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo y la administración del estimulante inmune no específico juntos resultan en los efectos sistémicos.

La presente invención no actuaría con acoplamiento radiativo, debido a que el acoplamiento radiativo quemaría a las células. Por lo tanto, no se utilizan antenas como en el arreglo de RF con acoplamiento radiativo, para la administración de ondas de radiofrecuencia junto con el estimulante inmune de conformidad no específico con la presente invención.

Las ondas de radiofrecuencia de conformidad con la presente invención son administradas utilizando un arreglo de condensador que comprende al menos un electrodo y al menos un contraelectrodo, en donde el paciente es el material dieléctrico en el medio.

Una modalidad favorecida de la presente invención se refiere a un estimulante inmune no específico utilizado en asociación con ondas de radiofrecuencia administrados sistémicamente.

Las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador de conformidad con la presente invención no incrementa la temperatura corporal del paciente o la temperatura del área tratada.

Todos los estimulantes inmunes no específicos comunes pueden utilizarse en la presente invención. Los inmunoestimulantes o inmunoestimuladores, son sustancias que estimulan al sistema inmune al inducir la activación o incrementar la actividad de cualquiera de sus componentes. La presente invención se refiere a un inmunoestimulante no específico, que actúa sin tomar en cuenta la especificidad antigénica para aumentar la respuesta inmune de otros componentes del estimulante o del antígeno del sistema inmune sin la especificidad antigénica. Los ejemplos de posibles estimulantes inmunes útiles dentro de la presente invención, son lipopolisacáridos, extracto de *Bacillus Calmette-Guérin*, Picibanil, Ancer, Xiao-Aiping, Leukine® (sargramostim; factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos recombinante), bacterias muertas *Corynebacterium parvum* y su extracto, hipertermia corporal completa moderada, Ipilimumab (un anticuerpo contra el antígeno 4 asociado con linfocitos T citotóxico), Levamisol, KLH (Hemocianina de lapa californiana), cisplatino o carboplatino en dosis baja (< 0.4 mg/kg), Juzentaihoto (JT48) y ácido desoxicólico (DCA). El estimulante inmune de conformidad con la presente invención puede ser seleccionado a partir del grupo que comprende o que consiste de las preparaciones bacterianas, modificadores de la respuesta biológica, agentes agonistas receptores de TLR, agente sintético o natural que actúa en la vía TLR, extractos herbales y hierbas, medicina tradicional china (TCM), Kampo (adaptación japonesa de la medicina china), como Juzentaihoto (JT48). Particularmente, los estimulantes inmunes favorecidos son Xiao-Aiping, Leukine®.

En el Ejemplo 14, se utilizó el estimulante inmune JT48 y en la Fig. 48 se muestra el resultado. La administración del estimulante inmune solo (JT-48) sin la administración de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador no tiene casi ningún efecto, mientras que el tratamiento de RF solo (OTM: tratamiento de oncotermia), tiene un efecto considerable pero los dos juntos, es decir, el estimulante inmune con la oncotermia tiene un efecto remarcable. Se podrían obtener los mismos resultados al utilizar cualquier otro de los estimulantes inmunes descritos, como los estimulantes inmunes del párrafo anterior.

Las preparaciones bacterianas son seleccionadas preferiblemente a partir del grupo que comprende o que consiste de lipopolisacáridos, extracto de *Bacillus Calmette-Guérin*, Picibanil (OK-432), bacterias muertas *Corynebacterium parvum* y su extracto.

Los modificadores de respuesta biológica (Biológicos; BRM), son sustancias producidas por el cuerpo humano de manera natural, pero que pueden producirse idénticas o muy similar por medio de métodos biotecnológicos y otras

tecnologías también. Estas sustancias estimulan la respuesta del cuerpo a una infección. Los biológicos son seleccionados preferiblemente a partir del grupo que comprende o que consiste de anticuerpos monoclonales, interleucina-2, interferon, varios tipos de factores estimulantes de colonias (CSF, GM-CSF, G-CSF), receptor de TNF humano, sustancia producida por el timo corporal como la proteína tímica A o el factor humoral tímico (THF) e Ipilimumab (un anticuerpo contra el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxico).

Preferiblemente, los extractos herbales y las hierbas son seleccionados a partir del grupo que comprende o que consiste de *Equinacea angustifolia* (Purple coneflower), raíz de ginseng, Xiao-Aiping (extracto de *Marsdenia tenacissima*), Juzentaihoto (JT48) y raíz de astrálogo chino.

Los cambios en los niveles de hormonas sexuales en el cuerpo ocasionan síntomas particulares. Estos varían de persona a persona. Los síntomas pueden ser suaves pero para algunas personas pueden ser graves y necesitar tratamiento. Algunos cánceres (de seno, de próstata) son sensibles a las hormonas y necesitan estrógeno o testosterona para crecer. Por lo tanto, se prefiere que el estimulante inmune no específico de conformidad con la presente invención no es hormona y adicionalmente preferentemente no hormona sexual.

El estimulante inmune no específico de la inventiva descrito en el presente documento, activa al sistema inmune del paciente y junto con las ondas de radiofrecuencia administradas utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, proporciona un efecto de vacuna contra las enfermedades cancerosas al crear una memoria para reconocer y matar a las células cancerosas, y de este modo, prevenir la recaída en la enfermedad cancerosa.

Como se utiliza en este documento, el término "efecto de vacuna" se refiere a la respuesta inmune desarrollado por el paciente, después de la administración del estimulante inmune no específico junto con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, la respuesta inmune posibilita el reconocimiento de los mecanismos de defensa para completar la erradicación de las células cancerosas.

Como se utilizado en este documento, el término "exitosamente tratado de cáncer" se refiere a pacientes en un periodo después del tratamiento de cáncer inicial que tengan una mejora y en quienes no pudiese detectarse más ningún tipo de cáncer. Estos pacientes tienen un riesgo incrementado de un regreso de una enfermedad cancerosa. Por lo tanto, son tratados exitosamente de manera potencial de cáncer, ya que algunas de las células cancerosas sobrevivieron al tratamiento inicial, por ejemplo, al diseminarse hacia otras partes del cuerpo y siendo demasiado pequeñas para ser detectadas por medio de los métodos de diagnóstico actuales. Los mamíferos que se han curado completamente que no tienen células cancerosas o células malignas, no son capaces de desarrollar el efecto de la vacuna de la presente invención, ya que, no se puede detectar ningún antígeno asociado al tumor o específico del tumor, y no puede ser atacado por el sistema inmune. Sin embargo, el riesgo de recaída es tan alto que la radiación actualmente es aplicada a muchos pacientes después del tratamiento anticancerígeno común, aun después de una cirugía exitosa, para prevenir la recaída. Una ventaja del presente método es una reducción de los efectos secundarios, tratando a personas solamente susceptibles al cáncer, y el efecto sistémico del tratamiento de la inventiva de modo que las células diseminadas puedan tratarse, también se conoce en qué parte del cuerpo del paciente están localizadas. De este modo, los métodos de conformidad con la presente invención son adecuados para los pacientes que tengan un riesgo de aclareamiento incompleto de células cancerosas después del tratamiento inicial contra el cáncer.

Un paciente que sufre de cáncer primario y/o metástasis o un paciente después de un tratamiento contra el cáncer exitoso, que tenga el riesgo de desarrollar una recaída o que tenga desarrollada una recaída, se le trata localmente o sistémicamente con un estimulante inmune y además se somete a un tratamiento con hipertermia con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. El tratamiento con hipertermia y ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, se administra según sea necesario, por ejemplo, una vez al día o cada segundo día o una vez a la semana o según sea programado por un médico. El tratamiento de hipertermia con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo toma normalmente de una a varias horas por sesión. El estimulante inmune, también, es administrado según sea necesario. El estimulante inmune no específico para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para la prevención de la recaída en el cáncer, se puede aplicar en paralelo o de manera secuencial con las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Por consiguiente, en paralelo significa que el estimulante inmune no específico y las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, son aplicados al paciente el mismo día (en un periodo de 12 horas), pero también, se refiere a un esquema de administración en donde la administración del estimulante inmune no específico y la aplicación no invasiva de las ondas de radiofrecuencia se realizan de manera alternada (intervalo entre 12 y 48 horas). Una aplicación secuencial se refiere a una aplicación, en donde el estimulante inmune no específico es administrado antes de o de manera subsecuente después de las ondas de radiofrecuencia, pero preferentemente, antes del tratamiento de hipertermia.

En una modalidad favorecida de la presente invención, las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, son administradas primero y después de este primer periodo, administrando solamente las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, adicionalmente, se administra un estimulante inmune no específico. Por ejemplo, 48 h después de la primera administración de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de

condensador, o más preferiblemente 72 h después de la administración, el estimulante inmune no específico es administrado por primera vez. A partir de entonces, hay una administración paralela tanto del estimulante inmune no específico como de las ondas de radiofrecuencia. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un estimulante inmune no específico para el tratamiento no invasivo de cáncer primario y su metástasis o para uso no invasivo en la prevención de la recaída en el cáncer, cuando se utiliza asociado con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, caracterizado porque en un primer intervalo, las ondas de radiofrecuencia son administradas solas y en un intervalo subsecuente, el estimulante inmune no específico es administrado simultáneamente con las ondas de radiofrecuencia. La administración del estimulante inmune no específico, así como la de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, puede ser diariamente, cada dos días o cada tres días repetidos durante una terapia. La duración de la terapia completa depende de los diferentes parámetros, tales como, la situación del paciente (corto para la prevención de las recaídas pero tal vez más largo o varias veces para los pacientes que tienen un riesgo incrementado debido a mutaciones relevantes), el tipo de cáncer o el tamaño del cáncer primario.

El uso de hipertermia en el tratamiento contra el cáncer es bien conocido en el estado de la técnica. Sin embargo, nunca se ha reportado en el estado de la técnica de la literatura, que ocurra la activación del sistema inmune adaptativo del paciente de manera que se realice la vacunación *in situ* altamente personalizada.

De este modo, la presente invención proporciona la vacunación *in-situ e in vivo* de un paciente, quien padece cáncer o que fue tratado exitosamente de cáncer con o sin el método de conformidad con la presente invención o de personas con riesgo incrementado de padecer cáncer.

Así, la presente invención se relaciona, también, con el uso de al menos un estimulante inmune no específico para lograr una vacunación contra las células cancerosas en un paciente, en caso de que al menos sea administrado un estimulante inmune no específico en combinación con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente aplicando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. También, la presente invención se relaciona con el uso de al menos un estimulante inmune no específico para conseguir una vacunación contra células cancerosas en un paciente, en caso de que al menos sea administrado un estimulante inmune no específico en combinación con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente aplicando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. También, la presente invención se relaciona con el uso de al menos un estimulante inmune no específico para conseguir una vacunación contra células cancerosas en un paciente, en caso de que al menos sea administrado un estimulante inmune no específico en combinación con ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente aplicando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.

Así, la presente invención se relaciona con el uso de un estimulante inmune no específico para la preparación de una vacuna para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis en un paciente, quien padece cáncer o para la prevención de la recaída en el cáncer en un paciente, quien ha sido tratado exitosamente de un cáncer, caracterizado porque el estimulante inmune es administrado al paciente en combinación con ondas de radiofrecuencia aplicando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. Especialmente, esta vacuna es útil para la vacunación *in-situ*, y preferiblemente, para los tipos de cáncer mencionados anteriormente. La vacuna de conformidad con la presente invención, es útil particularmente para la vacunación de personas con riesgo incrementado de desarrollar cáncer y/o para la vacunación de un paciente para prevenir la recaída en el cáncer tratado de manera exitosa.

Es importante mencionar que dentro de cualquier uso o método de la inventiva descritos en este documento, la aplicación y/o la administración de las ondas de radiofrecuencia no involucra un paso invasivo. Las ondas de radiofrecuencia son aplicadas desde afuera del cuerpo sin la necesidad de insertar o implantar los electrodos o arreglos de antenas dentro del cuerpo del paciente o dentro del torrente sanguíneo o dentro del tejido. Además, no se utiliza ningún acoplamiento radiativo, y preferiblemente no se utiliza o involucra ninguna aplicación directa o generación de calor (cf. Fig. 1). La longitud de onda utilizada en la presente invención, está entre los 10 kHz y 50 MHz, más preferiblemente entre 130 kHz y 42 MHz, y con mayor preferencia los valores de 135.6 kHz \pm 5%, 339 kHz \pm 5%, 678 kHz \pm 5%, 1.356 MHz \pm 5%, 3.39 MHz \pm 5%, 6.78 MHz \pm 5%, 13.56 MHz \pm 5%, 27.12 MHz \pm 5%, and 40.68 MHz \pm 5%.

Además, la presente invención no aplica el ajuste del arreglo de fase como se hace por el acoplamiento radiativo con el arreglo de antena. Las ondas de radiofrecuencia se forman en un arreglo de condensador entre los electrodos; es decir, al menos un electrodo y al menos un contraelectrodo, caracterizado porque el cuerpo del paciente es el dieléctrico (es decir, el material dieléctrico).

Además, la presente invención se relaciona con un método de vacunación de un paciente por medio de la administración de una vacuna compuesta de al menos un estimulante inmune y ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo. Dicha vacunación habilita al sistema inmune del paciente para reconocer células cancerosas hasta el momento no reconocidas, y además, generar una memoria en el sistema inmune del paciente para reconocer, también, células cancerosas en otras partes del cuerpo, especialmente, durante la formación de la metástasis, y también, para reconocer nuevas células cancerosas, que reaparecen después de un tratamiento contra el cáncer exitoso en el paciente. Este método multidisciplinario es capaz de ocasionar una vacunación del

tumor personalizada *in-situ* e *in vivo*, y permitir al sistema inmune, y especialmente, al sistema inmune adaptativo reconocer y eliminar células cancerosas, y especialmente, células cancerosas únicas antes de que se presente un cáncer y erradicar la metástasis y reconocer y eliminar a las nuevas células cancerosas, que reaparecen después del tratamiento exitoso contra el cáncer. De este modo, la presente invención habilita al sistema inmune para reconocer células cancerosas y la metástasis no reconocidas previamente, y por lo tanto, matar a las células cancerosas, finalmente, llevando al tratamiento exitoso del cáncer primario y su metástasis y prevención de la recaída en una enfermedad metastásica maligna.

El modo de acción de la vacuna de la presente invención, probablemente, podría ser explicado como se explica a grandes rasgos a continuación. La vacuna de la presente invención estimula al sistema inmune de una manera específica en comparación con el estimulante inmune solo. La lesión maligna no es atacada por el sistema inmune innato, y el sistema inmune adaptado no es capaz de reconocer al tumor, por lo que también, sigue siendo inactivo. Esta es la razón, de porque la estimulación inmune sencilla no puede ser efectiva para destruir la malignidad desarrollada. Las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador (oncoterapia) solas, estimulan al sistema inmune cuando son aplicadas sistémicamente, por lo que se enfrenta a la misma inespecificidad que los estimulantes inmunes. La oncoterapia aplicada localmente, ocasiona apoptosis o efectos locales, pero las fuerzas malignas promedio, la diseminación de las células y la formación metastásica están fuera del alcance de este tratamiento. La combinación de estimulante inmune no específico y las ondas de radiofrecuencia de acuerdo con la presente invención ataca a las células malignas presentes en todo el cuerpo.

Así, la combinación de estimulante inmune no específico y las ondas de radiofrecuencia de acuerdo con la presente invención es también altamente útil para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis o para la prevención de la recaída en el cáncer de los pacientes con sistema inmune débil o con el sistema inmune suprimido, ya que la vacuna de la inventiva dispara la respuesta inmune y activa al sistema inmune.

A continuación, se presenta un resumen del estatus de las posibilidades de inmunoterapia antitumorales actuales, especialmente los métodos de vacunación antitumorales. Tabla 1 resume algunos ensayos clínicos que muestran las posibilidades de vacunación antitumorales presentes (M. Vergati, C. Intrivici, N.-Y. Huen, J.Schlom, K. Y. Tsang, Strategies for Cancer Vaccine Development; *J. Biomed. Biotech.* **2010**, ID del artículo 596432, doi:10.1155/2010/596432).

Tabla 1: Estudios clínicos con vacunación antitumoral (Abreviaturas:) SG = supervivencia general; RR = tasa de respuesta; SSA = supervivencia sin evolución; BSC = mejor atención de apoyo; DFS = supervivencia sin enfermedad).

	VACUNA	FASE	DEL TUMOR	No. de pacientes	NOTA
5	Vacunas con vectores virales				
	PSA-TRICOM	II	Próstata	122	8.5 m SG, mejora vs. placebo
10		II	Próstata	32	>16.4 m SG, mejora en HPS > 18 m grupo
15	PANVAC-VF	III	Páncreas	255	Fracasos >SG Pacientes con expectativas de vida < 3 m
	Vacunas con péptidos				
20	Provenge	III	Próstata	512	4.1 m SG mejora vs. placebo
	Oncófago	III	Melanóma	322	SG prolongado en la subpoblación M1a y M1b
25		III	Renal	818	Ninguna diferencia en DFS y en SG
	gp100:209-217(210M)	III	Melanóma	185	Mejora significativa en RR y SSA
30	Stimuvax	IIB	Pulmón	171	17.3 m SG, mejora vs BSC en etapa locoregional IIB
	Vacunas con células tumorales o lisados de células tumorales				
35	OncoVAX	III	Colon	254	Mejora significativa en DFS y SG en la etapa II
	Reniale	III	Renal	558	Mejor significativa en DFS y SG
40	GVAX	III	Próstata	626	Falló para mejorar la SG vs docetaxel
45		III	Próstata	408	Falló Tasa de mortalidad más alta en el grupo de combinación (vacuna + docetaxel) vs docetaxel solo
50	Vacunas con ARN				
	ARNm de líneas celulares Pca	I/II	Próstata	19	Respuestas inmunológicas

Múltiples vacunaciones anticancerígenas, como aquellas enlistadas en la Tabla 1, han desarrollado el método muy complicado *off-situ* o el cultivo robótico de DC. Sin embargo, las vacunas anticancerígenas mencionadas anteriormente, pueden aplicarse únicamente en condiciones muy limitadas. La razón principal de los fracasos y la baja eficacia de las vacunas anticancerígenas de la técnica previa es la baja actividad inmunogénica de las células tumorales en casos generales. El sistema inmune no es capaz de reconocer o identificar a las células tumorales, y por lo tanto, no pueden ser eliminadas. La estimulación inmune sin los procesos de identificación inmune específica (por ejemplo, terapias de citocinas con IL-2, IL-8, TNF, etc.), no pueden alcanzar la eficacia deseada. En este contexto, la vacunación anticancerígena de conformidad con la presente invención es superior a lo conocido en el estado de la técnica conocido sobre vacunaciones anticancerígenas. La presente invención se relaciona con una vacunación *in-situ* e *in-vivo*; y genera los siguientes efectos benéficos:

1. El campo eléctrico de RF aplicado en la presente invención, y más específicamente, el campo eléctrico RR de amplitud modulada (AM) induce la muerte celular inmunogénica.

Pruebas:

1.1. La muerte celular apoptótica con formación de cuerpos apoptóticos (véase **Figura 14**)

5 1.2. Formación de DAMP (patrón molecular asociado al daño)/SAMP (patrón molecular asociado al estrés):

1.2.1. Sobreexpresión y externalización de HSP (véanse **Figuras 3, 18, 28 y 30**)

10 1.2.2. Sobreexpresión de DR5 (TRAIL) (véase **Figura 17**)

1.2.3 Externalización de HMGB1 (caja de grupo de alta movilidad) (véase **Figura 15**)

15 1.2.4 Externalización de calreticulina (véase **Figura 16**)

2. Muerte celular inmunogénica inducida por ondas de RF utilizando acoplamiento capacitivo, crea la reacción inmune local potente contra el tumor. Los antígenos tumorales no escondidos se vuelven reconocibles por APCs. Debido a que las ondas de RF indujeron la muerte celular inmunogénica, las TSA únicas de los pacientes están representadas por las células dendríticas (DC) a células T creando las reacciones inmunes específicas contra la malignidad en el paciente.

Pruebas:

2.1. El anillo de invasión de leucocitos alrededor del tejido tumoral destruido.

25 2.2. Presencia de las células T en este anillo

3. El efecto del estimulante inmune no específico, como los estimulantes inmunes derivados de bacterias (como por ejemplo, Picibanil, Ance, *C.parvum*, extracto Coley, Leucina, otros extractos de LPS, etc.), en combinación con las ondas de RF inducidas localmente utilizando acoplamiento capacitivo, es sistémico. Por lo tanto, las metástasis lejanas son destruidas por medio de las células T citotóxicas, las cuales son activadas por las DC cargadas de TSA.

Pruebas:

35 3.1. El estudio LPS, los efectos abscopales en el humano, las acciones abscopales experimentales (véanse **Figuras 4, 5, 6, 29, y 40**)

El estimulante inmune no específico usado en asociación con las ondas de radiofrecuencia aplicadas de forma no invasiva utilizando acoplamiento capacitivo de la presente invención ocasionan un efecto sistémico (el sistema inmune adaptativo actúa en el cuerpo entero), y esta es una de las ventajas más importantes de la presente vacuna, principalmente para llevar a cabo un tratamiento sistémico local. La acción sistemática del estimulante inmune no específico descubre a los antígenos tumorales escondidos, los cuales se presentan bajo la aplicación de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo; y trata al cáncer sin ocasionar fiebre artificial extrema. La invención del estimulante inmune no específico utilizado en asociación con las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente realiza este apoyo inmune sin inducir fiebre artificial y sin ninguna carga extra sobre el paciente débil.

Así, la presente invención se relaciona con un estimulante inmune no específico útil para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis aun en estados celulares diseminados, lo que no pueden ser detectados por los métodos de imagenología del estado de la técnica; y es útil para la prevención de la recaída en el cáncer cuando o bajo la condición de que se utilicen las ondas de radiofrecuencia estén presentes y que el acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador. El estimulante inmune no específico bajo esta condición, ocasiona una vacunación sistémica que activa al sistema inmune, y especialmente, al sistema inmune adaptativo sin ocasionar fiebre artificial; que es especialmente útil para el tratamiento de la metástasis y el cáncer primario que no pueden ser detectados por medio de los métodos del estado de la técnica, así como, especialmente, es útil para la prevención de la recaída en el cáncer que ha sido tratado exitosamente.

Además, la presente invención se relaciona con un método para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis, aun en estados celulares diseminados, los cuales no pueden ser detectados por los métodos de imagenología del estado de la técnica; y es útil para la prevención de las recaídas en el cáncer por medio de la administración de un estimulante inmune a un paciente y sometiendo al paciente a ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, mientras que el estimulante inmune estimula al sistema inmune del paciente. De este modo, mientras el estimulante inmune está activo en el cuerpo del paciente, se aplican las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo.

65 Tal efecto no se puede lograr solo por medio de los métodos para la estimulación inmune. De conformidad con la presente invención, se pueden utilizar las siguientes rutas de administración para la estimulación inmune:

1. Administración sistémica (intramuscular subcutánea) del inmunoestimulante.
2. Administración local (intratumoral) del inmunoestimulante (inmunoestimulación local directa vía la ruta TLR, transpresentación y estimulación de citocinas generadas de manera secundaria)
3. Inyección intratumoral
4. Compuestos objetivo liberados en el tumor por medio de liposomas (liposomas electrosensibles)

Estos estimulantes inmunes no específicos de la presente invención, podrían inyectarse directamente dentro de la lesión tumoral, o ser aplicados sistémicamente (oralmente, inyección i.v. o i.m.) Cuando se aplican sistémicamente, pueden dirigirse hacia la lesión tumoral a través de métodos de focalización tumoral especiales (como son portadores de liposomas, focalización magnética, portadores de nanopartículas, etc.)

La focalización dirigida intensifica fuertemente el cebado cruzado, cuando los estimulantes inmunes (por ejemplo, las endotoxinas bacterianas, como los materiales LPS o tipo LPS) están actuando a través de las rutas del receptor de TLR. Dichos estimulantes inmunes son enlazados a las células APC (por ejemplo, DC) junto con las TSA, por lo tanto, inducen reacciones inmunes efectivas más fuertes y más duraderas. En el caso de la liberación de liposomas, podrían adicionarse algunos adyuvantes inmunológicos (como óxido de aluminio (alumina), zeolita).

El efecto sistémico de los presentes métodos, genera una memoria inmune fuerte contra el tumor, previniendo la recaída en el cáncer. Así, la vacuna de la presente invención tienen un efecto tipo proxiláctico. Por ejemplo, cáncer colorectal o cáncer pancreático crean metástasis en el hígado en > 90%. En estos casos, el lugar con probabilidades de convertirse en metastásico puede ser tratado localmente, aun cuando el tumor primario sea extirpado. La vacuna de la inventiva podría aplicarse aún si no existen pruebas de formación de metástasis, pero que la formación de metástasis o la recaída son probables. Esto es importante en la mayoría de los casos de tratamiento de tumores primarios, aun después de la remisión completa. La remisión completa como la respuesta clínica no significa la cura completa, solo significa que los sistemas de imagenología actuales no pueden ver la malignidad en ese lugar particular y tiempo particular.

Los inventores encontraron que las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo, son útiles como un estimulante físico, y con más precisión, son útiles para el tratamiento de cáncer primario y su metástasis, así como, para la prevención de las recaídas en un cáncer, al inducir una respuesta inmune defensiva específica contra las células cancerosas. Especialmente, las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente utilizando acoplamiento capacitivo, son útiles como una vacunación para erradicar las células cancerosas, las cuales normalmente, no son reconocidas por el sistema inmune.

Las diferencias más importantes entre los métodos de la técnica previa y las ondas de RF que utilizan acoplamiento capacitivo, como se utiliza en la presente invención, se resumen a continuación:

Método de RFA (estado de la técnica):

- utiliza longitud de onda corta y frecuencia alta alternando corriente [130 MHz – 2400 MHz];
- es un método invasivo (inserción intratumoral de agujas);
- solo es posible el tratamiento local;
- la lesión se quema/el tumor se quema;
- solo el calor ocasiona el efecto terapéutico;
- ocasiona necrosis violenta;
- utiliza "antenas" en forma de agujas;
- utiliza acoplamiento radiativo;
- requiere el ajuste del arreglo de fase con propósitos de sintonización;
- las agujas son guiadas a través de métodos imagenológicos o de ultrasonido, como detección por rayos-X, tomografía computarizada (TC) en el cuerpo del paciente;
- solo es útil para los tumores sólidos.

La estimulación intravascular con radiofrecuencia pulsada descrita en WO 2011/078686, se caracteriza porque:

- es un método invasivo (se introduce intravascularmente un electrodo tipo aguja);
- es el método de tratamiento sanguíneo inespecífico que lleva al estímulo del sistema inmune al estimular y atraer a los linfocitos;
- tiene como resultado el calentamiento directo;
- usa una radiofrecuencia máxima de 1 MHz;
- tiene como resultado el calentamiento de una macroregión;
- no lleva a la inducción de la muerte celular apoptótica.

Los inventores encontraron que las ondas de RF utilizando acoplamiento capacitivo y un arreglo de condensador WO 2009/092612, WO 2010/0437372) tienen las siguientes ventajas, las que los hacen adecuados para un método de vacunación eficiente de conformidad con la presente invención;

- se utilizan ondas de RF están en el intervalo, preferiblemente, de 10 kHz a 50 MHz, de preferencia 13.56 MHz, pero no más de 50 MHz; más preferiblemente de 10 kHz a 45 MHz y con mayor preferencia 13.56 MHz o cualquier valor obtenido en la multiplicación o división por/entre un número entero, preferible la división entre 40. Por lo tanto, son más favorecidas las siguientes frecuencias: 13.56 MHz, o 1/100, 1/40, 1/20, 1/10, ½ veces, 2 veces o 3 veces, etc., este valor 13.56 MHz (i.e. 6.78 MHz, 27.12 MHz o 40.68 MHz).
- 5 - no es un método invasivo;
- hace posible el tratamiento sistémico;
- utiliza calor, el cual en combinación con los estimulantes inmunes y el sistema inmune activado propio del paciente, tiene éxito en la lucha contra las células cancerosas, y por lo tanto, hace uso de un efecto sinérgico del calor con el sistema inmune del paciente;
- 10 - no ocasiona efectos secundarios (indeseados);
- se puede utilizar en combinación con las terapias anticancerígenas comunes, tales como quimioterapia y terapia de radiación;
- induce la apoptosis de las células tumorales;
- 15 - no ocasiona la necrosis de las células tumorales;
- utiliza un arreglo de condensador, caracterizado porque el cuerpo del paciente en medio de los electrodos es el material dieléctrico y es parte del circuito conductivo;
- utiliza acoplamiento capacitivo;
- no requiere el apoyo de ultrasonido o cualquier otro método de imagenología;
- 20 - especialmente, es útil para destruir células cancerosas únicas, y por lo tanto, para tratar el cáncer en etapa muy temprana, en su estado muy inicial y también para tratar la recaída en un cáncer en la etapa muy temprana, en el estado muy inicial;
- induce la capacidad en el sistema inmune de reconocer células cancerosas. Más específicamente, dispara al sistema inmune adaptativo para reconocer a las células cancerosas, de este modo, establece una memoria a largo plazo en el sistema inmune adaptativo para reconocer a las células cancerosas, proporcionando así, una vacunación contra las células cancerosas. Esta puede ser la diferencia más importante sobre todos los métodos de tratamiento contra el cáncer conocidos.

