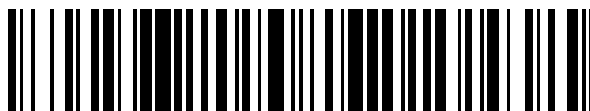


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 049**

51 Int. Cl.:

**A61N 7/02** (2006.01)

**A61M 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708168 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2822652**

54 Título: **Método para la determinación de parámetros optimizados de un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos enfocados en una región de interés**

30 Prioridad:

**08.03.2012 EP 12305278**

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

**03.10.2016**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (33.3%)  
y  
CENTRE LÉON BÉRARD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHAPELON, JEAN-YVES;  
LAFON, CYRIL y  
MESTAS, JEAN-LOUIS**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 585 049 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de parámetros optimizados de un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos enfocados en una región de interés

5

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la determinación de parámetros optimizados de un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés que puede ser una región dentro de un medio o una región en la interfaz entre un primer y un segundo fluido del medio.

10

De acuerdo con la presente invención, el medio puede ser cualquier medio que pueda propagar ondas de ultrasonidos. Por ejemplo, el medio puede ser un medio acuoso. El medio puede ser un medio acuoso encerrado en el interior de un tubo de ensayo o una cápsula de ensayo o cualquier dispositivo de ensayo. Por lo tanto, el medio es un medio *in vitro*.

15

De acuerdo con la presente invención, "una región de interés" indica una región que tiene un tamaño en todas las direcciones menor de 5 mm, y preferentemente menor de 2 mm. Esta región de interés puede estar dentro de un tumor, en particular un tumor canceroso, o pueden ser células almacenadas en un medio tal como un medio acuoso o cualquier medio de cultivo. El medio puede ser un medio de cultivo usado para experimentos *in vitro* sobre sustancias de interés antes de llevar a cabo los experimentos en condiciones *in vivo*.

20

Los métodos *in vivo* descritos no constituyen la invención.

25

De acuerdo con la presente invención, la redacción "un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés" significa que el dispositivo produce alrededor del punto focal P en el interior de la región de interés al menos un efecto elegido entre:

30

- un efecto de cavitación localizado en el interior de la región de interés localizada en el interior del medio,
- un efecto de fuente acústica simple localizado en la región de interés que está en la interfaz entre un primer y un segundo fluido del medio,
- un efecto de incremento térmico localizado en el interior de la región de interés en el interior del medio.

35

De acuerdo con el método, el dispositivo genera una intensidad de ultrasonidos localizada o, en otras palabras, genera una presión de ultrasonidos localizada alrededor del punto focal P en la región de interés.

De acuerdo con la presente invención, la relación "parámetros optimizados de un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés" son los parámetros de amplitud de las señales y las posiciones entre sí de los medios que generan dichos haces de ultrasonidos.

40

El medio es susceptible al fenómeno de cavitación. La cavitación es la creación o formación de burbujas de vapor en un medio en una región en la que la presión cae por debajo del umbral de presión, correspondiendo dicho umbral al denominado nivel de cavitación. Adicionalmente, dicho umbral de presión puede ser la presión de vapor de dicho medio o más alta que esta presión de vapor. Durante la cavitación, las burbujas de cavitación pueden oscilar dinámicamente. Entonces, las burbujas de cavitación pueden colapsar rápidamente, produciendo una onda de choque localizada en el medio, un incremento de la temperatura local, algunas tensiones mecánicas y/o efectos químicos. La cavitación puede producirse cuando el medio comprende algunos núcleos. La cavitación puede producirse también mediante la adición de microburbujas o burbujas dentro del medio, o mediante la adición de agentes de contraste para ultrasonidos.

45

50

Más aún, es bien conocido el uso de ondas de ultrasonidos para el suministro de una sustancia al interior de la región de interés. Más precisamente, es conocida la generación y el enfoque de un haz de ultrasonidos simple sobre un punto en el interior del medio (es decir el punto de actuación), de modo que produzca cavitación en el interior de una región alrededor de dicho punto de actuación y para hacer que un compuesto de liberación cambie desde un estado de mantenimiento en el que la sustancia está contenida por el compuesto de liberación a un estado de liberación en el que la sustancia es liberada por el compuesto de liberación.

55

La sustancia puede ser una sustancia química, una sustancia radiactiva, una sustancia colorante, un gel, un plásmido o un fármaco. Una sustancia puede estar contenida mediante un compuesto de liberación en un estado de contención cuando no hay cavitación en el interior del medio en la cercana proximidad al compuesto de liberación. En ese estado, la sustancia no está libre de moverse dentro del medio independientemente del compuesto de liberación, y no es capaz de activarse y reaccionar con otra sustancia en el interior del medio. La sustancia es liberada por el compuesto de liberación en un estado de liberación cuando hay cavitación en el medio en la cercana proximidad del compuesto de liberación. En ese estado, la sustancia es libre de moverse dentro del medio

60

65

independientemente del compuesto de liberación, y es capaz de activarse y combinar con otra sustancia.

Los compuestos de entrega son por lo tanto sensibles a la cavitación, y liberan la sustancia si está en la cercana proximidad a burbujas de cavitación. Cercana proximidad significa una distancia entre el compuesto de liberación y una burbuja de cavitación más pequeña de 1 mm. Las burbujas de cavitación se localizan en el interior de una región de interés del medio, es decir si la cavitación tiene lugar en el interior de dicha región de interés, el compuesto de liberación libera la sustancia sustancialmente en el interior de dicha región de interés. La sustancia es transportada a través del medio a la región de interés localizada en el interior de dicho medio y es liberada en el interior de dicha región de interés localizada y reducida. El compuesto de liberación puede considerarse como un medio de transporte y entrega para la sustancia en el interior del medio desde cualquier origen a la región de interés localizada. Son bien conocidos muchos compuestos de entrega. Pueden ser unas micropartículas o nanopartículas, y por ejemplo, un liposoma, una micela, o similares.

En otro caso, la sustancia puede liberarse sin un compuesto de liberación dentro de la región de interés del medio cuando hay cavitación en el interior de dicha región de interés del medio. Ciertamente, la sustancia puede ser sensible a la cavitación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "partículas" se refiere a una unidad física agregada de material sólido. Las partículas de acuerdo con la invención pueden ser micro o nanopartículas. Las micropartículas se entienden como partículas que tienen un diámetro medio  $d_{50}$  que varía de 500  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  y más preferentemente desde 100  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ , y el más preferente desde 10  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ . Las nanopartículas se entienden como partículas que tienen un diámetro medio  $d_{50}$  inferior a 1  $\mu\text{m}$  y notablemente variables entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 0,01  $\mu\text{m}$ . Tal como se usa en el presente documento, la expresión "diámetro medio  $d_{50}$ " se refiere al diámetro de partícula de modo que el 50 % del volumen o del número de la población de partículas tengan un diámetro más pequeño. Más específicamente, las micropartículas o nanopartículas pueden ser microesferas o microcápsulas, nanoesferas o nanocápsulas, respectivamente, que contienen una sustancia activa.

En particular, la generación de una intensidad de ultrasonidos (es decir presión de ultrasonidos) localizada en una región de interés, por ejemplo un tumor canceroso es bien conocido y muy interesante. Ciertamente, puede usarse para la entrega de fármacos en el interior de un cuerpo. El cuerpo es por ejemplo un cuerpo animal o un cuerpo humano. El fármaco puede entregarse en el interior del cuerpo preferentemente a una región predeterminada dentro del cuerpo (es decir la "región de interés"), y menos en cualquier otro lado. Más aún, la cantidad de fármaco necesaria para el tratamiento de la región predeterminada se reduce grandemente en comparación con métodos conocidos sin dicho método de entrega.

De ese modo, dicha aplicación tiene un gran interés para el tratamiento de tumores cancerosos. El fármaco es liberado por el compuesto de liberación solo en el interior del tumor. El tumor canceroso puede tratarse sin liberación del fármaco en cualquier otro lado en el interior del cuerpo. El fármaco es frecuentemente peligroso y tóxico para los órganos en el interior del cuerpo. Pueden evitarse por lo tanto muchos efectos secundarios indeseables de un tratamiento global del cuerpo.

Adicionalmente, la generación de una intensidad de ultrasonidos se usa para aplicaciones de sonoporación o transfección, en las que se transfieren plásmidos al interior de una célula. Para estas aplicaciones, la sustancia comprende al menos un plásmido. La sustancia puede ser un plásmido, un gen, o un injerto de plásmido en un liposoma. El punto focal P se sitúa cerca de al menos una célula. El fenómeno de cavitación libera la sustancia y abre simultáneamente la célula para transferir el plásmido al interior de la célula.

Para la generación de una intensidad de ultrasonidos en el interior de una región de interés del medio, es conocido el uso de un dispositivo que comprende un transductor para generar y para enfocar un haz de ultrasonidos simple sobre un punto de actuación en el interior de un medio, de modo que produzca cavitación en el interior de la región alrededor de dicho punto de actuación. Este método es satisfactorio, pero aún necesita ser mejorado.

