

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 606**

51 Int. Cl.:

A61N 7/00 (2006.01)

A61M 37/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2010.01)

B06B 1/02 (2006.01)

G16H 20/30 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2018 PCT/IB2018/060508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19123411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2018 E 18839880 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3727585**

54 Título: **Sistema para inducir la sonoporación de un fármaco en células cancerosas**

30 Prioridad:

22.12.2017 IT 201700148858

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

27.11.2024

73 Titular/es:

FREEDOM WAVES S.R.L. (50.0%)

Via Lorenzo Mascheroni 20

20145 Milano (MI), IT y

GIUSTETTO, PIERANGELA (50.0%)

72 Inventor/es:

FALETTO, DANIELE y

GIUSTETTO, PIERANGELA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 989 606 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema para inducir la sonoporación de un fármaco en células cancerosas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema para inducir la sonoporación de un fármaco en células cancerosas en un tumor para mejorar la captación del fármaco en el objetivo (es decir, el tumor).

10 **Antecedentes**

Después de las enfermedades circulatorias, el cáncer es hoy en día la segunda causa de muerte más común en el mundo. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer ha estimado que, debido al envejecimiento de la población, se espera que en 2030 los casos de cáncer aumenten en unos 21,7 millones, con una tasa de mortalidad de 13 millones de personas. Las terapias oncológicas conocidas se basan en quimioterapia y/o radioterapia y/o extirpación quirúrgica de la masa tumoral. La quimioterapia convencional, en particular, adolece de falta de selectividad hacia las células cancerosas y, por lo tanto, puede dar lugar a efectos secundarios tanto a nivel sistémico como local. Además, los tumores a menudo desarrollan resistencia a los fármacos quimioterapéuticos administrados. Por estas razones, en las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas para mejorar la selectividad en la administración de fármacos mediante el uso de una estructura lipídica especializada, denominada liposoma. Los liposomas son nanotransportadores que comprenden genéricamente una gota de lípido encerrada que tiene un núcleo, típicamente un núcleo acuoso, que contiene el fármaco (p. ej., un agente quimioterapéutico, un fármaco antiinflamatorio, un agente citotóxico, etc.). Los liposomas para encapsular fármacos quimioterápicos, en particular, suelen estar diseñados con una estructura que permite un tiempo prolongado de circulación en sangre del propio liposoma y, por lo tanto, del fármaco contenido en el liposoma. La longevidad prolongada en la sangre permite una interacción más prolongada de los liposomas con el objetivo (es decir, el tumor) porque el mayor número de conductos de sangre a través del tumor mejora el efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, se mejora la captación global del fármaco en el tumor y se obtienen mejoras notables del índice terapéutico del fármaco transportado [Deshpande P.P., Biswas S., y V. P. Torchilin V.P., “Current trends in the use of liposomes for tumor targeting” *Nanomedicine*, septiembre de 2013; 8(9)], [Torchilin V.P. “Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging”. *AAPS J.* 2007; 9(2): 128-147]. Sin embargo, incluso si se utiliza la formulación liposomal de fármacos quimioterapéuticos, el nivel de selectividad y la eficacia terapéutica obtenida mediante la liberación espontánea tras la degradación natural del liposoma aún no son completamente satisfactorios. Por estas razones, aunque las nanomedicinas actualmente aprobadas para uso clínico liberan el fármaco espontáneamente, se han probado experimentalmente varias técnicas para desencadenar dicha liberación mediante estímulos aplicados externamente. Está bien establecido que la mejora en el control de la liberación del fármaco se puede lograr utilizando ultrasonidos focalizados de alta intensidad que además de estimular la liberación del fármaco mediante un aumento local de la temperatura, provoca por sí mismo efectos citotóxicos e induce necrosis coagulativa del tumor y del tejido circundante (patente EP 1.774.989 B1). Las ondas de choque también se utilizaron para realizar tratamientos médicos destinados a introducir sustancias en el cuerpo humano, tejidos o células y, por tanto, para el suministro de vacunas, agentes anestésicos, antibióticos, etc. (patente US-2009/281464 A1).

Para evitar posibles efectos secundarios tóxicos asociados con el calentamiento local y con la propagación de material canceroso después de la necrosis de las células tumorales, más recientemente, se han empleado ultrasonidos no focalizados de baja intensidad pulsados (pLINFU). Los pLINFU son capaces de realizar la “insonación” de los liposomas y la “sonoporación” de las membranas celulares. El término “insonación” se refiere, en particular, a la inducción de la liberación del fármaco desde el interior hacia el exterior de los liposomas. El término “sonoporación” se refiere, en cambio, a la creación de perforaciones transitorias no letales en las membranas celulares para facilitar la entrada de liposomas en las células. Se ha demostrado que, a diferencia del ultrasonido focalizado de alta intensidad, la energía más baja ($< 3 \text{ W/cm}^2$) asociado con pLINFU produce efectos térmicos mínimos [Rizzitelli S., Giustetto P., Faleto D., Delli Castelli D., Aime S., Terreno E. “The release of Doxorubicin from liposomes monitored by MRI and triggered by a combination of US stimuli led to a complete tumor regression in a breast cancer mouse model.”, *J Control Release*, 2016; 230: 57-63.].

55 Los pLINFU, si se comparan con los ultrasonidos focalizados de baja intensidad pulsados, o PLIFU, como los empleados en el método y sistema descritos en la patente WO2016/196741, se caracterizan por diferentes campos de distribución ultrasónica a la misma frecuencia, diámetro piezoeléctrico y número de ciclos de excitación.

60 Los pLINFU tienen una distribución geométrica más regular que los pLIFU debido a la geometría plana del transductor piezoeléctrico que genera los pLINFU.

Esta geometría plana permite, además, sonoporar un volumen mayor que el sonoporable mediante pLIFU que, en cambio, se generan mediante la convergencia de los haces ultrasónicos de dos o más transductores piezoeléctricos.

65 Además, en el punto de convergencia de al menos dos haces ultrasónicos pueden producirse fenómenos de interferencia sin posibilidad de estimar la consiguiente distorsión causada por estos. Los sistemas pLIFU de la técnica

anterior adoptan métodos para reducir este fenómeno, pero la falta de homogeneidad del medio o de los tejidos biológicos atravesados por los ultrasonidos puede provocar otras interferencias impredecibles.

5 Por estas razones, solo con pLINFU es posible garantizar que las ondas ultrasónicas utilizadas para la sonoporación lleguen a las células objetivo con la frecuencia y el ciclo de trabajo establecidos. La sonoporación, de hecho, genera fenómenos biofísicos a escala nanométrica solo con valores de frecuencia y ciclo de trabajo específicos que dependen del tipo de células que se van a sonoporar y del tipo de fármacos que se van a introducir en las membranas de dichas células.

10 El ultrasonido pulsado, de hecho, consiste en una alternancia de períodos de emisión (períodos ON) y períodos de silencio (períodos OFF). El período OFF interrumpe el período de emisión y se alterna con los períodos ON.

15 Más particularmente, el período ON debe depender de las características del vector que contiene el fármaco y de las características de las membranas celulares; la vibración derivada del efecto de resonancia del vector interactúa con la membrana celular favoreciendo la apertura de los poros y protegiendo a la célula de los efectos directos de los ultrasonidos. La duración del período OFF se determina como función de la característica de apertura y cierre de los poros celulares. El período OFF tiene la función de no estimular más la membrana celular una vez abiertos los poros, facilitando la entrada del vector al compartimento celular mientras los mismos poros se van cerrando.

20 Si se adopta un período ON durante un período prolongado de tiempo sin un período OFF, el resultado sería un estrés continuo y prolongado de la membrana celular, que además de interferir en la correcta acumulación intracelular del fármaco podría provocar niveles excesivos de estrés en las células y fenómenos de entrada y salida, lo que provoca al mismo tiempo la entrada y salida del fármaco.

25 Además, una estimulación prolongada puede provocar la muerte celular, lo que tendría como resultado la fuga del contenido citoplasmático (incluido el fármaco) con el riesgo de que este pueda transportarse a otros sitios no deseados a través del flujo sanguíneo.

30 Por las razones detalladas anteriormente, solo los haces de ultrasonidos que tienen valores específicos de frecuencia y ciclo de trabajo, son capaces de interactuar con las membranas a nivel de red generando un pulso vibracional o fonón. Este último, al propagarse a través de los puntos de la red gracias al valor comparable de las frecuencias del pulso fonónico y de las frecuencias de movimiento de los fosfolípidos de la membrana, provoca la dislocación de los componentes de la membrana y desencadena, por lo tanto, el fenómeno de apertura transitoria de los poros de la membrana.

35 Si se utilizan haces no enfocados (es decir, pLINFU), no hay interferencia constructiva o destructiva entre los ultrasonidos que componen el haz de emisión; esto garantiza que todos los haces componentes puedan respetar los pulsos establecidos según todas las características del tejido a tratar y de los fármacos utilizados.

40 La propagación del pulso fonónico y, por lo tanto, el desencadenamiento de la apertura transitoria de los poros de la membrana también está influenciada por el efecto de transmisión acústica. Este último se define como un remolino de fluido a pequeña escala cerca de una estructura vibrante como las membranas celulares; se sabe que este fenómeno afecta las tasas de difusión y la permeabilidad de la membrana y, más particularmente, causa una disminución en la trayectoria útil, es decir, la trayectoria que el haz ultrasónico puede recorrer sin interactuar con un tejido deformado por la propia presión del sonido. [Nowicki A., Kowalewski T., Secomski W., Wo'jcik J., "Estimation of acoustical streaming: theoretical model, Doppler measurements and optical visualization", European Journal of Ultrasound 1998, 7: 73-81].

50 El efecto de transmisión acústica es diferente si se aplican pLIFU o pLINFU. En el caso de los pLIFU, además de la reducción de la trayectoria útil, puede producirse una distorsión de la señal de retorno desde el tejido al transductor piezoeléctrico. Esta distorsión no es específica ni característica del tejido a sonoporar y, por tanto, supone una fuente adicional de incertidumbre en la predicción de la frecuencia y el ciclo de trabajo del haz de ultrasonidos al llegar a las células diana. Por este motivo, es aún más difícil garantizar que las ondas ultrasónicas utilizadas para la sonoporación lleguen a las células objetivo con los valores de frecuencia y ciclo de trabajo establecidos como óptimos para la mejor interacción con las membranas.