30 Así, particularmente, el presente método de vacunación es útil para la erradicación de células tumorales "escondidas", siendo el primer método de vacunación en el campo que tiene este efecto benéfico inesperado. Como es sabido por una persona con habilidades en la técnica, las células tumorales "escondidas" presentan el comportamiento más agresivo ya que el sistema inmune las reconoce como propias o no las reconoce en lo absoluto. Se pueden diferenciar tres categorías de células tumorales escondidas:

- 35 la primera categoría y la peor categoría comprenden las "células tumorales latentes", que no muestran un carácter maligno mientras son estudiadas, son quimioresistentes, pero no resistentes al calor. Estas células están mayormente en la masa tumoral, de modo que no son afectadas por un calentamiento lejano. De este modo, debido al intercambio de calor intensivo con el gran volumen de sangre circulante, la estimulación intravascular por PRF que tiene un efecto de intervalo corto en el sentido termodinámico, no tiene ningún efecto sobre las "células tumorales latentes". Sin embargo, estas células son blanco del método de vacunación de conformidad con la presente invención.
- 40 - una categoría secundaria de células escondidas, son las células diseminadas, las cuales son circulantes en el torrente sanguíneo. Debido a su baja concentración, su presencia en la sangre es imposible de ser detectada en la actualidad.
- 45 - una tercera categoría de células escondidas es la de las micrometástasis. Las micrometástasis son las partes más peligrosas e invisibles del desarrollo maligno. La resolución de los sistemas de imagenología utilizados actualmente (PET, MRI, CT, SPECT, Usonido, etc.), permiten la detección de las micrometástasis solo después de que estas forman agregados compuestos de algunos millones de células, conforme su resolución este en el intervalo de los mm. En nuestro conocimiento, ninguno de los métodos de la técnica previa afecta a las micrometástasis. Sin embargo, el método de vacunación de conformidad con la presente invención, proporciona un efecto benéfico contra estas células cancerosas.

55 Los estimulantes inmunes no específicos de la invención son útiles para el tratamiento de las metástasis aun en los casos, en dónde los métodos de imagenología actuales no son capaces de detectarlas; o para la prevención de la recaída en el cáncer, caracterizada porque el estimulante inmune es aplicado en asociación con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo. Las ondas de radiofrecuencia pueden ser generadas por cualquier dispositivo convencional para hipertermia con RF utilizando ondas de radiofrecuencia (RF) en un arreglo de condensador de al menos dos electrodos, los cuales preferiblemente, son equipotenciales sobre su superficie total, utilizando RF-corriente de preferiblemente 13.56 MHz (véase WO 2009/092612 o WO 2010/0437372). El al menos un electrodo de RF, y el al menos un contraelectrodo son los medios de transferencia de energía electromagnética, los cuales son parte de un condensador para dirigir la energía hacia un blanco. El dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención utiliza el acoplamiento capacitivo, corriente alterna (AC) y radiofrecuencia (RF).

65 La radiofrecuencia (RF) utilizada por el dispositivo para hipertermia con RF es baja y no excede los 50 MHz. En

contraste, los dispositivos para hipertermia con radiación tienen que utilizar una frecuencia alta de al menos 100 MHz, de otra manera es imposible la focalización exacta. Generalmente, la antena (radiativa) tiene que ser optimizada a 50 Ohm (este es el estándar aceptado). Esta función se lleva a cabo por medio del sintonizador. En la presente invención, se prefiere la baja frecuencia preferiblemente de 6.78 MHz, 13.56 MHz, 27.12 MHz, o 40.68 MHz o cualquier valor en el medio. En contraste, la hipertermia radiativa común utiliza longitud de onda corta y alta frecuencia en el intervalo de 70 - 2400 MHz.

El dispositivo para hipertermia con radiofrecuencia (RF) mismo, comprende al menos una fuente de radiofrecuencia, un amplificador, un sensor, un amplificador de alimentación opcional y de manera opcional un generador de señal de modulación. Los dispositivos para hipertermia con RF adecuados son, por ejemplo, descritos en la solicitud de patente US 13/123,838 o la solicitud de patente US 12/863,418. El dispositivo para hipertermia con RF utilizado en la presente invención, es completamente diferente de los dispositivos para hipertermia del estado de la técnica como se resume a continuación.

En US 2004/0230263 A1, se describe un dispositivo para hipertermia del estado de la técnica. Este difiere del dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención, en las siguientes características:

- En el dispositivo de US 2004/0230263 A1 se utilizan antenas dipolo (acoplamiento radiativo). La RF radiativa es aplicada a través del paciente o más precisamente a través del tejido blanco, al utilizar la radiación de RF absorbida.
- En la solución radiativa, el blanco es independiente del circuito, la alimentación se realiza a través de la relación de onda estacionaria (SWR, por sus siglas en inglés) solamente, la cual mide el poder reflejado en comparación con el retransmisor. El dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención no utiliza antenas dipolo; utiliza un arreglo de condensador, caracterizado porque el cuerpo del paciente en medio de los electrodos es el material dieléctrico, que es parte del circuito conductivo. Esto posibilita un control directo del blanco como una parte del circuito, y genera una retroalimentación más exacta y precisa para controlar el proceso. El dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención utiliza electrodos condensadores (acoplamiento capacitivo) para la aplicación de ondas de RF a través de la respectiva sección transversal del cuerpo.
- El dispositivo para hipertermia convencional induce la interferencia de fase desplazada entre las antenas y la interferencia de su radiación de onda estacionaria para sintonizar el foco sobre el área deseada. El dispositivo utilizado en la presente invención utiliza diferencias de conductividad de los respectivos tejidos (por ejemplo, el tejido tumoral maligno tiene una conductividad más alta que el tejido sano), de este modo, que conduce a una selección automática del foco hacia el tejido tumoral maligno. Este tiene consecuencias inmediatas sobre los órganos expansibles como el pulmón o el corazón, o si el paciente se mueve durante una sesión de tratamiento, que pueda excederse de una hora.
- Además, mientras el foco en el dispositivo convencional permanece en el punto sobre el cual fué enfocado antes, independiente de la posición real del tumor, el dispositivo utilizado por la presente invención sigue cualquier movimiento del blanco, debido a que la corriente RF fluye automáticamente en la dirección correcta.
- En el dispositivo para hipertermia convencional, el blanco es tratado como un objeto independiente eléctricamente, que absorbe la energía irradiada, de ese modo, ocasiona quemaduras y necrosis violenta. La presente invención utiliza al blanco como una parte del circuito eléctrico, como un material dieléctrico de un condensador en un circuito resonante. Por consiguiente, el proceso de calentamiento se lleva a cabo y se controla de una manera diferente. El dispositivo para hipertermia convencional utiliza SAR (tasa de absorción específica), la energía absorbida como el único mecanismo de calentamiento para lograr un efecto benéfico, así, al calentar el tumor, las células tumorales se queman. La presente invención utiliza el efecto Joule ($Q=I^2R$) al convertir el flujo de corriente en calor, así como la diferencia de potencial para un efecto de campo eléctrico, de este modo, ocasiona la apoptosis en las células cancerosas, y por lo tanto, dispara el sistema inmune a una respuesta inmune. Así, los sistemas inmunes del propio paciente inician la pelea contra las células cancerosas únicas reconocidas, caracterizada porque la pelea es apoyada por los estimulantes inmunes administrados, por lo tanto, se vuelve una terapia anticancerígena efectiva, especialmente, para el primer estadio muy inicial del desarrollo del cáncer, el cual no es detectable por ninguno de los métodos de diagnóstico conocidos, y para el tratamiento de la metástasis, debido al hecho de que el tratamiento es sistémico y no local como en el estado de la técnica.
- El dispositivo para hipertermia convencional controla la temperatura solo como un herramienta para reproducir y estandarizar la terapia. En contraste, el dispositivo aplicado en la presente invención utiliza la energía absorbida (J/kg) y la conductividad del paciente ($S = 1/R$) para el control estricto de las condiciones de la terapia. El dispositivo para hipertermia convencional asume de manera implícita que el éxito de la terapia depende, solo, del efecto de calor respecto a la temperatura alcanzada. Por medio de dicho método se ocasiona principalmente la necrosis en el tejido blanco. Sin embargo, el dispositivo utilizado en la presente invención no requiere lograr dichas altas temperaturas a las cuales ocurre la necrosis, debido a que el efecto de campo ocasiona la apoptosis a temperaturas más bajas. Así, el dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención trata tejido tumorales o malignos, cáncer, tumores y especialmente

metástasis, y células cancerosas únicas, al inducir y/o causar la apoptosis, y al habilitar al sistema inmune reconocer a las células cancerosas, e iniciar la pelea contra ellas, mientras que los dispositivos comunes que utilizan el acoplamiento radiativo inducen necrosis y no son aún capaces de tratar metástasis y células cancerosas únicas en el estado inicial del desarrollo del cáncer o en el estado inicial de la recaída en el cáncer. El dispositivo para hipertermia con RF aplicado en la presente invención, no utiliza acoplamiento radiativo, y utiliza acoplamiento capacitivo, caracterizado porque el paciente es el material dieléctrico o dieléctrico como parte del circuito eléctrico.

Las diferencias se pueden resumir a continuación:

1. Los dispositivos RFA utilizan radiación-RF/absorción;
2. La vacunación de la inventiva utiliza conducción de corriente RF;
3. Los dispositivos de RFA utilizan una aguja como antena para el acoplamiento radiativo;
4. La vacunación de la inventiva utiliza electrodos para el acoplamiento capacitivo;
5. Los dispositivos RFA requieren de altas frecuencias (por arriba de 130 MHz);
6. La vacunación de la inventiva requiere de frecuencias por debajo de 50 MHz, y preferiblemente 6.78 MHz, 13.56 MHz, 27.12 MHz o 40.68 MHz, y más preferiblemente 13.56 MHz;
7. Los dispositivos RFA ocasionan necrosis (no es posible ninguna vacunación);
8. La vacunación de la inventiva ocasiona apoptosis y reconocimiento de las células cancerosas, y de este modo, lleva a la vacunación;
9. Los dispositivos RFA son utilizados de manera invasiva y localmente;
10. La vacunación de la inventiva se usa de manera no invasiva y sistémicamente;
11. Los dispositivos RFA son útiles solamente para tratar tumores sólidos
12. La vacunación de la inventiva es especialmente útil para tratar células cancerosas aisladas y ampliamente diseminadas, tales como la metástasis y el estadio inicial del desarrollo del cáncer.

Los métodos de vacunación inmunoterapéutica comunes son aplicables solo en condiciones muy limitadas en el estado de la técnica. La modalidad se enfrenta con varias solicitudes de la era moderna. Tiene que ser:

- Efectiva
- Personalizada (específica)
- Aplicable para todas las lesiones tumorales
- Adecuada para bloquear la recaída y la metástasis
- Aplicable de manera sencilla
- No muy costosa

Estos criterios no son cumplidos por los métodos de vacunación antitumoral del estado de la técnica. Las terapias aplicadas no fueron efectivas, en general, solo en algunos campos especiales. La razón principal de las fallas y la baja eficacia residen en la baja actividad inmunogénica de las células tumorales en los casos generales. El sistema inmune no reconoció a las células tumorales, y por lo tanto, no fue activa para eliminarlas. La estimulación inmune sin los procesos de identificación inmune específica (por ejemplo, terapias con citocinas con IL-2, IL-8, TGF, etc.), no pudieron por mucho alcanzar la eficacia deseada. La mayoría de las terapias están funcionando off-situ, tomando en el inmunopotencial de los pacientes, la manipulación off-situ de dichas células; y administrando las dichas células manipuladas off-situ o la vacuna preparada de nuevo al paciente. Las terapias off-situ son muy complicadas, muy costosas y tediosas, pero la mayor parte del tiempo no son lo suficientemente efectivas: La "extrañeza" y la baja concentración de las células manipuladas off-situ, así como, la ausencia de reproducción (continuando el proceso) de dichas células, limitan la acción completa.

Los métodos (o también, llamados métodos de vacunación), de la presente invención aplican un campo de radiofrecuencia generado por el acoplamiento capacitivo y no por una antena dipolo, y este campo de radiofrecuencia o las ondas de radiofrecuencia del mismo, habilitan al sistema inmune del paciente tratado para reconocer a las células cancerosas, que no fueron por mucho reconocidas por el sistema inmune del paciente. Se asume que el campo de radiofrecuencia generado por el acoplamiento capacitivo, o respectivamente las ondas de radiofrecuencia de este campo de radiofrecuencia ocasionan estrés en las células cancerosas, lo que conduce al efecto que las células cancerosas no pueden mantener ocultas sus estructuras o secuencias de reconocimiento de la superficie, y/o son destruidas por el calor generado por las ondas de radiofrecuencia en las células cancerosas y/o son forzadas por el campo de radiofrecuencia y las ondas de radiofrecuencia del mismo para experimentar apoptosis, así, permitiendo al sistema inmune del paciente reconocer las estructuras de superficie ya no ocultas o los productos de degradación de las células cancerosas apoptóticas o destruidas. El estimulante inmune no específico administrado, además de, el campo de radiofrecuencia/ondas de radiofrecuencia, apoya adicionalmente al sistema inmune para atacar y destruir a las células cancerosas efectivamente. Además, se crea una memoria del sistema inmune, así, que permite al sistema inmune reconocer a las células cancerosas, y especialmente, a las células cancerosas únicas en otras partes del cuerpo. De este modo, la presente invención esta dirigida hacia un método o método de vacunación, que también puede matar a las células cancerosas directamente, pero primero que nada, permite al sistema inmune del propio paciente reconocer primero a las células cancerosas y después matar a

las células cancerosas de manera efectiva. Por lo tanto, el método o método de vacunación de la presente invención apoya al sistema inmune a pelear contra las células cancerosas, y por consiguiente el cáncer, y por lo tanto, puede ser considerado como un método indirecto para tratar el cáncer, y especialmente, al cáncer primario, células cancerosas únicas y metástasis, y prevenir la recaída en un cáncer.

5 La presente invención proporciona estimulantes inmunes, vacunas y métodos de vacunación para el cáncer primario, así como para el tratamiento de la metástasis, y también, para la prevención de la recaída en el cáncer, especialmente, después de un cáncer tratado exitosamente, al apoyar al sistema inmune propio del paciente a reconocer a las células cancerosas escondidas y matar a las células cancerosas reconocidas. El método de
10 vacunación de la inventiva es muy sensible y permite al sistema inmune reconocer a las células cancerosas antes de que puedan ser detectadas por cualquier otro método analítico del estado de la técnica. Además, debido a la muy baja toxicidad y muy bajos efectos secundarios del método de vacunación descritos en el presente documento, el método puede ser utilizado después del tratamiento de un cáncer para prevenir la recaída en el cáncer.

15 "*In-vivo*" significa en nuestra nomenclatura, que la formación del antígeno apropiado se lleva a cabo dentro del cuerpo del paciente, de modo que no se involucra ningún proceso invasivo. Por lo tanto, el método de vacunación de la presente invención, también, puede llamarse método de vacunación *in vivo*. La nomenclatura *in-situ* significa que la inmunización, es decir, el reconocimiento del TRA específico, es procesada realmente en el tumor. De este modo, el método de vacunación de la presente invención, también, puede llamarse método de vacunación *in-situ* o
20 método de vacunación *in-situ e in vivo*.

Como se utiliza en el presente documento, el término "personalizado" se refiere al hecho de que la inmunización se realiza con el TSA (antígeno tumoral específico) propio del paciente. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las vacunaciones antitumorales utilizan antígenos artificiales, los cuales en muchos casos no son idénticos a los
25 antígenos asociados al tumor (TAA) o a los antígenos tumorales específicos (TSA) propios del paciente. En la mayoría de los casos, el mayor reto es el uso de proteínas generales (no personalizado) o cocktails de proteínas para efectos inmunes, lo que podría ser efectivo para algunos pacientes y algunos tipos de cáncer, pero no para todos. Estas condiciones hacen al tratamiento no controlable y impredecible. De conformidad con la invención, la vacunación utiliza el patrón molecular de proteínas único propio de los pacientes, células malignas y las no
30 artificiales. La vacunación de la inventiva crea el propio "cocktail" de TSA incomparable y muy individual del paciente, para la identificación inmune precisa y real. En el estado de la técnica, tal vacunación antitumoral económica y sencilla no existe. Los procesos existentes son demasiado sofisticados, altamente complicados, muy costosos y raramente efectivos. Por ejemplo, el TSA puede obtenerse a partir del espécimen extirpado. Después de, su proceso de reconocimiento *in-vitro* con células dendríticas (DC) y después de la activación inmune especial,
35 la "vacuna" se inyecta directamente dentro del tumor o es administrada sistémicamente al paciente. La vacunación de la inventiva induce la muerte celular inmunogénica altamente específica. El método de vacunación de la presente invención, también, puede llamarse método de vacunación personalizado *in-situ* o método de vacunación personalizado *in vivo* o método de vacunación personalizado *in situ e in vivo*.

40 El término "inducción de apoptosis": La vacuna de la inventiva puede inducir apoptosis inmunogénica especial con formación de cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos (cargados con los componentes de las células tumorales, incluyendo los TTA muy propios del paciente), pueden ser fagocitados fácilmente por las APC (células presentadoras de antígenos, DC) apropiadas. Los resultados de investigación en el pasado muestran un efecto inmuoestimulativo mayor de la apoptosis inducida por el estrés. Los cuerpos apoptóticos producidos en este
45 proceso contienen una gran cantidad de HPS junto con el TSA específico. Su fagocitosis a través de las APC induce reacciones inmunes fuertes y específicas.

El término "DAMP/SAMP": La vacuna de la inventiva puede inducir cambios moleculares únicos, tales como moléculas del patrón molecular asociado al daño (DAMP) y moléculas del patrón molecular asociado al estrés (SAMP) en las células tumorales que pueden estar sobre el estimulativo inmune de un lado y sobre el otro lado
50 pueden promover el reconocimiento inmune de las células tumorales. Aunque, se pensó que las células apoptóticas, cuando son fagocitadas rápidamente, experimentaron una muerte silenciosa que no disparó una respuesta inmune, en años recientes, ha emergido un nuevo concepto de muerte celular inmunogénica (ICD). Las características inmunogénicas de la ICD son principalmente mediadas por los patrones moleculares asociados al daño (DAMP), los que incluyen calreticulina expuesta en la superficie (CRT), ATP secretado y proteína B1 de grupo de alta movilidad liberada (HMGB1).

El término "sobreexpresión HSP". Las proteínas chaperonas HSP tienen un papel primario e importante en los procesos tumorales inmunológicos. Las HPS del citosol, tales como Hsp70 y Hsp90, y del ER, como gp96, unen los péptidos antigénicos generados dentro de la célula. Estos péptidos antigénicos son transportados por las HPS hasta
60 las moléculas de Clase I MHC presentes sobre la superficie celular para la presentación a los linfocitos. . Además, los péptidos que son acompañados por las HSP son liberados extracelularmente y estos complejos HSP-péptido son capturados por las APC, es decir, macrófagos y células dendríticas, vía la endocitosis mediada por receptores. Así, las HSP promueven el reconocimiento de antígenos por las APC. Los términos "sobreexpresión de HSP" y "externalización de HSP" se refieren a los siguientes: Por medio de la aplicación de un estimulante inmune no específico en asociación con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, son expresadas varias
65

proteínas HSP en las células malignas a una velocidad incrementada (siendo por arriba de la velocidad de las células sin tratar), y más HSP adicionales están presentes sobre la superficie celular o son secretadas por estas células.

5 El término "sobrexpresión TRAIL (DR5)", se refiere a una expresión incrementada de la codificación de genes por medio de TRAIL: De acuerdo con muchas publicaciones, esta molécula tiene un papel clave en las reacciones inmunes antitumorales. La distorsión tumoral generada por la vacuna de la inventiva ocasiona tales DAMP y SAMP, lo que resulta en mayores reacciones inmunes específicas tumorales a través de la liberación de los antígenos tumorales específicos propios (TSA) del paciente. De esta manera, la vacunación es *in situ* y no es necesaria ninguna manipulación para su éxito.

10 La vacunación de la inventiva satisface todos los requerimientos de las vacunas, enlistados anteriormente, especialmente, cuando se aplica junto con otros procesos estimulativos inmunes. La vacunación de la inventiva afecta sistémicamente (efecto abscopal o espectador), y el tratamiento es activo sobre las células malignas diseminadas, y también, sobre las metástasis formadas muy alejadas, especialmente cuando se aplica junto con otros procesos estimulativos inmunes. También, la reacción inmune inducida forma la memoria inmune propia, la cual bloquea las recaídas en la enfermedad, es decir, el cáncer.

Las ventajas de la vacuna de la inventiva se resumen a continuación:

- 20 • Formación de cuerpos apoptóticos inmunogénicos
- Cebado cruzado TSA-HSP
- Reconocimiento de antígenos efectivo por las APC
- Activación y maduración de las células APC
- Activación específica de células T citotóxicas por las APC
- 25 • Destrucción de metástasis distantes, muy lejanas del tumor tratado
- Desarrollo de la memoria inmune específica que previene la recurrencia del tumor y la recaída en el cáncer.

El estimulante inmune no específico de la invención usado en asociación con las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente usando acoplamiento capacitivo que alcanza los efectos, que no podrían alcanzar las estrategias de tratamiento del cáncer comunes. Un modo de acción de la vacuna de la inventiva podría ser explicado probablemente como sigue: Los TSA en los cuerpos apoptóticos producidos por la vacunación de la inventiva se vuelven alcanzables para los APC. Debido a que, la identificación del TSA y el adyuvante HSP se enriquecen por el estrés fuerte del tratamiento con la vacuna de la inventiva, las APC inducen reacciones inmunes remarcables, que incluyen

- 35 1. La activación del sistema CTL para obtener la información del TSA específica del paciente. Esta reacción inmune permite encontrar y destruir a las células malignas en las metástasis bastante lejanas o en la forma diseminada.
- 40 2. La creación de una memoria inmune efectiva que resulta en el bloqueo de la recaída posterior en la malignidad.

El proceso completo es bien promovido por los estimulantes inmunes, que convierten el efecto local en efecto sistémico. El efecto abscopal (espectador) podría ser orientado y controlado.

45 Se puede lograr el tratamiento de los siguientes tipos de cáncer primario, y se pueden tratar de las metástasis de los siguientes tipos de cáncer, y también, se puede prevenir la recaída en los siguientes tipos de cáncer, por medio de la presente invención: adenocarcinoma, melanoma coroidal, leucemia aguda, neurinoma acústica, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, tumor desmoide, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de seno, linfoma de Bukitt, cáncer corpus (carcinoma endometrial), síndrome CUP (carcinoma de sitio primario desconocido), cáncer colorectal, cáncer de intestino delgado, tumores de intestino delgado, cáncer ovarico, carcinoma endometrial, ependimoma, tipos de cáncer epitelial, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer gástrico, cáncer de la vesícula biliar, carcinomas de la vesícula biliar, cáncer cervical, cervix, glioblastomas, tumores ginecológicos; tumores de oreja, nariz y garganta, neoplasias hematológicas, leucemia de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, leucemia de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, cáncer de piel testicular, tumores cerebrales (gliomas), metástasis cerebral, cáncer de testículos, tumor de la hipófisi, carcinoides, sarcoma de Kaposi, cáncer laringeal, tumor de células germinales, cáncer de hueso, carcinoma colorectal, tumores de cabeza y cuello, Tumores del área de la oreja, nariz y garganta), carcinoma de colon, craneofaringiomas, cáncer oral (cáncer en el área de la boca y sobre los labios), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de hígado, metástasis de hígado, leucemia, tumor de parpado, cáncer de pulmón, cáncer de nódulos linfáticos (Hodgkin/no Hodgkin), linfomas, cáncer de estómago, melanoma maligno, neoplasia maligna, tumores malignos del tracto gastrointestinal, carcinoma de seno, cáncer rectal, meduloblastomas, melanoma, meningiomas, enfermedad de Hodgkin, micosis fungoides, cáncer nasal, neurinoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, linfomas de no Hodgkin, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásticos, osteosarcomas, carcinoma ovarico, carcinoma pancreático, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de células escamosas de la

- 5 cabeza y del cuello (SCCHN, por sus siglas en inglés), cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma rectal, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma tiroideo, enfermedad de Schneeberger, cáncer de esófago, espinaliomas, linfoma de células T (micosis fungoïdes), timoma, tumores urológicos, carcinoma urotelial, cáncer de vulva, apariencia de verruga, tumores de tejido blando, sarcoma de tejidos blanco, tumor de Wilm, carcinoma cervical y
- 10 cáncer de lengua. Particularmente, adecuados para el tratamiento son, por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, cáncer pancreático, cáncer bronquial, cáncer de seno, cáncer colorectal, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de laringe, melanoma maligno, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga y cáncer de células renales.
- 15 En otras palabras, el estimulante inmune no específico usado en asociación con las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente usando acoplamiento capacitivo descrito en este documento habilita y apoya al sistema inmune del paciente a pelear contra los tipos de cáncer antes mencionados o a matar a las células cancerosas de los tipos de cáncer antes mencionados.
- 20 Además, el estimulante inmune no específico usado en asociación con las ondas de radiofrecuencia aplicadas no invasivamente usando acoplamiento capacitivo no tiene y no ocasiona ningún efecto secundario grave, de modo que, la vacunación de la inventiva es adecuada para ser combinada con las terapias comunes contra el cáncer, tales como quimioterapias con uno o más de los siguientes agentes quimioterapéuticos: actinomicina D, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antagonistas de bases púricas y pirimidínicas, antraciclina, inhibidores de
- 25 aromatasas, asparaginasa, antiestrógenos, bexaroten, bleomicina, buselerina, busulfan, derivados de camptotecina, capecitabino, carboplatino, carmustina, clorambucil, cladribin, ciclofosfamida, citarabin, citosinarabinósido, citostáticos alquilantes, dacarbacin, dactinomycin, daunorubicin, docetaxel, doxorubicin (adriamicin), lipodoxorubicin, epirubicin, estramustina, etoposid, exemestan, fludarabin, fluorouracil, antagonistas de ácido fólico, formestan, gemcitabin, glucocorticoides, goselerin, antagonistas hormonales, hicamtin, hidroxí urea, idarubicin, ifosfamid, imatinib, irinotecan, letrozol, leuprorelin, lomustin, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, miltefosin, mitomicina, inhibidores de mitosis, mitoxantron, nimustina, oxaliplatin, paclitaxel, pentostatin, procarbacin, tamoxifen, temozolomid, teniposid, testolacton, tiotepa, tioguanina, inhibidores de topoisomerasa, topotecan, treosulfan, tretinoin, triptorelin, trofosfamida, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, antibióticos con actividades
- 30 citotóxicas.

Abreviaturas:

- APC: Célula presentadoras de antígenos
 CTL: Linfocito T citotóxico
 35 DAMP: Patrón Molecular Asociado al Daño
 DC: Célula dendrítica
 DR5 (TRAIL): Receptor de muerte celular (Ligante que induce la apoptosis relacionado con el TNF)
 GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
 HMGB1: Caja de grupo de alta movilidad 1
 40 HSP: Proteína de choque térmico
 IHCH : Análisis inmunohistoquímico IL: Interleucina
 LPS: Lipopolisacárido
 NK: Célula asesina natural
 OTM: Método de oncotermia (ondas de radiofrecuencia que utilizan el acoplamiento
 45 capacitivo en un arreglo de condensador)
 SAMP: Patrón Molecular Asociado al Estrés
 TAA: Antígeno asociado al tumor
 TLR: receptor tipo Toll
 TNF: factor de necrosis tumoral
 50 TSA: antígeno tumoral específico

Breve descripción de las figuras

- 55 **Figura 1** muestra cómo trabaja el método RFA: Una aguja tipo antena se inserta dentro del tumor sólido y se produce calor por la corriente de RF local aplicada, la cual quema el tumor y ocasiona la necrosis violenta. La RFA es un método invasivo, que utiliza corriente de RF para producir calor, y por lo tanto ocasiona la ablación por medio de un arreglo en antena que utiliza acoplamiento radiativo.

- 60 **Figura 2** muestra una tinción HE sobre un portaobjetos de un tumor disecado. Se puede ver que aparece un anillo de invasión transparente (flechas) alrededor del tumor. Por lo tanto, se produce una reacción inmune fuerte después del tratamiento de conformidad con la presente invención.

- 65 **Figura 3** muestra una sobreexpresión de la HSP diferente (Fig. 3A: HSPA1A, Fig. 3B: HSPA6, Fig. 3C: HSPA8, Fig. 3D: HSPD) en tumores tratados de conformidad con la presente invención. La producción de HPS se midió sobre el nivel de ARNm (B corresponde a la producción de HSP en el tumor tratado [negro], A corresponde la producción de HSP en el tumor sin tratamiento [gris], CTRL es el control sin tratamiento). La línea gris

corresponde al nivel sin cambio.

Figura 4 demuestra que la presente vacuna proporciona un efecto sistémico en el ratón. La administración sistémica del LPS (lipopolisacárido de *E.coli*, 100 µg de LPS en 100 µL de solución de Salsol), tiene, también, como resultado el efecto de masivo de asesinar a las células del tumor no tratado a distancia.

Figura 5 muestra el modelo de ratón utilizado para los experimentos: sobre ratones hembra inmunodeficientes BALB/c (nu/nu), se indujeron dos tumores simétricos alejados por medio de la administración en la región femoral en ambos lados de 6×10^6 células en 0.1 mL de suero libre de medio adecuado para inducir el crecimiento del tumor. Solamente, se utilizaron los ratones que desarrollaron tumores simétricamente y aproximadamente del mismo tamaño. Solo se trato el tumor del lado derecho.

Figura 6 muestra el efecto sistémico de la presente invención, cuando se uso en el tratamiento para humanos. Se diagnosticó al paciente sin cáncer de pulmón de células no pequeñas, y que presento diversas metástasis ubicadas alejadas de la ubicación del cáncer principal: en el cuello, en la región lumbar, en la axila, etc. A pesar de que solo, se trató el tumor principal con la radiofrecuencia, utilizando acoplamiento capacitivo (disparo único, 30 min, 42°C), la administración de la GM-GSF (Leukine®) asociada con la radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo tuvo como resultado un efecto sistémico que tiene también, un efecto benéfico sobre las metástasis lejanas, que desaparecen.