En el documento WO 2008/018019, se divulga un dispositivo que comprende dos transductores que generan dos haces de ultrasonido que se enfocan. Sin embargo, no se optimiza la posición de los transductores ni las señales enviadas a los transductores. Los haces no se superponen con precisión sobre los puntos focales de los transductores acústicos.

Otro dispositivo ultrasónico adaptado para producir cavitación se describe en el documento US 6 428 532. Ciertamente, es importante tener en cuenta que cada transductor tiene una distancia focal acústica que es una distancia entre la superficie del transductor y un punto focal acústico en donde la presión de ultrasonidos en el medio tiene la mayor amplitud. Sin embargo, los transductores tienen un comportamiento no lineal. La distancia focal acústica depende de la amplitud de la señal proporcionada al transductor y, por ejemplo, la distancia focal acústica disminuye para señales de elevada amplitud.

El punto focal acústico del haz enfocado es el punto focal acústico efectivo, es decir el punto dentro del medio en el que la presión alcanza un valor máximo, es decir donde la potencia o intensidad acústica en el interior del medio

tiene un valor máximo.

Los transductores también tienen un punto focal geométrico. Estos puntos focales geométricos se localizan a una distancia focal geométrica predeterminada desde una superficie de cada transductor, produciendo dicha superficie la onda de ultrasonidos dentro del medio. El punto focal geométrico se define por las propiedades geométricas del transductor. Por ejemplo, para un transductor que tenga una superficie semiesférica, la distancia focal geométrica es sustancialmente igual al radio de curvatura de dicha superficie del transductor.

El punto focal acústico se localiza cerca del punto focal geométrico para una señal de pequeña amplitud proporcionada al transductor. Debido al comportamiento no lineal del transductor, este punto focal acústico se mueve hacia la superficie del transductor en relación a un incremento de la amplitud de la señal.

Un primer transductor que recibe una primera señal de una primera amplitud de modo que genere un primer haz de una primera onda de ultrasonidos en el interior del medio hacia una primera dirección del haz produce una primera zona de alta presión dentro de dicho medio, es decir una primera zona de máxima potencia o intensidad acústica. La primera zona está típicamente centrada sobre el primer punto focal acústico y tiene una forma alargada a lo largo de la primera dirección del haz. En caso de un transductor que tenga una frecuencia de 1 MHz, la primera zona es por ejemplo una región del medio que tenga una longitud de 13 mm en la primera dirección del haz y un ancho de 2 mm en direcciones ortogonales perpendiculares a la primera dirección del haz.

Un segundo transductor que recibe una segunda señal de una segunda amplitud de modo que genere un segundo haz de una segunda onda de ultrasonidos en el interior de un medio hacia una segunda dirección del haz, produce una segunda zona de alta presión en el interior del medio, es decir una segunda zona de máxima potencia o intensidad acústica. La segunda zona está centrada sustancialmente sobre el segundo punto focal acústico y tiene una forma alargada a lo largo de la segunda dirección del haz. La segunda zona es similar a la primera zona, y tiene por ejemplo el mismo tamaño que la primera zona, pero está alargado en la segunda dirección del haz.

En caso de un haz simple enfocado sobre un punto focal acústico, la primera zona corresponde a una región del medio en la que tiene lugar la cavitación si la primera señal s1 tiene una primera amplitud mayor que una amplitud predeterminada. La primera zona es bastante grande y alargada. Más aún, la cavitación en el interior de esta región no es estable: las burbujas de cavitación aparecen y colapsan en varias posiciones dentro del volumen. Estas posiciones de las burbujas de cavitación parecen moverse dentro de la región, y no están igualmente extendidas espacialmente en el interior de dicha región.

En el caso de haces dobles no coaxiales y confocales, la primera y segunda zonas intersectan en una región de interés alrededor del punto sobre el que se superponen entre sí el primer y segundo puntos focales acústicos, teniendo dicha región de interés un tamaño reducido en comparación con el tamaño de dicha primera zona o dicha segunda zona.

Es difícil entonces superponer con precisión los dos puntos focales acústicos de dos transductores separados (es decir enfocar los haces de ultrasonidos generados por dos transductores sobre el mismo punto focal P) y más precisamente superponerlos sobre un punto de actuación de la región de interés (es decir superponer el punto focal P sobre el punto de actuación de la región de interés).

En consecuencia los transductores deben moverse. Adicionalmente, para transductores no lineales y/o régimen acústico no lineal, el cambio de la amplitud de las señales influencia o modifica la posición de los puntos focales acústicos. Por lo tanto, dicho ajuste puede ser complejo en la práctica.

La presente invención supera las desventajas anteriormente detalladas proporcionando un método para la determinación de parámetros optimizados de un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés que puede ser una región en el interior de un medio o una región en la interfaz entre un primer y un segundo fluidos del medio, siendo dicha región de interés de volumen y tamaño reducidos.

Gracias a la optimización de los parámetros de acuerdo con el método de la presente invención, el al menos un efecto elegido entre:

- un efecto de cavitación localizado en el interior de la región de interés localizada en el interior del medio,
- un efecto de fuente acústica simple localizado en la región de interés que está en la interfaz entre un primer y un segundo fluido del medio,
- un efecto de incremento térmico localizado en el interior de la región de interés en el interior del medio,

que tienen lugar en dicha región de interés, es más estable que el efecto ocurrido sin la optimización del dispositivo que genera la intensidad de ultrasonidos localizada.

Un primer objeto de la presente invención es un método *in vitro* para la determinación de parámetros optimizados de

un dispositivo que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés que puede ser una región en el interior de un medio o una región en la interfaz entre un primer y un segundo fluidos del medio, de modo que dicho dispositivo produzca alrededor del punto focal P en el interior de la región de interés al menos un efecto elegido entre:

- 5
- un efecto de cavitación localizado en el interior de la región de interés localizada en el interior del medio,
  - un efecto de fuente acústica simple localizado en la región de interés que está en la interfaz entre un primer y un segundo fluido del medio,
  - un efecto de incremento térmico localizado en el interior de la región de interés en el interior del medio,

10

comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) proporcionar un dispositivo que comprende:

- 15
- al menos dos generadores de señal que generan respectivamente una primera señal s1 que tiene una amplitud a1 y una segunda señal s2 que tiene una amplitud a2,
  - al menos dos medios de ultrasonidos, estando adaptados dichos al menos dos medios de ultrasonidos respectivamente:
- 20
- para recibir la primera señal s1 de modo que genere un primer haz B1 de una primera onda de ultrasonidos en el interior del medio hacia una primera dirección del haz D1, estando enfocado dicho primer haz B1 sobre un primer punto focal acústico P1a en el interior de dicha región de interés,
  - para recibir la segunda señal s2 de modo que genere un segundo haz B2 de una segunda onda de ultrasonidos en el interior del medio hacia una segunda dirección del haz D2, estando enfocado dicho segundo haz B2 sobre un segundo punto focal acústico P2a en el interior de dicha región de interés,
- 25
- al menos un medio de detección del al menos un efecto,

b) posicionar los al menos dos medios de ultrasonidos entre sí de modo que la primera y segunda direcciones D1, D2 sean sustancialmente coplanares e inclinadas relativamente entre sí en un ángulo comprendido entre 60° y 120°,

30 c) mover los al menos dos medios de ultrasonidos respectivamente en al menos dos desplazamientos x1, x2 de modo que se detecte al menos un efecto en el interior de la región de interés alrededor del punto focal P sobre el que se superponen el primer y el segundo puntos focales acústicos P1a y P2a y no se detecte fuera de la región de interés,

35 d) reducir la amplitud a1, a2 de las señales s1, s2 hasta un nivel de amplitud en el que el al menos un efecto no se detecte,

e) mover los al menos dos medios de ultrasonidos a una pluralidad de posiciones de ensayo, correspondiendo cada una de dichas posiciones de ensayo a dicha posición de los medios de ultrasonidos a la que al menos uno de los medios de ultrasonidos se ha movido mediante un incremento de desplazamiento D,

40 f) si el al menos un efecto se detecta en una de las posiciones de ensayo en la etapa e) alrededor del punto focal P sobre el que se superponen el primer y segundo puntos focales acústicos P1a y P2a, seleccionar dicha posición de ensayo para que sea la posición del medio de ultrasonidos, y repetir las etapas d) y e),

g) determinar y registrar los parámetros optimizados del dispositivo que son las amplitudes a1, a2 de las señales s1, s2 y la posición x1, x2 de los medios de ultrasonidos ajustados antes de la última reducción en la etapa d).

45 De acuerdo con el método de la invención, la región tiene un tamaño en todas las direcciones menor de 5 mm, y preferentemente menor de 2 mm. El tamaño de la región de interés depende de las frecuencias de las ondas de ultrasonidos de las señales. Si las frecuencias son bajas, la zona focal es grande. Ciertamente, el tamaño de la zona focal es proporcional a la longitud de onda.

50 El método de acuerdo con la presente invención es proporcionar parámetros específicos y optimizados de modo que tengan un efecto en el interior de la región de interés que pueda ser un efecto acústico tal como el efecto de cavitación y de modo que todos los puntos focales acústicos de los medios de ultrasonidos se superpongan (es decir, los haces de ultrasonidos se enfoquen sobre un punto focal P).