Resumen de la invención

60 La invención es tal como se define en las reivindicaciones independientes 1 y 21. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones ilustrativas.

El objeto de la presente invención es proporcionar:

65 - un sistema que permite mejorar la selectividad del fármaco y la absorción del mismo en las células cancerosas.

Esto se logra mediante el sistema de la presente invención mediante la administración de pLINFU para inducir la sonoporación celular a través de la generación de la vibración del fonón.

Como se demuestra en los ejemplos a continuación, el porcentaje de muerte celular logrado mediante el tratamiento de sonoporación depende de la combinación del tipo de fármaco utilizado y del tipo de tumor amenazado. Más particularmente, los resultados de pruebas experimentales in vitro en células cancerosas humanas enumeradas a continuación, mostraron que, para lograr un porcentaje importante de muerte celular, el ciclo de trabajo de los pLINFU debe modularse según el tipo de fármaco y de células cancerosas. La duración temporal de la administración, es decir, el tiempo de operación de los pLINFU, también es importante para garantizar el momento correcto de apertura y cierre de los poros de la membrana celular.

Basándose en estos resultados, la presente invención proporciona un sistema para controlar la frecuencia y el ciclo de trabajo de pLINFU que inducen sonoporación según los datos de configuración introducidos por un operador, comprendiendo dichos datos de configuración al menos el tipo de tumor y el tipo de fármaco.

A los efectos de la presente descripción, la expresión “ultrasonidos de baja intensidad” designa ondas ultrasónicas con una densidad de potencia inferior a 3 W/cm^2 y la expresión “tipo de tumor” está designando una denominación que indica el tipo histológico y el órgano donde se localiza el tumor. Ejemplos no limitativos de “tipo de tumor” son, por lo tanto, “carcinoma ductal de mama humano”, “adenocarcinoma de páncreas humano”, “adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos”, “melanoma de las mucosas humano”, “melanoma nodular humano”, “carcinoma hepatocelular”, etc. Además, se hace constar que a los efectos de la presente descripción, con la palabra “fármaco” se pretende designar cualquier sustancia (distinta de los alimentos que aportan soporte nutricional) que, al inhalarse, inyectarse, fumarse, consumirse, absorberse mediante un parche sobre la piel, o disuelta bajo la lengua, provoca un cambio fisiológico (y/o psicológico) temporal en el organismo y cualquier sustancia que pueda utilizarse para mejorar el contraste y la visibilidad de los tejidos y/o estructuras en las imágenes médicas (es decir, medio de contraste). Es claro que, a los efectos de la presente invención, el término “fármaco” se utiliza no solo para referirse a una única sustancia o agente sino también a una solución, composición o mezcla de dos o más sustancias o agentes. Aunque la realización preferida de la presente invención es un sistema para inducir la sonoporación de liposomas quimioterapéuticos en células cancerosas, se observa aquí que el mismo sistema se puede utilizar también en fármacos quimioterapéuticos no encapsulados en liposomas y para cualquier agente citotóxico (es decir, agente capaz de matar la célula diana) o agente citostático (es decir, agente que tiene la capacidad de suprimir el crecimiento o la división celular de la célula diana). Además, el sistema de la presente descripción se puede utilizar para la sonoporación de cualquier medicamento distinto de los quimioterapéuticos (p. ej., medicamentos antiinflamatorios) y para cualquier patología distinta de las tumorales. En este último caso, la expresión “tipo de tumor” podrá sustituirse por la expresión “tipo de patología” indicando el tipo histológico y el órgano afectado por la patología.

Los objetos mencionados anteriormente se logran mediante la presente invención proporcionando un sistema que comprende:

- un generador configurado para proporcionar energía eléctrica a una frecuencia de ultrasonido;
- al menos una sonda ultrasónica conectada eléctricamente al generador y configurada para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas pulsadas no focalizadas de baja intensidad definidas por parámetros de operación, comprendiendo dichos parámetros de operación la frecuencia y el ciclo de trabajo de las ondas ultrasónicas;

caracterizado porque el sistema comprende, además:

- un dispositivo de entrada que permite a un operador introducir datos de configuración que comprenden: tipo de tumor y tipo de fármaco; y
- un procesador configurado para:

determinar los valores de dichos parámetros de operación según los datos de configuración introducidos, en donde el valor de la frecuencia se determina según al menos el tipo de tumor, y el valor del ciclo de trabajo se determina según al menos el tipo de fármaco y el tipo de tumor; y

controlar el generador y la sonda ultrasónica para que operen según dichos valores determinados.

Más particularmente, la determinación de los valores de los parámetros de operación según los datos de configuración introducidos, se realiza por el procesador a través de las siguientes etapas: - asignar un valor de frecuencia a un tipo de tumor; y

- asignar un valor de ciclo de trabajo a un par de datos de configuración que comprenden: un tipo de tumor y un tipo de fármaco.

Para este fin, el sistema comprende una memoria legible por ordenador que almacena una lista de valores de frecuencia y una lista de valores de ciclo de trabajo.

5 En el sistema de la presente invención el tipo de fármaco se selecciona, preferiblemente, del grupo formado por: paclitaxel, albúmina de paclitaxel, doxorubicina, doxorubicina liposomal, irinotecán e irinotecán liposomal y fluoruracilo y el valor determinado del ciclo de trabajo es, preferiblemente, inferior al 12 %.

La descripción también describe un método no reivindicado que comprende:

- 10 - leer datos de configuración introducidos por un operador, comprendiendo dichos datos de configuración: tipo de tumor, tipo de fármaco, grado del tumor y mediciones antropométricas;
- determinar los valores de los parámetros de operación de las ondas ultrasónicas según al menos el tipo de tumor y el tipo de fármaco, comprendiendo dichos parámetros la frecuencia y el ciclo de trabajo;
- 15 - controlar al menos una sonda ultrasónica para que opere según dichos valores determinados, estando dicha al menos una sonda conectada eléctricamente a un generador y configurada para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas; siendo realizada la operación de leer, determinar y controlar por medio de un procesador.

20 La presente invención se refiere también a un programa de ordenador que comprende porciones de código adaptadas para realizar el método detallado anteriormente, y la descripción también se refiere a un medio legible por ordenador no reivindicado que almacena el código de un programa de ordenador para realizar dicho método, cuando se ejecuta en un ordenador.

25 Aunque el valor de frecuencia debería determinarse al menos según el tipo de tumor, se ha considerado que, para aquellos tipos de tumores que no son superficiales y están localizados en regiones corporales particulares (p. ej., abdomen), también deben tenerse en cuenta otros datos de configuración. Se sabe, de hecho, que la profundidad de penetración de las ondas ultrasónicas está influenciada por la frecuencia ultrasónica y que la profundidad de penetración es mayor con frecuencias más bajas. En los tejidos blandos, por ejemplo, la profundidad media de penetración (es decir, la profundidad a la que la intensidad del ultrasonido se reduce un 50 % con respecto a la intensidad inicial) es de 4-5 cm si la frecuencia del ultrasonido es de 1 MHz y de aproximadamente 1,5 cm si la frecuencia es de 3 MHz. La profundidad máxima de penetración en los tejidos blandos es, en cambio, de 10-12 cm si la frecuencia del ultrasonido es de 1 MHz y de 3-4 cm si la frecuencia del ultrasonido es de 3 MHz. Con referencia a la presente invención, la dependencia de la profundidad de penetración con respecto a la frecuencia se considera implícitamente al afirmar que la frecuencia depende del tipo de tumor. De hecho, si el tipo de tumor es, por ejemplo, uno de los melanomas, el tumor está en la superficie del cuerpo, mientras que si el tipo de tumor es carcinoma ductal de mama, el tumor está a una cierta profundidad bajo la superficie del cuerpo. Por estas razones, afirmar que la frecuencia se determina considerando el tipo de tumor, significa, en general, que la frecuencia se determina considerando también la información respecto a la profundidad del tumor bajo la superficie corporal. Sin embargo, existen algunos tipos de tumores (p. ej. el adenocarcinoma de páncreas) que se localizan en regiones corporales cuyas dimensiones pueden variar mucho entre individuos. En estos casos, las diferencias corporales interindividuales (p. ej., la circunferencia abdominal) pueden afectar significativamente la determinación de la frecuencia necesaria para garantizar que los ultrasonidos lleguen al tumor. Por consiguiente, el valor de la frecuencia del ultrasonido también debe determinarse según las mediciones antropométricas del paciente. Más particularmente, para el adenocarcinoma de páncreas humano, algunos ejemplos de dichas mediciones antropométricas pueden ser: circunferencia abdominal, índice de masa corporal y porcentaje de grasa corporal. Para el carcinoma ductal de mama humano y el adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógeno, algunos ejemplos de dichas mediciones antropométricas pueden ser: circunferencia mamaria, índice de masa corporal, porcentaje de grasa corporal y circunferencia del tórax. Por lo tanto, en el sistema de la presente invención, los datos de configuración pueden comprender además mediciones antropométricas del paciente al que pertenecen las células cancerosas, seleccionándose dichas mediciones antropométricas del grupo que consiste en: circunferencia abdominal, índice de masa corporal, circunferencia mamaria, circunferencia torácica y porcentaje de grasa corporal y el valor de la frecuencia puede determinarse también según las mediciones antropométricas. En el sistema de la presente invención, el valor determinado de la frecuencia está comprendido entre 0,6 MHz y 3 MH. Aunque el valor del ciclo de trabajo debe determinarse al menos según el tipo de tumor y el tipo de fármaco, se ha considerado que cuando un tumor es una metástasis, o tumor secundario, su ubicación puede ser diferente a la indicada en la denominación "tipo de tumor" y las células son, por lo tanto, diferentes de las células del tumor primitivo correspondiente, porque pertenecen a un órgano diferente de aquel en el que se originó el tumor. Dado que el ciclo de trabajo, como se detalla en los ejemplos a continuación, debe variarse según el tipo de células en las que se desea inducir la sonoporación, el ciclo de trabajo debe variarse según la ubicación de un eventual tumor secundario. Por estas razones, en el sistema de la presente invención los datos de configuración pueden comprender además el grado del tumor y, si se trata de una metástasis, la ubicación de dicha metástasis.