Figura 7 muestra el incremento en la actividad de caspasa-3 tanto en el tumor tratado como en el lejano en los ratones inmunodeficientes. La actividad de la caspasa-3, la cual es un importante marcador de la ruta de señalización de la apoptosis, incrementa tanto en los tumores tratados como en el no tratado lejano en los ratones inmunodeficientes, de este modo, muestran el efecto sistémico de la presente vacuna.

Figura 8 muestra las series respecto al tiempo del xenoinjerto de los ratones inmunodeficientes (colorectal de humano HT29), un solo disparo, 30 min, 42°C. Cada punto representa a 3 animales portadores de dobles tumores. El sacrificio de los animales se realizó en el momento después del tratamiento (indicado sobre el eje de las "x"). La observación, de que la apoptosis inicia después de 24 horas (el inserto no mostró ningún efecto durante las primeras 8 horas), y la diferencia entre los inferiores muertos por tumores tratados y no tratados alejados, la acción inició muy lejos del tratamiento local.

Figura 9 muestra

Figura 9A el sistema experimental para el tratamiento de los animales (ratones);

Figura 9b el sistema aplicador del tratamiento con la sonda sensora de medición de la temperatura. Un electrodo contador es brillante y subyacente al animal, y el segundo electrodo es el aplicador redondo por encima del animal, que puede ser movido hacia el área de tratamiento.

Figura 10 resume los procesos de evaluación de las muestras. A. Método de disección del tumor; B. Esquema de análisis de la muestra de tumor que incluye el análisis de un gran número de transcritos de ARNm, 35 proteínas relacionadas con la apoptosis, muchos factores morfológicos junto con el arreglo de proteínas asociadas con DAMP completo.

Figura 11 muestra el set típico del estudio de la evolución temporal con las moléculas medidas.

Figura 12 muestra los resultados del ensayo TUNEL como una prueba de la apoptosis. El azul es la tinción DAPI estándar (núcleos celulares) y el verde es el TUNEL FITC.

Figura 13 muestra cómo de la investigación de la evolución temporal comprueba correctamente el proceso apoptótico, teniendo correspondencia completa con las acciones en la escala temporal.

Figura 14 muestra cómo los cuerpos apoptóticos están inducidos siguiente el tratamiento de oncotermia. Un gran número de cuerpos apoptóticos pueden observarse en las células tratadas en comparación con los no tratados.

Figura 15 muestra la presentación de HMGB1 y liberación hacia la matriz extracelular después del tratamiento de oncotermia.

Figura 16 muestra la expresión de calreticulina (4 h, posttratamiento). La calreticulina se expresa sobre la membrana celular de las células tratadas con oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando el acoplamiento capacitivo), creando las condiciones óptimas para DAMP.

Figura 17 muestra la expresión de TRAIL-R2 por medio de la medición del nivel de proteínas y la detección inmunofluorescente:

Figura 17A. Regulación por incremento de TRAIL-R2 en las muestras del tumor del xenoinjerto HT29, 8 h después del tratamiento con oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) medida en los arreglos de proteínas de la apoptosis. Dot blots dobles representan las sondas duplicadas de anticuerpos y la línea punteada muestra la expresión relativa de TRAIL-R2 en los controles no tratados.

Figura 17 B. Expresión fuerte de la proteína TRAIL-R2 en las membranas celulares del tumor (Alexa564, fluorescencia roja) a las 8 h posttratamiento (fila superior) comparada con la de los tumores no tratados en las piernas opuestas (fila inferior). Áreas en rectángulos están resaltadas en recuadros a mayor ampliación (columna central). En la columna izquierda, las líneas que rodean las áreas en donde la intensidad de la señal excede el umbral de positividad estándar (área enmascarada) medido con el software HistoQuant (columna derecha). Las áreas enmascaradas relativas (MAr) están calculadas al dividir las medias de las MA entre las medias de las áreas totales. La barra indica 50 μm en la columna izquierda, 15 μm en la columna central y 10 μm en la columna de la derecha. C. La gráfica que muestra los valores de MAr incrementados de manera significativa (** $p < 0.01$) de la expresión de la proteína TRAIL-R2 en los tumores tratados (columnas en negro) comparados con los tumores no tratados (columnas en gris) tanto a las 8 h como a las 14 h posttratamiento.

Figura 18 muestra la detección inmunofluorescente de HSP70

Figura 18 A la expresión de HSP70 14 h posttratamiento con las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador;

Figura 18B la liberación de HSP70 hacia la matriz extracelular 72 h después del tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.

Figura 19 muestra la dinámica de HSP70 durante la formación de DAMP. Se resume la evolución temporal completa de HSP70 y pueden observarse los dos desarrollos independientes:

- el primer desarrollo es mucho después de 48 h a partir del tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, y está conectado a la inducción por calor directo de HSP70. Localización de la membrana por los estímulos inmunes (expresión temprana)
- el segundo desarrollo inicia después de eso, contribuyendo a la muerte celular inmunogénica como parte de DAMP. Liberación de electrolitos extracelulares por DAMP (expresión tardía)

Figura 20 Se analizaron el chip de genes del genoma humano tiene 6,500 genes y sus 47,000 transcritos 4 h después del tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo.

Figura 21 muestra el esquema del análisis del kit de arreglos para Apoptosis Humana Proteome ProfilerTM. A. muestras medidas en el chip de arreglos; B. proteínas examinadas en el arreglo; C. método cuantitativo para el análisis del nivel de expresión de las proteínas.

Figura 22 muestra el efecto del tratamiento con ondas de radiofrecuencia sobre la expresión de proteínas involucrada en las rutas que inducen la muerte. Estos resultados constituyen evidencias adicionales para la realización de la ruta apoptótica asociada a la membrana celular.

Figura 23 resume las observaciones por medio del tiempo transcurrido (h) después del tratamiento de un solo disparo con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (30 min, 42°C), sobre células HT Se identificaron las proteínas más importantes inducidas por el tratamiento. Como se mostró, la apoptosis terminó después de 48 horas después del tratamiento, y después de una zona de transición, se observaron las reacciones inmunes.

Figura 24 muestra la configuración de medición y el patrón de temperatura del experimento.

Figura 25 muestra ejemplos de la evaluación de las muestras.

Figura 26 muestra la evidencia del efecto abscopal típico proporcionado por la presente invención.

Figura 26A. El área muerta promedio relativa de los tumores en los grupos de estudio.

Figura 26B. La relación del área muerta relativa tratada/no tratada de los tumores en los grupos de estudio.

Por lo tanto, la administración combinada de Xiao-Aiping y ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (Xi-OTM) tuvo el efecto benéfico en ambos tumores, mientras que solo un tumor se trató con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (Oncotermia-OTM). El tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de Oncotermia-OTM), fue efectivo solamente sobre el tumor que fue tratado. El tratamiento con Xiao-Aiping (xi) no tuvo resultados al compararse con el control (CTRL).

Figura 27 muestra las muestras de tumor teñidos HE provenientes del grupo tratado solo con OTM.

Figura 28 muestra la detección IHCH de HSP70 (rojo) en las muestras tumorales obtenidas del grupo tratado solo con oncotermia. (núcleos celulares: azul)

Figura 29 muestra las muestras tumorales teñidas HE provenientes del grupo tratado con OTM + Xi.

Figura 30 muestra la detección IHCH de HSP70 (rojo) en las muestras tumorales obtenidas a partir del grupo tratado con OTM + Xi. (núcleos celulares: azul)

Figura 31 muestra la detección IHCH de las células CD3 + T (rojo), y la reacción TUNEL (verde) en las muestras de tumor provenientes del grupo tratado solo con oncotermia. (núcleos celulares: azul) (Colocalización del núcleo y la reacción TUNEL significa la muerte celular programada).

Figura 32 muestra la colocalización del núcleo y la fragmentación de ácidos nucleicos (TUNEL) inducidas por el tratamiento con las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de oncotermia), según lo demuestra la muerte celular programada. El azul es la tinción DAPI estándar (núcleos celulares) y el verde es el TUNEL FITC.

Figura 33 muestra la colocalización del núcleo y la fragmentación de los ácidos nucleicos (tunnel) inducidas por el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de oncotermia) como lo demuestra la muerte celular programada. El azul es la tinción DAPI estándar (núcleos celulares) y el verde es el TUNEL FITC.

Figura 34 muestra la detección IHCH de las células CD3 + T (rojo), y la reacción TUNEL (verde) en las muestras de tumor obtenidas del grupo tratado solo con OTM + Xi. (núcleos celulares: azul) (Colocalización del núcleo y la reacción TUNEL significa la muerte celular programada).

Figura 35 muestra la colocalización del núcleo y la fragmentación de los ácidos nucleicos (tunnel) inducidas por el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de oncotermia) como lo demuestra la muerte celular programada. El azul es la tinción DAPI estándar (núcleos celulares) y el verde es el TUNEL FITC.

Figura 36 muestra la colocalización del núcleo y la fragmentación de los ácidos nucleicos (tunnel) inducidas por el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de oncotermia) como lo demuestra la muerte celular programada. El azul es la tinción DAPI estándar (núcleos celulares) y el verde es el TUNEL FITC.

Figura 37 muestra los resultados obtenidos al aplicar la vacuna de conformidad con la presente invención a un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas (hombre, 72 años de edad). El tumor local se trató por medio de ondas de radiofrecuencia de amplitud modulada utilizando acoplamiento capacitivo y se aplicó Leukine® como estimulador inmune en paralelo. El tumor primario comenzó a encogerse, mientras que la metástasis desapareció.

Figura 38 muestra un método para crear un multibloque de tejido a partir de una muestra tumoral incrustada en parafina fijada con formalina: se tomaron los núcleos de 2 mm de diámetro seleccionados a partir de los bordes del tumor intactos y de los dañados (1 y 2), y a partir del centro del tumor dañado (3) de cada muestra.

Figura 39 muestra el esquema del método para calcular TDR y TDE utilizando el análisis cuantitativo de microscopía digital: Las áreas dañadas del tumor (etiquetadas como D y encerradas en un círculo en rojo; círculos internos), y las áreas completas del tumor (etiquetadas como W y encerradas en un círculo azul; círculo exterior), son medidas con el software. La relación de destrucción del tumor (TDR) se calcula al dividir los valores de D entre W, ambos en los tumores tratados (t) y no tratados (u). La eficiencia de destrucción del tumor (TDE) es una correlación entre los valores TDR de los tumores tratados y no tratados.

Figura 40 muestra:

Figura 40A. la apariencia histomorfológica cualitativa del tratamiento con oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador), indujo la destrucción del tumor 24 h después de un tratamiento con un sólo disparo;

Figura 40B. el resultado del análisis cuantitativo de la relación de la destrucción del tumor (TDR): la gráfica muestra valores de TDR más altos de manera significativa (*p<0.05) en los tumores tratados (recuadros negros) que en los tumores no tratados (recuadros grises);

Figura 40C. el resultado del análisis cuantitativo del tratamiento con oncotermia (ondas de radiofrecuencia

utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) relacionados con la destrucción celular del tumor (TDE): la gráfica que muestra el incremento, relacionado con el tratamiento, de los valores TDE que va hasta una diferencia de 7 veces a las 72 h.

5 **Figura 41** es una observación cualitativa de la positividad TUNEL en la sección transversal del tumor completo 48 h después del tratamiento. Nótese la alta positividad TUNEL en la región central destruida del tumor.

10 **Figura 42** es una observación cualitativa (a las 48 h) y la medición cuantitativa de la positividad TUNEL y la formación del cuerpo apoptótico en las secciones transversales del tumor completo 24 h y 48 h después del tratamiento:

15 **Figura 42A.** La elevación significativa de la fragmentación de ADN revelada por el ensayo TUNEL (fluorescencia verde en la fotografía superior de la figura), contracción nuclear y cuerpos apoptóticos (tinción H&E; flechas en la fotografía inferior de la figura), en los tumores tratados (fila superior) con oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) comparados con los tumores no tratados (fila inferior), a las 48 h después del tratamiento. Las fotografías de la figura muestran vistas de un solo canal de las áreas dentro de los rectángulos a una ampliación mayor. La positividad doble de DAPI y TUNEL (azul; fotografía del centro) confirma la tinción de ADN nuclear en las células idénticas etiquetadas como 1-3. Las células del tumor no tratado (por ejemplo, aquellas etiquetadas como 1-2) muestran solo la fluorescencia verde básica. La barra indica 50 μm en la columna izquierda y 15 μm en la columna derecha.

20 **Figura 42B.** Gráfica que muestra el número promedio incrementado significativamente de células positivas en TUNEL tanto a las 24 h como a las 48 h después del tratamiento (columnas en negro);

25 **Figura 42C.** Gráfica que muestra el número promedio incrementado significativamente de cuerpos apoptóticos a las 48 h y a las 72 h después del tratamiento (columnas en negro) comparadas con los controles no tratados (columnas en gris) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

30 **Figura 43** muestra la detección inmunofluorescente de HMGB1 a las 14 h y 24 h después del tratamiento. Claramente, es visible que la HMGB1 es liberada hacia la matriz extracelular en los tumores tratados con oncotermia (ondas de radiofrecuencia usando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador).

35 **Figura 44** muestra

Figura 44 A las secciones transversales del tumor completo teñido HE 72 h posteriores al tratamiento. Las flechas indican la formación del anillo de invasión.

40 **Figura 44B** las secciones transversales del tumor completo teñido HE 168 h posteriores al tratamiento. Las flechas indican el anillo de invasión bien definido.

Figura 45 muestra

45 **Figura 45 A** la detección IHCH de mieloperoxidasa (MPO) a partir del multibloque TMA. MPO es un marcador de neutrófilos (granulocitos). El anillo de invasión de los leucocitos, que aparece a las 72 h, y se vuelve muy característico a las 16 h, alrededor del área del tumor destruida, contiene alto número de células positivas a MPO (neutrófilos).

50 **Figura 45 B** El análisis semicuantitativo de las células MPO+ provenientes de las muestras de multibloque TMA. Las muestras de tumores tratados con oncotermia contienen una cantidad mucho más elevada de células MPO+ (neutrófilos) que las muestras de los tumores control y que los tumores no tratados.

55 **Figura 45 C** la detección IHCH de células positivas CD3+ del multibloque TMA. El anillo de invasión contiene una cantidad grande de células CD3+ T a las 168 h después del tratamiento.

Figura 45 D el análisis semicuantitativo de las células CD3+ T obtenidas de las muestras multibloque TMA. Muestras de tumores tratados con oncotermia contienen significativamente más células CD3+ (linfocitos T) que las muestras de tumores control y que las muestras de tumores no tratados.

60 **Figura 46** muestra el método de análisis histomorfológico.

Figura 47 muestra el efecto sistémico de la vacuna de conformidad con la presente invención. Se observó la regresión de las metástasis ubicadas muy lejos del sitio de tratamiento.

65 **Figura 48** muestra el efecto benéfico sobre la reducción del volumen del tumor en el modelo de tumor ortotópico 4T1, proporcionado por la vacuna de conformidad con la presente invención. La oncotermia (ondas

de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) en asociación con TJ-48, se aplicó como se describe en el Ejemplo 14.

Los siguientes ejemplos son incluidos para demostrar las modalidades favorecidas de la invención. Aquellos habilitados en la técnica deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos, a continuación, representan técnicas descubiertas por el inventor para el correcto funcionamiento en la práctica de la invención, y por lo tanto, pueden ser consideradas para constituir los modos favorecidos y su práctica. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica deberán apreciar, a la luz de la presente descripción, que se pueden realizar muchos cambios en las modalidades específicas, los cuales son descritos y, que aún, permiten obtener un resultado igual o similar sin alejarse del alcance y campo de la invención.

Las modificaciones y modalidades alternativas adicionales de diversos aspectos de la invención serán aparentes para aquellos expertos en la técnica en vista de esta descripción. Por consiguiente, esta descripción se debe interpretar solo como ilustrativa, y es con el objetivo de enseñar a los habilitados en la técnica la manera general para llevar a cabo la invención. Se ha de entender que las formas de la invención mostradas y descritas en el presente documento, son para tomarse como ejemplos de las modalidades. Los elementos y materiales pueden sustituirse por aquellos ilustrados y descritos en este documento, las partes y procesos pueden invertirse, y ciertas características de la invención se pueden utilizar de manera independiente, todo como sería aparente para una persona habilitada en la técnica después de tener el beneficio de esta descripción de la invención. Los cambios se pueden realizar en los elementos descritos en este documento sin alejarse del campo y alcance de la invención, según se describe en las siguientes reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y métodos

Modelo tumoral

Línea celular

Línea celular de cáncer de colon invasivo HT29 (proporcionada por Tyrolean Cancer Research Institute, Innsbruck, Austria), se propaga en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + GlutaMax, alta glucosa (4.5 g/L), medio que incluye 10% de suero fetal de bovino inactivado por calor (FCS) y 1% de estreptomycin-penicilina (5000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin/mL). Las células fueron liberadas desde una monocapa subconfluente utilizando 0.25% de tripsina + ácido etileno diamino tetraacético (EDTA, 0.22 mg/mL) durante 5 min y suspendidas en un medio libre de suero para alcanzar la concentración de células requerida de 10^7 /mL. Todos los reactivos se compraron a GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, EEUU).

Modelo animal

Ratones Balb/c (nu/nu) inmunodeficientes hembras (suministrados por la Experimental Animal House of the National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest, Hungría), mantenidos en ambiente estéril, alimentados con agua y alimentos esterilizados *ad libitum* bajo ciclos de 12 h en la oscuridad/12 h en la luz. Ambas regiones femorales de los ratones de 6 a 8 semanas de edad, fueron inyectadas subcutáneamente con 0.1 mL de suspensión de 10^7 /mL de células HT29. Los animales (xenoinjertos) fueron tratados con 18 días después de la inyección de células HT29, cuando el diámetro de los implantes del tumor habían alcanzado ~ 1.5 cm. Solo los ratones con tumores simétricos en ambas piernas se utilizaron para el tratamiento. Los animales de laboratorio se mantuvieron y trataron de conformidad con las secciones relevantes de las Leyes Húngaras No. XXVIII/1998 y LXVII/2002 sobre la protección y bienestar de los animales, y las regulaciones de bienestar animal de la Unión Europea. El Comité de Ética Gubernamental aprobó el estudio bajo el No. 22.1/609/001/2010.

Tratamiento de los xenoinjertos con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador

Los tratamientos fueron realizados sistemáticamente solo sobre el tumor derecho de los animales, mientras que el izquierdo se mantuvo para control individual (véase **Figura 5**). Los implantes tumorales en las piernas derecha de los ratones Balb/c (nu/nu) se colocaron dentro del condensador eléctrico de planos paralelos del circuito (véase **Figura 9**). La configuración permitió el control eléctrico inmediato al mantener la impedancia del circuito a 50 Ohm, dependiendo de los dieléctricos de los tejidos tratados incluyendo el tumor. El arreglo de los electrodos fue asimétrico. Los animales se fijaron sobre el electrodo rectangular a tierra (inferior) hecho de aluminio pulido de 72.0 cm², el cual se mantuvo a 37 °C durante el tratamiento. El electrodo de forma redonda de 2.5 cm² superior (opuesto) activo, hecho de material textil flexible (tejido textil cubierto de cobre-plata-estaño, Lorix Ltd, Bajna, Hungría), fue sobrepuesto sobre la región tumoral para proporcionar un contacto con la piel completo para la pierna tratada. La superficie completa del electrodo superior se enfrió desde el exterior por medio de una esponja mojada. El campo electromagnético se generó a 13.56 MHz de radiofrecuencia utilizando 1/f de modulación de amplitud (LabEHY, Oncotherm Ltd, Paty, Hungría). Los parámetros se ajustaron para mantener la temperatura intratumoral a 41 - 42 °C

sobre el lado tratado y ~ 36 °C sobre el lado de control.

La temperatura subcutánea por debajo del electrodo, se mantuvo a ~ 40 °C, y la temperatura rectal estuvo a ~ 37 °C. La temperatura se monitoreo en las localizaciones mencionadas anteriormente por medio de sensores ópticos (Luxtron FOT Lab Kit, LumaSense Technologies, Inc. CA, EEUU).

En este modelo animal, los implantes de cáncer foraron parte del circuito eléctrico a través de acoplamiento capacitivo, es decir, colocados en medio de los electrodos del condensador. Ya que, la penetración eficiente del tejido se puede lograr por debajo de los ~ 25 MHz, se utilizó una radiofrecuencia modulada de 13.56 MHz. Se esperaba que las ondas de radiofrecuencia aplicadas de conformidad con la invención interactuaran con los iones y grupos moleculares dipolares (sin efecto térmico) resultando en su rotación, y también, pueden generar calor de $\leq 42^{\circ}\text{C}$ (efecto térmico). Bajo el control aplicado, la frecuencia de 13.56 MHz no representan ningún riesgo de que los tejidos normales sean dañados, induciendo potenciales acciones en los nervios o interfiriendo con cualquier instrumento eléctrico o telecomunicación.

Diseño del estudio

Los grupos de tratamiento involucraron 33 animales (Figura 11) los cuales fueron irradiados con ondas de radiofrecuencia con un solo disparo utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador durante 30 minutos a una potencia promedio de 4 W, bajo 11 mg/kg de Ketamina y 10 mg/kg de anestesia Xilazina. Se realizó un estudio de curso temporal. Después de un tratamiento, se realizó el muestreo a las 0, 1, 4, 8, 14, 24, 48, 72, 120, 168, 216 h después del tratamiento, utilizando 3 ratones de cada grupo. 5 animales adicionales implantados con tumores no tratados fueron sacrificados junto con los ratones de 24 y 72 h después del tratamiento.

Procesamiento de las muestras tumorales

Al momento del muestreo, los animales tratados unicos fueron sacrificados y ambos tumores el control y el tratado fueron removidos y estudiados en pares (véase **Figura 10A**). Una mitad de los tumores extirpados se fijo en formalina al 10%, se deshidrató e incrustó rutinariamente en cera de parafina (FFPE). La otra mitad se congeló estando fresca, en nitrógeno líquido y se guardaron a - 80 °C en el congelador hasta las pruebas adicionales. Las muestras tumorales fueron analizadas utilizando diferentes tipos de métodos (**Figura 10B**).

Método de Microarreglo de tejidos (TMA)

Debido al numero extremadamente grande de muestras tumorales, la tecnología de microarreglo de tejidos (TMA) se utilizó para realizar las reacciones inmunohistoquímicas exactas en muchas muestras en un bloque (**Figura 10B**). Un milibloque contiene muchas muestras de tejido tumoral representativas (2 mm), por lo tanto, la reacción inmunohistoquímica altamente estandarizada en todas las muestras se puede realizar. Esta es la ventaja real de esta tecnología. TMA incluyó 3 núcleos de 2 mm de diámetro muestreados a partir de las áreas estándar, 2 de los bordes del borde del tumor intacto y del degradado, y 1 del centro degradado en cada bloque donador (Figura 38), utilizando el Master TMA desde la computadora (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungría).

Métodos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, se desecneraron secciones de 4 μm de espesor, se rehidrataron, y después se bloquearon las enzimas peroxidasas endógenas utilizando peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 20 min excepto para la inmunofluorescencia. La recuperación de los antígenos se llevo a cabo en el autoclave eléctrica (Avair Ida YDB50-90D, Biatlon kft, Pecs, Hungría) a ~105°C en buffers preparados ya sea de citrato de sodio-ácido cítrico 0.01 M (citrato, pH 6.0; para romper la caspasa-3), o bien Trisbase 0.1 M y EDTA 0.01 M (T-E, pH 9.0, para todos los demás anticuerpos), seguido de albumina de suero bovino (BSA)-Bloque de proteínas en Azida (1%, Sigma-Aldrich, St Luis, MO), durante 20 min. Las secciones fueron incubadas durante 16 en una cámara de humedad a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos primarios:

1. caspasa 3 policlonaal rota antihumana de conejo (1:100, Cell Signaling Danvers, MA),
2. mieloperóxidasa (1:200, Sigma-Aldrich),
1. AIF (1:50, Cell Signaling),
2. TRAIL-R2 (1:50, Cell Signaling),
3. Calreticulina (1:200, Cell Signaling)
4. HMGB1 (1:200 Cell Signaling)
5. CD3 (1:2, Dako, Glostrup, Dinamarca)

Después, se utilizó el sistema de detección de polímero peróxidasa EnVision (Dako) durante 30 min. Para el desarrollo de las enzimas se utilizó, ya sea, el kit (RE7105, Leica-NovoCastr, Newcastle, RU) de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, café), o bien el kit (K3461, Dako) de aminoetilcarbazol (AEC, rojo). Entre las incubaciones, los portaobjetos se lavaron en buffer de solución salina tris-amortiguada (TBS) por 3 x 2 min y finalmente, se contratiñeron utilizando hematoxilina.

Los anticuerpos primarios se detectaron por inmunofluorescencia (IF) utilizando Alexa Fluor 546 (naranja-rojo) acoplado a IgG anticonejo (1:200) o Alexa Fluor 488 (verde) acoplado a IgG antiratón (1:200) durante 90 min, y los núcleos celulares fueron revelados en azul utilizando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (todos de Invitrogen/Molecular Probes). Las imágenes de campo brillante se escanearon, mientras que las imágenes de IF se escanearon a través del sistema SlideScanner o un Nikon Eclipse e-600.

Análisis de proteínas relacionadas con la apoptosis

Las proteínas fueron aisladas a partir de las muestras congeladas, utilizando el buffer de extracción (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 10 µl/mL inhibidor de fosfatasa y 5 µl/mL de inhibidores de proteasas), durante 30 min sobre hielo, seguido de la centrifugación a 15,000 rpm a 4 °C durante 15 min. La concentración de proteínas se midió con el ensayo Bradford.

Arreglo de apoptosis

La expresión de las 35 proteínas relacionadas con la apoptosis se evaluó simultáneamente en las muestras tratadas y no tratadas utilizando un kit de Arreglo de Apoptosis en Humano con una membrana de nitrocelulosa Proteome Profile™ (R&D, Minneapolis, MN) (**Figuras 21A y 21B**). Los arreglos fueron incubados en un agitador con 250 µL de lisados de proteína con 1,200 µg/mL de concentración, a 4 °C toda la noche, después, con la IgG anti humano bioestabilizada durante 60 min, y con el conjugado de EStreptavidina-peroxidasa de rábano por 30 min, y se visualizaron utilizando un kit de quimioluminiscencia ECL (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Kit; Thermo Scientific, Rockford, IL), durante 10 min en la Kodak Image Station 4000 mm (Rochester, NY). El análisis semicuantitativo se realizó utilizando el ImageJ 1.45s (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Western immunoblots

Para los western immunoblots, los extractos de proteínas se mezclaron con el buffer de muestra Laemmli 5x que contiene 5% de 2-mercaptoetanol, y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Se cargaron 30 µg de proteína en cada pozo de gel de poliacrilamida con 12% de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y se realizó la electroforesis a 150 V durante 1 h. Después, las proteínas se sometieron al inmunoblot en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) a 75 mA y 4 °C, toda la noche. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron secuencialmente con leche semidescremada al 5% como un bloque de proteína durante 60 min, seguido por la incubación con AIF anti humano de conejo (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA), anticuerpo RIP (proteína cinasa que interactúa con el receptor; 1:1000, Sigma-Aldrich) a 4 °C durante 16 h. Para el control de carga, se utilizó el anticuerpo de conejo anti-β-actina (1:200, Thermo) durante 60 min. Después, las señales detectaron con la IgG anticonejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (1:1000; Cell Signaling) por 60 min, y el kit (Thermo) SuperSignal enhanced chemiluminescence (ECL) por 10 min al utilizar la Kodak Image Station y su software 4.1. La escala Precision Plus Protein Standard produjo bandas a 250 kDa, 150-, 100-, 75-, 50-, y 37 kDa. Todos los reactivos, excepto en donde se indica lo contrario, son de Bio-Rad (Hercules, CA).

Ensayo TUNEL

Con base en el precribado en las secciones TMA, también, se realizó el ensayo TUNEL sobre las secciones transversales completas de los tumores tratados con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador y sus controles emparejados recolectados a las 24 h y 48 h después del tratamiento. El ensayo por TUNEL une terminales rotas (nick ends) de ADN utilizando la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) con el trifosfato de desoxiuridina etiquetada con un fluorocromo (dUTP). De este modo, las señales de fluorescencia en los núcleos celulares son proporcionales a la cantidad de ADN fragmentado por para indicar la muerte celular programada. El "Click it TUNEL Alexa Fluor 488 Imaging Assay" (Invitrogen) se utilizó de conformidad con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los portaobjetos rehidratados y desecados se calentaron en una solución desenmascarada de antígeno a pH 6.0 con base de citrato (H-3300, Vector Lab, Burlingame, CA) utilizando el autoclave eléctrico (como se mencionó anteriormente). Después, los portaobjetos fueron incubados a 37 °C por 60 min con un cocktail de dUTP y TdT substituidas con alquinos, seguido del fluorocromo acoplado a dUTP por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN nuclear se tiñó con DAPI.

Método de microscopía digital:

Procedimiento para escanear el portaobjetos:

Las secciones transversales completas y las muestras TMA teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica o ensayo TUNE, se digitalizaron utilizando el sistema de escáner de portaobjetos Panoramic Scan utilizando un objetivo 20x (3DHISTECH, Budapest, Hungría).

Imagenología y análisis de la microscopía digital:

La imagenología del tejido tumoral se llevó a cabo utilizando el software Panoramic Viewer. La ampliación de la imagen se ajustó digitalmente, toda la muestra de tumor fotografiado contiene una escala indicadora. El análisis cuantitativo de las muestras se realizó manualmente o utilizando el módulo HistoQuant del software Panoramic Viewer (todos de 3DHISTECH, Budapest, Hungría) con base en el color de la imagen y la intensidad de la segmentación. La tasa de tratamiento con oncotermia relacionado con la destrucción tumoral (TDR) se calculó al dividir el área de tejido tumoral destruido (D) entre el área total del tumor (W) medido en las secciones transversales completas. La eficiencia de destrucción tumoral relacionada con el tratamiento (TDE) se evaluó al dividir la TDR del tumor tratado entre la TDR del tumor no tratado del mismo animal (**Figura 39**). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Kruskal-Wallis del software SPSS Statistics v.20 (IBM Corp. New York, NY).