55 Con este fin, se ajustan la primera y segunda señales para tener una amplitud que sea mínima para generar el efecto de cavitación, y los medios de ultrasonidos deben posicionarse también y simultáneamente para superponer todos los puntos focales acústicos para esa amplitud mínima de las señales. El efecto de cavitación se localiza entonces en el interior de la región del medio, alrededor del punto de intersección de las direcciones de los haces D1, D2 (es decir alrededor de la superposición de los puntos focales acústicos). El efecto de cavitación no se localiza en el exterior de dicha región de interés.

60

La idea de la invención es que, para estos parámetros optimizados:

- 65
- un pequeño cambio de las posiciones de los medios de ultrasonidos cancelará el efecto; y
  - una pequeña reducción de la amplitud de las señales cancelará el efecto en la región del medio que pueda tener un efecto acústico. En ese caso, el efecto acústico tiene lugar solo en el interior de una región de interés que

tenga un mínimo tamaño.

Gracias al método de acuerdo con la presente invención, la región de interés tiene un volumen y tamaño reducidos. El efecto que puede ser un efecto acústico (es decir un efecto de cavitación) se localiza solo en el interior de la región de interés y no fuera de esta región de interés. Más aún, el efecto en el interior de la región de interés es más estable.

Los ensayos realizados con un dispositivo tal como se ha descrito anteriormente confirmaron que la región de interés en la que se produce la cavitación es una pequeña región que tiene un tamaño de aproximadamente 2 mm x 2 mm x 2 mm en tres direcciones ortogonales (X, Y, Z). Dicha región de interés que tiene burbujas de cavitación puede observarse con un transductor de imagen en una posición relativa al dispositivo que es estable, no moviéndose durante el tiempo. En el interior de dicha región de interés, las burbujas de cavitación tienen en la duración de tiempo una densidad constante y se extienden uniformemente dentro de la región de interés. Fuera de la región de interés, no se observa cavitación.

Gracias al método de acuerdo con la presente invención, los parámetros (es decir las señales proporcionadas a los medios de ultrasonidos y las posiciones de los medios de ultrasonidos entre sí) se ajustan con precisión para superponer los puntos focales acústicos de los medios de ultrasonidos (es decir para enfocar los haces de ultrasonidos sobre un punto focal P) de modo que se tenga un efecto acústico (por ejemplo un efecto de cavitación) en el interior de una región alrededor del punto de intersección y con una amplitud mínima de las señales.

El efecto de cavitación es en sí mismo no lineal: aparece bruscamente si los parámetros se ajustan adecuadamente, y desaparece bruscamente si los parámetros no se ajustan adecuadamente. Gracias a este comportamiento, puede elaborarse un método iterativo para hallar los mejores valores de parámetros optimizados (señales y posiciones de los medios de ultrasonidos).

Los al menos dos medios de ultrasonidos pueden separarse entre sí. Esto es necesario para tener un volumen entre ellos que sea suficiente para colocar una muestra de ensayo. Por ejemplo, los medios de ultrasonidos se separan en una distancia mayor de 50 mm. Esta distancia puede ser mayor de 100 mm.

El dispositivo puede comprender al menos dos órganos de desplazamiento que se adapten para mover los al menos dos medios de ultrasonidos relativamente entre sí, en particular a una posición determinada por los al menos dos desplazamientos, siendo dichos desplazamientos a lo largo de diferentes direcciones de desplazamiento.

En el caso de dos medios de ultrasonidos, el dispositivo solo necesita dos órganos de desplazamiento para superponer el primer y el segundo puntos focales acústicos P1a, P2a. Generalmente, si las direcciones de los haces son coplanares, para superponer todos los puntos focales acústicos, el dispositivo necesita incluir un número de órganos de desplazamiento que sea igual a  $2 \cdot (N-1)$ , en donde N es el número de transductores.

De acuerdo con el método de la invención, en la etapa c), las direcciones de desplazamiento de los medios de ultrasonidos pueden ser perpendiculares a una de las direcciones de los haces.

Preferentemente, los medios de ultrasonidos son transductores. Los transductores pueden ser transductores de ultrasonidos enfocados de alta intensidad (HIFU). Dichos transductores tienen la capacidad de generar un alto nivel de potencia acústica, y tienen la capacidad de generar muy pequeña presión y cavitación en el medio.

Los medios de detección del al menos un efecto que comprende el dispositivo puede ser un sensor. Por ejemplo, puede ser un sensor que detecte el efecto de cavitación dentro del medio. El sensor puede ser un sensor hidrofónico, un sensor piezoeléctrico, un sensor hidrofónico de fibra óptica, un sensor de cámara, o cualquier tipo de sensor conocido adaptado para detectar la cavitación.

De acuerdo con una realización del método de la presente invención, las etapas b) a g) pueden ejecutarse mediante una unidad de control que incluye el dispositivo. La unidad de control puede tener en cuenta una pluralidad de diversos factores que pueden influir en los valores de los parámetros optimizados predeterminados o distancias focales predeterminadas. Por ejemplo, el factor puede ser la naturaleza del medio, la temperatura del medio, la temperatura del transductor.

El medio puede ser heterogéneo y su naturaleza puede variar. Por ejemplo, si el medio es un cuerpo, comprende huesos y tejidos de diferente naturaleza. Los diferentes haces pueden atenuarse y desenfocarse de diferentes formas como consecuencia de esta heterogeneidad del medio. Esto puede dar como resultado un cambio de la superposición de los puntos acústicos focales que puede ser tenido en cuenta.

De ese modo, el método de la invención puede comprender una etapa adicional que tenga en cuenta la atenuación de los haces de ultrasonidos y la variación de la velocidad del sonido a lo largo de los haces de ultrasonidos. Más precisamente, el método puede comprender una etapa adicional de cálculo de:

- el coeficiente de atenuación de cada uno de los haces de ultrasonidos, y
- la variación de la velocidad del sonido en cada uno de los haces de ultrasonidos,

5 de modo que se los tenga en cuenta para la superposición de los puntos focales acústicos sobre el mismo punto focal P.

10 El dispositivo puede comprender adicionalmente un medio de creación de imagen que cree imágenes del medio para determinar la región de interés dentro del medio. Estos medios de creación de imagen pueden ser un tercer medio de ultrasonidos adaptado para producir imágenes acústicas del medio. El tercer medio de ultrasonidos produce una imagen del medio para definir una región de interés en el interior de dicho medio. Las imágenes producidas con el transductor de imagen se usan para visualizar el medio y localizar las burbujas de cavitación dentro del medio. Estas imágenes pueden usarse para determinar la primera y segunda amplitudes de señal para controlar el nivel de cavitación, en una forma como un en bucle cerrado controlado. El transductor de imagen puede ser un transductor que tenga una frecuencia nominal de 5 MHz y que comprenda una matriz multielemento de elementos piezoeléctricos.

20 El dispositivo puede comprender adicionalmente un medio de control para mover secuencialmente el punto focal P a una pluralidad de puntos determinados en el interior de dicha región de interés de modo que se controle el efecto (por ejemplo la cavitación) dentro de dicha región de interés. Cada punto determinado en el interior de la región de interés puede controlarse con un tiempo transcurrido predeterminado o intensidad predeterminada de dicho primer y segundo haces.

25 De ese modo, en una realización de la invención, antes de la etapa b), el método comprende una etapa adicional de creación de imagen del medio para determinar la región de interés en el interior del medio.

Más aún, el método de la invención puede llevarse a cabo para enfocar los haces de ultrasonidos sobre una pluralidad de puntos determinados (es decir una pluralidad de puntos de actuación) en el interior de la región de interés mediante el movimiento secuencialmente del punto focal P a esta pluralidad de puntos determinados.

30 En otras palabras, en una realización de la invención, los al menos dos medios de ultrasonidos pueden moverse para mover secuencialmente los puntos focales acústicos superpuestos P1a, P2a a una pluralidad de puntos de actuación predeterminados en el interior de la región de interés dentro del medio. La región de interés puede determinarse mediante una imagen producida por el transductor de creación de imagen.

35 En otra realización de la invención, si el dispositivo comprende órganos de desplazamiento, los órganos de desplazamiento pueden mover los medios de ultrasonidos para mover secuencialmente los puntos focales acústicos superpuestos P1a, P2a a una pluralidad de puntos de actuación predeterminados dentro de una región de interés dentro del medio. La región de interés puede determinarse mediante una imagen producida por el transductor de creación de imagen.

40 Es bien entendido que los puntos focales acústicos P1a, P2a pueden moverse mediante el movimiento del primer y segundo medios de ultrasonidos (transductores) con relación al medio o mediante el movimiento del medio en relación a los medios de ultrasonidos.