65 Otro parámetro operativo que es relevante para obtener una sonoporación efectiva del fármaco en las células cancerosas es el tiempo de operación, es decir, el intervalo temporal de la administración de los ultrasonidos. Como se explica en detalle en los ejemplos a continuación, el valor del tiempo de operación también es relevante para

garantizar una sonoporación efectiva del fármaco en las células. Por esta razón, en el sistema de la presente invención los parámetros de operación pueden comprender el tiempo de operación, determinándose el valor de dicho tiempo de operación según al menos el tipo de tumor y del tipo de fármaco.

5 El sistema de la presente invención está configurado además para sintonizar automáticamente la frecuencia y la amplitud de la sonda de ultrasonidos para compensar la atenuación de las ondas ultrasónicas causadas por cualquier medio interpuesto entre la sonda y las células cancerosas. Además, el ajuste automático de la frecuencia y la amplitud se produce de forma sincronizada con el ciclo de trabajo.

10 Estas y otras características adicionales se harán más evidentes con la ayuda de la siguiente descripción detallada de una realización preferida de la invención, que se leerán a modo de ejemplo no limitativo del principio general reivindicado.

15 Breve descripción de los dibujos

La descripción se refiere a los dibujos adjuntos, en los que:

20 - Figura 1a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de paclitaxel a células de carcinoma ductal de mama humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

25 - Figura 1b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de albúmina de paclitaxel a células de carcinoma ductal de mama humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

30 - Figura 2a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de doxorubicina a células de carcinoma ductal de mama humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($1000 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$);

35 - Figura 2b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de doxorubicina liposomal a células de carcinoma ductal de mama humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($1000 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$);

40 - Figura 3a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de paclitaxel a células de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-independientes, realizándose dicha administración simultáneamente a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

45 - Figura 3b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de albúmina de paclitaxel a células de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-independientes, realizándose dicha administración simultáneamente a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

50 - Figura 4a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de doxorubicina a células de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-independientes, realizándose dicha administración simultáneamente a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($1000 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$);

55 - Figura 4b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de doxorubicina liposomal a células de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-independientes, realizándose dicha administración simultáneamente a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($1000 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$);

60 - Figura 5a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de paclitaxel a células de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-independientes, realizándose dicha administración simultáneamente a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

65 - Figura 5b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de albúmina de paclitaxel a células de adenocarcinoma de páncreas humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$);

- 5 - Figura 6a muestra el porcentaje de muerte celular obtenido mediante la administración in vitro de irinotecán a células de adenocarcinoma de páncreas humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,05 \mu\text{m}$);
- 10 - Figura 6b muestra el porcentaje de muerte celular obtenido al administrar in vitro irinotecán liposomal junto con fluorouracilo a células de adenocarcinoma de páncreas humano, realizándose dicha administración de forma simultánea a la administración de ondas ultrasónicas. La figura muestra los resultados obtenidos con diferentes concentraciones totales ($50 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $0,05 \mu\text{m}$);
- 15 - Figura 7 muestra los resultados relativos a un experimento de internalización de una fluoresceinamina (FA, por sus siglas en inglés) en células cancerosas. La Figura 7 muestra en particular la captación de FA en células de adenocarcinoma pancreático humano en cinco condiciones experimentales, dichas condiciones diseñadas específicamente para investigar el efecto de la administración de ultrasonidos;
- 20 - Figura 8a muestra una imagen obtenida por microscopía confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) de la ingesta del FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano, administrándose dicho FA solo, es decir sin administración de ultrasonidos y de ningún fármaco;
- 25 - Figura 8b muestra una imagen obtenida por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de la entrada del FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano, administrándose dicho FA junto con irinotecán liposomal sin administración de ultrasonidos;
- 30 - Figura 8c muestra una imagen obtenida por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de la entrada del FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano, administrándose dicho FA junto con irinotecán liposomal y simultáneamente con la administración de ultrasonidos pulsados con un ciclo de trabajo del 12 %;
- 35 - Figura 8d muestra una imagen obtenida por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de la entrada del FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano, administrándose dicho FA junto con irinotecán liposomal tras la administración de ultrasonidos pulsados con un ciclo de trabajo del 1 %; y
- 40 - Figura 8e muestra una imagen obtenida por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de la entrada del FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano, administrándose dicho FA junto con irinotecán liposomal y simultáneamente con la administración de ultrasonidos pulsados con un ciclo de trabajo del 1 %;
- la Figura 9a muestra la cinética del cierre de los poros de la membrana celular con ProHance (Gd^{3+});
- la Figura 9b muestra la cinética del cierre de los poros de la membrana celular con ProHance y liposomas;
- la Figura 9c muestra la cinética del cierre de los poros de la membrana celular con Tetramer; y
- la Figura 9d muestra la cinética del cierre de los poros de la membrana celular con tetrámeros y liposomas.

45 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Una realización preferida del sistema comprende:

- 50 - un generador configurado para proporcionar energía eléctrica a una frecuencia de ultrasonido;
- una sonda ultrasónica conectada eléctricamente al generador y configurada para
- 55 - convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas pulsadas no focalizadas de baja intensidad definidas por parámetros de operación, comprendiendo dichos parámetros de operación la frecuencia, el ciclo de trabajo y el tiempo de operación de las ondas ultrasónicas;
- un dispositivo de entrada que permite a un operador introducir datos de configuración que comprenden: tipo de tumor, tipo de fármaco, medidas antropométricas del paciente al que pertenecen las células cancerosas y grado del tumor; y
- 60 - un procesador configurado para:
 - 65 • determinar los valores de dichos parámetros de operación según los datos de configuración introducidos, en donde el valor de la frecuencia se determina según el tipo de tumor y de las mediciones antropométricas y el valor del ciclo de trabajo se determina según al menos el tipo de fármaco y el tipo de tumor; y

- controlar el generador y la sonda ultrasónica para que operen según dichos valores determinados.

Más particularmente, el sistema comprende una memoria legible por ordenador que almacena una lista de valores de frecuencia y una lista de valores de ciclo de trabajo y el procesador está configurado por lo tanto para:

- asignar un valor de frecuencia a un tipo de tumor; y
- asignar un valor de ciclo de trabajo al par de datos de configuración que comprende: un tipo de tumor y un tipo de fármaco.

La densidad de potencia de las ondas ultrasónicas generadas por la realización preferida del sistema es inferior a 3 W/cm².

El dispositivo de entrada es preferiblemente una pantalla táctil integrada con el sistema. Otros ejemplos de dispositivos de entrada son un ordenador portátil, una tableta y un teléfono inteligente.

En la realización preferida, los primeros datos de configuración que se solicitan al operador que introduzca, es el tipo de fármaco. El tipo de fármaco se selecciona del grupo que consiste en: paclitaxel, albúmina de paclitaxel, doxorubicina, doxorubicina liposomal, irinotecán, irinotecán liposomal y fluorouracilo.

Después de seleccionar de una lista de menú o introducir escribiendo el tipo de fármaco, se le puede solicitar a un operador que elija el tipo de tumor. El tipo de tumor se selecciona del grupo que consiste en carcinoma ductal de mama humano, adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos y adenocarcinoma de páncreas humano. Después se debe introducir el grado del tumor seleccionando las dos opciones siguientes: tumor primario (es decir, tumor primitivo) y tumor secundario (es decir, metástasis). Si el grado del tumor seleccionado es:

- tumor primario, el ciclo de trabajo se determina según el tipo de fármaco y el tipo de tumor.
- tumor secundario, el operador también debe introducir la ubicación del tumor secundario. En este caso, el ciclo de trabajo se determina según el tipo de fármaco, el tipo de tumor y la ubicación del tumor secundario.

En este caso, el procesador está configurado para asignar un valor de ciclo de trabajo al conjunto de datos de configuración que comprende el tipo de tumor, el tipo de fármaco, el grado del tumor y, eventualmente, la ubicación del tumor secundario.

Por ejemplo, si el grado del tumor introducido es primario, el tipo de tumor introducido es carcinoma ductal de mama humano o adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógeno y el tipo de fármaco introducido es paclitaxel o albúmina de paclitaxel o doxorubicina o doxorubicina liposomal, el ciclo de trabajo asignado es del 9 %.

Por ejemplo, si el grado del tumor introducido es primario, el tipo de tumor introducido es adenocarcinoma de páncreas humano y el tipo de fármaco introducidos es paclitaxel o albúmina de paclitaxel o irinotecán o irinotecán liposomal o fluorouracilo, el ciclo de trabajo asignado es del 1 %.

Después de seleccionar el grado del tumor, se deben introducir las medidas antropométricas. Las medidas antropométricas que debe especificar el operador son diferentes según el tipo de tumor si el grado del tumor es un tumor primario y según la ubicación del tumor secundario si el grado del tumor es un tumor secundario. Por ejemplo, las mediciones antropométricas pueden comprender la circunferencia abdominal si el tipo de tumor es adenocarcinoma de páncreas humano, y la circunferencia mamaria si el tipo de tumor es carcinoma ductal mamario humano. La frecuencia se determina entonces según dichas mediciones antropométricas.

En este caso, el procesador está, por lo tanto, configurado para asignar un valor de frecuencia al conjunto de datos de configuración que comprende el tipo de tumor y al menos una medida antropométrica seleccionada del grupo formado por: circunferencia abdominal, índice de masa corporal, circunferencia mamaria, circunferencia torácica y porcentaje de grasa corporal.

Si el tumor se extiende a diferentes profundidades, el sistema de la presente invención también puede comprender dos sondas que operan a diferentes frecuencias correspondientes a las diferentes profundidades.

Después de haber completado la introducción de los datos de configuración antes mencionados, se le da al operador también la posibilidad de elegir otro conjunto de parámetros relativos a otro tumor. Por ejemplo, si el primer conjunto de datos de configuración se refiere a un tumor primario, es posible establecer también datos de configuración relativos a una metástasis de dicho tumor primario. El sistema de la presente invención puede, de hecho, proporcionar dos sondas, una primera sonda para el tumor primario y una segunda sonda para la metástasis. Los ultrasonidos emitidos desde la primera sonda tendrán un ciclo de trabajo dependiente del tipo de fármaco y del tipo de tumor primario, mientras que los ultrasonidos emitidos desde la segunda sonda tendrán un ciclo de trabajo dependiente del tipo de fármaco, del tipo de tumor primario y de la ubicación del segundo tumor.