El número de células positivas al marcador, los núcleos celulares o los cuerpos apoptóticos se contaron en una ampliación con objetivo 100x en 10 campos microscópicos diferentes (FOV) de 3 muestras tratadas y 3 muestras no tratadas en cada punto temporal evaluado. Ya que, la localización nuclear fue crítica tanto para las muestras teñidas por TUNEL como por AIF, se utilizó la tinción DAPI para la verificación. Para las células teñidas del citocromo con la señal citoplásmica difusa, se contaron solo en las áreas tumorales intactas morfológicamente. Los cuerpos apoptóticos se contaron sobre los portaobjetos H&E. Los portaobjetos teñidos con TRAIL-R2 y la caspasa-3 rota, se evaluaron utilizando el software HistoQuant. El área enmascarada relativa (AER) se definió al dividir el área enmascarada positiva del marcador entre el área total anotada. Para la estadística, la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov se llevó a cabo seguida por la prueba t independiente, utilizando SPSS Statistics v.20. Para los portaobjetos teñidos con CD3 y mieloperóxidasa, se fijó un sistema en escala 10, para llevar la cuenta de la frecuencia de células positivas y los resultados fueron analizados utilizando la prueba Kruskal-Wallis.

Ejemplo 1: Destrucción del tumor

En las secciones transversales teñidas con H&E de los xenoinjertos HT29, las zonas centrales dañadas de los tumores, fueron desmarcadas como las áreas tenues. (Flechas en la **Figura 40A**). El software visor de portaobjetos digital permitió mediciones exactas del área en μm^2 . La relación de destrucción tumoral (TDR), la proporción de daño (D) por área total (W) del tumor, fue significativamente más alta ($*p < 0.05$) en los tumores tratados comparados con los tumores no tratados (véase **Figura 40B**). El tratamiento con oncotermia relacionado con la destrucción celular del tumor (TDE), también, mostró un incremento dinámico a partir de las 24 h en las cuales se observó un pico de 7 veces a las 72 h después del tratamiento (**Figura 40C**).

Ejemplo 2: Fragmentación de ADN

El ensayo TUNEL probó la fragmentación de ADN relacionada con la muerte celular programada significativamente más alta en las secciones transversales completas (Figura 41) de los tumores tratados comparados con los tumores no tratados a las 24 h ($*p < 0.05$) y 48 h ($**p < 0.01$) post-tratamiento (**Figuras 42 A-B**). De acuerdo con esto, hubo un grado significativamente más alto de reducción nuclear (picnósis) y acumulación de fragmentos de cromatina densos (cuerpos apoptóticos) en los tumores tratados comparados con los tumores no tratados tanto a las 48 h ($*p < 0.05$) como a las 72 h ($**p < 0.01$) post-tratamiento (**Figuras 42 y C**).

Ejemplo 3: La formación de cuerpos apoptóticos

La elevación significativa en la fragmentación del ADN medida con el ensayo TUNEL, la reducción nuclear y los cuerpos apoptóticos (véase Figura 14), comprobó la muerte celular como el principal mecanismo detrás de la oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) indujo la destrucción del tumor.

Ejemplo 4: Expresión de calreticulina

La calreticulina (CRT) es una de las moléculas más importantes en el proceso del ICD. Cuando la CRT aparece sobre la membrana celular del tumor, puede generar una señal fuerte para las células fagocíticas, incluyendo las células dendríticas (DC), para atacar a las células tumorales que están muriendo. Esta es la señal "comeme" más significativa para las células inmunes. El tratamiento de oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) puede incrementar significativamente la expresión membranar de la CRT brevemente después del tratamiento (**Figura 16**).

Ejemplo 5: Expresión de HMGB1

HMGB1 es la otra señal de identidad importante de la ICD. HMGB1 en estado normal está localizada en el núcleo celular, en donde estabiliza al núcleo y regula la transcripción de muchos genes. Más y más evidencia sugiere que puede liberarse a partir de las células apoptóticas. La HMGB1 extracelular actúa como una citocina y puede activar a las DC (a través de TLR 4), por lo tanto, puede disparar las respuestas de las células T antitumorales, y mediar la ICD. La muerte celular programada inducida por el tratamiento de oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador), acelera su liberación hacia la matriz extracelular (**Figura 15**).

y **Figura 43**), contribuyendo a la activación de DC y mediación de los procesos de reacción inmune antitumoral.

Ejemplo 6: Expresión TRAIL

5 Se utilizó un arreglo de nitrocelulosa perfilador de proteoma incluyendo anticuerpos para 35 proteínas relacionadas con la muerte celular programada, para evaluar el respaldo molecular de la muerte celular inducida por la oncotermia. Este arreglo de proteínas reveló un incremento significativo del receptor de muerte TRAIL-R2 8 h después del tratamiento comparados con los controles no tratados (**Figura 17A**). La expresión en la membrana celular significativamente elevada de la proteína TRAIL-R2 en los tumores tratados, también, fue confirmado tanto a las 8 h como a las 14 h cuando la tinción inmunofluorescencia fue evaluada con el análisis automatizado de las imágenes (**Figura 17 B-C**).

Ejemplo 7: Expresión de HSP70

15 Las chaperonas HSP70 tienen funciones complejas. En las células HSP tratar de mantener la integridad de las células, pero si se pueden expresar hacia la membrana células (**Figura 18A**) o ser liberadas hacia la ECM (**Figura 18B**), es una señal fuerte para las células inmunes. Las HSP juega un papel importante en el reconocimiento de antígenos asociado a tumores o específicos de tumores por el proceso de cebado cruzado y la copresentación.

Ejemplo 8: Señas histomorfológicas de las reacciones inmunes locales

20 Alrededor del área destruida del tumor tratado con oncotermia 72 h post-tratamiento, apareció un anillo de invasión de leucocitos (**Figura 44A**), el cual se vuelve más enfatizado a las 120 h y 168 h después de un tratamiento de oncotermia de un solo disparo (**Figura 44B**).

Ejemplo 9: La identificación inmunohistoquímica (IHCH) de los leucocitos en el anillo de invasión

30 Morfológicamente, no se pueden distinguir las células inmunes diferentes en el anillo de invasión. Fue necesaria la detección inmunohistoquímica compleja para revelar la composición de las poblaciones de células inmunes. La mieloperóxidasa (MPO) es el marcador clave de los neutrófilos (**Figuras 45A y 45B**), CD3 es el marcador de las células T nativas (**Figura 45C y 45D**).

En vista de los resultados presentados en los ejemplos 1-9, se puede concluir que:

- 35 1. El tratamiento de oncotermia puede inducir la muerte celular programada en los tumores que crearon muchos cuerpos apoptóticos. La presencia de cuerpos apoptóticos en un tejido tumoral destruido es esencia para inducir las reacciones inmunogénicas.
- 40 2. La muerte celular inducida por el tratamiento de oncotermia, es altamente inmunogénica, mostrando todos los cambios dinámicos del patrón molecular clave, que son característicos de la muerte de células tumorales inmunogénicas.
- 45 3. El tratamiento de oncotermia induce la reacción inmune local muy inusual y fuerte en el sitio del tratamiento, mucho tiempo después del tratamiento de oncotermia.
- 50 4. La reacción inmune antitumoral local del tratamiento de oncotermia puede ser sistémica, se puede administrar, sí el huésped tiene un sistema inmune intacto, y un estimulante inmune no específico apropiado. Este proceso puede controlar las metástasis distantes a través del efecto espectador, haciendo posible el control sistémico de la enfermedad maligna con el tratamiento local.

Ejemplo 10: administración de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en combinación con Xiao-Aiping

55 La inyección de Xiao-aiping (Xi) se utiliza en la medicina tradicional china (TCM). La inyección es la decocción de *Marsdenia tenacissima*, que contiene flavonoides, ácido clorogénico y polidatina. El experimento se realizó utilizando ratones BALB-C hembra convencionales, en 4 grupos, 4 animales/grupo:

- 60 C: control simulado
- Xi: tratamiento con inyección Xi, dosis: 7.5 mL/kg de peso corporal/día, intraperitonealmente por 4 días
- OTM: Tratamiento de oncotermia una vez por 30 minutos del tumor femoral derecho
- 65 OTM+Xi: tratamiento con inyección Xi, dosis: 7.5 mL/kg de peso corporal/día, intraperitonealmente por 4 días, en el 4o día, el tratamiento de OTM una vez por 30 minutos del tumor femoral derecho.

Los aloinjertos fueron generados al inyectar 10^6 células de adenocarcinoma de colon C26 cultivadas, de manera subcutánea a ambas regiones femorales de los animales. 14 días más tarde, este modelo tumoral doblemente simétrico dio la oportunidad de utilizar el control interno (tumores tratados y no tratados) para el tratamiento de oncotermia, y también, para la investigación de los efectos sistémicos del Xi y el tratamiento de combinación.

El tratamiento OTM, montaje experimental (**Figura 24**).

- Parámetros de RF:
- 13.56 MHz
- Amplitud modulada con 1/f de ruido
- Acoplamiento capacitivo - Impedancia sintonizada

- Sistema:
- LAB-EHY 100 (Oncotherm, Páty)

- Duración: 30 min
- Potencia de salida: 1 - 3 W

Los animales fueron sacrificados 24 horas después del último tratamiento, el tejido neoplásico fue extirpado y se fijó con formalina.

Se realizó el examen histopatológico e inmunohistoquímico de las muestras:

- Histopatología: portaobjetos con H&E
- Inmunohistoquímica
- Ensayo TUNEL (fragmentación de ácido nucléico) (**FITC**)
- CD3 (linfocito) (**rodamina**)
- HSP70 (**rodamina**)
- Evaluación: relación Área Muerta relativa comparada en pares en cada grupo (HistoQuant, 3DHistech) (**Figura 39**.)

Aunque la terapia con Xi sola, fue efectiva de acuerdo con los resultados, la combinación con el tratamiento de oncotermia produjo la destrucción masiva de los tumores tanto del lado tratado con oncotermia como en el lato no tratado también. La monoterapia de oncotermia resultó en la destrucción de los tumores tratados solamente, mientras que no hubo considerables diferencias entre los tumores no tratados y los aloinjertos tratados simulados (**Figura 26A y 26B**).

De acuerdo con los resultados, el tratamiento con la combinación OTM + Xi tiene efecto sistémico contra los tumores multilocalizados en los animales evaluados. El nivel del efecto destructivo contra el tumor sobre el lado no tratado, fue estadísticamente igual con el efecto experimentado en el lado tratado ya sea en el mismo grupo como en el grupo de la monoterapia OTM también. Los hallazgos histomorfológicos e inmunohistoquímicos pueden verse en las **Figuras 27 - 36**.

Ejemplo 11: Las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador en asociación con Carboplatino a dosis baja.

Este informe apoya la capacidad de que el tratamiento de oncotermia en asociación con el estimulante inmune no específico proporciona un efecto sistémico y erradica la metástasis lejana del sitio del tratamiento.

Caso No.: 11461, Cocker spaniel, 8 años, macho castrado,

Diagnóstico: melanoma con metástasis en el pulmón. El tumor primario se situó sobre la pata trasera derecha, y fue removido quirúrgicamente. 5 meses más tarde, la metástasis en el pulmón se presentó en el momento en que iniciamos el tratamiento.

Tratamiento:

Oncotermia (10 veces en un periodo de 2 semanas)

Carboplatino a baja dosis 2 veces, (100 mg/m^2)

(La dosis prescrita de Carboplatino para los perros es 300 mg/m^2)

El Carboplatino en dosis mucho más baja que la prescrita originalmente, una tiene propiedades inmunoestimuladoras. La explicación de este efecto es, que en dosis más baja, el efecto citotóxico de estos fármacos no es significativo para las células cancerosas, pero puede bloquear efectivamente la función de las células T reguladoras (T_{reg} ; antiguamente conocida como células T supresoras). Las células T_{reg} pueden controlar la intensidad de las reacciones inmunes de modo que sí el número de células T_{reg} se ve disminuido, la actividad general del sistema inmune es de algún modo incrementada (Pacientes que tienen la función de células T_{reg} dañada ocasiona que desarrolle enfermedades autoinmunes graves).

El sitio del tratamiento de OTM fue en el cuello, exactamente en la línea del corazón. Se observó la regresión significativa del tumor solamente en el sitio del tratamiento, pero fuera del área tratada con OTM directamente, como

puede ser visible en la serie de imágenes de CT (véase **Figura 47**)

Ejemplo 12

Los experimentos de mediciones del curso temporal típicos se realizaron de la siguiente manera:

- 5
- se utilizaron ratones hembra inmunocomprometidos BALB/c (nu/nu);
 - línea celular, HT29, de cáncer colorectal de humano;
 - modelo de xenoinjerto en dos regiones femorales, solo uno es tratado;
 - estudio del curso temporal 0 → 216 h , 39 animales, (78 tumores);
 - 10 - el tratamiento utilizado es con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (oncoterapia), un solo disparo, 30 min, 42 °C;
 - la frecuencia usada, 13.56 MHz, ruido rosa modulado;
 - la naturaleza de los electrodos es flexible de conformidad con la patente WO 2009/092619;
 - 15 - los datos fueron analizados, como se describió anteriormente - el estimulante inmune no específico: Se administró el estimulante inmune LPS de *E. coli* (100 µg de LPS En 100 µL de solución Salsol) sc en la región dorsal del animal 24 h antes de la administración de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (tratamiento de oncoterapia).

20 El resumen de las mediciones del curso temporal típicas, se muestra en la **Figura 11**. Este estudio utiliza las secciones transversales completas para identificar la morfología. El resultado típico del tratamiento es la apoptosis de las células tumorales (véase **Figura 12**), que es proporcionada por las múltiples investigaciones y diferentes métodos de detección, como se describe a continuación.

25 La presencia dominante de la apoptosis se prueba experimentalmente por medio del ensayo TUNEL (realizado como se describió previamente), mostrando la desfragmentación de ADN como se muestra en la **Figura 12**. Como se muestra en la Figura 13, la escala de tiempo de la apoptosis está bien sustentada por los experimentos de curso temporal.

30 Primeramente, el antígeno que contiene anticuerpos apoptóticos son bastante observables (véase Figura 14), como el marcador general para la muerte celular apoptótica inmunogénica, la que es la base del método de vacunación de conformidad con la presente invención. Esta especialidad (muerte celular apoptótica dominante) del tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo (oncoterapia), es un factor clave del efecto de la vacunación. La formación del patrón molecular asociado al daño y la estimulación de las reacciones inmunes completas, son dos condiciones necesarias de la muerte celular inmunogénica.

35 La oncoterapia indujo efectos sobre los miembros de DAMP necesarios, son probados experimentalmente. Así, el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo tiene como resultado la presentación de HMGB1 y la liberación hacia la matriz extracelular (véase **Figura 15**). Además, 4 h después del tratamiento, se observa la expresión de calreticulina sobre la membrana celular (véase **Figura 16**).

40 Por consiguiente, el tratamiento de células cancerosas con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo induce la expresión de TRAIL-R2 (véase Figura 17), y la expresión de HSP70 en el espacio extracelular y sobre la superficie de la membrana de las células (véase **Figura 18**).

45 La evaluación del porcentaje promedio relativo de HSP70 en el volumen del tumor, muestra dos desarrollos independientes (véase **Figura 19**):

- el primer desarrollo es después de las 48 h desde el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo y está conectado con la inducción directa por calor de HSP70;
- 50 - el segundo desarrollo comienza más tarde y contribuye a la muerte celular inmunogénica como parte de DAMP.

55 La evaluación de la expresión de ARNm 4 h después del tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, perfila la capacidad del tratamiento de conformidad con la presente invención para inducir la síntesis de las siguientes proteínas: HSP4, HSPA8, BAG3, HSPB1, DNAJB1, HSPA1A, HSP90AA1, DNAJB4, HSPA6, HSPD1, HSP1L (véase **Figura 20** y **Figura 3**).

60 Para investigar adicionalmente, el mecanismo apoptótico de la muerte celular, se realizaron los ensayos de perfilador de proteoma de apoptosis de humano. Los resultados se resumen en la **Figura 21**. El efecto del tratamiento con ondas de radiofrecuencia sobre la expresión de las proteínas involucradas en las rutas que inducen la muerte, como TRAIL-R2 (DR5), FAS y FADD como se muestra en la **Figura 22**, proporciona nuevas percepciones adicionales en el mecanismo de realización de la ruta apoptótica de la membrana celular.

65 De este modo, se identificaron las proteínas más importantes involucradas en la inducción de la apoptosis de las células tumorales por el tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo. Además, fueron diferenciadas las respuestas inmunes al tratamiento con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo. Por lo tanto, como se muestra en la **Figura 23**, el evento apoptótico de la célula cancerosa tratada vence

después de 48 h después del tratamiento y es seguido después de un periodo de transición por una activación fuerte del sistema inmune, lo que lleva a la muerte de células cancerosas inmunogénicas.

Como se muestra en la **Figura 4**, la vacuna antitumoral de conformidad con presente invención proporciona un efecto sistémico: el tumor no tratado situado sobre la otra extremidad se encoje en respuesta al tratamiento aplicado al tumor situado sobre la otra extremidad. La literatura del estado de la técnica muestra solo apoyo inmune *off-situ*, cuando fue necesaria la asistencia del laboratorio para los efectos a distancia (inmunoasistidos). En el tratamiento de conformidad con la presente invención, el punto principal es la aplicación *in situ*. La oncotermia sola (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo), no tiene ningún efecto sobre el tumor situado muy lejos. La administración de LPS no tiene ningún efecto sobre la regresión del tumor. Sin embargo, la administración asistida por LPS de las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo, proporciona un efecto abscopal y los resultados en la reducción del tumor situado a una distancia muy lejana. Así, la oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo) y la administración de LPS, tiene como resultado el efecto a larga distancia (sistémico) de la oncotermia local.

Ejemplo 13: Las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador en asociación con Leukine®

Se diagnosticó a un paciente hombre de 72 años de edad con cáncer de pulmón de células no pequeñas no clasificable. La clasificación del tumor en el primer diagnóstico fue cT2N2M0, etapa IIIB. A pesar del caso avanzado, el paciente rechazó cualquier tratamiento. Cinco meses más tarde, el paciente visitó el departamento de medicina complementaria y alternativa para pacientes externos, con malestares de hemoptisis y disnea de esfuerzo que empeoraba gradualmente 4 semanas antes. El paciente fue referido al departamento médico de oncología y fue admitido para la reevaluación.

El diagnóstico y clasificación del cáncer que incluye escanéos PET y CT del pecho, mostraron la masa cavitaria de 9.5 cm de tamaño en el lóbulo medio derecho con los nodos linfáticos metastásicos y regionales múltiples. El paciente no tuvo comorbidades y ningún historial médico. Sin embargo, el paciente rechazó la quimioterapia, y junto con los miembros de su familia solicitaron otras opciones posibles de tratamiento.

Es estas circunstancias, se realizó la radioterapia en combinación con la oncotermia y GM-CSF esperando inducir el efecto abscopal. La terapia de radiación de campo local a la masa del pulmón se aliberado a una dosis de 1.7 cGy en 28 fracciones diarias para los 5 - 6 tratamientos en una semana. Se siguió la oncotermia después de la radiación 3 veces a la semana. Después de 2 semanas con el tratamiento de oncotermia, se administró GM-CSF (250 microgramos, Leukina®, EEUU), de manera subcutánea una vez al día por 10 días. Se administró GM-CSF en una dosis de 125 µg/m² por vía subcutánea durante 14 días después de una semana de radioterapia. El resultado apoyo que utilizando GM-CSF fue factible y su efecto mejoró la terapia inmune.

Los tratamientos se administraron sin ninguna complicación. El paciente no presentó ningún efecto adverso severo excepto fatiga grado 1 al final del periodo de tratamiento. A través del proceso de seguimiento, justó después del tratamiento de radiación terminados, el escáneo de las series PET mostraron la remisión casi completa en múltiples nódulos linfáticos metastásicos, los que estaban distantes del campo de radioterapia. El tumor primario (tratado) se encogió, la metástasis que se encontraba a distancia desapareció (véase **Figura 37**).

El paciente quedó satisfecho y dado de alta con respuesta exitosa. Se continuó el seguimiento del paciente. Este caso describe un efecto abscopal exitoso con la radioterapia local en combinación con la oncotermia y la inmunoestimulación con GM-CSF. Este intento pareció ser más efectivo en la respuesta inmune que en la radioterapia sola.

Ejemplo 14: Las ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador en asociación con Juzentaihoto (TJ-48)

El efecto de la vacuna del Juzentaihoto (TJ-48) en combinación con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador, fue evaluado en un modelo tumoral ortotópico 4T1(luc2). Juzentaihoto (TJ-48) (Tsumura Co., Tokyo, Japan) es una hierba japonesa que ha sido utilizada para aliviar la anemia. Contiene el extracto de 10 hierbas medicinales tradicionales, y tiene un efecto modificador de la respuesta biológica potente para el sistema inmune.

Línea celular tumoral: 4T1(luc2). Esta clona de la línea celular contiene una enzima luciferasa. El tumor y su metástasis puede emitir una radiación de luz débil, cuando el sustrato de la enzima es administrado vía intraperitoneal, y puede ser fotografiada (y cuantificada) utilizando un sistema de cámara sensible (sistema de imagenología bioluminiscente *in vivo* IVIS[®]2000).

Diseño experimental:

Inducción del tumor: - 14 días.

administración de TJ-48: desde el día - 3 hasta el día 18 (50 mg/día, diariamente, po).

Tratamiento de oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador): día 0 y día 6 (1 - 2 W alcanzando la temperatura del núcleo del tumor 41 - 42 °C, 25 min el tiempo

total de tratamiento).

Los ratones fueron sacrificados el día 20, y el pulmón fue fotografiado *ex-vivo* para detectar la metástasis. El examen histomorfológico del tumor primario y la metástasis en el pulmón, se realizó de acuerdo con la descripción previa.

Grupos de animales experimentales:

1. Control no tratado (4 ratones)
2. Grupo TJ-48: los ratones se trataron solo con TJ48 (4 ratones); El TJ-48 se administró oralmente utilizando la sonda gástrica.
3. Grupo de oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador): los ratones fueron tratados solo con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador el día 0 y el día 6 (4 ratones)
4. Grupo de oncotermia + TJ-48: los ratones fueron tratados con TJ-48 y oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) el día 0 y el día 6 (4 ratones).

El volumen del tumor del tumor primario inducido se evaluó desde el día 0 hasta el día 13. Como se muestra en la **Figura 48**, la administración de oncotermia (ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador) en asociación con TJ-48 resultó en una reducción significativa del volumen del tumor.

Ejemplo 15: Demostración experimental del efecto de vacunación del método de la inventiva

El diseño experimental, el modelo tumoral (4T1) y los grupos de animales experimentales son los mismos, según se describió en el ejemplo 14.

Abreviaturas utilizadas en este documento:

Métodos de evaluación:

I. Investigaciones del tiempo de supervivencia de los animales en los grupos experimentales.

El incremento significativo en el tiempo de supervivencia del grupo tratado con oncotermia y el estimulante inmune, provó indirectamente el efecto de vacunación del método.

II. Evaluación de la eficiencia de la vacunación utilizando un ensayo ELISPOT

El ensayo **punto inmunosorbente unido a enzimas (ELISPO)** es un método común para monitorear las respuestas inmunes en humanos y animales. El ensayo ELISPOT está basado en, y fue desarrollado a partir de la versión modificada del inmunoensayo ELISA. Los ensayos ELISPOT fueron desarrollados originalmente para enumerar a los anticuerpos específicos de antígenos secretores de células B, y han sido adaptado subsecuentemente para varias tareas, especialmente, la identificación y enumeración de las células productoras de citocina al nivel de células únicas. En pocas palabras, en condiciones apropiadas el ensayo ELISPOT permite la visualización del producto secretor de las células de respuesta o las células individuales activadas. Cada punto que se desarrolla en el ensayo, representa a una célula única reactiva. Así, el ensayo ELISPOT proporciona tanto información cualitativa (tipo de proteína inmune) y cuantitativa (número de células de respuesta). Para la evaluación de la vacunación antitumoral, el ensayo ELISPOT de IFN-gama es el método utilizado y aceptado ampliamente.

Breve descripción del diseño del estudio ELISPOT (kits para el ensayo ELISPOT para ratón, disponibles comercialmente con BDBiosciences):

1. La recolección de las células de interés (células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células originadas en el vaso), de los animales de los grupos experimentales. Se agruparon las muestras de los animales individuales de acuerdo con los grupos experimentales. Grupos experimentales: animales control no tratados; animales tratados con oncotermia; animales tratados con inmunoestimulantes; se combina el tratamiento de oncotermia y tratamiento de inmunoestimulación.
2. Incubación de muestras a partir de las células de interés con células de tumor 4T1
3. El funcionamiento de un ensayo ELISPOT de conformidad con el protocolo de manufactura
4. Evaluación del estudio: En caso del efecto de vacunación exitoso, las muestras de OTM + CIS muestran el número más alto de puntos en el ensayo.

III. Evaluación de la eficiencia de la vacunación utilizando un análisis citometría de flujo (FACS)

La población de células CD4+ y CD8+T de PBMC se puede investigar utilizando el análisis de citometría de flujo y los anticuerpos apropiados. Las muestras de sangre pueden agruparse también en este experimento. En caso de vacunación exitosa, la relación de las células positivas CD4+

II. Evaluación de la eficacia de la vacunación utilizando un ensayo ELISPOT

5 El punto de inmunoabsorción (ELISPOT) de ensayo ligado a enzimas es un método común para la supervisión de respuestas inmunológicas en humanos y animales. El ensayo ELISPOT se basa en, y fue desarrollado a partir de una versión modificada del inmunoensayo ELISA. ELISPOT ensayos fueron desarrollados originalmente para enumerar las células B secretoras de anticuerpos específicos de antígeno, y fueron subsecuentemente adaptados a varias tareas, especialmente la identificación y enumeración de producción células de citokina a nivel unicelular. Simplemente poner, a condiciones apropiadas el ensayo ELISPOT permite la visualización del secreto de producto de las células activadas individuales o correspondientes. Cada punto que se desarrolla en el ensayo representa una
 10 única célula reactiva. Así, el ensayo ELISPOT proporciona información tanto cualitativa (tipo de inmuno proteína) como cuantitativa (número de células reactivas). Para la evaluación de vacuna antitumoral el ensayo IFN-gamma ELISPOT es un método ampliamente usado y aceptado.

15 Breve descripción del diseño del estudio ELISPOT (kits de ensayo de ELISPOT para ratón disponible comercialmente de BDBiosciences):

- 20 1. Recogida de las células de interés (periférica de células mononucleares de la sangre (PBMC) o en el bazo se originó células) de los animales de los grupos experimentales. Las muestras se combinaron a partir de animales individuales de acuerdo con grupos experimentales. Grupos experimentales: los animales de control no tratados, los animales tratados oncothermia, animales tratados con inmuno estimulantes; tratamiento oncothermia y el tratamiento se combina la inmunoestimulación
2. La incubación de muestras de células de interés con 4T1 células tumorales
3. Realización de un ensayo ELISPOT de acuerdo con protocolo del fabricante
- 25 4. Evaluación del estudio: En caso de éxito de la vacunación efecto las muestras OTM + IC muestran el mayor número de puntos en el ensayo.