45 La unidad de control del dispositivo puede comprender dispositivos mecánicos adicionales para mover el medio o una parte del medio con relación a los medios de ultrasonidos. Por ejemplo, los dispositivos mecánicos pueden comprender accionadores de desplazamiento de acuerdo con una, dos o una pluralidad de direcciones lineales o una, dos u otra pluralidad de direcciones rotacionales, o cualquier combinación de direcciones lineales o rotacionales. Por ejemplo, los dispositivos mecánicos comprenden tres accionadores de desplazamiento de acuerdo con tres direcciones ortogonales X, Y, Z.

55 Alternativamente los medios de ultrasonidos pueden tener la capacidad de producir un haz móvil de ondas de ultrasonidos, teniendo un haz enfocado a un punto focal que tenga una posición controlada en el interior del medio, sin el movimiento de ninguna pieza mecánica. Dicha técnica es bien conocida y usa la tecnología de formación del haz con un medio de ultrasonidos que tenga una pluralidad de transductores, cada uno de ellos precisamente controlado de acuerdo con un algoritmo de formación del haz.

60 En otras realizaciones, el dispositivo puede comprender más de dos medios de ultrasonidos para generar una pluralidad que haces que se intersectan cuyos puntos focales acústicos se intersectan sobre un punto focal P localizado en el interior de la región de interés. La región tiene por lo tanto un tamaño más reducido y la cavitación en el interior de esta región se incrementa y es más estable.

65 El ángulo  $\alpha$  puede estar comprendida entre  $60^\circ$  y  $120^\circ$ . De acuerdo con los experimentos realizados, este intervalo de ángulo da el tamaño más reducido de región de interés. Para un intervalo de ángulo entre  $90^\circ$  y  $110^\circ$  los presentes inventores descubrieron que el cruce del primer y segundo haces B1, B2 genera adicionalmente un fenómeno de interferencia que parece estabilizar la posición de las burbujas de cavitación en el interior de la región

de interés. Dicho intervalo es preferido.

5 Puede ser útil un ángulo reducido para tener más de dos medios de ultrasonidos en el dispositivo, para definir una forma más precisa de la región de interés, para reducir el tamaño de la región de interés y para estabilizar mejor las burbujas en el interior de dicha región de interés.

10 En una realización de la invención, el ángulo  $\alpha$  puede variarse durante el transcurso del método. Más precisamente, el método de la invención puede comprender una etapa adicional de variación del ángulo entre las direcciones del haz. Esta etapa de variación del ángulo puede llevarse a cabo después de la etapa g) y antes de repetir las etapas c) a g) hasta la determinación de los parámetros más optimizados del dispositivo.

Esto tiene las siguientes ventajas:

- 15
- definir más precisamente alrededor del punto de actuación una región de interés en la que tiene lugar al menos un efecto, siendo dicha región de interés más pequeña y más estable.
  - ser una solución para superar los problemas de atenuación de los haces de ultrasonidos y la variación de la velocidad del sonido a lo largo de los haces de ultrasonidos en caso de un medio heterogéneo, que se detallaron anteriormente.

20 Ciertamente, puede ser particularmente ventajoso adaptar el ángulo  $\alpha$  de acuerdo con la naturaleza del medio de modo que se evite tanto como sea posible esta atenuación y esta variación de la velocidad del sonido. Por ello, los parámetros utilizados se definen más precisamente gracias a la variación del ángulo.

25 La primera señal  $s_1$  tiene una amplitud ajustada de modo que el primer haz no induce la cavitación cerca del punto focal acústico P1a en ausencia del segundo haz. Recíprocamente, la segunda señal  $s_2$  tiene una amplitud ajustada de modo que el segundo haz no induce la cavitación cerca del punto focal acústico P2a en ausencia del primer haz. Pero, la amplitud de la primera y segunda señales se ajustan de modo que induzcan la cavitación en el interior de la región de interés alrededor de los puntos focales acústicos superpuestos P1a, P2a cuando ambos haces están presentes o al menos cuando ambas de la primera y segunda ondas llegan al interior de dicha región de interés del medio.

30

La primera y segunda señales pueden incluir la misma o diferentes frecuencias, para producir respectivamente primeras y segundas ondas de ultrasonidos. Normalmente, las señales y ondas tienen frecuencias principales comprendidas entre 100 kHz y 10 MHz. Preferentemente, estas frecuencias están comprendidas entre 0,2 MHz y 1,5 MHz.

35

La primera señal  $s_1$  y la segunda señal  $s_2$  pueden ser señales continuas en el tiempo, o señales de ráfagas o una combinación de señales continuas y de ráfagas sinusoidales. Estas señales comprenden por ejemplo una onda sinusoidal o una pluralidad de ondas sinusoidales o cualquier otra onda.

40

En caso de una primera y segunda señales de ráfagas, la unidad de control puede comprender el dispositivo que sincroniza estas primera y segunda señales de modo que la primera y segunda ondas lleguen cerca del punto sobre el que se superponen el primer y segundo puntos focales acústicos (es decir el punto focal P) al mismo tiempo. Las ondas suman sus amplitudes. La amplitud de la presión local (potencia o intensidad acústica) puede incrementarse.

45

La primera y segunda señales pueden tener amplitudes iguales. El método de la invención es por lo tanto más fácil de implementar.

50 Las amplitudes  $a_1$ ,  $a_2$  de la primera y segunda señales  $s_1$ ,  $s_2$  pueden definirse mediante muchas fórmulas matemáticas diferentes. Si  $a_1$  es la amplitud de la primera señal  $s_1$ , y si  $a_2$  es la amplitud de la segunda señal  $s_2$ , la amplitud  $a$  de ambas señales puede definirse mediante la siguiente fórmula (I):

$$a = [(a_1^2 + a_2^2) / 2]^{1/2} \quad (I)$$

55 Cada método conocido para la normalización, ecuilibración de las señales puede aplicarse para definir una amplitud de la primera y segunda señales. Estas definiciones pueden aplicarse también a un número ilimitado de señales.

60 El método de acuerdo con la presente invención puede refinarse mediante la implementación de un proceso iterativo en la etapa d). Las amplitudes  $a_1$ ,  $a_2$  de las señales  $s_1$ ,  $s_2$  proporcionadas a los medios de ultrasonidos se reducen etapa a etapa mediante el proceso iterativo, en el que en cada bucle la amplitud se actualiza mediante la fórmula siguiente (II):

$$\text{amplitud} = \text{amplitud} / k \text{ y } 1 < k < 2 \quad (II)$$

65 en la que  $k$  es un factor de reducción para disminuir la amplitud de las señales. El factor de reducción puede ser un valor menor que 1,5 y preferentemente menor que 1,1. La amplitud determinada de las señales es por lo tanto



precisa.

De ese modo, la etapa b) se implementa mediante un proceso iterativo, en el que la amplitud de las señales se reduce en cada bucle mediante una división de la amplitud previa con un factor de reducción  $k$  que tiene un valor comprendido entre uno y dos, siendo repetido dicho bucle hasta que no se detecte al menos un efecto.

Los parámetros optimizados pueden predeterminarse, por ejemplo con experimentos sobre el dispositivo, y almacenarse directamente en el interior de una memoria de la unidad de control que incluye el dispositivo.

Los parámetros optimizados pueden determinarse a través de distancias focales predeterminadas de un medio de ultrasonidos para una pluralidad de amplitudes de señal proporcionada a dichos medios de ultrasonidos. Las distancias focales de tanto el primer como del segundo medio de ultrasonidos pueden almacenarse en la memoria.

Los parámetros optimizados pueden determinarse a partir de un modelo matemático de la distancia focal de un medio de ultrasonidos respecto a la amplitud de una señal proporcionada a dicho medio de ultrasonidos que incluye el dispositivo.

Una posición de ensayo puede corresponder a la posición previa de los transductores  $x_1$ ,  $x_2$  en la que solo uno o cualquier combinación del primer o segundo desplazamientos se incrementa o reduce por el incremento de desplazamiento  $D$ .

Por ejemplo, si el primer desplazamiento de la posición de ensayo se denota por  $x_1'$ , y si el segundo desplazamiento de la posición de ensayo se denota por  $x_2'$ , podemos tener cualquier combinación de:

$$x_1' = x_1 + D;$$

$$x_1' = x_1 - D;$$

$$x_2' = x_2 + D;$$

$$x_2' = x_2 - D;$$

Estas posiciones de ensayo permiten ensayar si hay un efecto acústico en cualquier posición alrededor de la última o previa posición del medio de ultrasonidos. Este es un procedimiento de búsqueda de la posición óptima, ejecutado para una nueva amplitud en cada bucle de etapas d) y e).

Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención es la búsqueda de los parámetros óptimos que producen la intensidad de ultrasonidos localizada en el interior de una región del medio o en la interfaz entre un primer y un segundo fluidos del medio para la mínima amplitud de las señales. Este método de búsqueda se ejecuta con señales reales y desplazamientos de los medios de ultrasonidos y es por lo tanto muy preciso.