El tiempo de operación de cada sonda también se determinará según los datos de configuración introducidos. Más particularmente, según el tipo de tumor y el tipo de fármaco, el tiempo de intervención puede comprender:

- 5 - una ventana temporal en la que se administran los ultrasonidos; o
- dos o más ventanas temporales en las que se administran ultrasonidos, estando intercaladas dichas ventanas por una ventana temporal en la que no se administran ultrasonidos. Se solicita al operador que acepte este tiempo mínimo de operación o que ingrese otro dato de configuración que consiste en un número entero que multiplicado por el tiempo mínimo de operación, da como resultado el tiempo de operación.

En este caso, el procesador está configurado para asignar un valor de tiempo de operación al par de datos de configuración que comprende: un tipo de tumor y un tipo de fármaco.

15 Finalmente, en una realización preferida, la sonda puede comprender una pluralidad de transductores de ultrasonidos, estando configurados un primer subconjunto de dichos transductores como emisores de ultrasonidos para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas para inducir la sonoporación, y estando configurado un segundo subconjunto de dichos transductores como receptores de ultrasonidos para convertir las ondas ultrasónicas reflejadas por cualquier medio interpuesto en una señal eléctrica legible por el procesador, estando programado el procesador para:

- 20 - calcular las diferencias de frecuencia y amplitud entre las ondas ultrasónicas emitidas por el primer subconjunto de transductores y las ondas ultrasónicas recibidas por el segundo subconjunto de transductores; y
- 25 - ajustar los valores de la amplitud y la frecuencia del ultrasonido emitido, de tal modo que se compensen dichas diferencias.

El primer y el segundo subconjunto de transductores también pueden superponerse en un solo transductor. En este caso, la sonda comprende un transductor de ultrasonidos, configurado como emisor de ultrasonidos para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas para inducir la sonoporación y como receptor de ultrasonidos para convertir las ondas ultrasónicas reflejadas por cualquier medio interpuesto en una señal eléctrica legible por el procesador, estando programado el procesador para:

- 30 - calcular las diferencias de frecuencia y amplitud entre las ondas ultrasónicas emitidas y las ondas ultrasónicas recibidas por dicho transductor; y
- 35 - ajustar los valores de la amplitud y la frecuencia del ultrasonido emitido, de tal modo que se compensen dichas diferencias.

Ejemplos

40 El sistema de la presente invención se probó in vitro utilizando dos líneas celulares de cáncer de mama humano y una línea celular de adenocarcinoma de páncreas humano.

En particular, se emplearon las siguientes líneas celulares:

- 45 - MCF-7: carcinoma ductal de mama humano;
- MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógeno;
- 50 - MiaPaCa-2: adenocarcinoma de páncreas humano.

La siguiente tabla resume las combinaciones probadas de líneas celulares y tipo de fármaco:

<i>Líneas celulares</i>	<i>Tipo de tumor</i>	<i>Tipo de fármaco</i>
MCF -7	Carcinoma ductal de mama humano	Paclitaxel
MCF -7	Carcinoma ductal de mama humano	Albúmina de paclitaxel
MCF -7	Carcinoma ductal de mama humano	Doxorrubicina
MCF -7	Carcinoma ductal de mama humano	Doxorrubicina liposomal
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos	Paclitaxel

<i>Líneas celulares</i>	<i>Tipo de tumor</i>	<i>Tipo de fármaco</i>
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos	Albúmina de paclitaxel
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos	Doxorrubicina
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano independiente de estrógenos	Doxorrubicina liposomal
MiaPaCa-2	Adenocarcinoma pancreático humano	Paclitaxel
MiaPaCa-2	Adenocarcinoma pancreático humano	Albúmina de paclitaxel
MiaPaCa-2	Adenocarcinoma pancreático humano	Irinotecán
MiaPaCa-2	Adenocarcinoma pancreático humano	Irinotecán liposomal + fluorouracilo

20 Para cada combinación se midió el porcentaje de muerte celular en tres condiciones experimentales principales:

- administración del fármaco (en adelante, denominada condición “NO-US” en la presente memoria);
- administración del fármaco y administración simultánea de ultrasonidos pulsados no focalizados de baja intensidad con una frecuencia de 1 MHz y un período de 1 segundo, administrándose dicho fármaco en una dosis única;
- administración de ultrasonidos pulsados no focalizados de baja intensidad con una frecuencia de 1 MHz y un período de 1 segundo, seguido de la administración del fármaco; y
- administración del fármaco y administración simultánea de ultrasonidos pulsados no focalizados de baja intensidad con una frecuencia de 1 MHz y un período de 1 segundo, administrándose dicho fármaco en dos dosis de igual concentración (en adelante, denominada condición “US-DC” en la presente memoria).

35 Se replicaron todas las condiciones experimentales, excepto las NO-US, para diferentes valores de ciclo de trabajo y cada condición experimental se replicó para tres concentraciones totales diferentes de fármacos. También se probaron varios tiempos de operación para cada línea celular y para cada tipo de fármaco. Los mejores resultados se obtuvieron en la condición US-DC mediante una primera administración de una primera dosis del fármaco y la administración simultánea de ultrasonidos durante 20 segundos, seguida de una segunda administración de una segunda dosis del fármaco y la administración simultánea de ultrasonidos durante otros 20 segundos.

Los resultados se enumeran en las tablas a continuación y se muestran en las figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b.

45 Las tablas en particular resumen los resultados obtenidos para la condición US y la condición US-DC para las tres concentraciones totales diferentes de fármacos enumerados anteriormente. Para esta última condición se eligen dos valores del ciclo de trabajo que se muestran como mejor representativos de la eficacia del tratamiento. En particular, para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se muestran los resultados relativos a los siguientes valores de ciclo de trabajo:

- ciclo de trabajo = 12 % (US-DC = 12 %)
- ciclo de trabajo = 9 % (US-DC = 9 %)

55 Para la línea celular MiaPaCa-2, se muestran los resultados relativos a los siguientes valores de ciclo de trabajo:

- ciclo de trabajo = 12 % (US-DC = 12 %)
- ciclo de trabajo = 1 % (US-DC = 1 %).

60 Ejemplo 1

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de paclitaxel administradas a células de MCF-7 en tres condiciones:

65

ES 2 989 606 T3

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel;

5 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

10 - US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Paclitaxel - MCF -7							
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0,5 μm		
15	NO-US	7,2 %	-	4,1 %	-	1,0 %	-
20	US-DC=12 %	17,8 %	+147,3 %	13,2 %	+221,6 %	3,4 %	+242,5 %
	US-DC=9 %	32,7 %	+354,2 %	24 %	+484,7 %	9,1 %	+807,5 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 1a.

25 Ejemplo 2

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de albúmina de paclitaxel administradas a células de MCF-7 en tres condiciones:

30 - NO-US: una primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel;

35 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos; US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Albúmina de paclitaxel - MCF -7							
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0,5 μm		
45	NO-US	23,7 %	-	12,9 %	-	2,6 %	-
50	US-DC=12 %	39,9 %	+68,3 %	26,5 %	+106 %	25,24 %	+491,3 %
	US-DC=9 %	51,7 %	+118,1 %	33,7 %	+161,8 %	24 %	+830 %

55 Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 1b.

Ejemplo 3

60 En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de doxorubicina administradas a células de MCF-7 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de doxorubicina sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina;

65

ES 2 989 606 T3

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

5 - US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Doxorrubicina - MCF -7							
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a -US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	
	Concentración total 1000 µg/ml		Concentración total 500 µg/ml		Concentración total 100 µg/ml		
10	NO-US	59 %	-	23,3 %	-	17,1 %	-
15	US-DC=12 %	82 %	+39 %	49,9 %	+114,2 %	28,2 %	+64,9 %
20	US-DC=9 %	70,6 %	+19,7 %	47,2 %	+102,5 %	29,8 %	+74,4 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 2a.

Ejemplo 4

25 En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de doxorubicina liposomal administradas a células de MCF-7 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de doxorubicina liposomal sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal;

30 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

35 - US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Doxorrubicina liposomal - MCF-7							
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	
	Concentración total 1000 µg/ml		Concentración total 500 µg/ml		Concentración total 100 µg/ml		
40	NO-US	75,4 %	-	35,5 %	-	16,2 %	-
45	US-DC=12 %	82 %	+8,7 %	49,8 %	+40,4 %	28,2 %	+74 %
50	US-DC=9 %	92,8 %	+23 %	47,2 %	+97,4 %	37 %	+128,7 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 2b.

Ejemplo 5

55 En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de paclitaxel administradas a células de MDA-MB-231 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel;

60 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

65

ES 2 989 606 T3

- US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Paclitaxel - MDA-MB-231						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0.5 μm	
NO-US	7,9 %	-	6,4 %	-	6,4 %	-
US-DC=12 %	12,3 %	+55,3 %	7,4 %	+15 %	5,9 %	-7,8 %
US-DC=9 %	25,5 %	+221,9 %	14,7 %	+128,4 %	11,3 %	+76,6 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 3a.

Ejemplo 6

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de albúmina de paclitaxel administradas a células de MDA-MB-231 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel;

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

- US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos, seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Paclitaxel albúmina - MDA-MB-231						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0,5 μm	
NO-US	17,8 %	-	9,4 %	-	5 %	-
US-DC=12 %	21,6 %	+21,3 %	11,3 %	+20,2 %	7,8 %	+56 %
US-DC=9 %	45,1 %	+153,4 %	31,9 %	+239,4 %	80,9 %	+282 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 3b.

Ejemplo 7

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de doxorubicina administradas a células de MDA-MB-231 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina;

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

- US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

ES 2 989 606 T3

Doxorrubicina - MDA-MB-231						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 1000 µg/ml		Concentración total 500 µg/ml		Concentración total 100 µg/ml	
5	NO-US	54,5 %	-	22,8 %	-	10,9 %
	US-DC=12 %	54,6 %	+0,3 %	27 %	+18,4 %	12 %
10	US-DC=9 %	60,5 %	+11,1 %	38,8 %	+70,5 %	23,5 %
						+116 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 4a.

15 Ejemplo 8

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de doxorubicina liposomal administradas a células de MDA-MB-231 en tres condiciones:

20 - NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal;

25 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

30 - US-DC=9 %: primera administración de una primera dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 9 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de doxorubicina liposomal y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Doxorrubicina liposomal - MDA-Mb-231						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 1000 µg/ml		Concentración total 500 µg/ml		Concentración total 100 µg/ml	
35	NO-US	65,7 %	-	29 %	-	11,1 %
	US-DC=12 %	72,4 %	+10,2 %	37,8 %	+30,4 %	17,1 %
40	US-DC=9 %	81,3 %	+23,7 %	51,2 %	+76,6 %	29,4 %
						+164,6 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 4b.