III. Evaluación de la eficiencia de la vacunación utilizando un análisis de citometría de flujo (FACS)

30 Población de células CD4 + y T CD8 + de PBMC puede ser investigada utilizando el análisis de citometría de flujo y anticuerpos apropiados. Las muestras de sangre se pueden agrupar también en este experimento. En caso de éxito de la vacunación, la relación de la CD4 +

REIVINDICACIONES

1. Un estimulante inmune no específico para el tratamiento no invasivo de cáncer primario su metástasis o para uso no invasivo en la prevención de la recaída en el cáncer o para el uso de vacuna no invasiva para personas con riesgo alto de desarrollo de cáncer, dicho estimulante inmune no específico se utiliza en asociación con ondas de radiofrecuencia utilizando acoplamiento capacitivo en un arreglo de condensador.
2. El estimulante inmune no específico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el arreglo de condensador comprende al menos un electrodo y al menos un contraelectrodo, en el que un paciente es el material dieléctrico entre ellos.
3. El estimulante inmune no específico de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en el que no se utiliza ninguna antena como en el arreglo de RF con acoplamiento radiativo para la administración de ondas de radiofrecuencia.
4. El estimulante inmune no específico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que las ondas de radiofrecuencia son administrados sistémicamente.
5. El estimulante inmune no específico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que las ondas de radiofrecuencia administradas aplicadas no invasivamente no incrementan la temperatura corporal del paciente o la temperatura del área tratada del paciente.
6. El estimulante inmune no específico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el estimulante inmune no específico activa al sistema inmune del paciente, y en asociación con las ondas de radiofrecuencia administradas utilizando acoplamiento capacitivo en una arreglo de condensador, proporciona un efecto de vacuna contra el cáncer al desarrollar células de memoria para reconocer y matar a las células cancerosas.
7. El estimulante inmune no específico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el estimulante inmune no específico es seleccionado a partir del grupo que comprende lipopolisacáridos, extracto de Bacilos Calmette-Guérin, Picibanil, Ancer, Xiao-Aiping, Leukine® (sargramostim; factor recombinante estimulante de colonias de macrófagos granulocitos), bacterias muertas de *Corynebacterium parvum* y su extracto, Ipilimumab (un anticuerpo contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxico), Levamisol, KLH (Hemocianina de lapa californiana), cisplatino o carboplatino en dosis baja (< 0.4 mg/kg), Juzentaihoto (JT48) y ácido deoxicólico (DCA).
8. El estimulante inmune no específico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la metástasis o el cáncer primario es seleccionado del grupo que consiste de: adenocarcinoma, melanoma coroidal, leucemia aguda, neurinoma aústica, carcinoma ampular, carcinoma anal, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, tumor desmoide, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de seno, linfoma de Burkitt, cáncer de corpus, síndrome CUP (carcinoma de cáncer primario desconocido), cáncer colorectal, cáncer de intestino delgado, tumores de intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma endometrial, ependimoma, tipos de cáncer epitelial, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer gástrico, cáncer de la vesícula biliar, carcinomas de la vesícula biliar, cáncer cervical, cervix, glioblastomas, tumores ginecológicos; tumores de oreja, nariz y garganta, neoplasias hematológicas, leucemia de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, leucemia de células capilares, cáncer uretral, cáncer de piel, cáncer de piel testicular, tumores cerebrales (gliomas), metástasis cerebral, cáncer de testículos, tumor de la hipófisi, carcinoides, sarcoma de Kaposi, cáncer laríngeal, tumor de células germinales, cáncer de hueso, carcinoma colorectal, tumores de cabeza y cuello, Tumores del área de la oreja, nariz y garganta), carcinoma de colon, craneofaringiomas, cáncer oral (cáncer en el área de la boca y sobre los labios), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de hígado, metástasis de hígado, leucemia, tumor de parpado, cáncer de pulmón, cáncer de nódulos linfáticos (Hodgkin/no Hodgkin), linfomas, cáncer de estómago, melanoma maligno, neoplasia maligna, tumores malignos del tracto gastrointestinal, carcinoma de seno, cáncer rectal, meduloblastomas, melanoma, meningiomas, enfermedad de Hodgkin, micosis fungoides, cáncer nasal, neurinoma, neuroblastoma, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, linfomas de no Hodgkin, oligodendroglioma, carcinoma esofágico, carcinomas osteolíticos y carcinomas osteoplásticos, osteosarcomas, carcinoma ovarico, carcinoma pancreático, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de células escamosas de la cabeza y del cuello (SCCHN, por sus siglas en inglés), cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma rectal, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma tiroideo, enfermedad de Schneeberger, cáncer de esófago, espinaliomas, linfoma de células T (micosis fungoiges), timoma, tumores urológicos, carcinoma urotelial, cáncer de vulva, apariencia de verruga, tumores de tejido blando, sarcoma de tejidos blanco, tumor de Wilm, carcinoma cervical y cáncer de lengua. Particularmente, adecuados para el tratamiento son, por ejemplo, astrocitomas, glioblastomas, cáncer pancreático, cáncer bronquial, cáncer de seno, cáncer colorectal, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de laringe, melanoma maligno, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vejiga y cáncer de células renales.

65



Figura 1

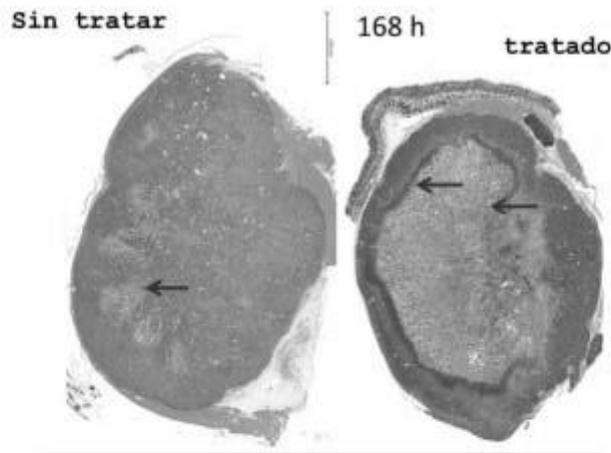


Figura 2

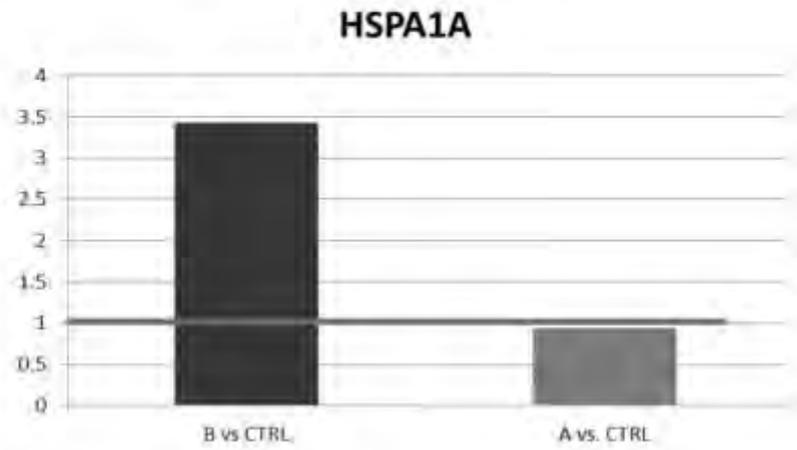


Figura 3A

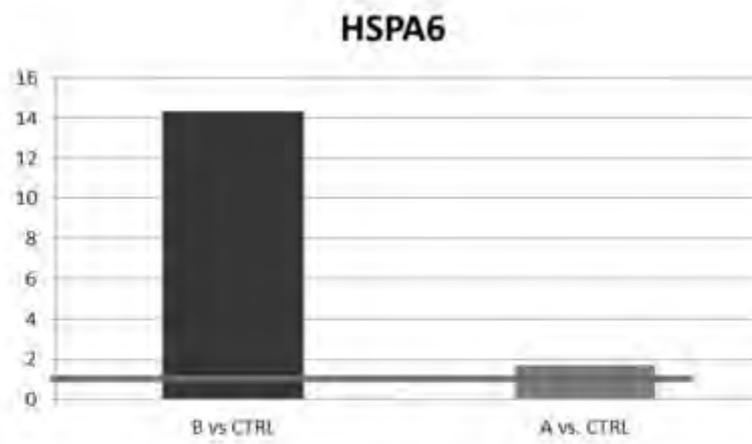


Figura 3B

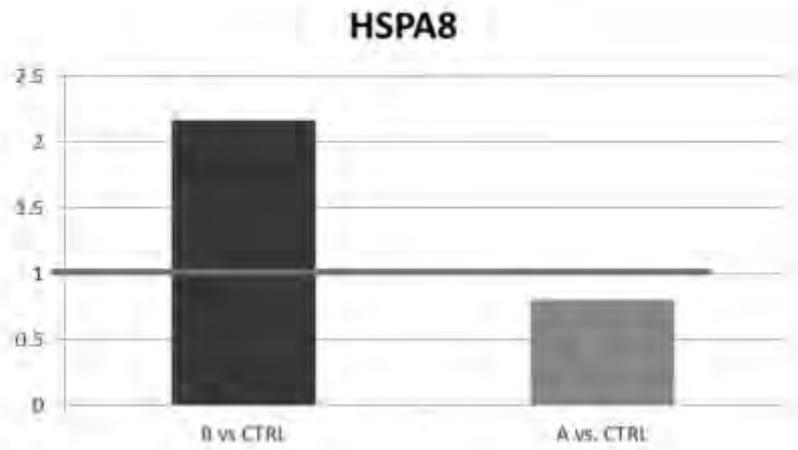


Figura 3C

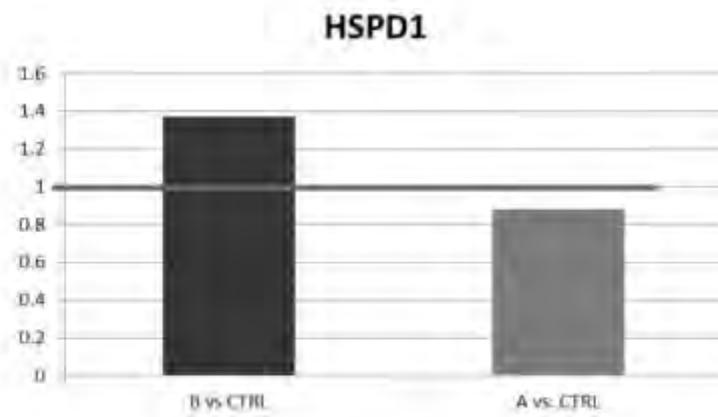


Figura 3D

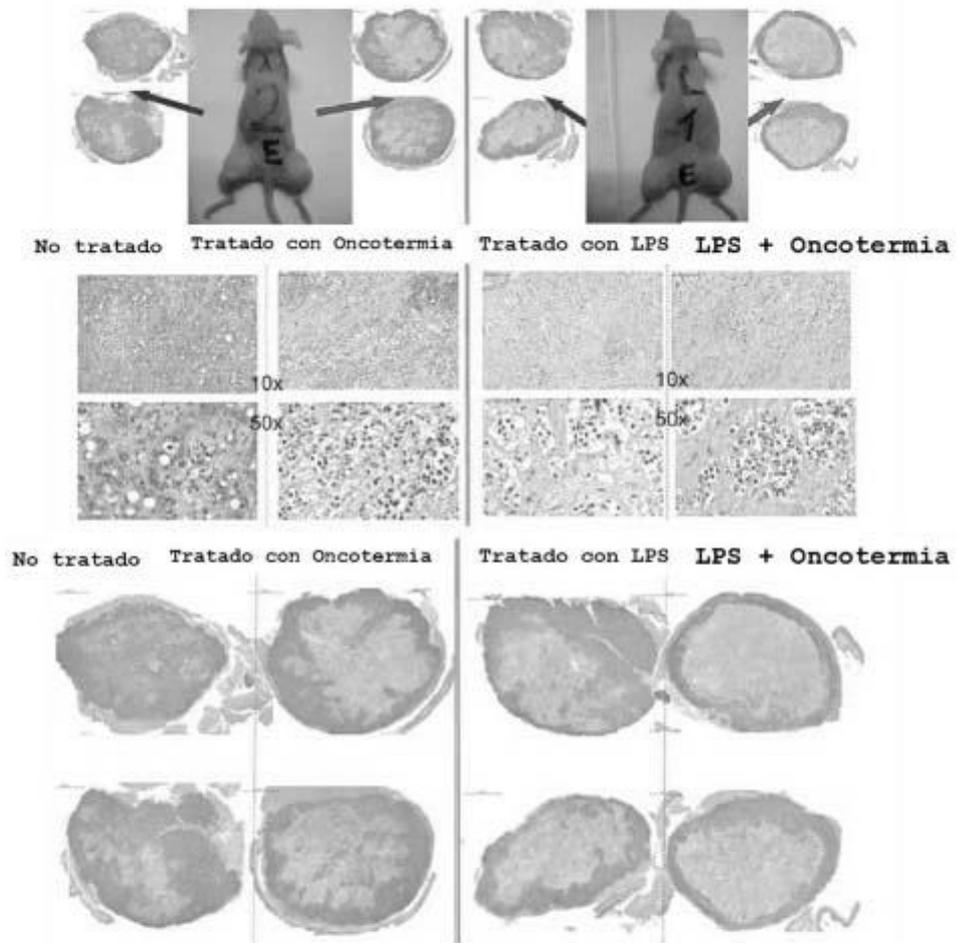


Figura 4

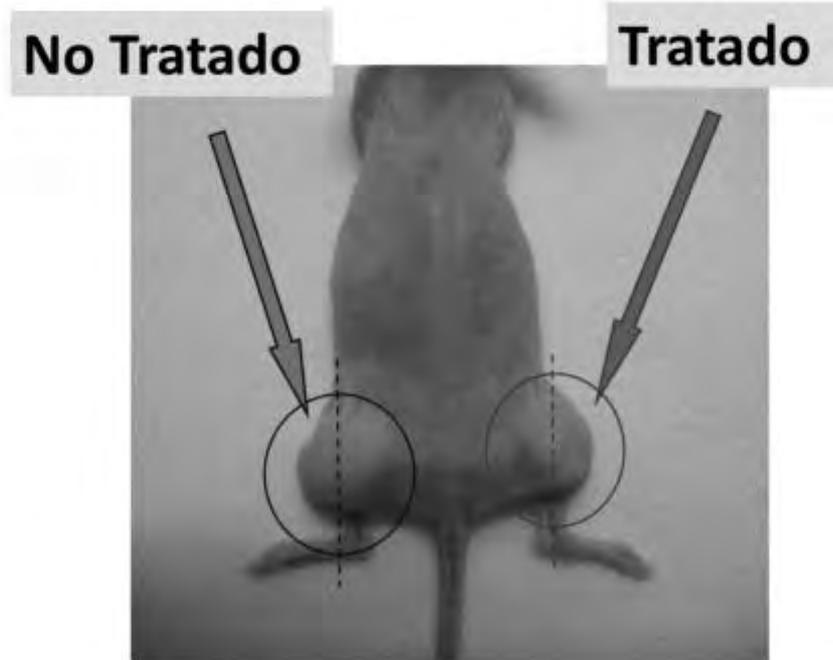


Figura 5

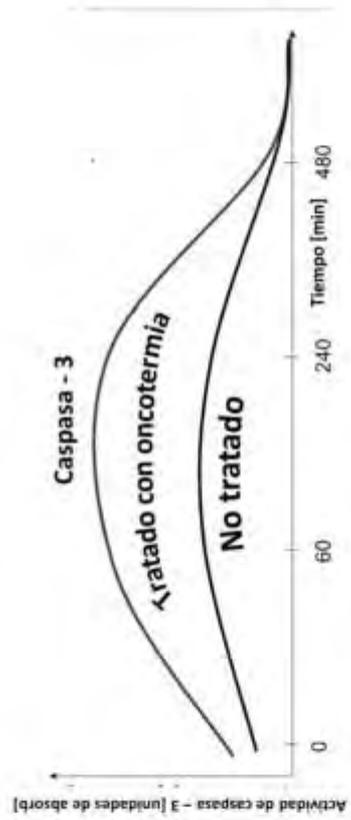
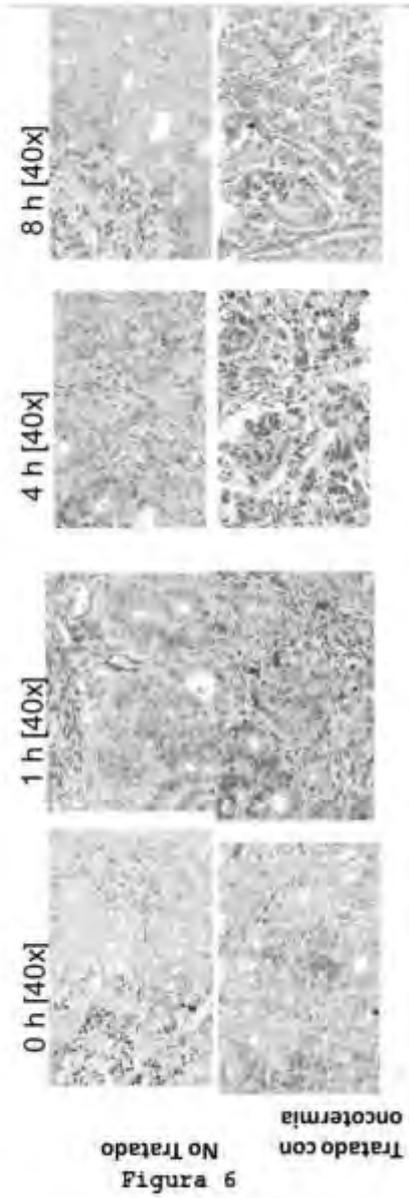