El método de acuerdo con la presente invención puede refinarse haciendo entre la etapa f) y g) una etapa en la que: si el incremento de desplazamiento  $D$  no es más bajo o igual que un incremento de desplazamiento mínimo  $D_{\min}$ , el incremento de desplazamiento  $D$  se reduce y las etapas d) y e) del método se repiten. Gracias a esta característica, puede determinarse una posición de ensayo óptima más precisa del primer y segundo medios de ultrasonidos (valores más precisos del primer y segundo desplazamientos  $x_1$ ,  $x_2$ ). Dicho incremento de desplazamiento mínimo  $D_{\min}$  puede ser igual a 0,1 mm, y preferentemente igual a 0,05 mm. El incremento de desplazamiento  $D$  puede ser igual a 0,5 mm, y preferentemente igual a 0,1 mm. La posición de ensayo determinada es por lo tanto precisa.

De acuerdo con el método de la invención, el efecto puede ser un efecto térmico localizado en el interior de la región de interés en el interior del medio. El efecto térmico puede detectarse y/o medirse mediante un sensor térmico, tal como un sensor de cámara térmica, o material sensible a la temperatura. Por ejemplo, puede usarse una lámina de material absorbente que cambia su color localmente en respuesta a un cambio local de la temperatura. Dicho material puede usarse en la superficie  $S$  o en el plano de los haces, y eventualmente en combinación con una cámara óptica. El efecto térmico es un incremento local de la temperatura, por ejemplo durante una duración específica.

Por ello, el dispositivo y el método divulgados anteriormente pueden usarse para termoablación o tratamiento térmico en el interior de un medio *in vitro* o *in vivo*. Dicha hipertermia se usa adecuadamente para tratamiento del cáncer.

El método de la invención mejora la hipertermia, dado que la región de interés tratada tiene un tamaño más reducido.

Dicho incremento térmico puede detectarse fácilmente. Ciertamente, puede determinarse un cambio de temperatura en comparación con los valores de temperatura previos, o con un valor medio. Un cambio relevante de la

temperatura debido a la intensidad de ultrasonidos concentrada en el interior de la región de interés puede ser mayor que un umbral, por ejemplo un umbral de 1 °C o 0,5 °C.

5 El incremento térmico local en los puntos focales acústicos se usa entonces para determinar experimentalmente la posición exacta de los puntos focales acústicos P1a, P2a, y para implementar el método de la invención.

10 El efecto térmico tiene la ventaja de una superposición más precisa de los puntos focales acústicos. Ciertamente, el calentamiento del medio se vincula a una parte positiva de la onda de ultrasonidos. En caso de un régimen no lineal, la parte positiva de la onda de ultrasonidos contiene muy altas frecuencias ("ondas de choque") que se concentran sobre el punto focal P. Ciertamente, el tamaño de la zona focal es proporcional a la longitud de onda.

De acuerdo con el método de la invención, el efecto puede ser un efecto de fuente acústica simple en la interfaz entre un primer y un segundo fluido del medio.

15 Más precisamente, cada uno del primer y segundo haces B1, B2, genera una presión de radiación acústica en el interior del medio. Cada presión de radiación acústica puede generar un efecto acústico en la superficie del líquido, denominado fuente acústica. Pueden proyectarse algunas gotas de líquido en el aire por encima de la superficie del fluido desde los puntos de interfaz, respectivamente en el primer punto de interfaz A1 y en el segundo punto de interfaz A2.

20 Una fuente acústica simple tiene lugar en caso de un nivel de líquido específico para el que ambas fuentes acústicas se superponen: solo es visible una fuente acústica.

25 Este efecto de fuente acústica puede usarse para determinar la posición exacta del primer y segundo puntos de interfaz A1, A2, es decir las posiciones del primer y segundo haces B1, B2.

30 Este efecto de fuente acústica puede detectarse fácilmente mediante un sensor óptico, por ejemplo un sensor de cámara. Este puede usarse para determinar la posición exacta del primer y segundo puntos de interfaz A1, A2, es decir las posiciones del primer y segundo haces B1, B2 y el caso de que el primer y segundo puntos de interfaz A1, A2 se superponen de modo que tiene lugar un efecto de fuente acústica simple. Adicionalmente, la unidad de control del dispositivo puede procesar las imágenes desde la cámara para detectar el efecto de fuente acústica. En consecuencia, el método general de la invención puede aplicarse usando el efecto de fuente acústica.

35 De acuerdo con varios aspectos, el método de la invención se adapta particularmente y es más eficiente para la entrega de una sustancia en el interior de un medio, siendo la sustancia contenida por un compuesto de liberación en un estado de contención. La sustancia y el compuesto de liberación pueden ser los divulgados anteriormente. Por ejemplo, el compuesto de liberación se elige en la lista de nanopartículas y micropartículas. En otra realización, el compuesto de liberación se elige en la lista de liposomas y micelas.

40 En otra realización de la invención, el método de la invención está adaptado particularmente y es más eficiente para la entrega de una sustancia en el interior de una región de interés de un medio sin un compuesto de liberación cuando hay cavitación en el interior de dicha región de interés del medio. Ciertamente, la sustancia puede ser sensible a la cavitación. Por ello, puede no ser necesario el compuesto de liberación. El método de la invención puede usarse para la entrega de una sustancia en el interior de la región de interés (es decir un punto de actuación, por ejemplo en el interior de un tumor) del medio sin ningún compuesto de liberación. El uso del compuesto de liberación no es obligatorio.

50 Como se ha explicado anteriormente, la generación y enfoque de una pluralidad de haces de ultrasonidos sobre un punto en el interior de una región de interés dentro del medio (es decir un punto de actuación) produce cavitación en el interior de la región de interés alrededor de dicho punto de actuación y hace que un compuesto de liberación cambie desde un estado de contención en el que la sustancia está contenida por el compuesto de liberación, a un estado de liberación en el que la sustancia es liberada por el compuesto de liberación.

55 Gracias al método de la invención que determina parámetros optimizados para el enfoque de los haces de ultrasonidos sobre un punto focal P de modo que induzca una cavitación en el interior de la región de interés, es decir alrededor del punto de actuación, esta región de interés en la que se libera y entrega la sustancia tiene un volumen y tamaño reducidos. Más aún, los inventores han observado que la cavitación en el interior de la región es más estable.

60 Por ello, el método de la invención tiene la ventaja de que la cantidad de fármaco inyectado en el interior del cuerpo es mucho más pequeña que la cantidad para métodos conocidos.

65 En una realización de la invención, el método se usa para la entrega de una sustancia que comprende al menos un plásmido y el medio es un medio acuoso que comprende células. Por ello, el punto de actuación se sitúa cerca de al menos una célula, de modo que la cavitación libere la sustancia y abra una célula para transferir el plásmido al interior de dicha célula. El método de la invención puede usarse para aplicaciones de sonoporación o transfección,

en las que se transfiere un plásmido al interior de la célula. Estas aplicaciones son aplicaciones *in vitro*.

La sonoporación pueden ser aplicaciones *in vitro* o *in vivo* para la entrega de plásmidos.

- 5 En otra realización de la invención, la sustancia es un fármaco dirigido a ser entregado a un tumor en el interior de dicho medio. El punto de actuación se posiciona en el interior de dicho tumor.

10 En otra realización de la invención, el dispositivo divulgado anteriormente y el método de la invención pueden usarse para destruir células de grasa o adipocitos, en el interior del cuerpo. El método de la invención puede usarse para la entrega de una sustancia que comprende al menos una sustancia catalizadora. La destrucción de adipocitos se mejora mediante la combinación de la cavitación y los efectos catalizadores de la sustancia catalizadora.

15 El método puede ser un método *in vivo* o un método *in vitro*. En el caso de un método *in vivo*, el medio puede ser un cuerpo humano o animal. En el caso de un método *in vitro*, el medio puede ser un medio acuoso, en particular en el que puedan almacenarse células. El medio puede ser un medio de cultivo, preferentemente un medio de cultivo usado para experimentos *in vitro* sobre sustancias de interés antes de llevar a cabo los experimentos en condiciones *in vivo*.

20 De acuerdo con la presente invención, el medio puede ser cualquier medio que pueda propagar ondas de ultrasonidos. Por ejemplo, el medio puede ser un medio acuoso. El medio puede ser también un medio acuoso encerrado en el interior de un tubo de ensayo o una cápsula de ensayo o cualquier dispositivo de ensayo. Por lo tanto, el medio es un medio *in vitro*.

25 Se dirigieron ensayos para verificar la eficiencia de la combinación del método de transfección y el presente método para la entrega de una sustancia. Sorprendentemente, la cavitación generada para entrega de la sustancia es también capaz de abrir las células para transferir plásmidos al interior de las células y sin destruir dichas células.

30 El ensayo se realizó sobre un ratón. Se realizaron dos inyecciones sobre estos ratones con células RL de modo que 24 días tras la inyección tenían dos tumores, teniendo cada uno un volumen de al menos 1000 mm<sup>3</sup>.

El primer tumor se insonificó con haces de ultrasonidos confocales duales tal como se ha descrito anteriormente.

35 Se inyectó dentro del segundo tumor una sustancia ARNip de la Bcl2L1 que comprende genes acoplados a un Alexa Flúor. El Alexa Flúor es un ejemplo de marcador (marcador fluorescente) adaptado para detectar la presencia de genes añadidos ARNip. El volumen inyectado fue de 30 µl, y la concentración de la sustancia fue de 7,5 µg/ml.