45 Ejemplo 9

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de paclitaxel administradas a células de MiaPaCa2 en tres condiciones:

50 - NO-US: una primera administración de una primera dosis de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel;

55 - US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

60 - US-DC=1 %: primera administración de una primera dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 1 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

65

ES 2 989 606 T3

Paclitaxel - MiaPaCa2						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0,5 μm	
NO-US	80,2 %	-	65,3 %	-	45,5 %	-
US-DC=12 %	87,6 %	+9,2 %	9,2 %	+12,7 %	12,7 %	17,1 %
US-DC=1 %	90,5 %	+12,8 %	12,8 %	+22,7 %	22,7 %	40,1 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 5a.

Ejemplo 10

En la siguiente tabla se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de albúmina de paclitaxel administradas a células de MiaPaCa2 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel;

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

- US-DC=1 %: primera administración de una primera dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 1 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de albúmina de paclitaxel y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Paclitaxel albúmina - MiaPaCa2						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μm		Concentración total 10 μm		Concentración total 0,5 μm	
NO-US	7,9 %	-	6,4 %	-	6,4 %	-
US-DC=12 %	12,3 %	+55,3 %	7,4 %	+15 %	5,9 %	-7,8 %
US-DC=1 %	25,5 %	+221,9 %	14,7 %	+128,4 %	11,3 %	+76,6 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 5b.

Ejemplo 11

En la siguiente tabla, se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de irinotecán administradas a células de MiaPaCa2 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de irinotecán sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de irinotecán;

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de irinotecán y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de irinotecán y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

- US-DC=1 %: primera administración de una primera dosis de irinotecán y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 1 %) durante 20 segundos seguida de una segunda administración de una segunda dosis de irinotecán y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Irinotecán - MiaPaCa2						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μm		Concentración total 1 μm		Concentración total 0,05 μm	
NO-US	56,7 %	-	21,1 %	-	11,5 %	-

ES 2 989 606 T3

Irinotecán - MiaPaCa2						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total 50 μ m		Concentración total 1 μ m		Concentración total 0,05 μ m	
US-DC=12 %	66 %	+16,5 %	30 %	+42,5 %	18,5 %	+60,6 %
US-DC=1 %	74,3 %	+31,1 %	34,3 %	+62,9 %	25,4 %	+120,8 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 6a.

Ejemplo 12

En la siguiente tabla, se informa el porcentaje de muerte celular para tres concentraciones diferentes de irinotecán liposomal y fluorouracilo (FU) administrados a células de MiaPaCa2 en tres condiciones:

- NO-US: una primera administración de una primera dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo, sin administración de ultrasonidos (NO-US) seguida de una segunda administración de una segunda dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo;

- US-DC=12 %: primera administración de una primera dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo, y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 12 %) durante 20 segundos, seguida de una segunda administración de una segunda dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo, y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos;

- US-DC=1 %: primera administración de una primera dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo, y administración simultánea de pLINFU (con ciclo de trabajo = 1 %) durante 20 segundos, seguida de una segunda administración de una segunda dosis de una solución que contiene irinotecán liposomal y fluorouracilo, y administración simultánea de pLINFU durante otros 20 segundos.

Irinotecán liposomal + fluorouracilo (FU) - MiaPaCa2						
	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US	Muerte celular %	Aumento % frente a NO-US
	Concentración total		Concentración total		Concentración total	
	50 μ m + 5 FU 100 μ m		1 μ m + 5 FU 10 μ m		0,05 μ m + 5 FU 1 μ m	
NO-US	85 %	-	67 %	-	25 %	-
US-DC=12 %	89 %	+4,7 %	80,5 %	+20,1 %	39 %	+56 %
US-DC=1 %	98 %	+11,8 %	88 %	+31,3 %	53,5 %	+114 %

Los resultados de la tabla anterior se representan gráficamente en la figura 6b.

Ejemplo 13

Este ejemplo es relativo a un experimento de internalización de una fluoresceinamina (FA). La figura 7 muestra en particular la captación de FA en células de adenocarcinoma de páncreas humano en cinco condiciones experimentales, dichas condiciones diseñadas específicamente para comparar el efecto de la administración de ultrasonidos. Las condiciones experimentales probadas son:

- FA - NO-US - NO DRUG: administración de FA sola, sin administración de ningún fármaco y sin administración de ultrasonidos;

- FA-LI - NO-US: administración de FA e irinotecán liposomal (LI), sin administración de ultrasonidos;

- US-DC=12 %: administración de FA e irinotecán liposomal (LI), con administración simultánea de pLINFU con un ciclo de trabajo del 12 %;

- US-PRE-DC=1 %: administración de pLINFU con un ciclo de trabajo del 1 % seguido de la administración posterior de FA e irinotecán liposomal (LI); y

- US-DC=1 %: administración de FA e irinotecán liposomal (LI), con administración simultánea de pLINFU con un ciclo de trabajo del 1 %.

En la figura 7, se representa gráficamente la internalización de FA (%), es decir el porcentaje de FA medido después de la eliminación del líquido surfactante de los pocillos de cultivo celular, es decir el porcentaje de FA dentro de la célula.

Los resultados del experimento de este ejemplo también se analizaron mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM) después de 2 horas de incubación. Las figuras 8a, 8b, 8c, 8d, 8e muestran la ingesta de AG en células de adenocarcinoma pancreático humano, en las cinco condiciones experimentales mencionadas anteriormente. De la figura 7 se puede deducir que el mayor % de internalización de FA se obtiene con la condición US-DC = 1 %.

En estas imágenes se puede observar como el FA solo (representado en blanco) no se acumula en las células (representadas en gris) (figura 8a). Cuando se administra FA junto con irinotecán liposomal (figura 8b) se observa una mayor densidad de fluorescencia, pero solo a nivel perimembrana extracelular. Esto se puede explicar con una mayor interacción química entre las cadenas poliméricas de polietilenglicol de la membrana liposomal y el FA. En la figura 8c y la figura 8d (US-DC=12 % y US- PRE - DC=1 %, respectivamente), se hizo evidente la presencia de FA dentro de las células y el mayor nivel de internalización de FA se muestra en la figura 8e correspondiente a la condición US-DC=1 %. En la condición US-PRE-DC=1 % se consigue un cierto grado de internalización de FA, probablemente, debido a que tras la administración de ultrasonidos, las membranas de las células necesitan algunas decenas de segundos para volver a la permeabilidad que tenían antes de la sonoporación.

Ejemplo 14

Este ejemplo es relativo al estudio de la apertura y cierre de poros en células de cáncer de mama.

Para cada punto del gráfico (figuras 9a, 9b, 9c, 9d) se sondeó una muestra. Todas las muestras contienen la misma cantidad de células.

En el eje X se reportan los tiempos entre el final de la sonoporación celular y la adición de la sustancia cuya internalización debe medirse en las células.

El experimento de internalización es el siguiente:

- Tiempo 0 min: una vez transcurrido 1 minuto de sonoporación, se añade una cantidad fija de ProHance (medio de contraste para resonancia magnética) al cultivo celular; Después de 1 minuto las células están aisladas.

- Tiempo 1 min: 1 minuto de sonoporación, luego después de 1 minuto se agrega una cantidad fija de ProHance al cultivo celular, después de otro minuto se aíslan las células.

- Tiempo n min: 1 minuto de sonoporación, luego de n minutos se agrega una cantidad fija de ProHance al cultivo celular; Después de otro minuto, las células quedan aisladas.

Estas pruebas, además de las realizadas en otros tipos de células, han demostrado que el tiempo de cierre de los poros celulares depende de:

- tipo de células;

- tipo de molécula de fármaco (ProHance y Tetramer simularon la presencia de moléculas farmacológicas de diferente composición y tamaño)

- presencia o ausencia de agentes vectores (liposomas)

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para inducir la sonoporación de un fármaco en células cancerosas en un tumor, que comprende:
 - 5 -un generador configurado para proporcionar energía eléctrica a una frecuencia de ultrasonido;
-al menos una sonda ultrasónica conectada eléctricamente al generador y configurada para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas pulsadas no focalizadas de baja intensidad definidas por parámetros de operación, comprendiendo dichos parámetros de operación la frecuencia de las ondas ultrasónicas;
 - 10 -un dispositivo de entrada que permite a un operador introducir datos de configuración que comprenden el tipo de fármaco; y
-un procesador configurado para:
 - 15 determinar los valores de dichos parámetros de operación según los datos de configuración introducidos; y
controlar el generador y la sonda ultrasónica para que operen según dichos valores determinados;
 - 20 **caracterizado por que** los parámetros de operación comprenden además el ciclo de trabajo de las ondas ultrasónicas, el dispositivo de entrada permite además que un operador ingrese datos de configuración que comprenden el tipo de tumor, y el procesador está configurado para determinar el valor de la frecuencia según al menos el tipo de tumor, y el valor del ciclo de trabajo según al menos el tipo de fármaco y el tipo de tumor.
- 25 2. Sistema según la reivindicación 1, en donde los parámetros de operación comprenden la amplitud de las ondas ultrasónicas y el sistema está configurado para sintonizar automáticamente la frecuencia y la amplitud de la sonda ultrasónica para compensar la atenuación de las ondas ultrasónicas causada por cualquier medio interpuesto entre la sonda y las células cancerosas.
- 30 3. Sistema según la reivindicación anterior en donde el sistema está configurado para sintonizar automáticamente la frecuencia y la amplitud de forma sincronizada con el ciclo de trabajo.
4. Sistema según la reivindicación anterior en donde la sonda comprende una pluralidad de transductores de ultrasonidos, estando configurados un primer subconjunto de dichos transductores como emisores de ultrasonidos para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas para inducir la sonoporación, y estando configurado un segundo subconjunto de dichos transductores como receptores de ultrasonidos para convertir las ondas ultrasónicas reflejadas por cualquier medio interpuesto en una señal eléctrica legible por el procesador, estando programado el procesador para:
 - 40 -calcular las diferencias de frecuencia y amplitud entre las ondas ultrasónicas emitidas por el primer subconjunto de transductores y las ondas ultrasónicas recibidas por el segundo subconjunto de transductores; y
-ajustar los valores de la amplitud y la frecuencia de los ultrasonidos emitidos, de tal modo que se compensen dichas diferencias.
- 45 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la sonda comprende un transductor de ultrasonidos, configurado como emisor de ultrasonidos para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas para inducir la sonoporación y como receptor de ultrasonidos para convertir las ondas ultrasónicas reflejadas por cualquier medio interpuesto en una señal eléctrica legible por el procesador, estando programado el procesador para:
 - 50 -calcular las diferencias de frecuencia y amplitud entre las ondas ultrasónicas emitidas y las ondas ultrasónicas recibidas por dicho transductor; y
-ajustar los valores de la amplitud y la frecuencia de los ultrasonidos emitidos, de tal modo que se compensen dichas diferencias.
- 55 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una memoria legible por ordenador que almacena una lista de valores de frecuencia y una lista de valores de ciclo de trabajo y en donde el procesador está configurado para:
 - 60 -asignar un valor de frecuencia a un tipo de tumor; y
-asignar un valor de ciclo de trabajo a un par de datos de configuración que comprenden: un tipo de tumor y un tipo de fármaco.
- 65 7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tipo de tumor se selecciona del grupo que consiste en carcinoma ductal de mama humano, adenocarcinoma de mama humano independiente