Figura 7

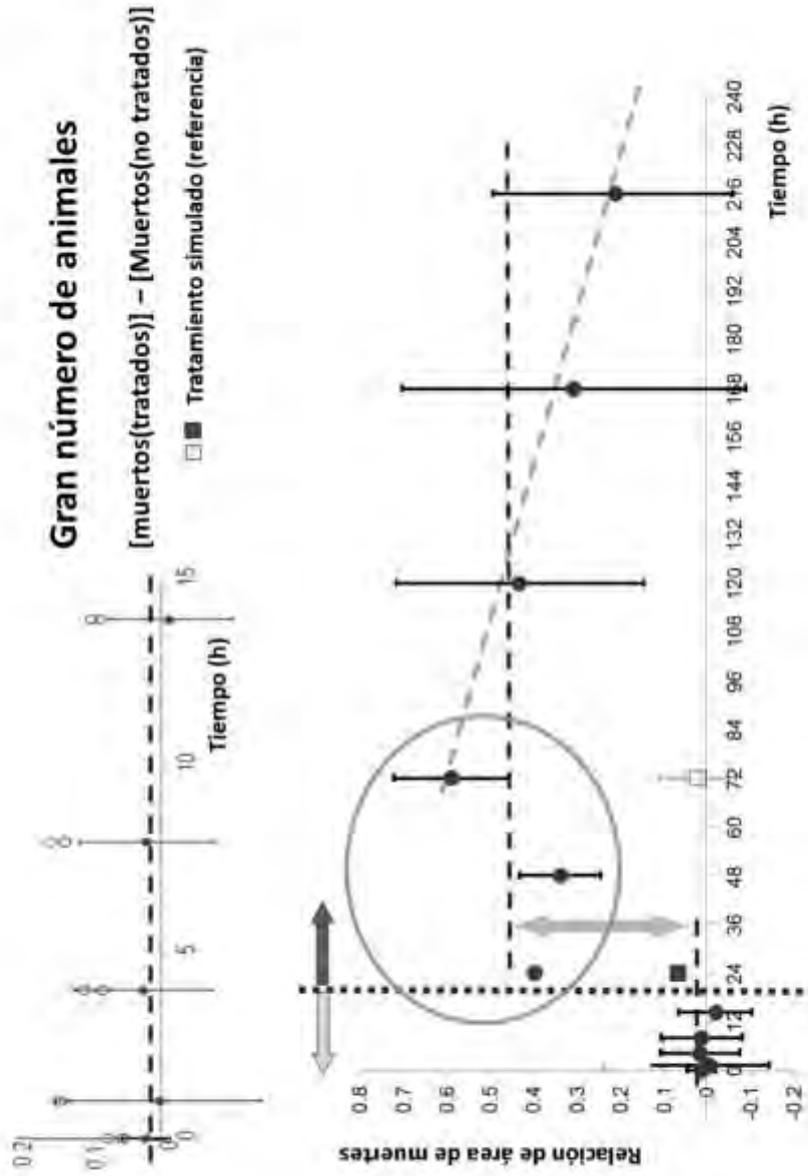


Figura 8



Figura 9A

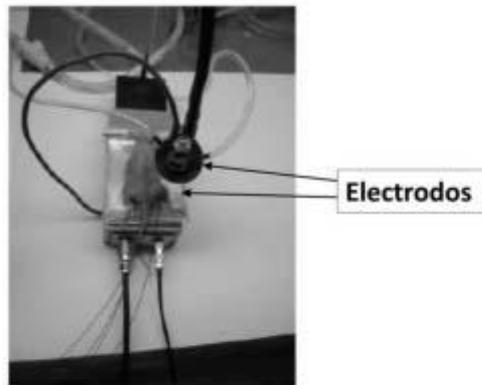


Figura 9B

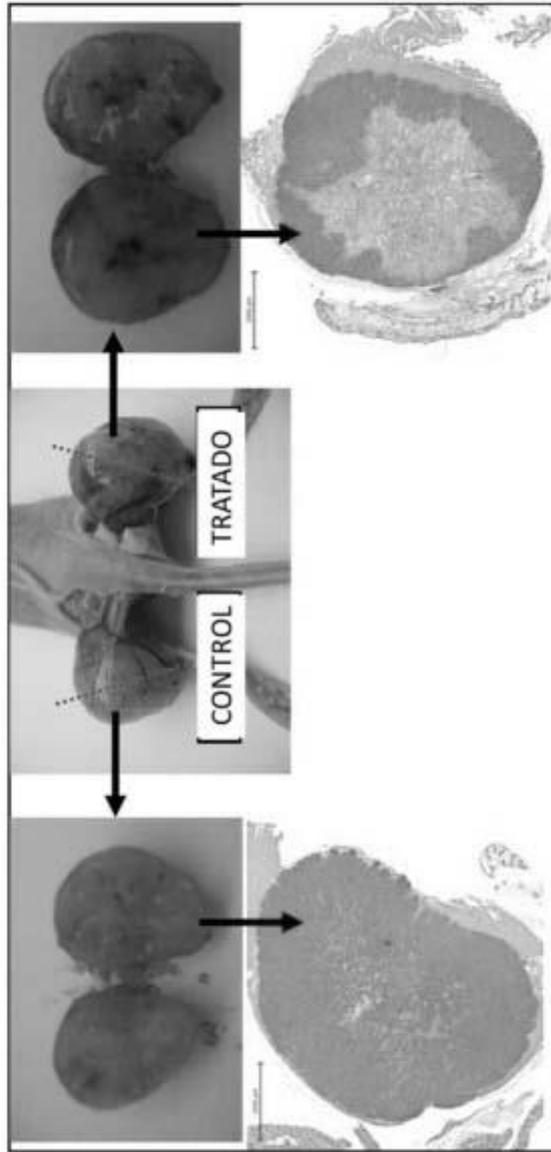


Figura 10A

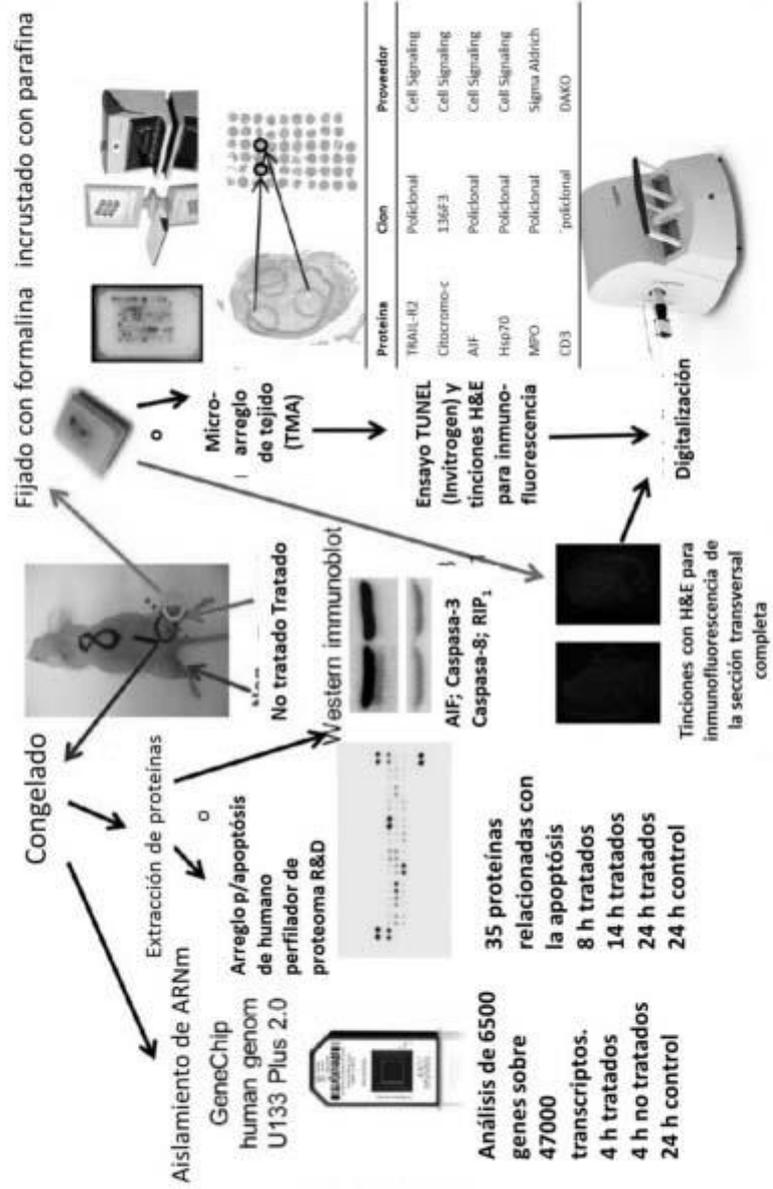


Figura 10B

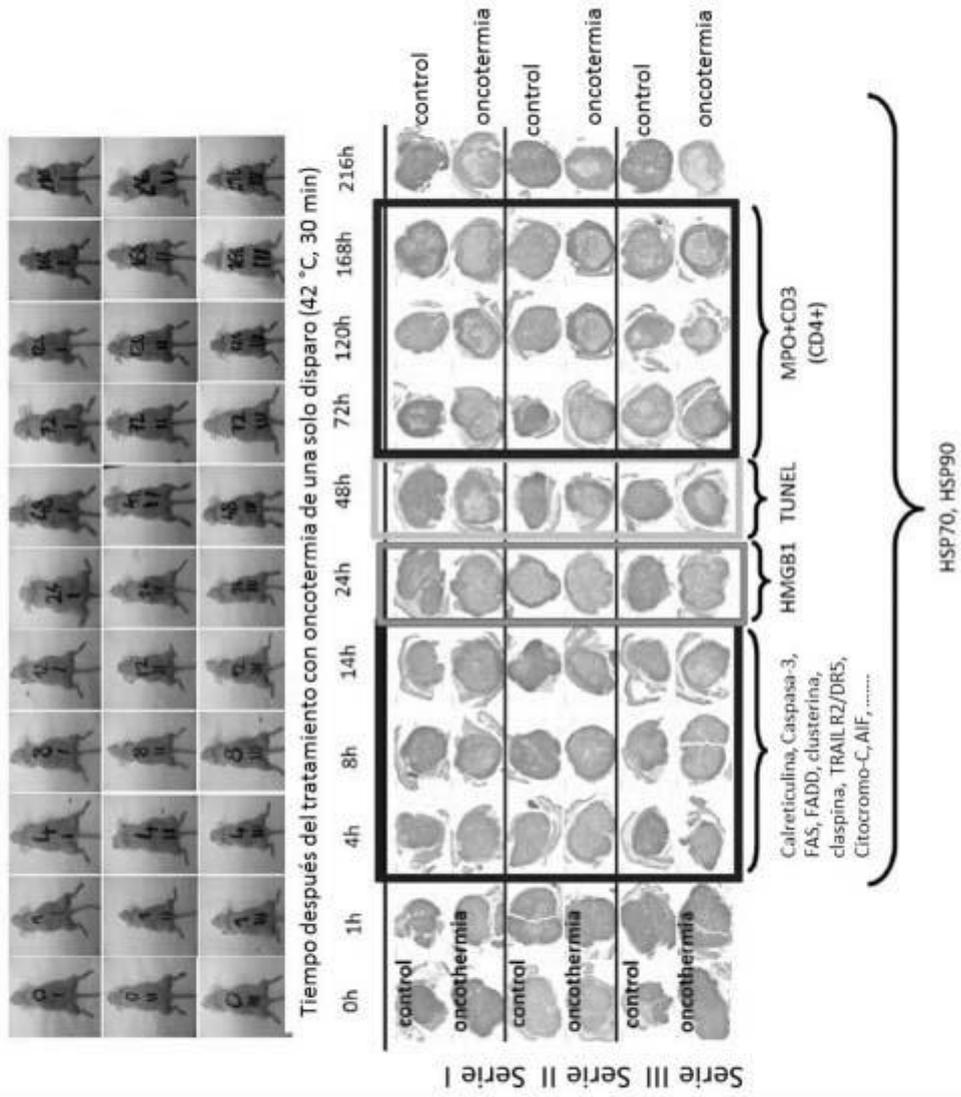


Figura 11

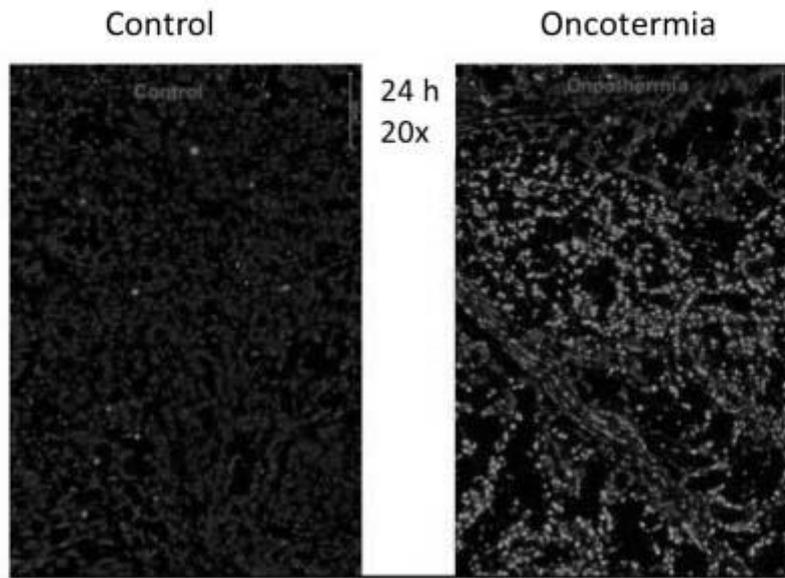


Figura 12

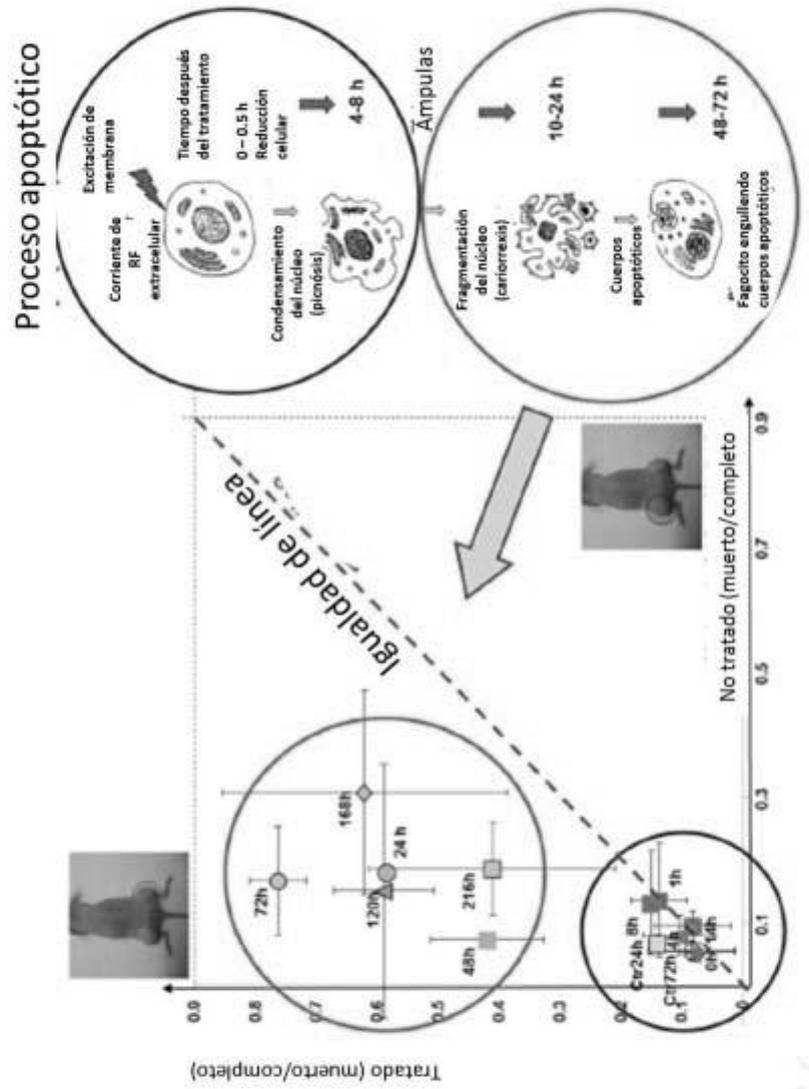


Figura 13

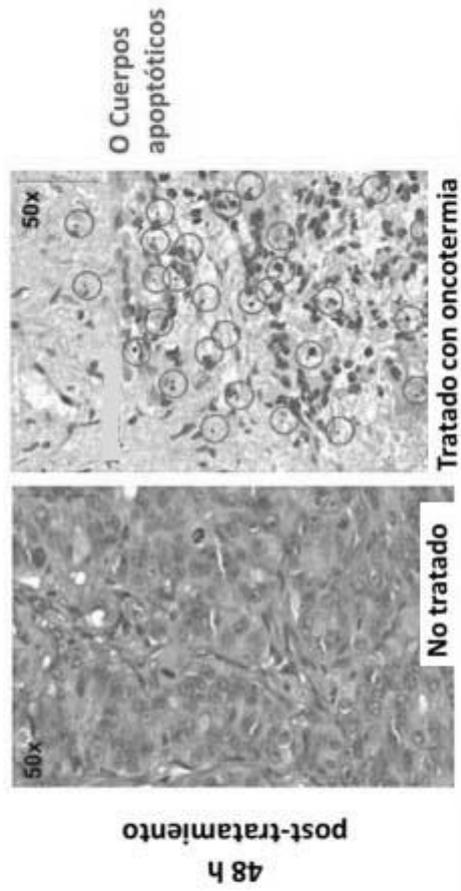


Figura 14

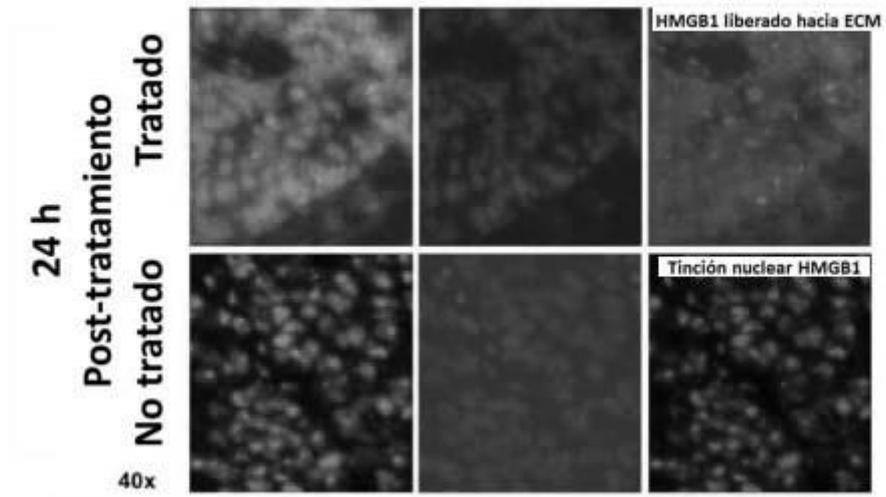


Figura 15

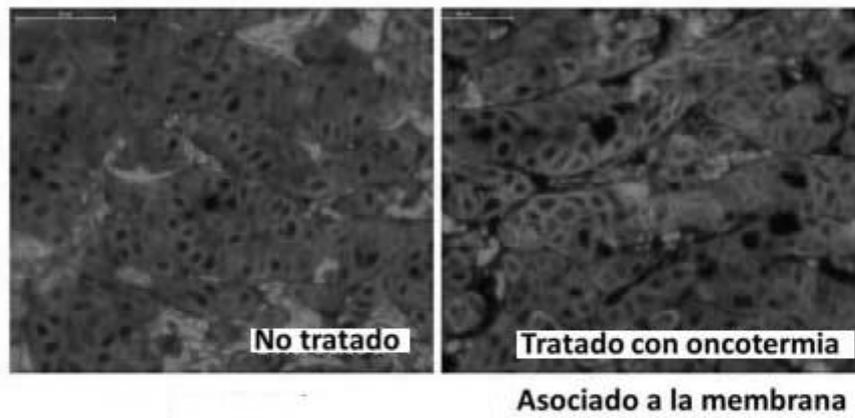


Figura 16

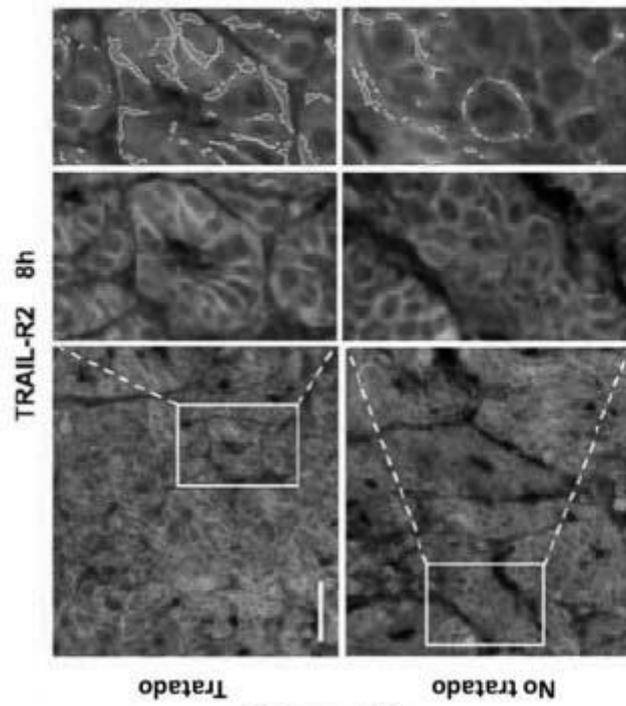


Figura 17B

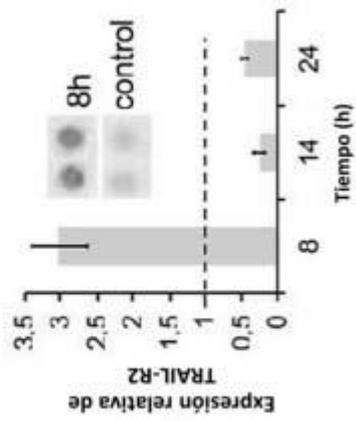


Figura 17A

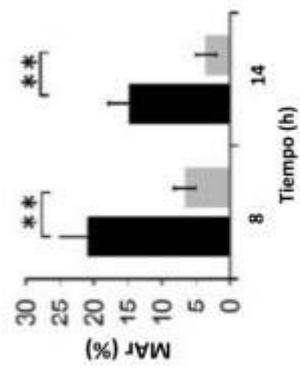


Figura 17C

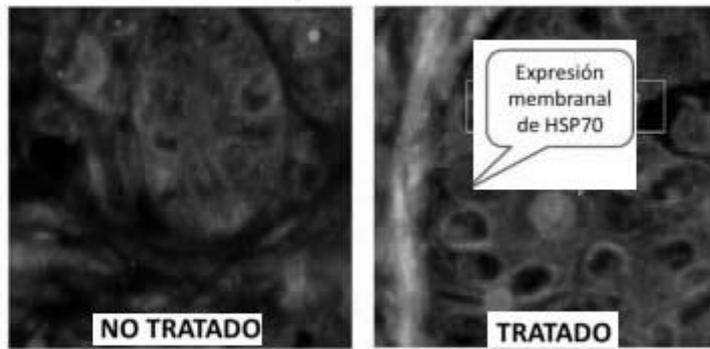


Figura 18A



Figura 18B

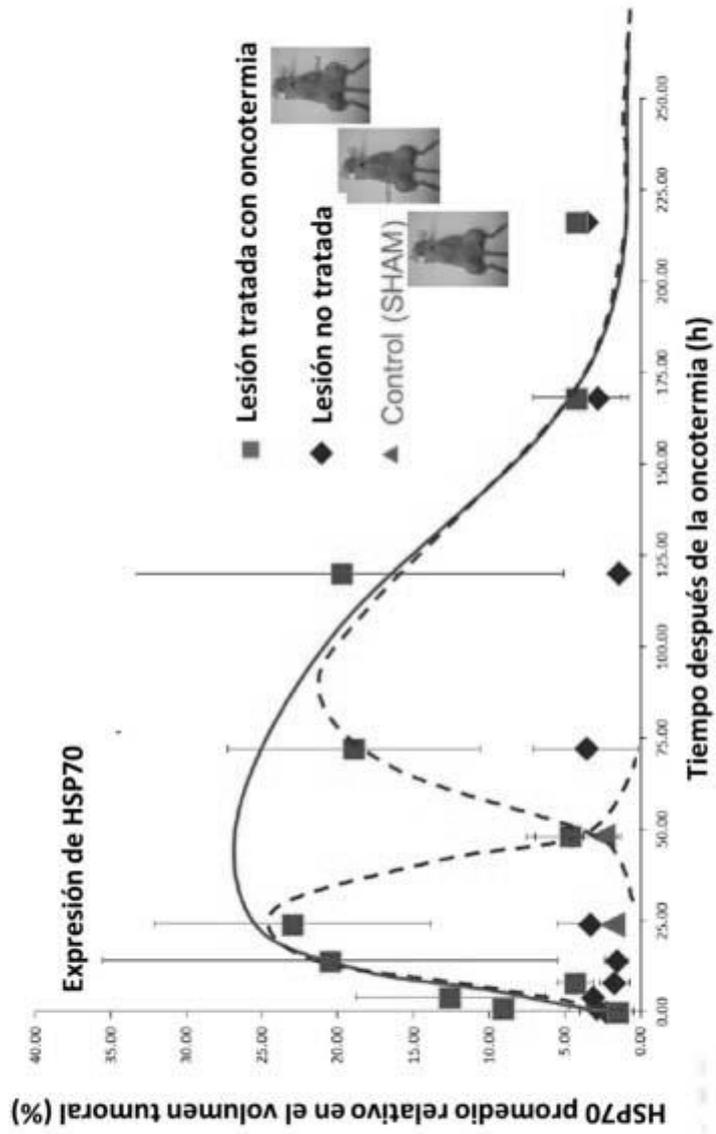


Figura 19

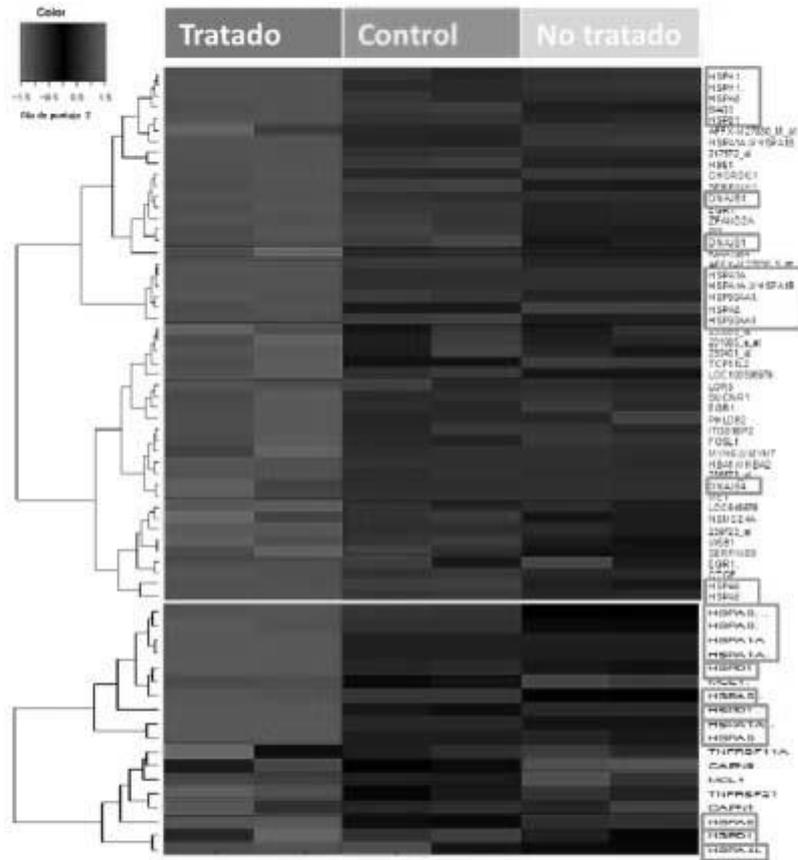


Figura 20

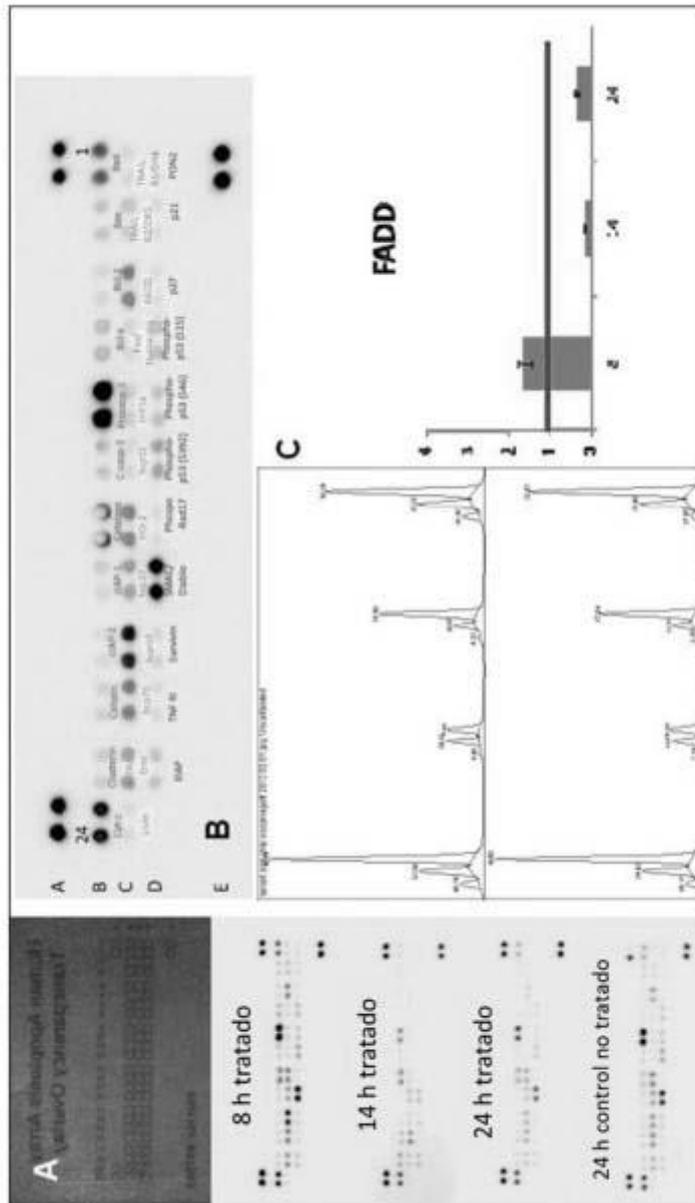


Figura 21