A continuación, el segundo tumor también se insonificó con los mismos haces de ultrasonidos confocales duales.

40 Ambos tumores se analizaron para detectar fluorescencia intracelular. El segundo tumor comprendió el 16 % de células fluorescentes, es decir el 16 % de células transfectadas. Pueden obtenerse porcentajes más altos.

### Descripción de las figuras

45 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones dadas a modo de ejemplos no limitativos, con referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos:

- las Figuras 1 y 2 son vistas esquemáticas de un dispositivo para llevar a cabo el método de la invención,
  - la Figura 3 es una vista en perspectiva de un dispositivo que lleva a cabo el método,
  - las Figuras 4a y 4b son diagramas de flujo de una realización del método de optimización para determinar los
- 50 parámetros de acuerdo con la invención.

### Descripción detallada de la invención

55 La Figura 1 representa un dispositivo 1 que genera una presión de ultrasonidos localizada. El dispositivo 1 comprende:

- un primer medio de ultrasonidos 11 que es un transductor adaptado para generar un primer haz B1 de una primera onda de ultrasonidos en el interior del medio hacia una primera dirección del haz D1, estando enfocando dicho primer haz B1 a un primer punto focal acústico P1a en el interior del medio (no mostrado),
- 60 - un segundo medio de ultrasonidos 12 (segundo transductor) adaptado para generar un segundo haz B2 de una segunda onda de ultrasonidos en el interior del medio hacia una segunda dirección del haz D2, estando enfocando sustancialmente dicho segundo haz B2 a un segundo punto focal acústico P2a,
- adaptados un primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 para mover el primer y segundo transductores 11, 12 a una posición determinada por un primer y segundo desplazamientos x1, x2 de dichos
- 65 primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 respectivos.

El primer y segundo puntos focales acústicos P1a y P2a se superponen sobre un mismo punto, el punto focal P.

La primera y segunda direcciones de los haces D1, D2 son sustancialmente coplanares e inclinadas relativamente entre sí en un ángulo  $\alpha$  de 90°.

5 El primer y segundo transductores 11, 12 son transductores diferentes: no son elementos transductores integrados dentro de un único transductor. Están accionados cada uno mediante una señal independiente para generar un haz de ultrasonidos independiente. El primer transductor 11 recibe la primera señal s1 desde un primer generador de  
10 señal 21 y genera el primer haz B1. El segundo transductor 12 recibe una segunda señal s2 desde un segundo generador de señal 22 y genera el segundo haz B2.

15 Como se muestra en la Figura 1, los puntos focales geométricos P1, P2 se sitúan sobre la dirección respectiva, primera o segunda dirección D1, D2, y se sitúan a una distancia de la superficie del transductor más alta que el punto focal acústico P1a, P2a de los haces de ultrasonidos B1, B2.

20 El primer transductor 11 que recibe la primera señal s1 de una primera amplitud a1 de modo que genere un primer haz B1 de una primera onda de ultrasonidos en el interior de un medio hacia una primera dirección del haz D1, produce una primera zona Z1 de alta presión en el interior de dicho medio, es decir una primera zona Z1 de máxima potencia o intensidad acústica. La primera zona Z1 está sustancialmente centrada sobre el primer punto focal  
acústico P1a y tiene una forma alargada a lo largo de la primera dirección del haz D1.

25 El segundo transductor 12 que recibe la segunda señal s2 de una segunda amplitud a2 de modo que genere un segundo haz B2 de una segunda onda de ultrasonidos en el interior de un medio hacia una segunda dirección del haz D2 produce una segunda zona Z2 de alta presión en el interior del medio, es decir una segunda zona de máxima potencia o intensidad acústica. La segunda zona Z2 está sustancialmente centrada sobre el segundo punto focal acústico P2a y tiene una forma alargada a lo largo de la segunda dirección del haz D2.

30 La primera y segunda zonas Z1, Z2 intersectan en una región de interés V alrededor del punto focal P sobre el que se superponen entre sí el primer y el segundo puntos focales P1a, P2a, teniendo dicha región de interés V un tamaño reducido en comparación con el tamaño de dicha primera zona Z1 o dicha segunda zona Z2.

35 El dispositivo 1 también comprende una unidad de control 30 adaptada para controlar, sincronizar y ajustar las características del primer y segundo generadores de señal 21, 22. La unidad de control 30 es un ordenador con un teclado, y una pantalla para la interfaz con el usuario. La unidad de control 30 proporciona la primera y segunda señales s1, s2 al primer y segundo transductores 11, 12 respectivamente para generar los haces B1, B2. También proporciona el primer y segundo desplazamientos x1, x2 al primer y segundo órganos de desplazamiento respectivamente para mover los transductores 11, 12. Esta primera y segunda señales s1, s2 (principalmente sus respectivas amplitudes) y el primer y segundo desplazamientos x1, x2 son por lo tanto parámetros para el ajuste del  
40 dispositivo 1.

El dispositivo 1 comprende adicionalmente un sensor 16 que es una cámara.

45 En la Figura 2, las direcciones de los haces D1, D2 intersectan entre sí en un punto de intersección I dentro del medio. La Figura 2 muestra una configuración del dispositivo 1 que no está correctamente ajustada. El primer y segundo puntos focales acústicos P1a, P2a no están superpuestos entre sí y no están superpuestos sobre el punto de intersección I. Pero esta Figura 2 ayuda a entender cómo se acciona el dispositivo 1 para superponer dichos puntos focales acústicos P1a, P2a.

50 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, el primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 soportan solo uno de los transductores 11, 12. Las dos direcciones de desplazamiento se representan por las flechas F1 y F2 en las Figuras 1 y 2. Más aún, las direcciones de desplazamiento F1, F2 son perpendiculares a las direcciones del haz D1, D2. Más precisamente, la dirección de desplazamiento F1 del primer órgano de desplazamiento 13 es perpendicular a la primera dirección del haz D1, y la dirección de desplazamiento F2 del segundo órgano de desplazamiento 14 es perpendicular a la segunda dirección del haz D2.  
55

En la figura 2, se muestran una primera distancia focal d1 del primer transductor 11 y una segunda distancia focal d2 del segundo transductor 12. La distancia focal es la distancia desde la superficie del transductor al punto focal acústico.

60 Alrededor del punto de intersección I se delimita eventualmente una región de interés en la Figura 2. En el interior de la región de interés V, el primer y segundo haces B1, B2 generan un efecto acústico en el interior de dicha región de interés V; dicho efecto acústico es un efecto de cavitación.

65 En la figura 2, el medio 4 comprende un líquido que tiene una superficie superior S entre dicho líquido y el aire. El líquido está contenido dentro de un tanque 3. El nivel de la superficie del líquido puede cambiarse mediante medios de control del líquido. Por ejemplo, el nivel de líquido puede descenderse a un nivel más bajo. Por ejemplo, el nivel

de líquido puede ajustarse a un nivel específico SI en el que el punto de intersección I está cerca o por encima de dicho nivel específico SI del líquido.

5 La primera dirección del haz D1 intersecta con la superficie S en un primer punto de interfaz A1. Respectivamente, la segunda dirección del haz D2 intersecta con la superficie S en un segundo punto de interfaz A2.

10 Cada uno del primer y segundo haces B1, B2, genera una presión de radiación acústica en el interior del medio. Dicha presión de radiación acústica puede generar un efecto acústico en la superficie del líquido, denominado fuente acústica: pueden proyectarse algunas gotas de líquido al interior del aire por encima de la superficie del fluido S desde el punto de interfaz. La primera fuente acústica AF1 y la segunda fuente acústica AF2 están representadas en la Figura 2. Dichas fuentes acústicas pueden detectarse fácilmente por un sensor óptico, por ejemplo un sensor de cámara.

15 Este efecto de fuente acústica puede usarse para determinar la posición exacta del primer y segundo puntos de interfaz A1, A2, es decir las posiciones del primer y segundo haces B1, B2. Los órganos de desplazamiento 13, 14 pueden actuarse por lo tanto de acuerdo con las direcciones laterales de modo que la primera y segunda direcciones del haz sean correctamente coplanares.

20 En caso de que el nivel de líquido sea el nivel específico SI, ambas fuentes acústicas se superponen: solo es visible una fuente acústica.

El efecto de fuente acústica puede usarse entonces para determinar experimentalmente la posición exacta del punto I de intersección, y los puntos focales acústicos.

25 El primer y segundo haces enfocados B1, B2, también generan un incremento de temperatura en los puntos focales acústicos P1a, P2a (o en la proximidad a estos puntos).

30 La Figura 3 muestra una realización de un dispositivo 1 que comprende un primer y un segundo transceptores 11, 12, primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 y un órgano de soporte 10.