- de estrógenos, adenocarcinoma de páncreas humano, melanoma humano; melanoma lentiginoso humano, melanoma lentigo maligno humano; melanoma humano de propagación superficial; melanoma lentiginoso acral humano, melanoma mucoso humano, melanoma nodular humano, melanoma polipoide humano, melanoma de células pequeñas humano; melanoma spitzoide humano, melanoma uveal humano y melanoma desmoplásico humano, carcinoma hepatocelular.
- 5
8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los datos de configuración comprenden medidas antropométricas del paciente al que pertenecen las células cancerosas, seleccionándose dichas medidas antropométricas del grupo que consiste en: circunferencia abdominal, índice de masa corporal, circunferencia mamaria, circunferencia torácica, y porcentaje de grasa corporal.
- 10
9. Sistema según la reivindicación 8, en donde el valor de la frecuencia se determina también según las mediciones antropométricas.
- 15
10. Sistema según la reivindicación 9 cuando depende de la reivindicación 2, en donde el procesador está configurado para asignar un valor de frecuencia a un conjunto de datos de configuración que comprenden el tipo de tumor y al menos una medida antropométrica seleccionada del grupo que consiste en: circunferencia abdominal, índice de masa corporal, circunferencia mamaria, circunferencia torácica, y porcentaje de grasa corporal.
- 20
11. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los datos de configuración comprenden un grado del tumor, seleccionándose dicho grado del tumor del grupo que consiste en: tumor primario, o primitivo, y tumor secundario, o metástasis.
- 25
12. Sistema según la reivindicación 11 en donde los datos de configuración comprenden una ubicación del tumor secundario, si dicho grado del tumor es tumor secundario, o metástasis.
- 30
13. Sistema según la reivindicación 12, en donde el valor del ciclo de trabajo se determina también según la ubicación del tumor secundario.
- 35
14. Sistema según la reivindicación 12 cuando depende de la reivindicación 2, en donde el procesador está configurado para asignar un valor de ciclo de trabajo a un conjunto de datos de configuración que comprenden el tipo de tumor, el tipo de fármaco y el grado del tumor.
- 40
15. Sistema según la reivindicación 14 cuando depende de la reivindicación 2, en donde el procesador está configurado para asignar un valor de ciclo de trabajo a un conjunto de datos de configuración que comprenden el tipo de tumor, el tipo de fármaco y la ubicación del tumor secundario, si el grado del tumor es tumor secundario, o metástasis.
- 45
16. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tipo de fármaco se selecciona del grupo que consiste en: paclitaxel, albúmina de paclitaxel, doxorubicina, doxorubicina liposomal, irinotecán, irinotecán liposomal y fluorouracilo.
- 50
17. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los parámetros de operación comprenden un tiempo de operación de las ondas ultrasónicas, determinándose el valor de dicho tiempo de operación según al menos el tipo de tumor y el tipo de fármaco.
- 55
18. Sistema según la reivindicación anterior, en donde el procesador está configurado para asignar un valor de tiempo de operación a un par de datos de configuración que comprenden: un tipo de tumor y un tipo de fármaco.
- 60
19. Sistema según la reivindicación anterior, en donde el tiempo de operación consiste en:
- una ventana temporal en la que se administran los ultrasonidos; o
 - al menos dos ventanas temporales en las que se administran ultrasonidos, estando dichas dos al menos dos ventanas temporales intercaladas por una ventana temporal en la que no se administran ultrasonidos.
- 65
20. Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el valor determinado de la frecuencia está comprendido entre 0,6 MHz y 3 MHz y/o el valor determinado del ciclo de trabajo es inferior al 12 %.
21. Programa de ordenador que comprende porciones de código adaptadas para realizar, cuando se ejecutan en un ordenador acoplado a un generador y a un dispositivo de entrada, un método para controlar ondas ultrasónicas para inducir la sonoporación de un fármaco en las células, comprendiendo el método:

ES 2 989 606 T3

-leer datos de configuración introducidos por un operador a través del dispositivo de entrada, comprendiendo dichos datos de configuración: tipo de tumor, tipo de fármaco, grado del tumor y mediciones antropométricas;

5

-determinar un valor de frecuencia según el tipo de tumor; y determinar un valor de ciclo de trabajo según un par de datos de configuración que comprenden: el tipo de tumor y el tipo de fármaco;

-controlar la al menos una sonda ultrasónica para que opere según dichos valores determinados, estando dicha al menos una sonda conectada eléctricamente al generador y configurada para convertir la energía eléctrica en ondas ultrasónicas pulsadas no focalizadas de baja intensidad.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