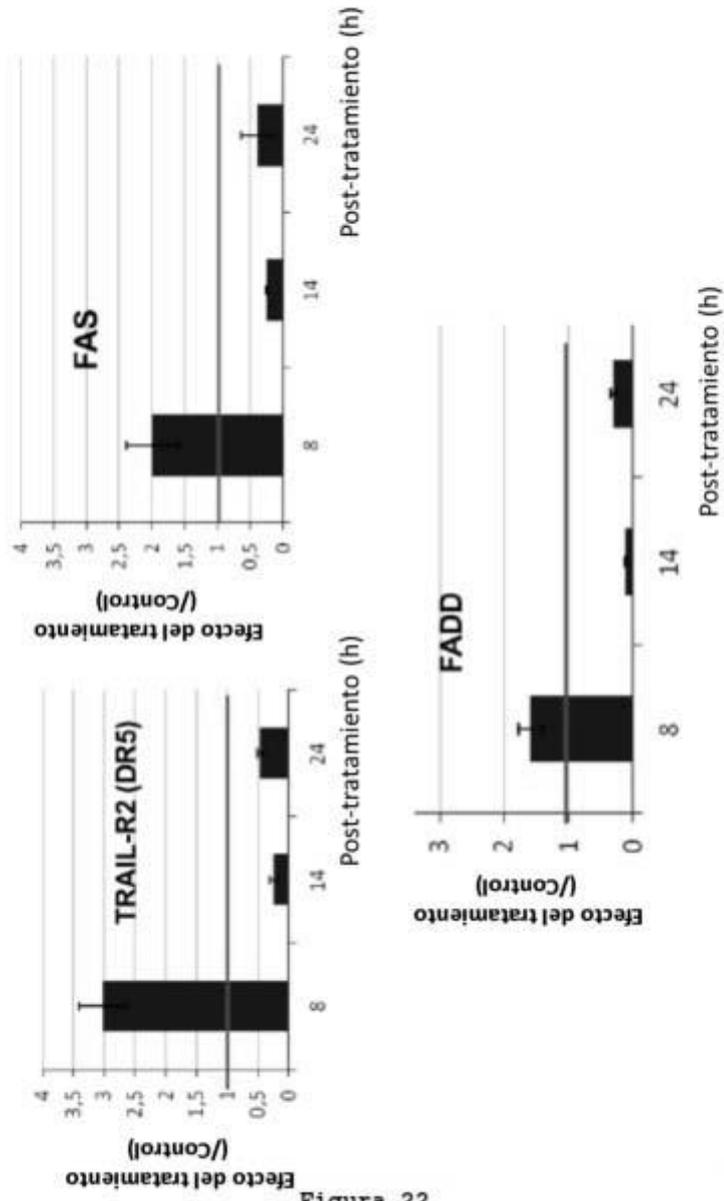


Figura 22

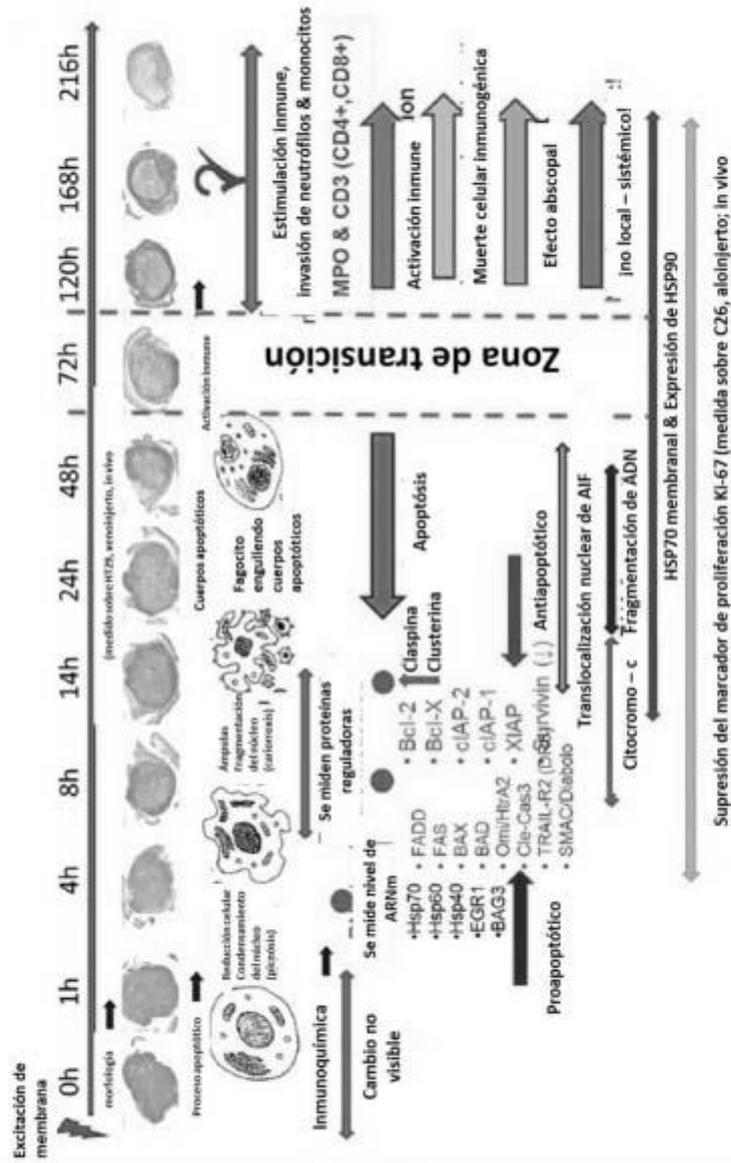


Figura 23

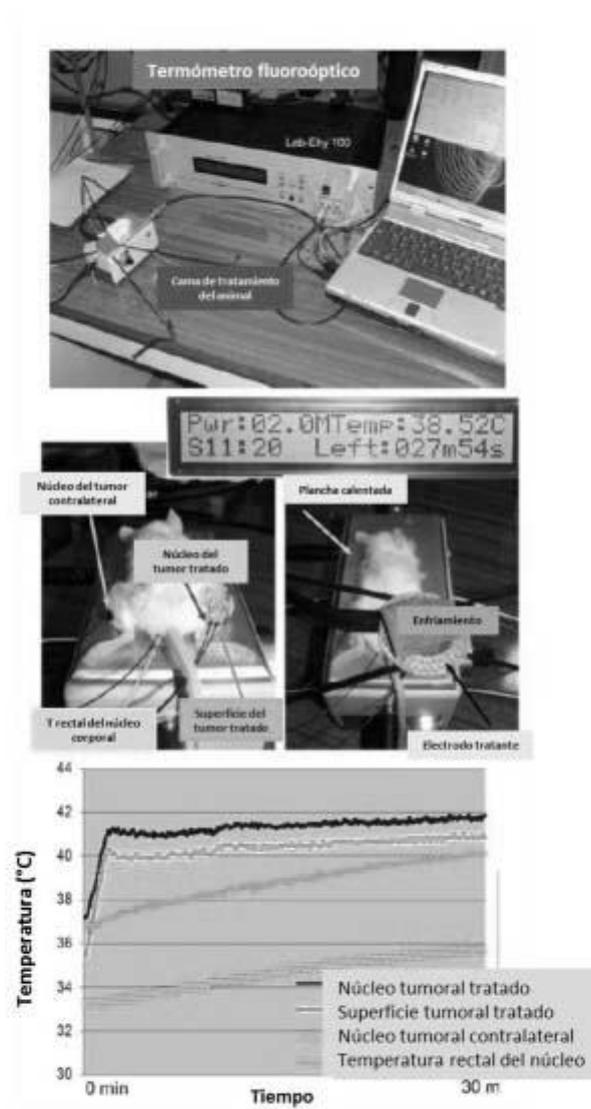


Figura 24

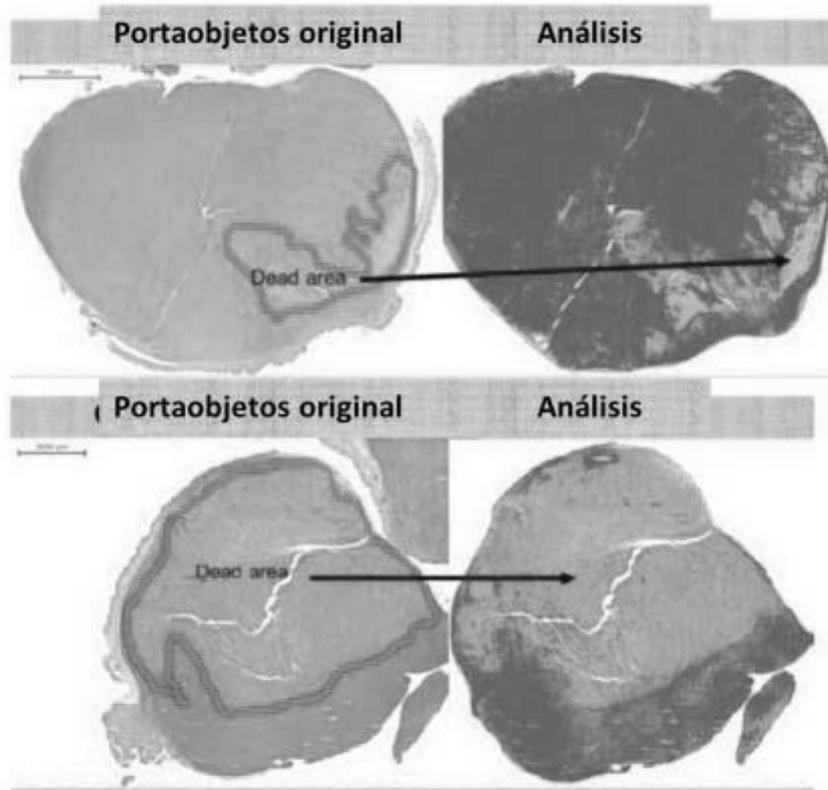


Figura 25

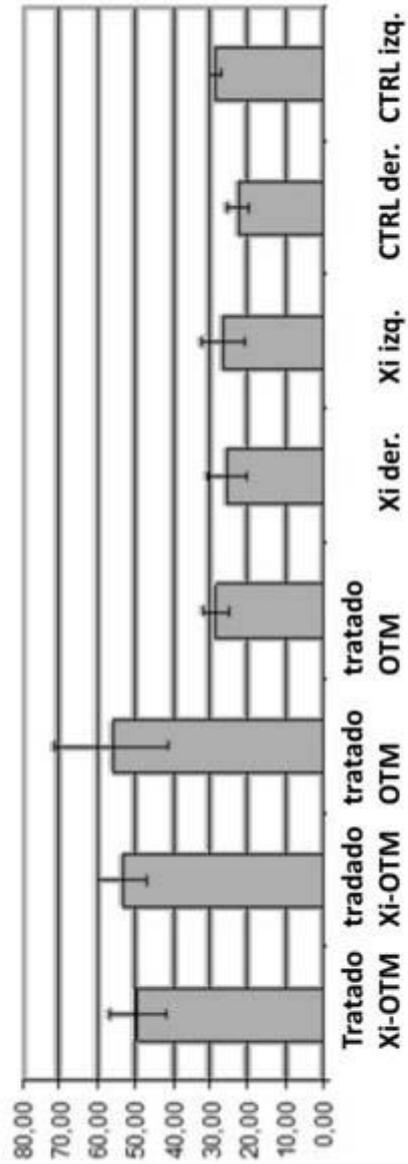


Figura 26A

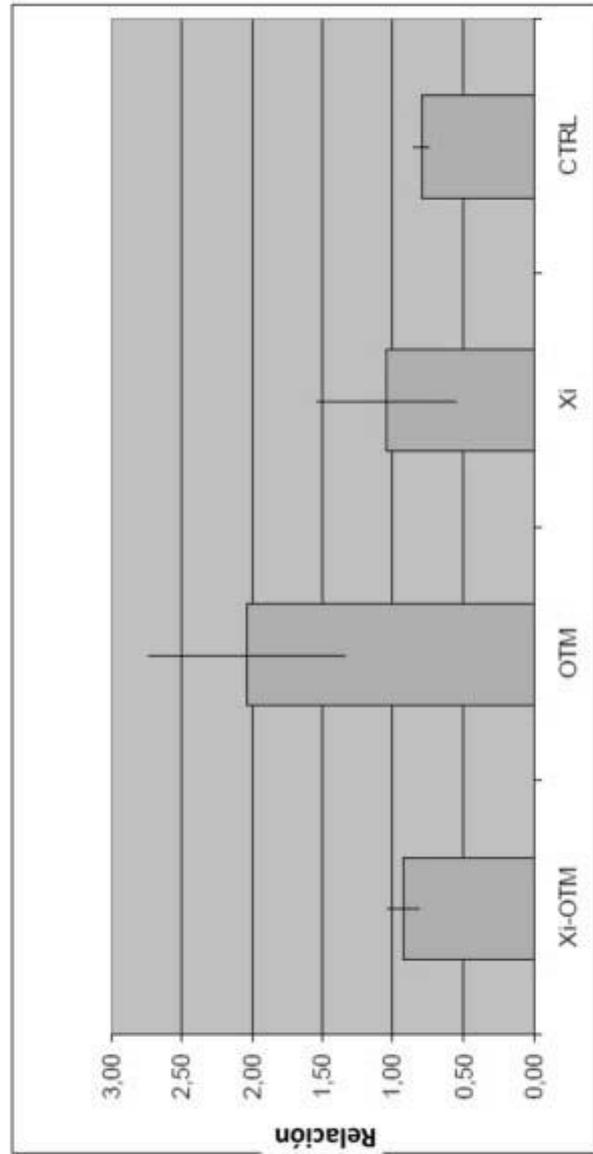


Figura 26B

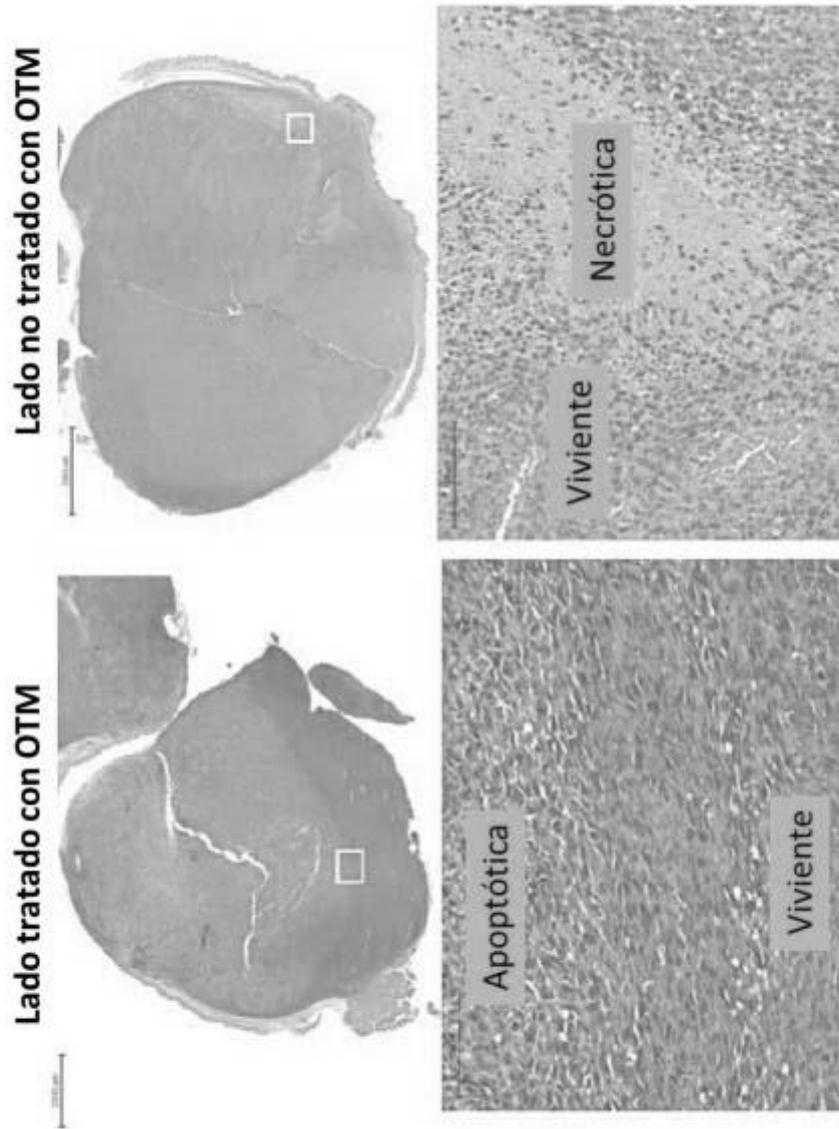


Figura 27

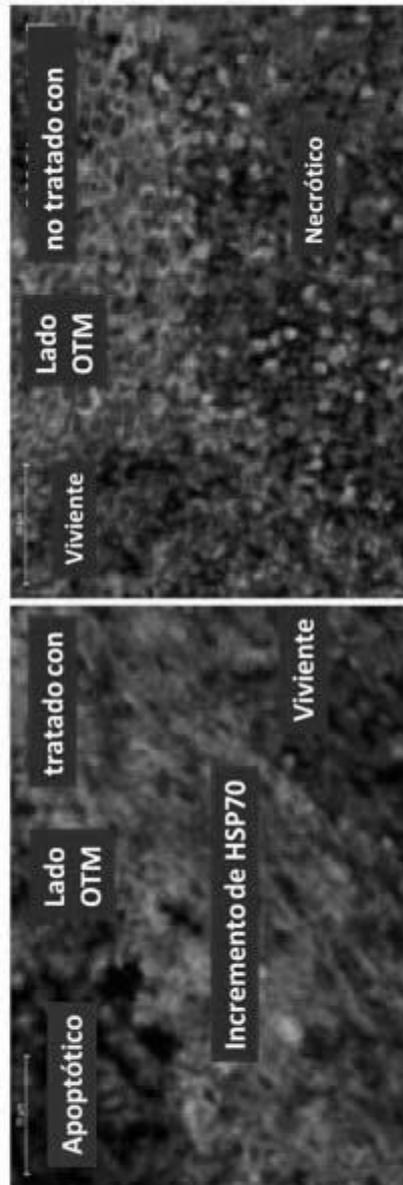


Figura 28

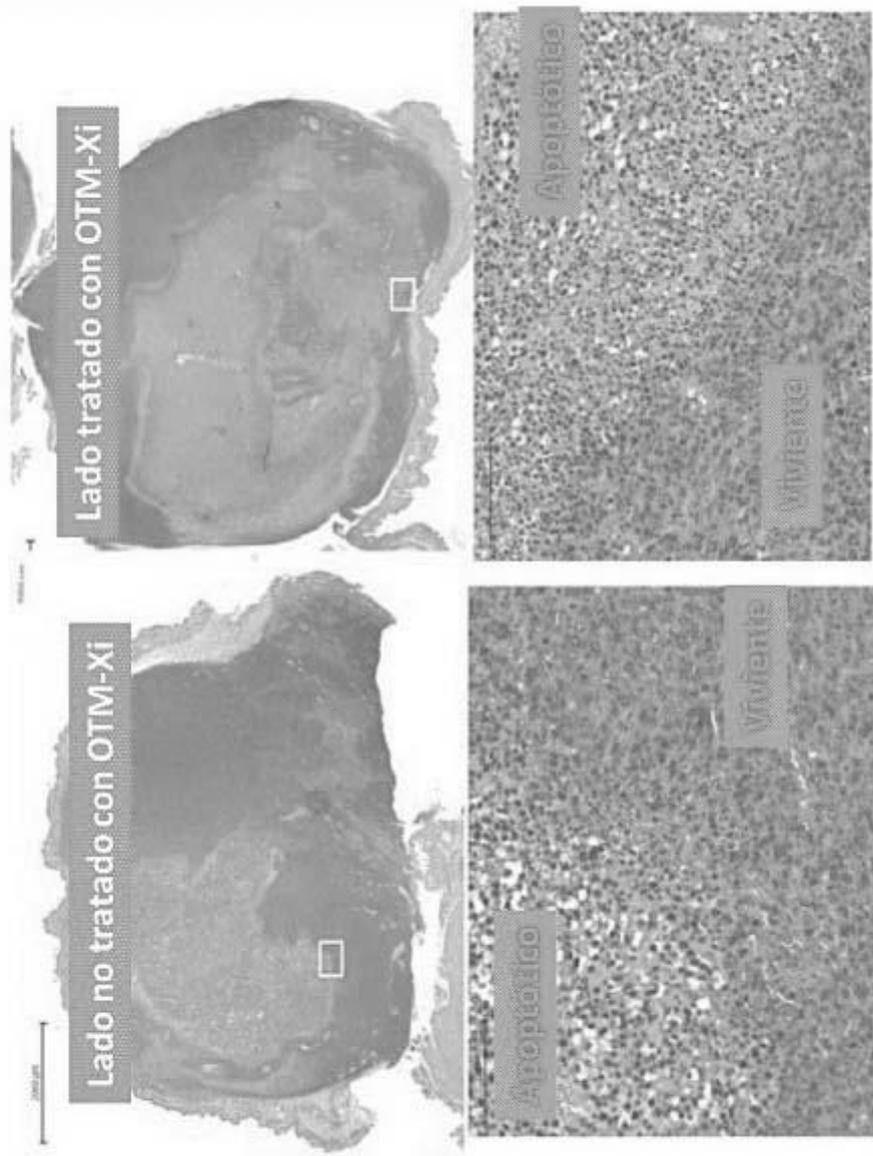


Figura 29

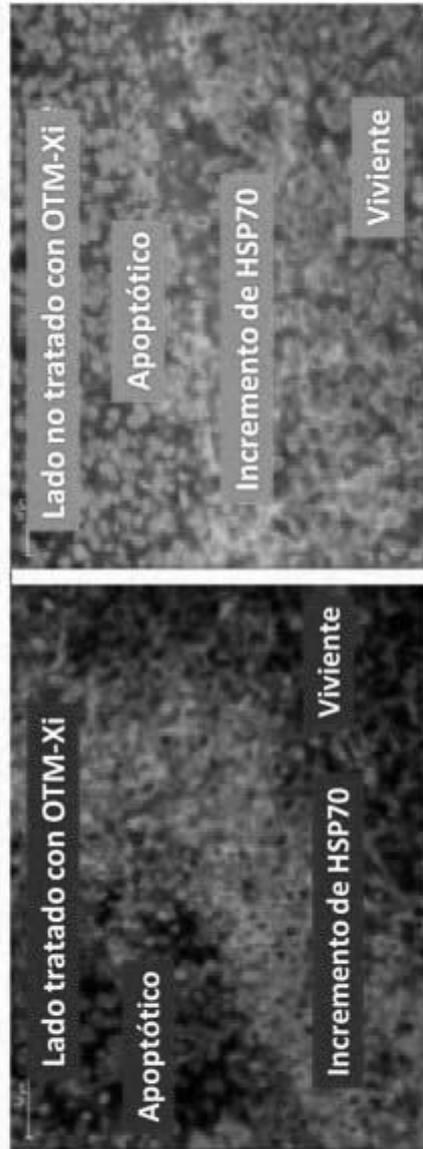


Figura 30

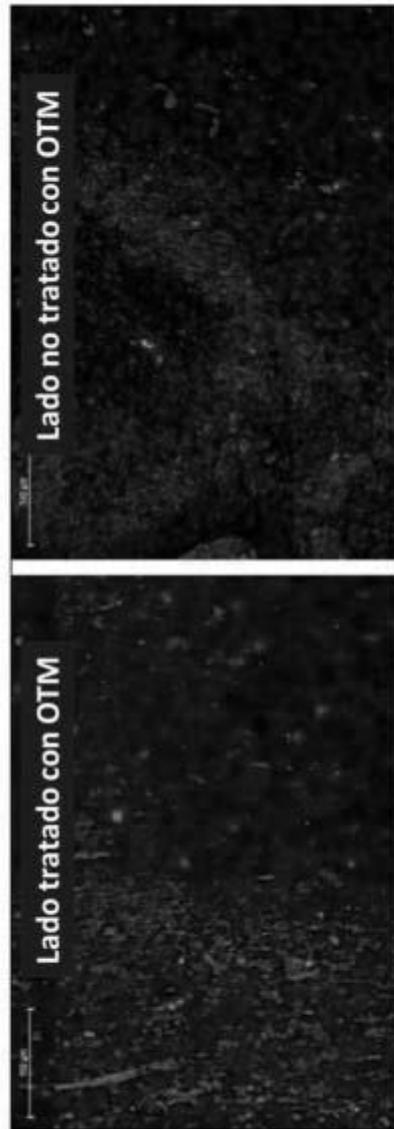


Figura 31

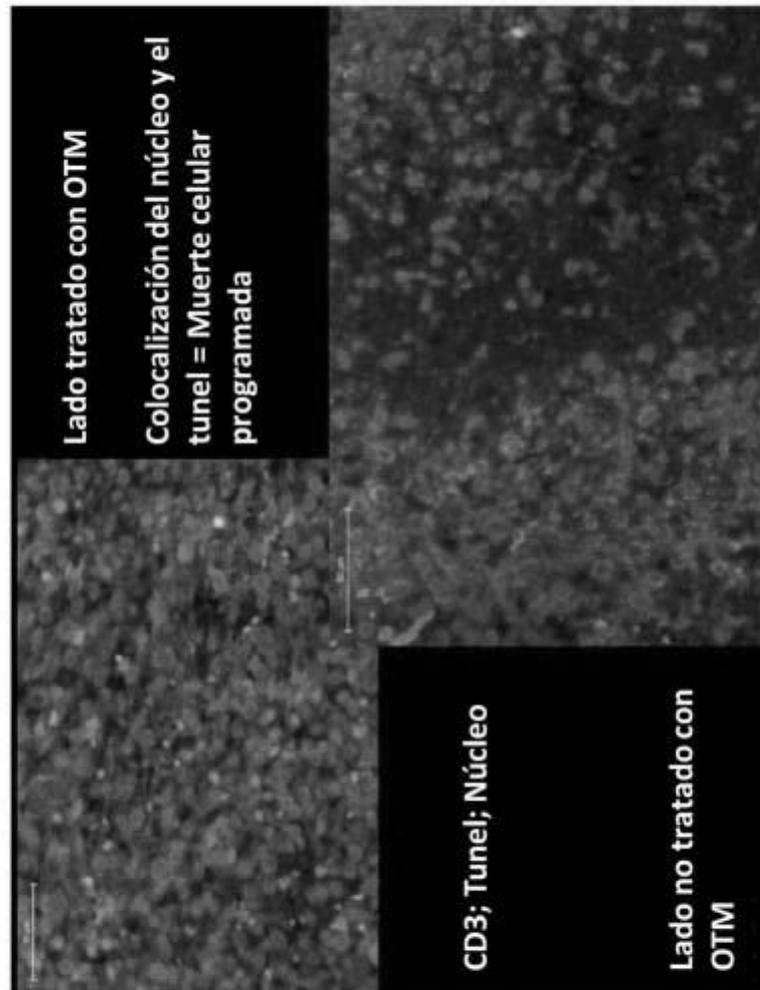


Figura 32

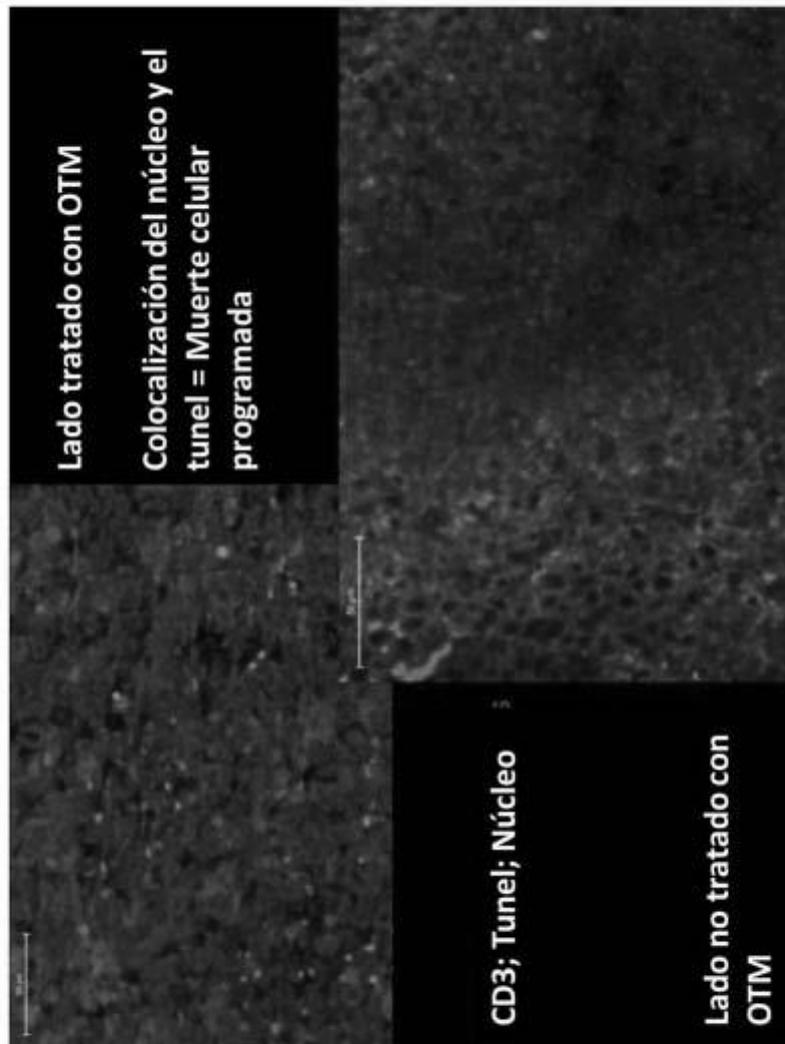


Figura 33

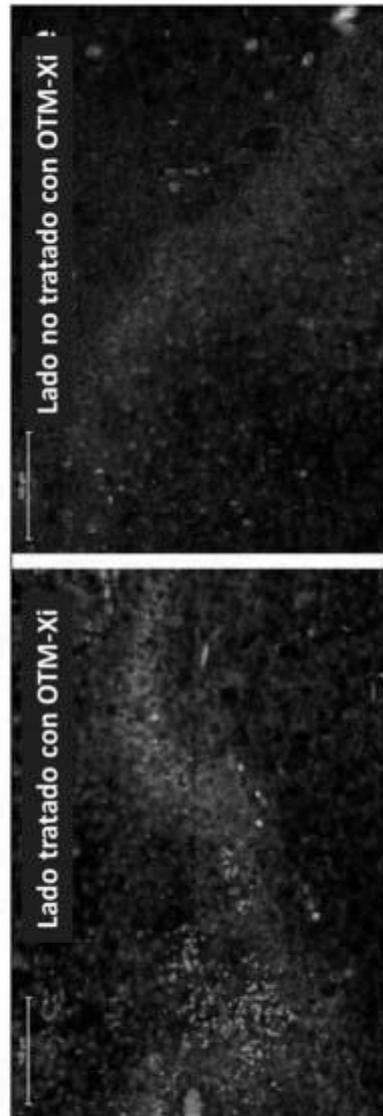


Figura 34

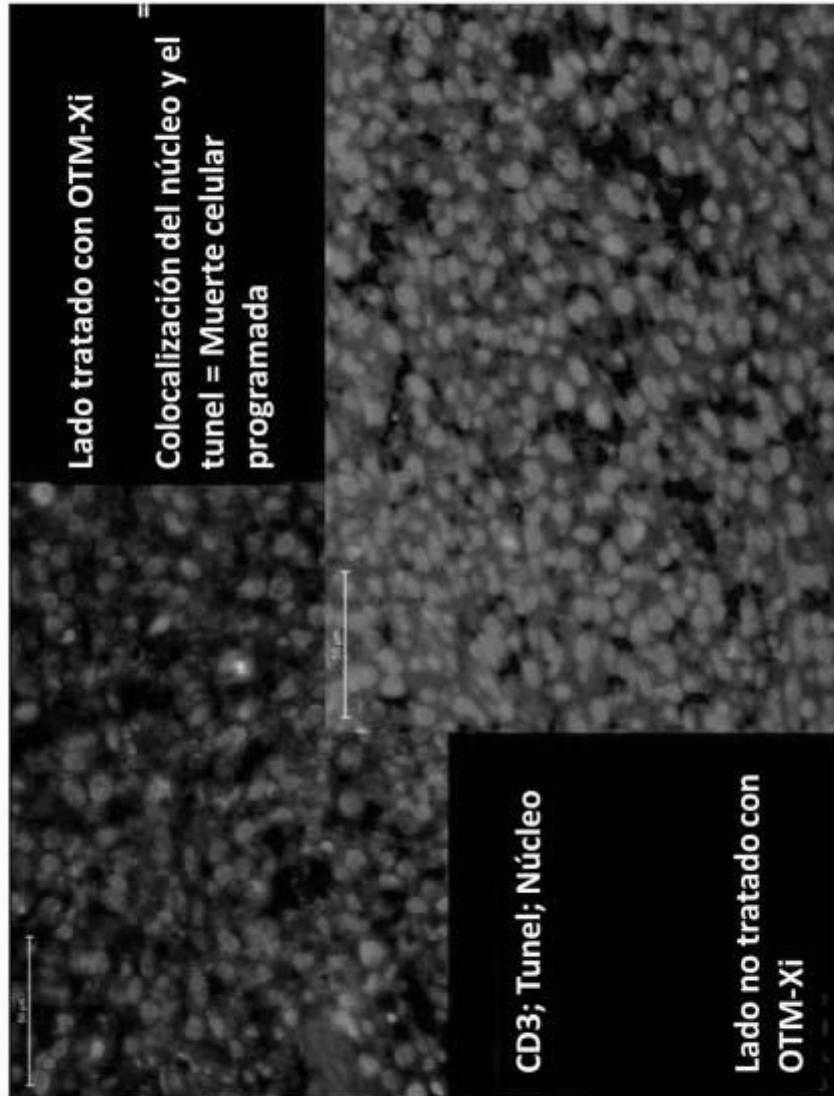


Figura 35

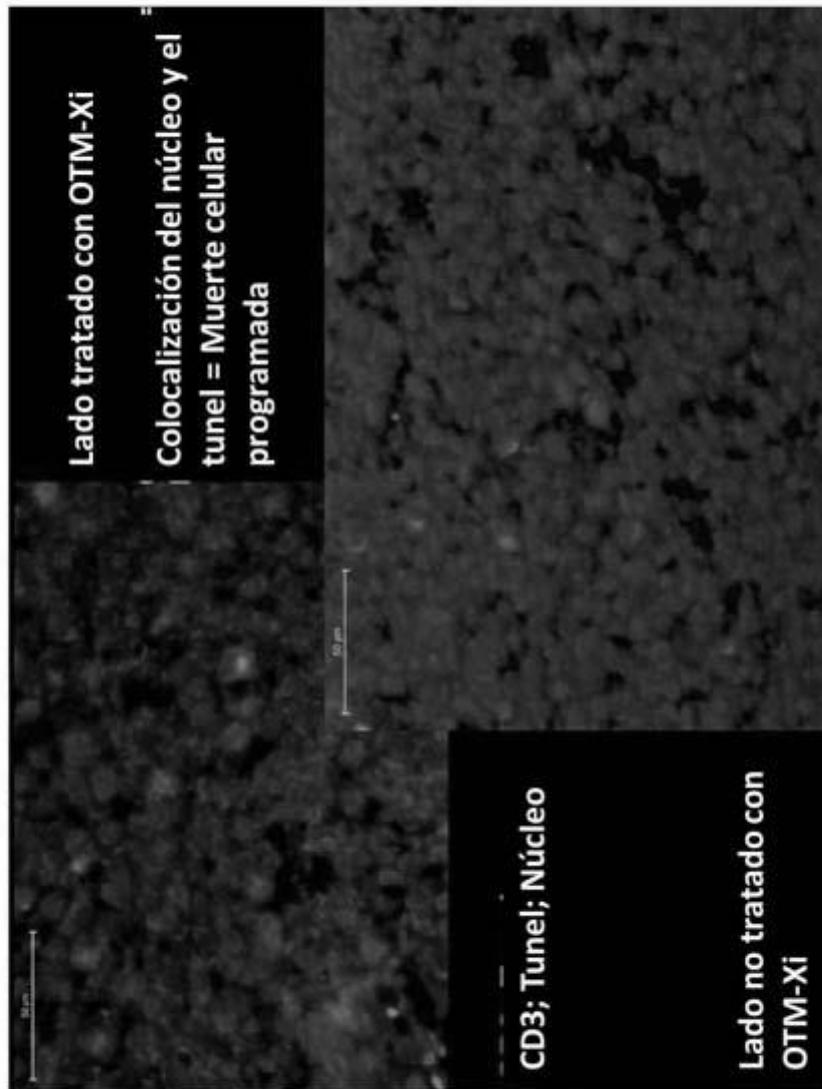


Figura 36

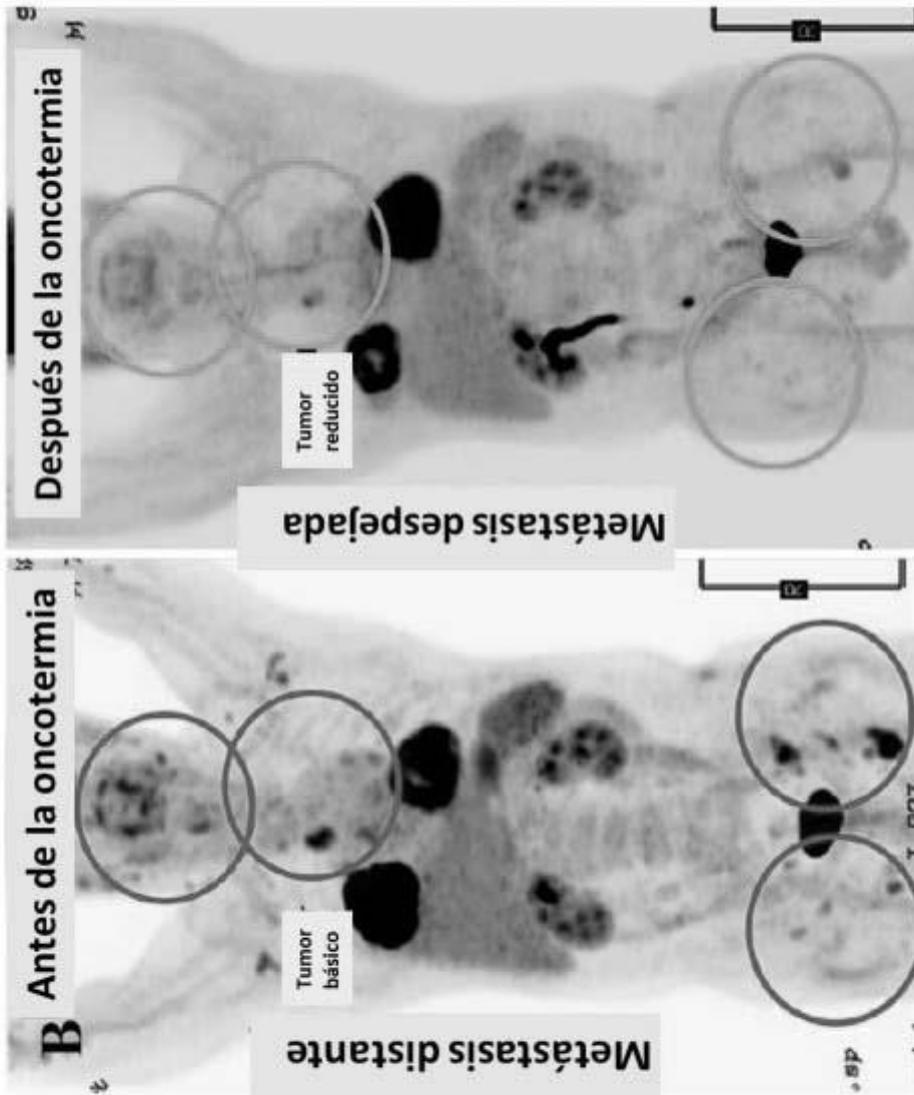


Figura 37

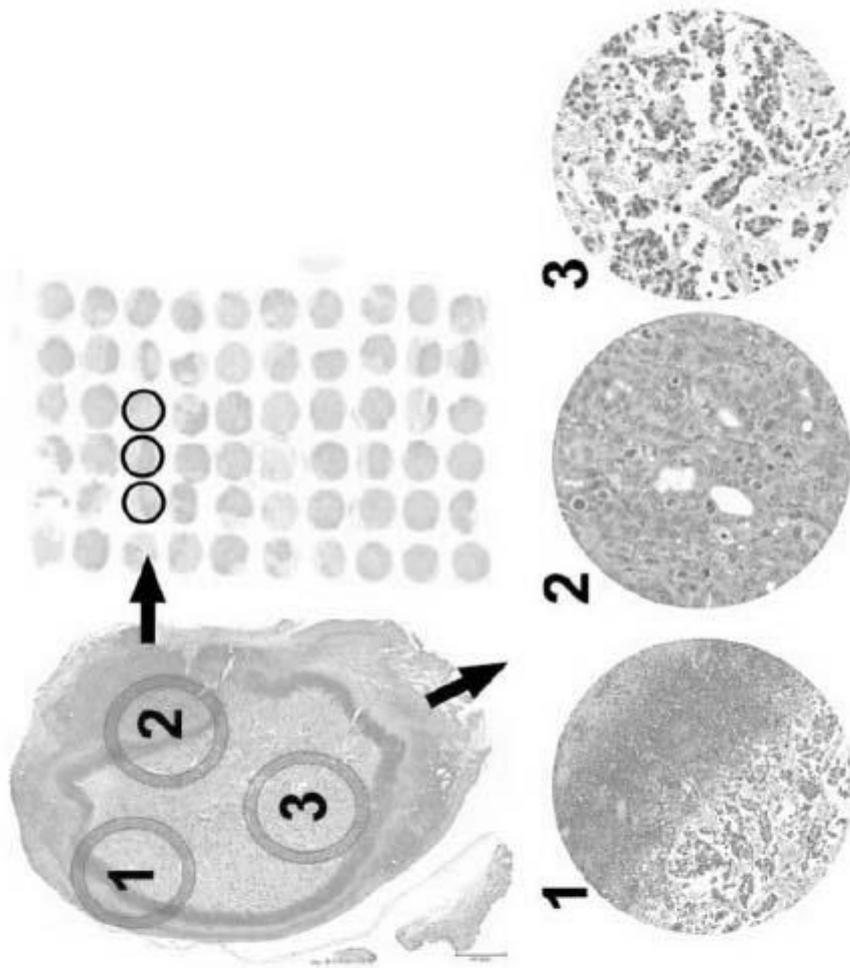


Figura 38