35 La Figura 3 representa un dispositivo 1 que comprende un tanque de agua 3 lleno con un medio 4 de agua desgasificada. El agua desgasificada es un medio que tiene niveles de presión de cavitación equivalentes a un medio *in vivo*. Es representativo por lo tanto para el ajuste de los parámetros del dispositivo. Un agua no desgasificada conduciría a grandes cantidades de burbujas de cavitación dentro del medio, y a un ajuste impreciso del dispositivo. En este dispositivo 1, el primer medio de ultrasonidos comprende un transductor esférico 11 que tiene una superficie de emisión 11a para la emisión de la primera onda de ultrasonidos en la primera dirección D1 y para el enfoque de la primera onda de ultrasonidos a una primera distancia desde la superficie de emisión 11a. El primer transductor 11 es un transductor cerámico piezoeléctrico que tiene una frecuencia nominal de 1 MHz, una primera distancia de 50 mm y una superficie de emisión 11a de 50 mm de diámetro.

40 El segundo medio de ultrasonidos comprende un segundo transductor 12 que tiene una superficie de emisión 12a para la emisión de la segunda onda de ultrasonidos en la segunda dirección D2 y para el enfoque de la segunda onda de ultrasonidos a una segunda distancia desde la superficie de emisión 12a.

45 El segundo transductor 12 es idéntico al primero. Pero pudiera ser diferente.

50 La primera señal s1 es una ráfaga de pulsos sinusoidales de 1 MHz, con una frecuencia de repetición de 200 Hz, y un ciclo de trabajo del 5 %. La primera amplitud predeterminada corresponde a una potencia de la primera onda de ultrasonidos generada de 5 vatios.

En la realización del dispositivo 1 mostrado en la Figura 3, indicado para el ensayo del método de la invención, el ángulo  $\alpha$  entre la primera dirección D1 y la segunda dirección D2 es de 110°.

55 Como se muestra en la Figura 3, los puntos focales geométricos P1, P2 se sitúan en la respectiva dirección, primera o segunda dirección D1, D2, y se sitúan a una distancia desde la superficie del transductor más alta que el punto focal acústico P1a, P2a de los haces de ultrasonidos B1, B2. El primer y segundo puntos focales acústicos P1a y P2a se superponen en un mismo punto, el punto focal P.

60 El dispositivo 1 comprende adicionalmente un primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 adaptados para mover el primer y segundo transductores 11, 12 a una posición determinada por un primer y segundo desplazamientos x1, x2 de dicho primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 respectivos.

65 El primer órgano de desplazamiento 13 soporta y está conectado al primer transductor 11 para moverlo de acuerdo con una primera dirección de desplazamiento. Recíprocamente, el segundo órgano de desplazamiento 14 soporta y está conectado al segundo transductor 12 para moverlo de acuerdo con una segunda dirección de desplazamiento. El primer y segundo órganos de desplazamiento 13, 14 mueven cada transductor 11, 12 independientemente entre

sí.

- Como se muestra en la Figura 3, el dispositivo 1 comprende un transductor de imagen 12b para producir imágenes del medio 4 alrededor del punto de intersección P. Las imágenes producidas con el transductor de imagen 12b se usan para visualizar el medio 4 y para localizar las burbujas de cavitación en el interior del medio 4. Estas imágenes se usan para determinar la primera y segunda amplitudes de señal para controlar el nivel de cavitación, en una forma tal como un bucle cerrado controlado. El transductor de imagen 12b es un transductor que tiene una frecuencia nominal de 5 MHz y que comprende una matriz multielemento de elementos piezoeléctricos.
- 10 De acuerdo con una realización del dispositivo, la unidad de control 30 puede determinar los parámetros optimizados a partir de un proceso de optimización 100 ilustrado en la Figura 4a y que tiene las siguientes etapas de optimización:
- 15 - proporcionar en la etapa 101 los parámetros iniciales para mover el primer y segundo transductores por medio del primer y segundo órganos de desplazamiento a una posición y para generar un primer y segundo haces B1, B2 por medio de dichos primer y segundo transductores de modo que se detecte un efecto acústico en el interior del medio,
  - reducir en la etapa 102 una amplitud de las señales hasta un nivel de amplitud en el que no se detecte el efecto acústico,
  - 20 - mover en la etapa 103 el primer y segundo transductores por medio del primer y segundo órganos de desplazamiento a una pluralidad de posiciones de ensayo, correspondiente cada una de dichas posiciones de ensayo a dicha posición de los transductores en la que al menos uno del primer y segundo desplazamientos se modifica mediante un incremento de desplazamiento (D),
  - 25 - si se detecta el efecto acústico en la etapa 104 en una de las posiciones de ensayo en la etapa c), seleccionar dicha posición de ensayo para que sea la posición de los transductores, y repetir las etapas b) y c) (etapas 102 y 103),
  - los parámetros determinados en la etapa 105 son las señales y desplazamientos ajustados antes de la última reducción en la etapa b).
- 30 El método anterior puede refinarse mediante la implementación de un proceso iterativo en la etapa b) (etapa 102) representado en la Figura 4b.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para la determinación de parámetros optimizados de un dispositivo (1) que genera una pluralidad de haces de ultrasonidos que se enfocan sobre un punto focal P situado en una región de interés (V) que puede ser una región en el interior de un medio (4) o una región en la interfaz (S) entre un primer y un segundo fluidos del medio (4), de modo que dicho dispositivo (1) produzca alrededor del punto focal P en el interior de la región de interés (V) al menos un efecto elegido entre:
- un efecto de cavitación localizado en el interior de la región de interés (V) localizada en el interior del medio (4),
  - un efecto de fuente acústica simple localizado en la región de interés (V) que está en la interfaz (S) entre un primer y un segundo fluido del medio (4),
  - un efecto de incremento térmico localizado en el interior de la región de interés (V) en el interior del medio (4),
- en el que dicho método comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar un dispositivo (1) que comprende:
    - al menos dos generadores de señal (21, 22) que generan respectivamente una primera señal s1 que tiene una amplitud a1 y una segunda señal s2 que tiene una amplitud a2,
    - al menos dos medios de ultrasonidos (11, 12), estando adaptados dichos al menos medios de ultrasonidos (11, 12) respectivamente:
      - para recibir la primera señal s1 de modo que genere un primer haz B1 de una primera onda de ultrasonidos en el interior del medio (4) hacia una primera dirección del haz D1, estando enfocado dicho primer haz B1 sobre un primer punto focal acústico P1a en el interior de dicha región de interés (V),
      - para recibir la segunda señal s2 de modo que genere un segundo haz B2 de una segunda onda de ultrasonidos en el interior del medio (4) hacia una segunda dirección del haz D2, estando enfocado dicho segundo haz B2 sobre un segundo punto focal acústico P2a en el interior de dicha región de interés (V),
    - al menos un medio de detección (16) del al menos un efecto,
  - b) posicionar los al menos dos medios de ultrasonidos (11, 12) entre sí de modo que la primera y segunda direcciones D1, D2 sean sustancialmente coplanares e inclinadas relativamente entre sí en un ángulo  $\alpha$  comprendido entre 60° y 120°,
  - c) mover los al menos dos medios de ultrasonidos (11, 12) respectivamente en al menos dos desplazamientos x1, x2 de modo que se detecte al menos un efecto en el interior de la región de interés (V) alrededor del punto focal P sobre el que se superponen el primer y el segundo puntos focales acústicos P1a y P2a y no se detecte fuera de la región de interés (V),
- caracterizado por que** comprende adicionalmente las etapas de:
- d) reducir la amplitud a1, a2 de las señales s1, s2 hasta un nivel de amplitud en el que el al menos un efecto no se detecte,
  - e) mover los al menos dos medios de ultrasonidos (11, 12) a una pluralidad de posiciones de ensayo, correspondiendo cada una de dichas posiciones de ensayo a dicha posición de los medios de ultrasonidos a la que al menos uno de los medios de ultrasonidos (11, 12) se ha movido mediante un incremento de desplazamiento D,
  - f) si el al menos un efecto se detecta en una de las posiciones de ensayo en la etapa e) alrededor del punto focal P sobre el que se superponen el primer y segundo puntos focales acústicos P1a y P2a, seleccionar dicha posición de ensayo para que sea la posición del medio de ultrasonidos, y repetir las etapas d) y e),
  - g) determinar y registrar los parámetros optimizados del dispositivo (1) que son las amplitudes a1, a2 de las señales s1, s2 y la posición x1, x2 de los medios de ultrasonidos (11, 12) ajustados antes de la última reducción en la etapa d).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio (4) es un medio acuoso en el que se almacenan las células o un medio de cultivo.
3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la región de interés (V) tiene un tamaño en todas las direcciones menor de 5 mm, y preferentemente menor de 2 mm.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dispositivo (1) comprende al menos dos órganos de desplazamiento (13, 14) que están adaptados para mover los al menos dos medios de ultrasonidos (11, 12) relativamente entre sí.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dispositivo (1) comprende adicionalmente un medio de creación de imagen (12b) que crea imágenes del medio (4) para determinar la región de

interés (V) en el interior del medio (4).

5 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la etapa c), los medios de ultrasonidos (11, 12) tienen direcciones de desplazamiento (F1, F2) que son perpendiculares a una de las direcciones de los haces (D1, D2).