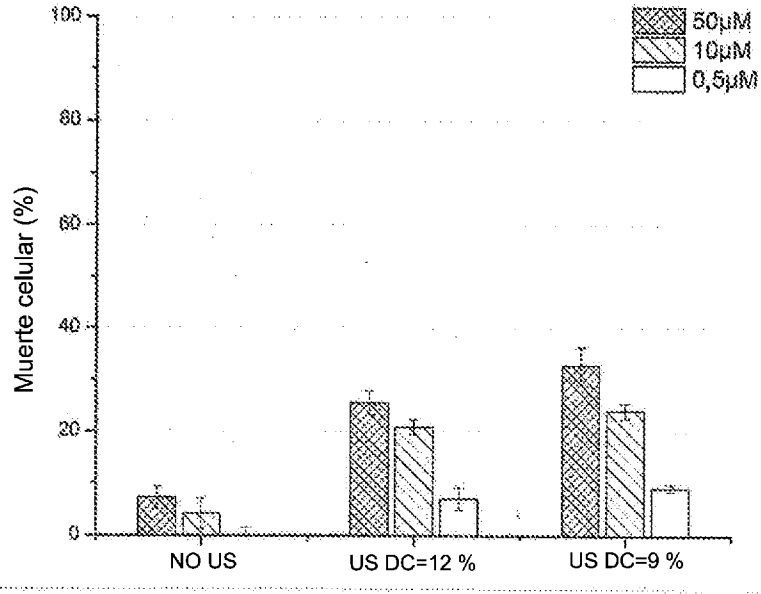


Figura 1a

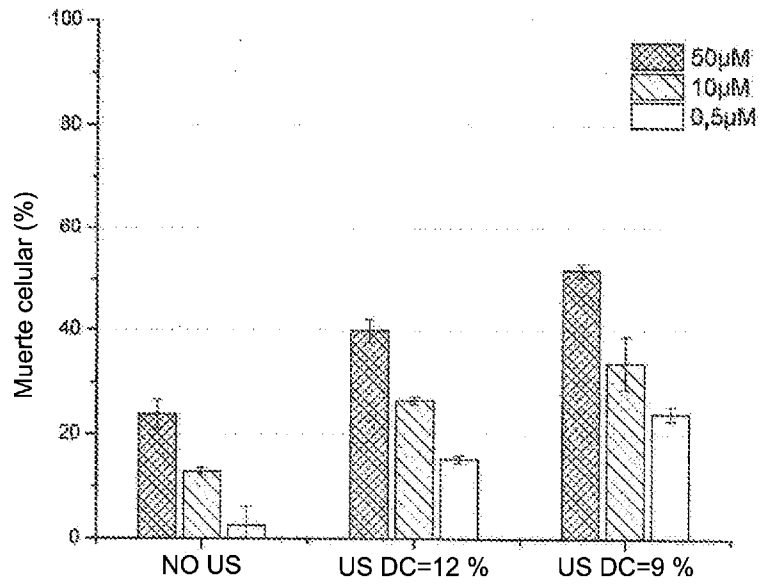


Figura 1b

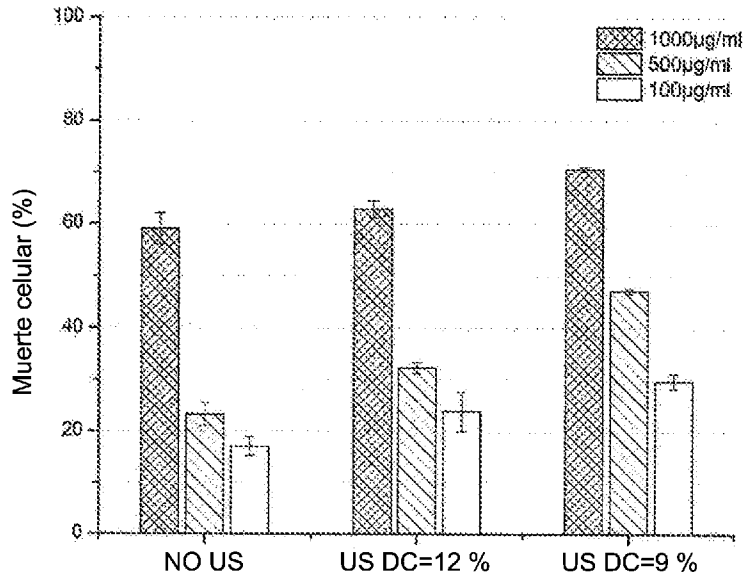


Figura 2a

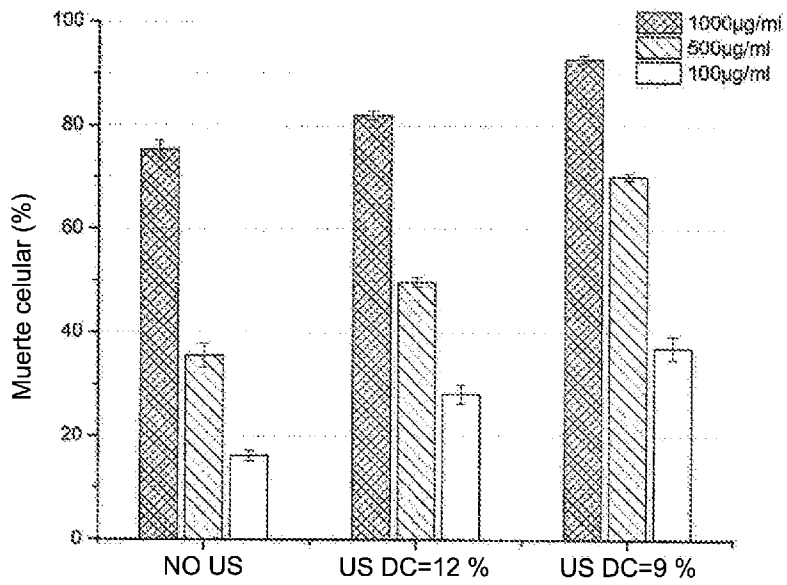


Figura 2b

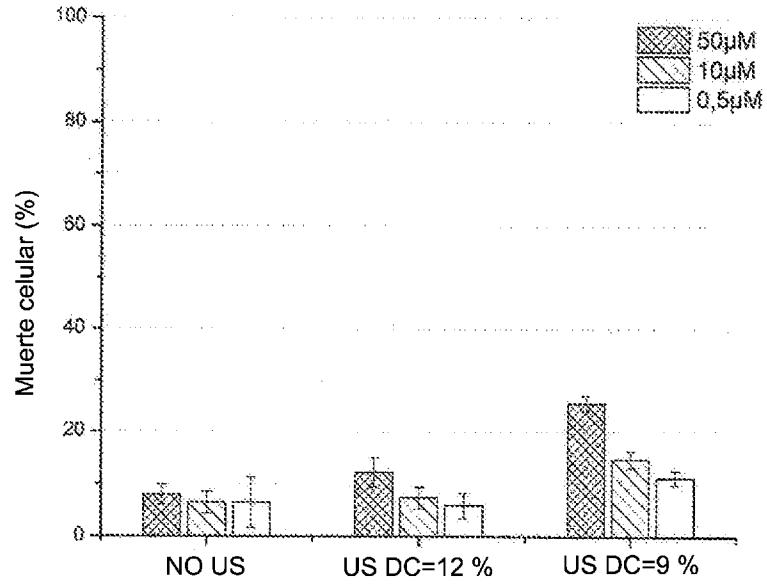


Figura 3a

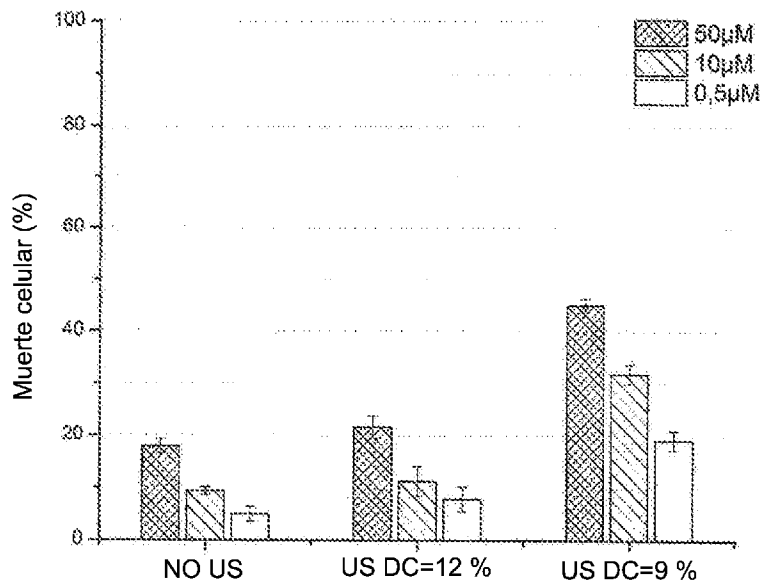


Figura 3b

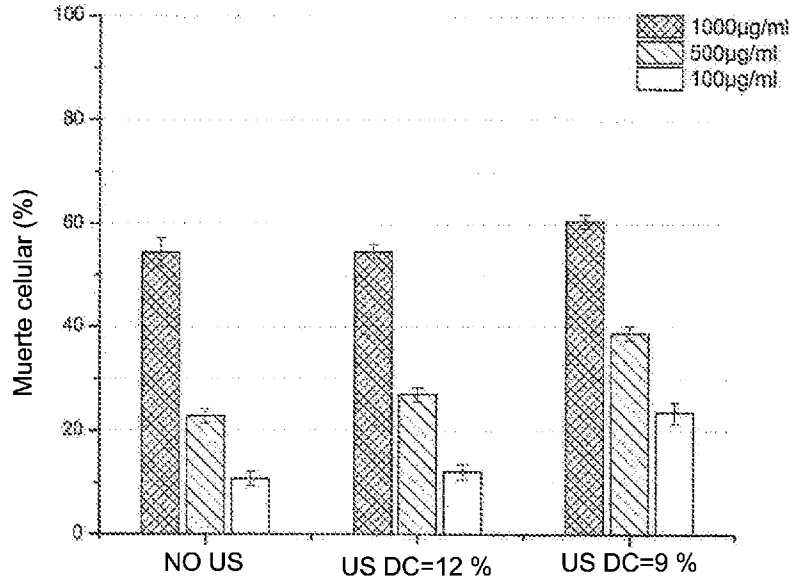


Figura 4a

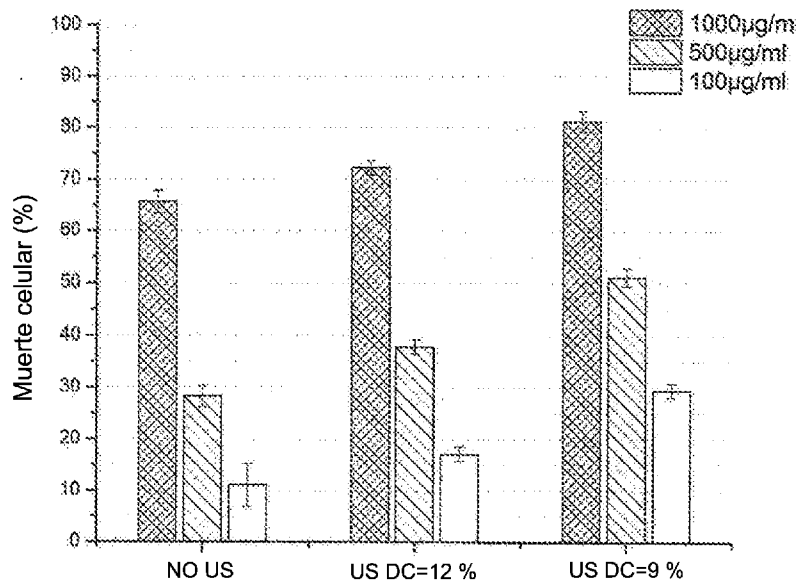


Figura 4b

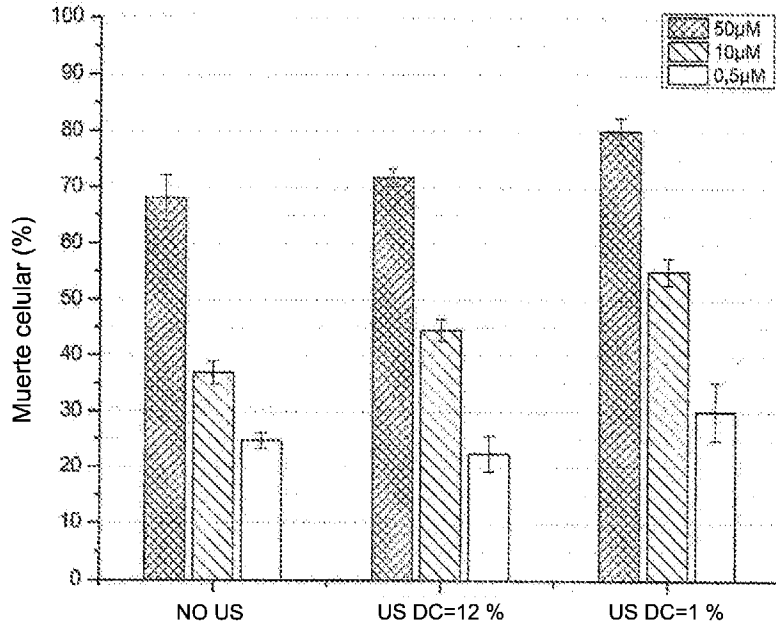


Figura 5a

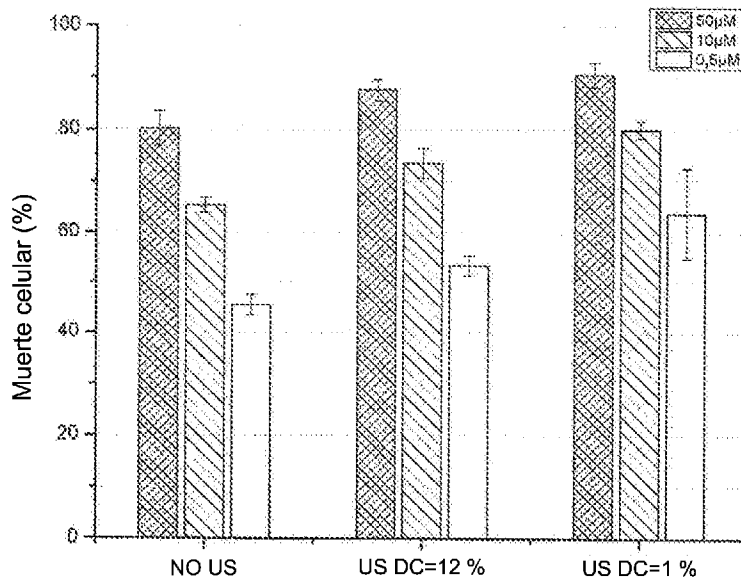


Figura 5b

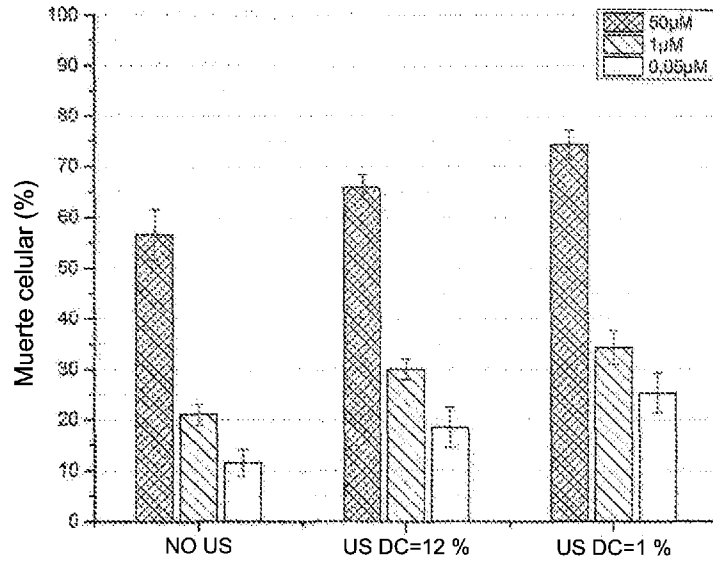


Figura 6a

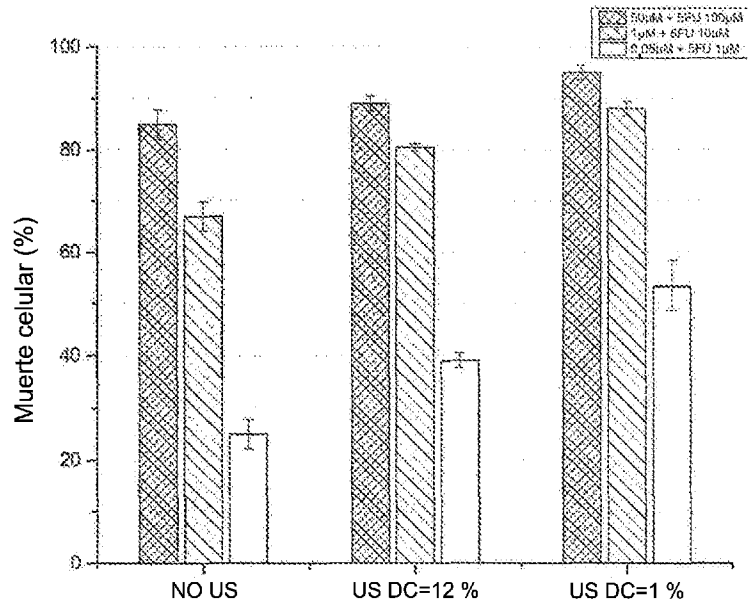