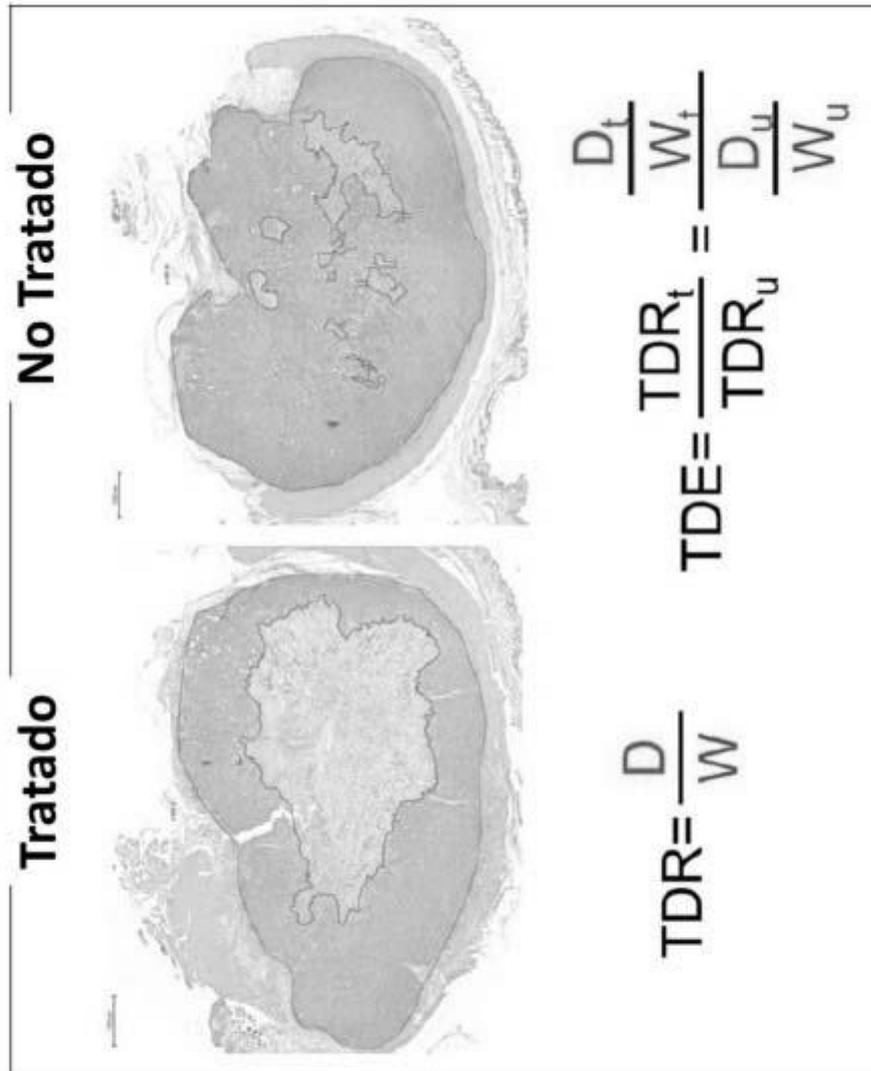


Figura 39

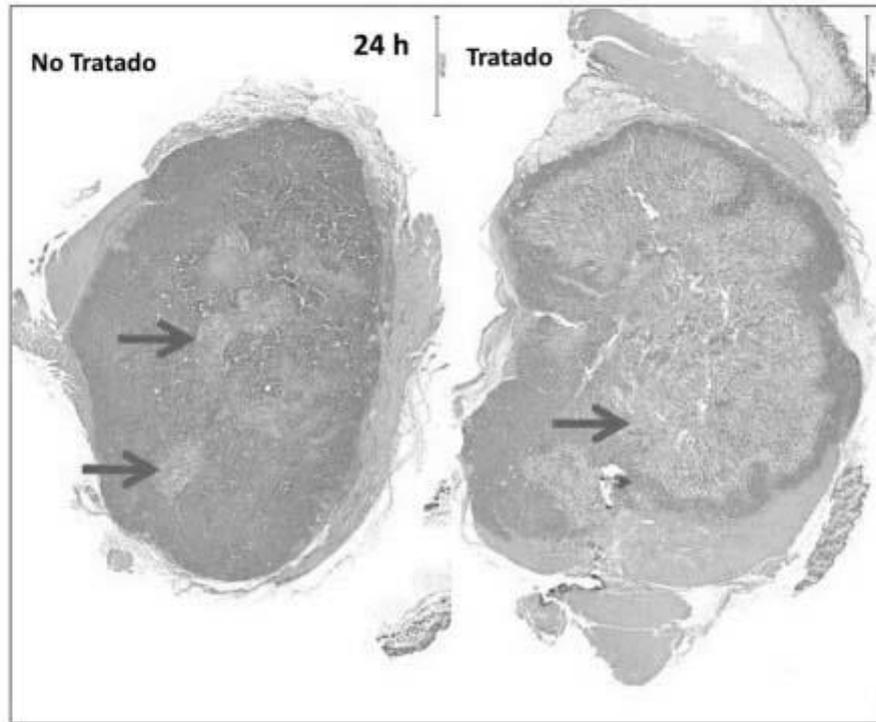


Figura 40A

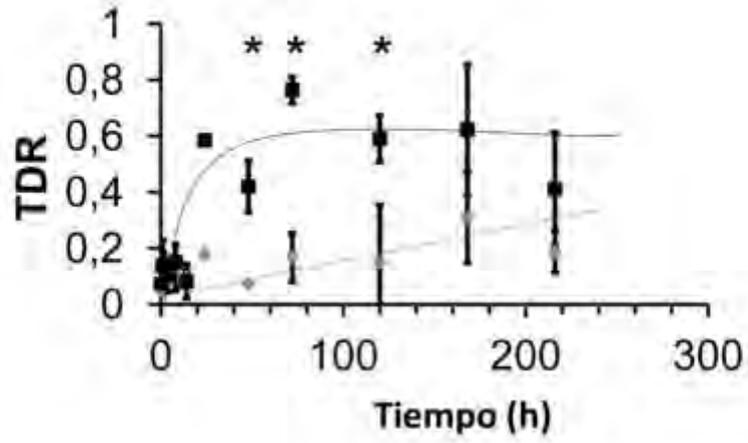


Figura 40B

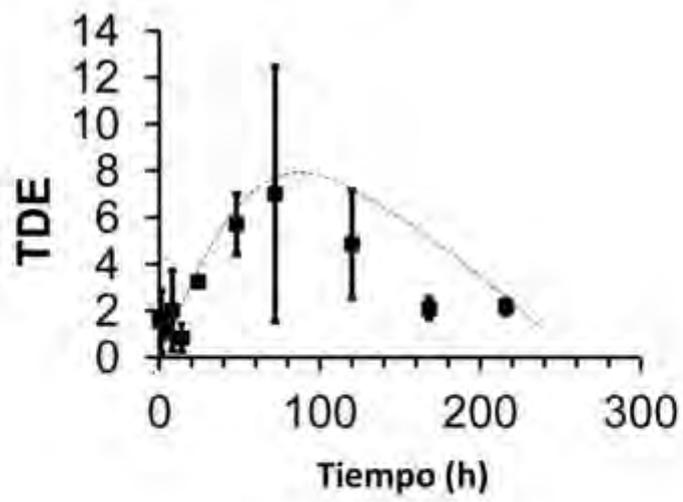


Figura 40C

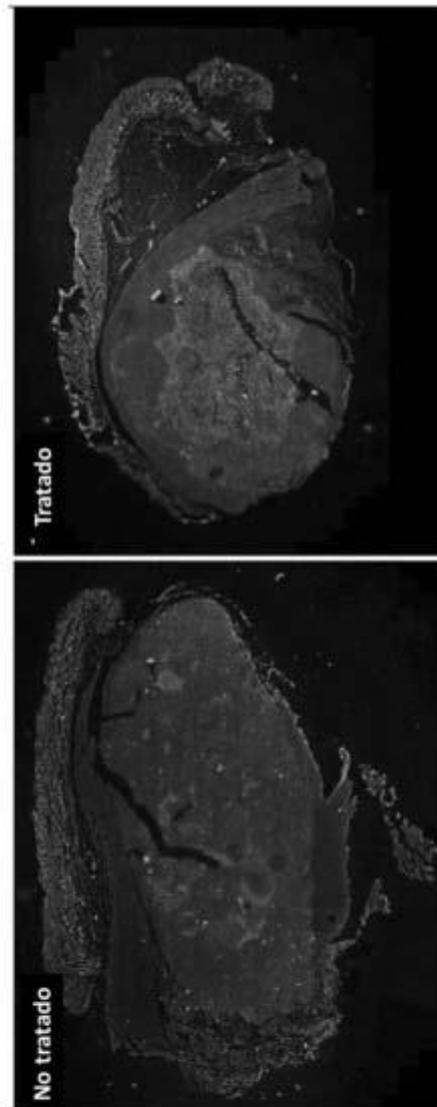


Figura 41

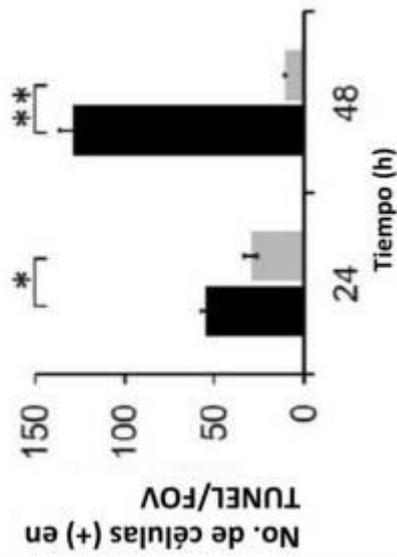


Figura 42B

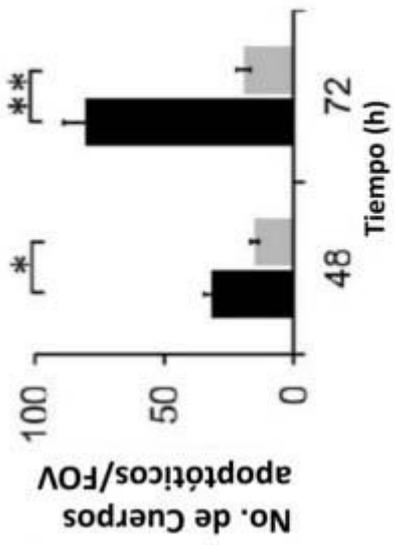


Figura 42C

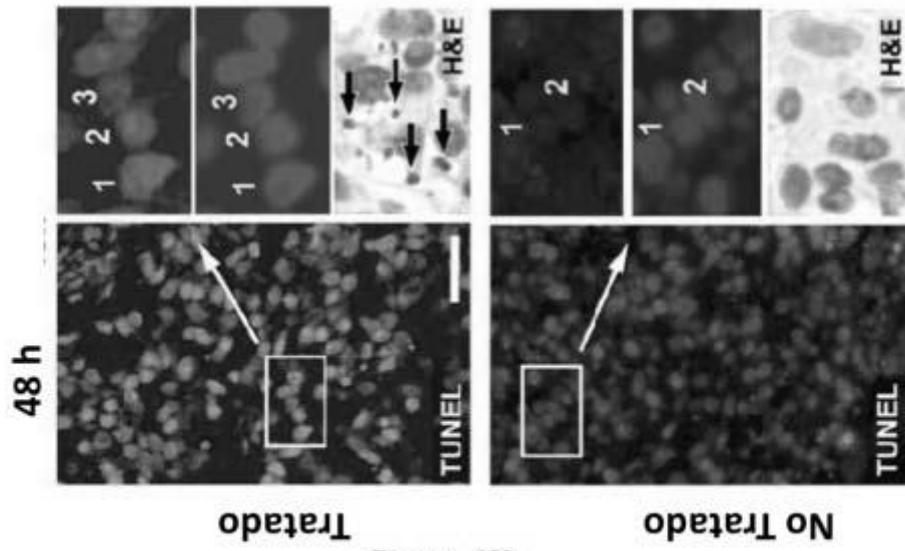


Figura 42A

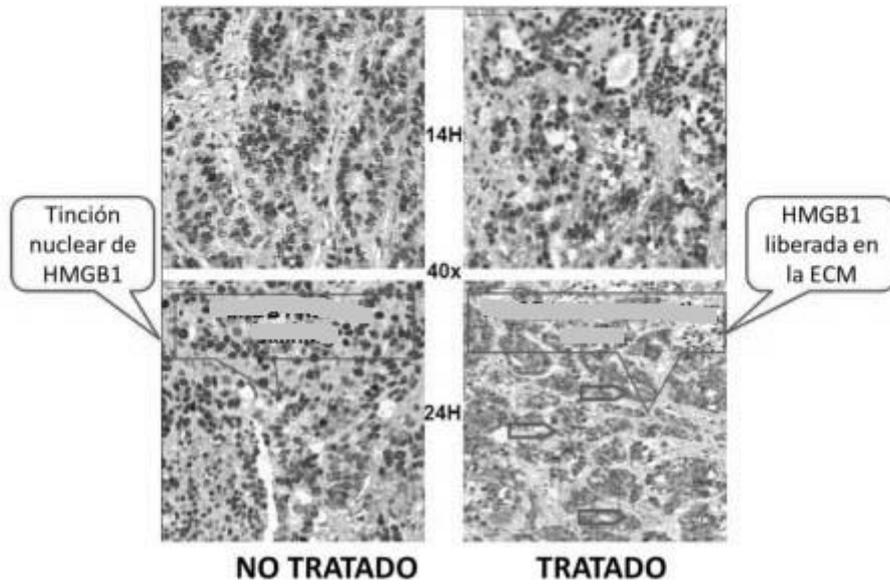


Figura 43

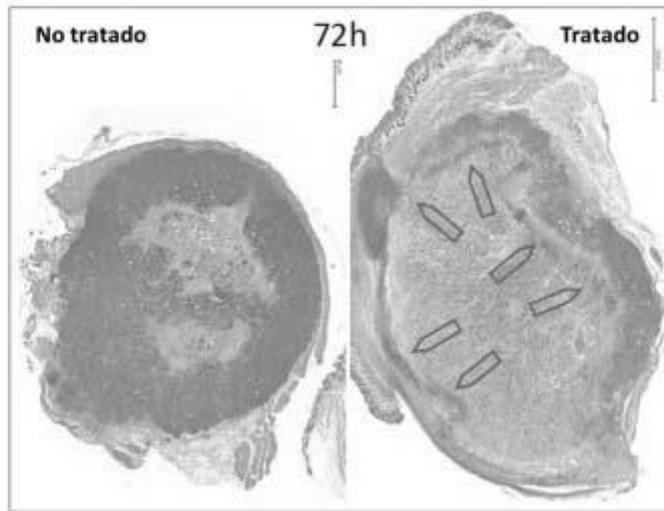


Figura 44A

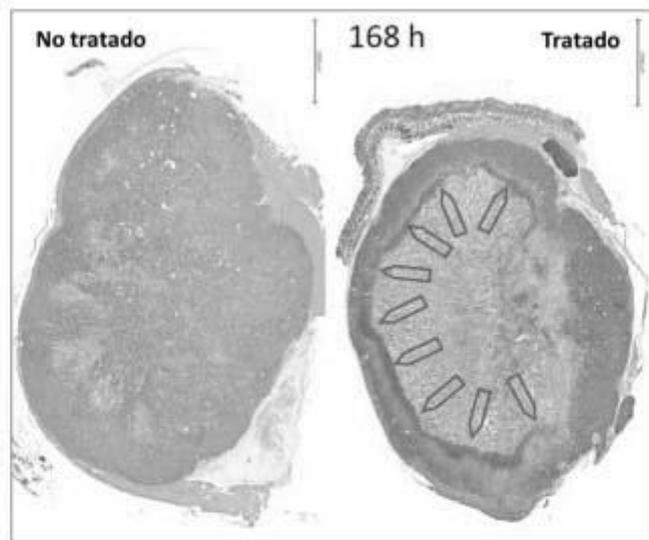


Figura 44B

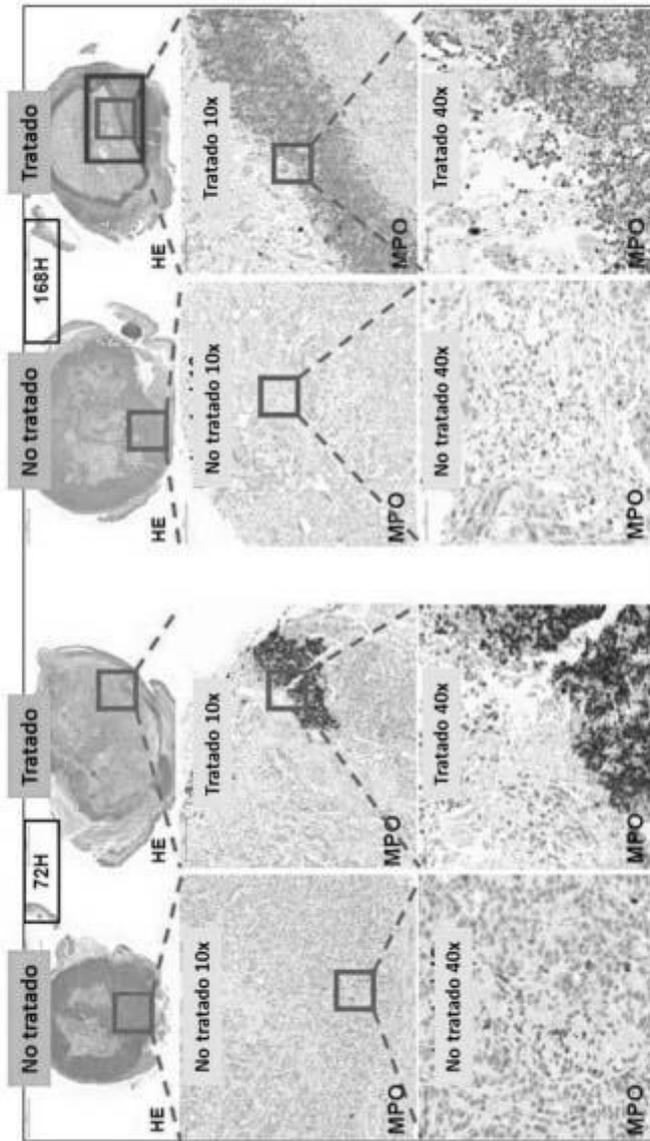


Figura 45A

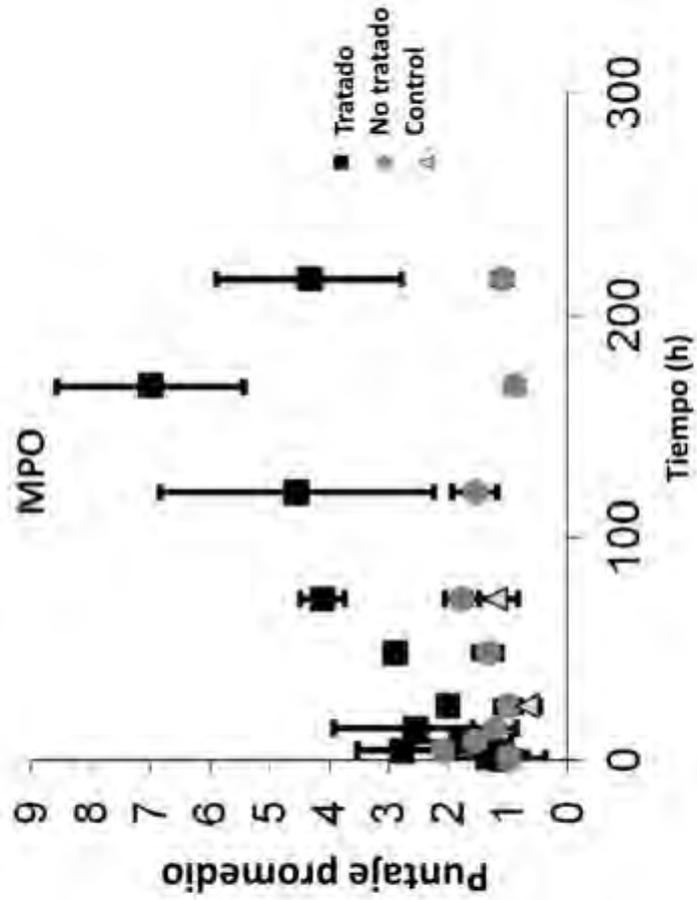


Figura 45B

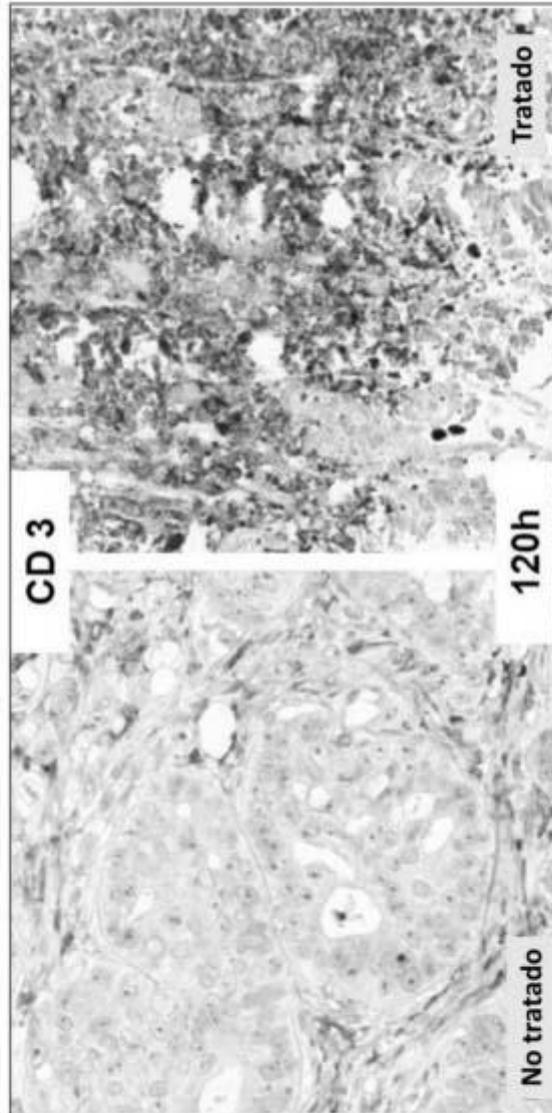


Figura 45C

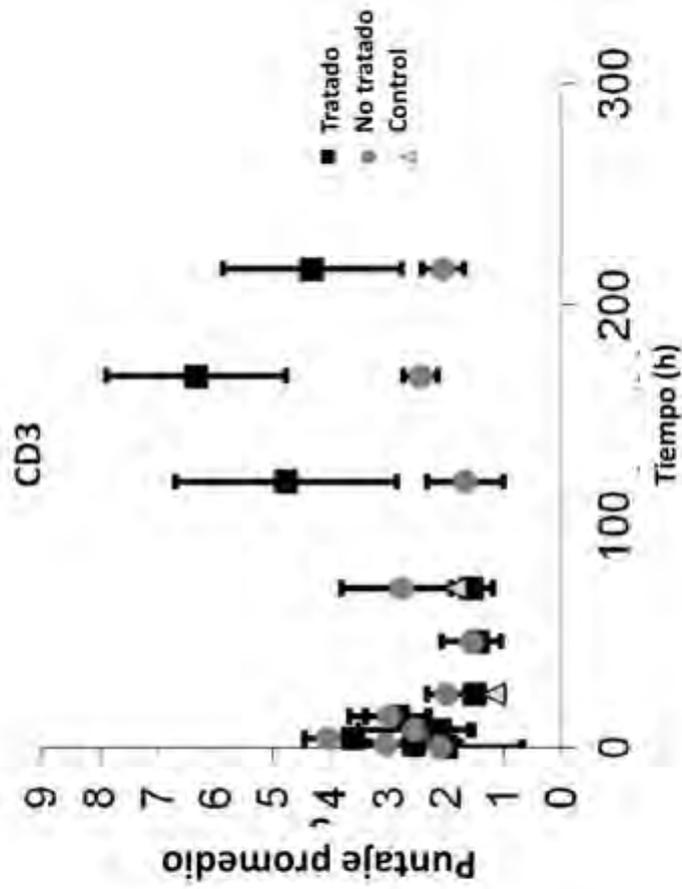


Figura 45D

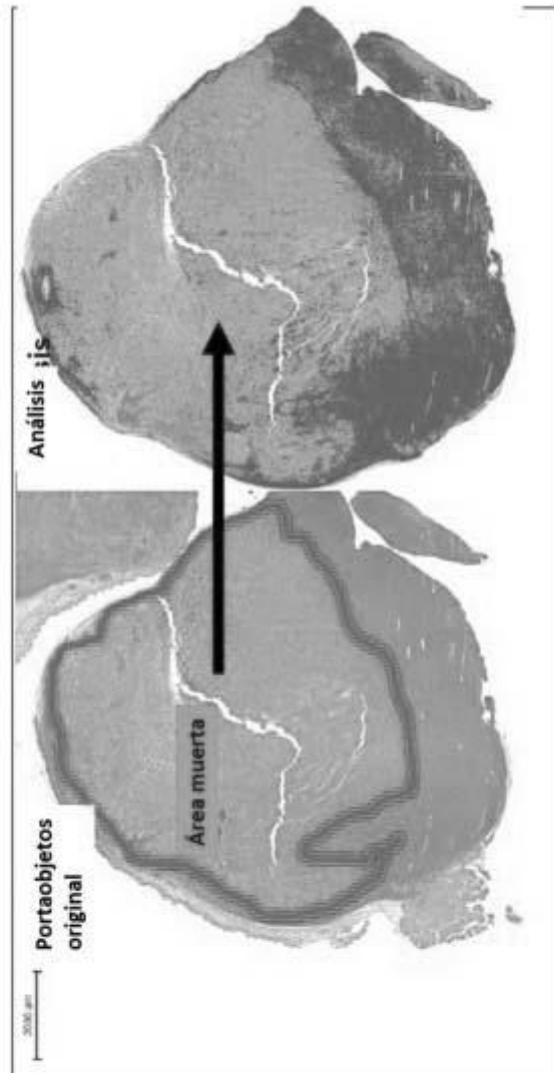


Figura 46

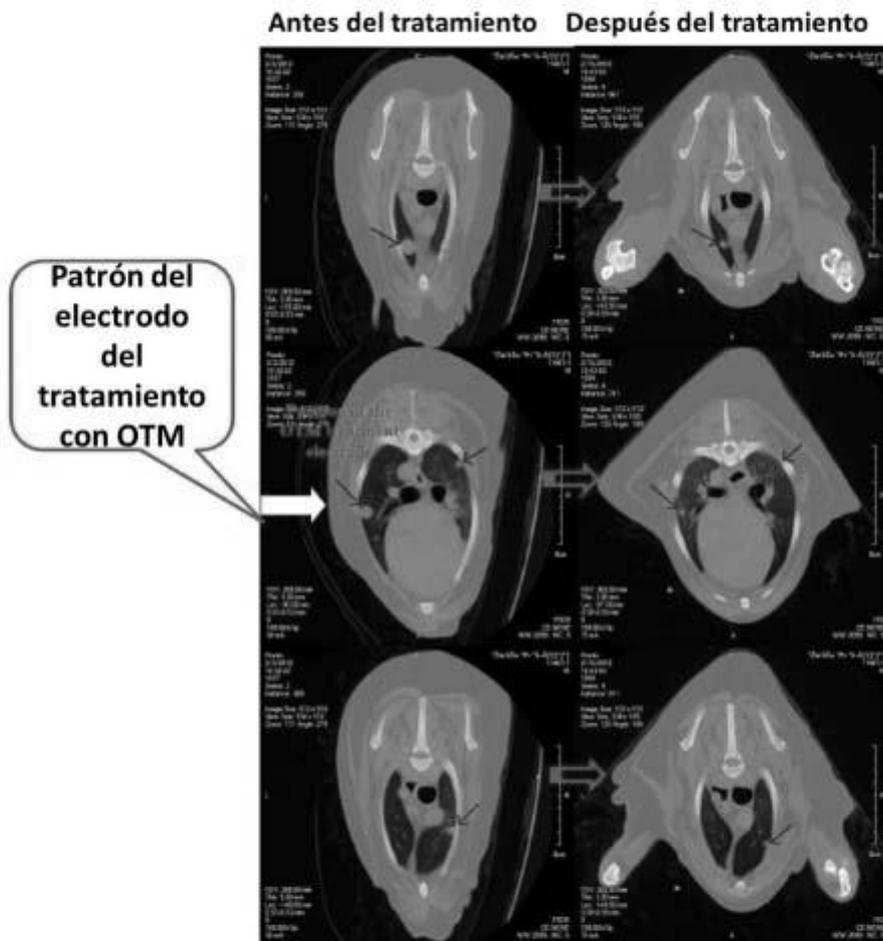


Figura 47

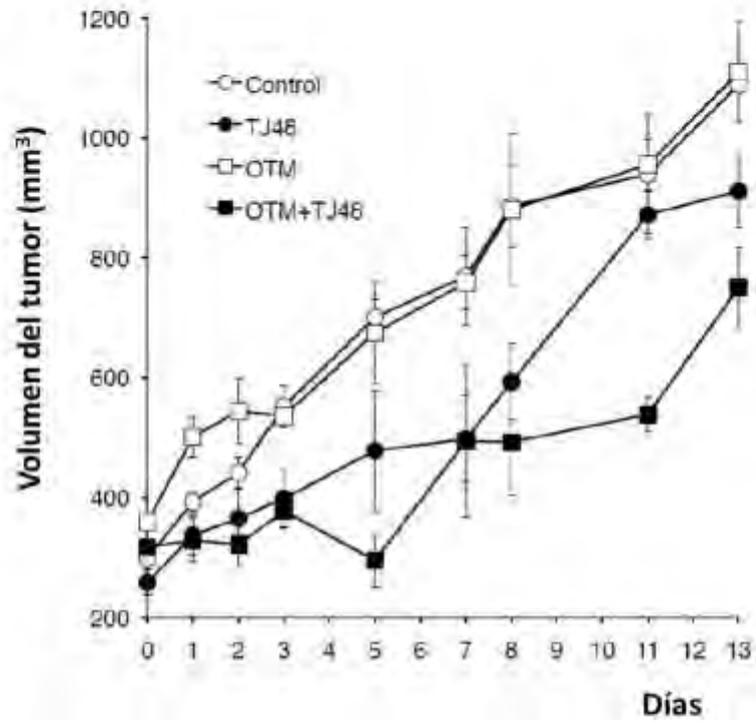


Figura 48