Figura 6b

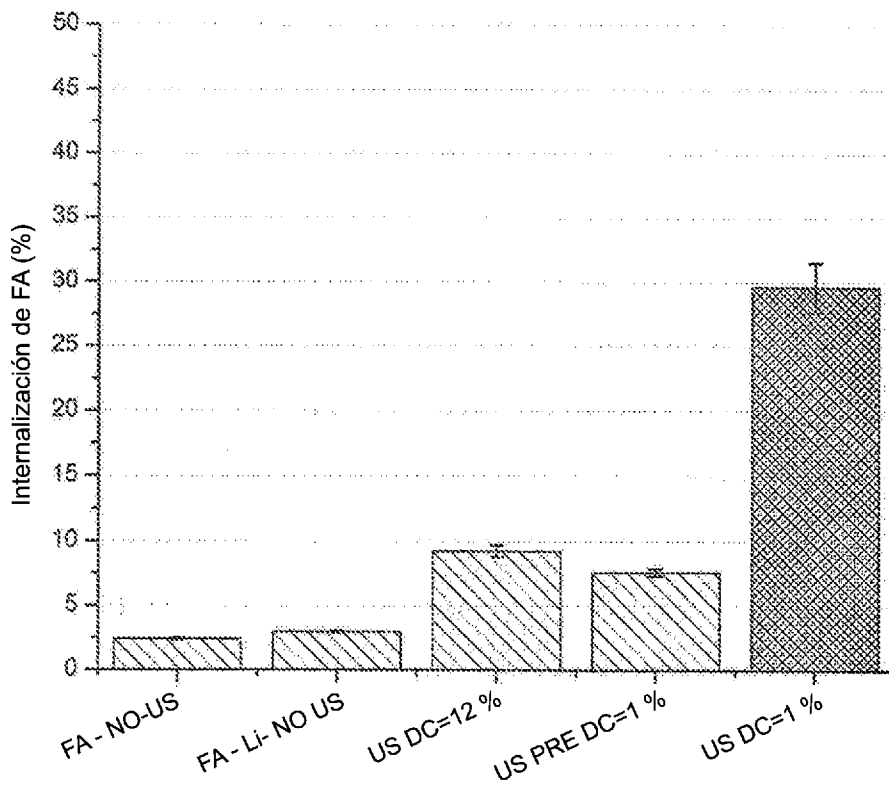


Figura 7

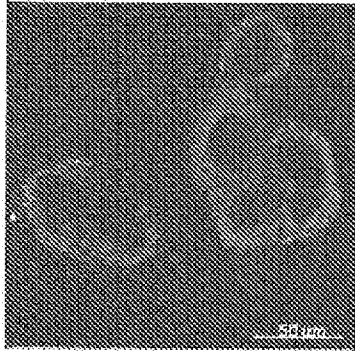


Figura 8a

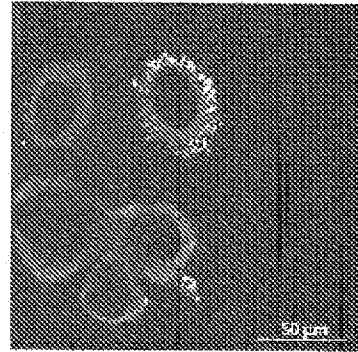


Figura 8b

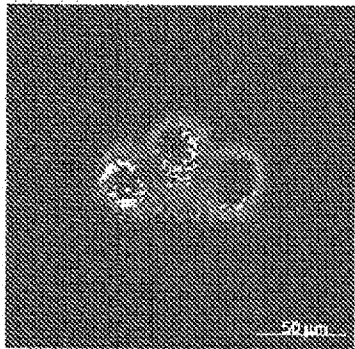


Figura 8c

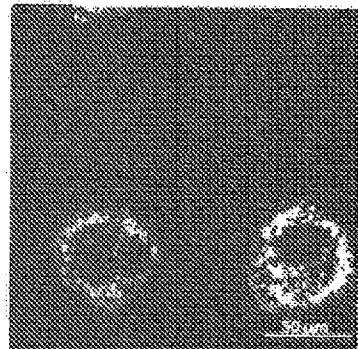


Figura 8d

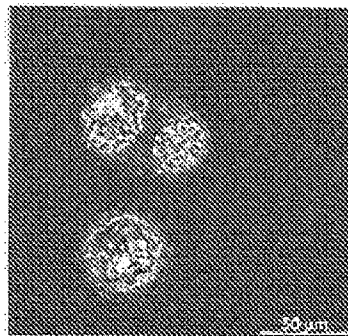
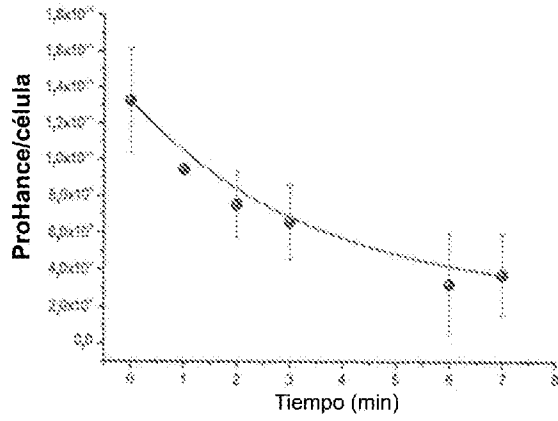
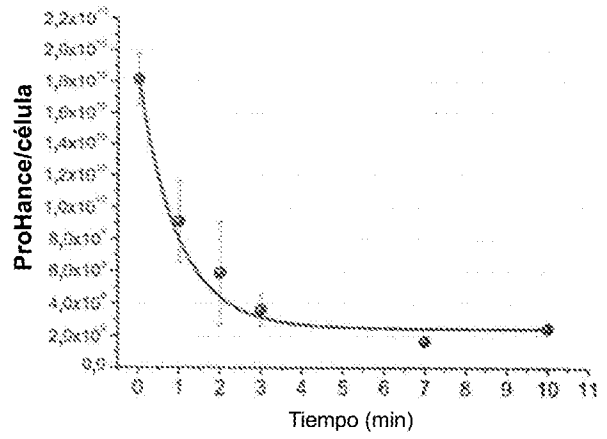


Figura 8e



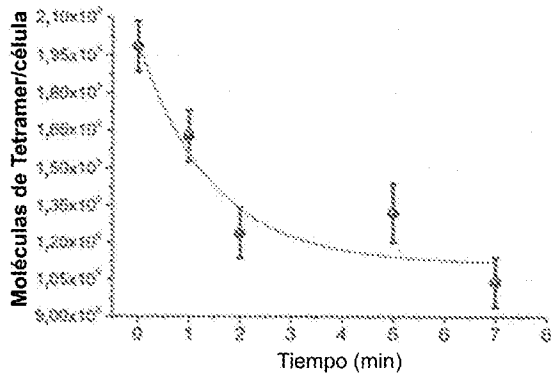
Hora de cierre: 6 min

Figura 9a



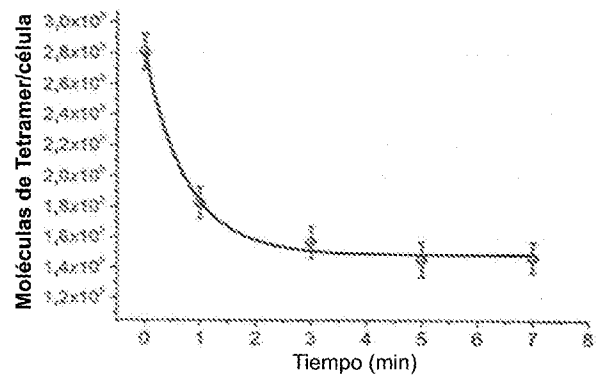
Hora de cierre: 3 min

Figura 9b



Hora de cierre: > 8 min

Figura 9c



Hora de cierre: 4 min

Figura 9d