10 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el dispositivo (1) comprende adicionalmente un medio de control (30) para mover secuencialmente el punto focal P a una pluralidad de puntos determinados en el interior de dicha región de interés (V) de modo que se controle al menos un efecto en el interior de dicha región de interés (V).

15 8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método se lleva a cabo para el enfoque de los haces de ultrasonidos (B1, B2) sobre una pluralidad de puntos determinados en el interior de la región de interés (V) mediante el movimiento secuencialmente del punto focal P a esta pluralidad de puntos determinados.

9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las señales y ondas tienen frecuencias principales comprendidas entre 100 kHz y 10 MHz.

20 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa b) se implementa mediante un proceso iterativo, siendo reducida la amplitud de las señales en cada bucle mediante una división de la amplitud previa por un factor de reducción k que tiene un valor comprendido entre uno y dos, siendo repetido dicho bucle hasta que no se detecte el al menos un efecto.

25 11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que comprende entre la etapa f) y g) una etapa en la que: si el incremento de desplazamiento D no es menor o igual que un incremento de desplazamiento mínimo  $D_{\min}$ , el incremento de desplazamiento D se reduce y se repiten las etapas d) y e) del método.

30 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el método comprende una etapa adicional de variación del ángulo  $\alpha$ .

13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el método se usa para entregar una sustancia que comprende el menos un plásmido y el medio (4) es un medio acuoso que comprende células.

35 14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el método se usa para aplicaciones de sonoporación o transfección para la transferencia de plásmidos al interior de una célula.



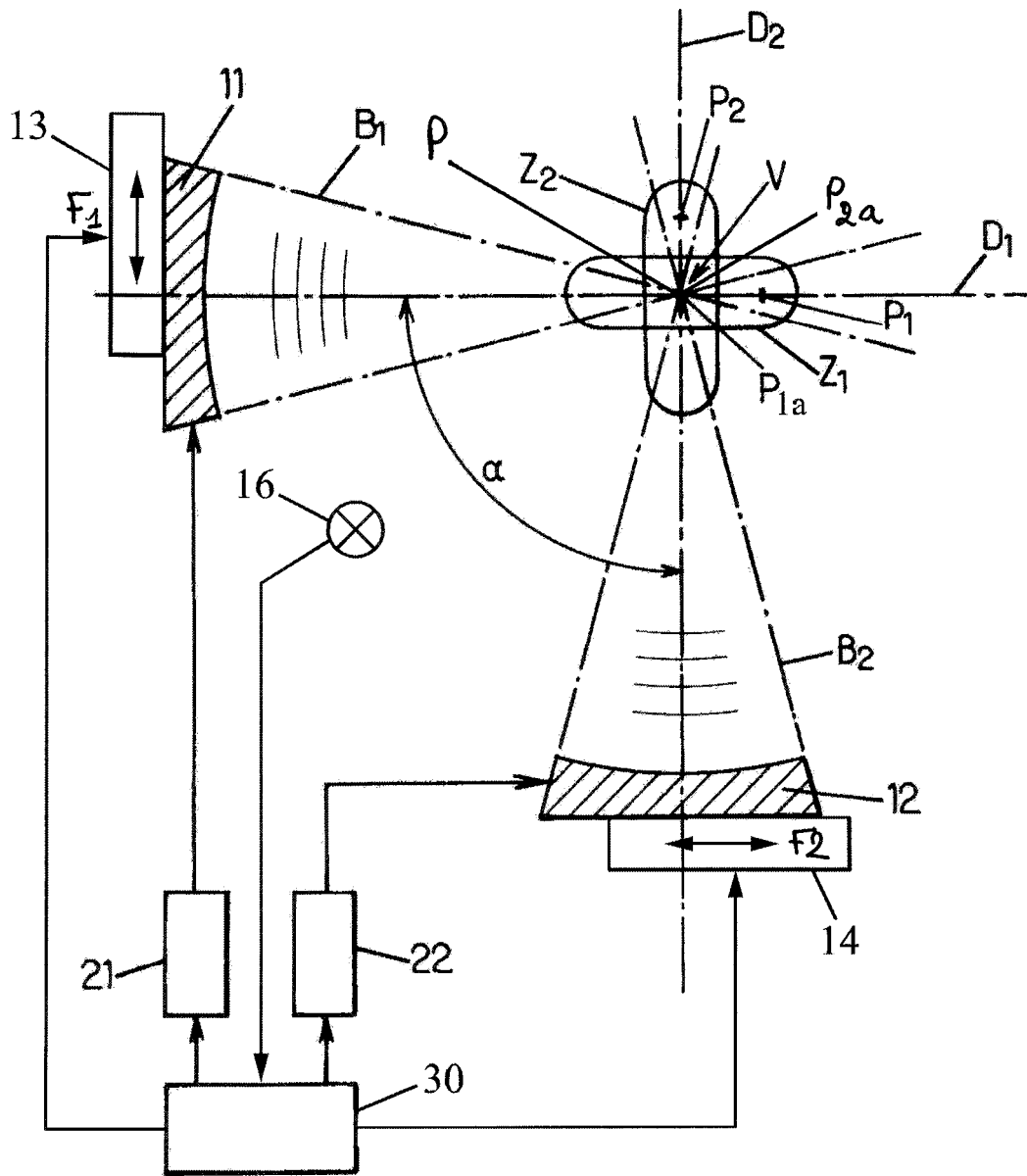


FIG. 1

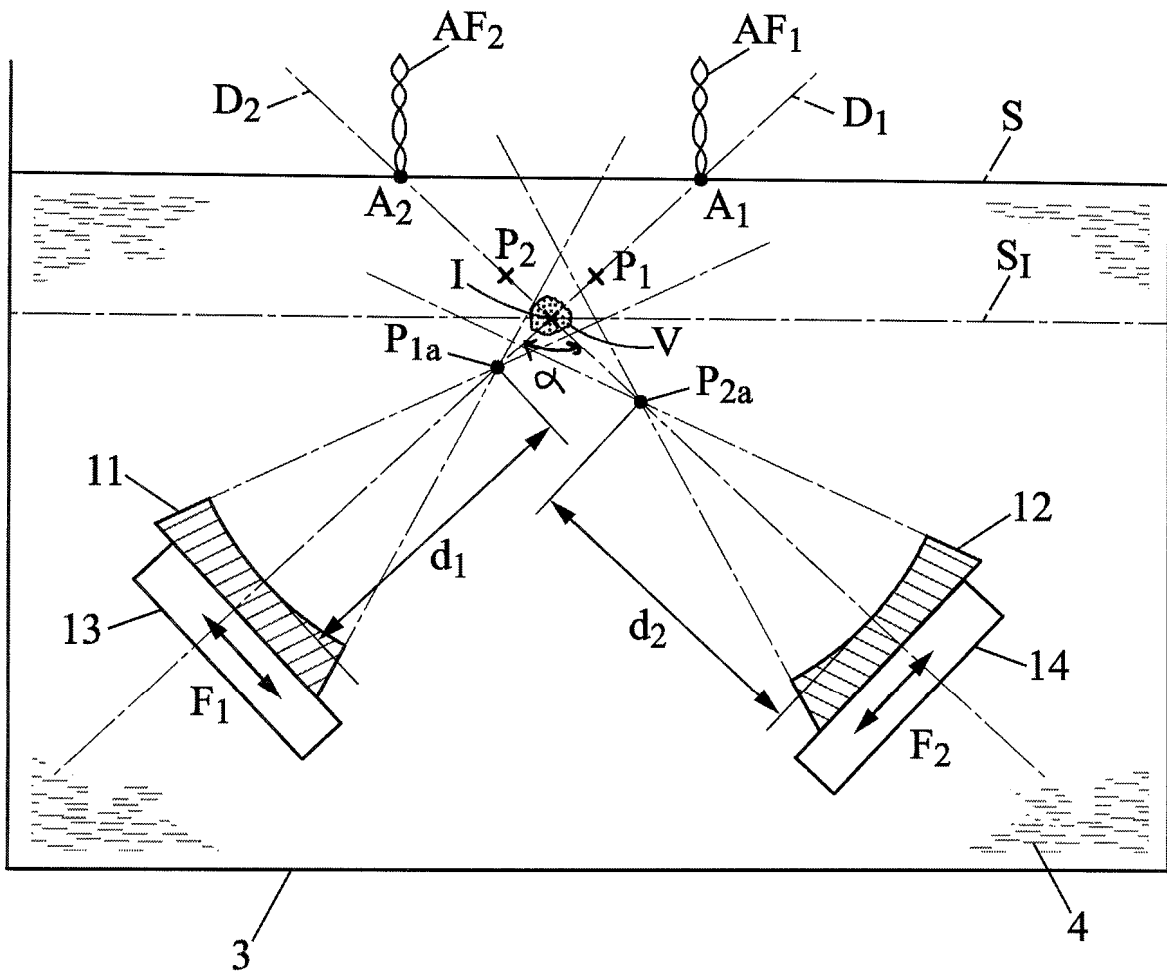


FIG. 2

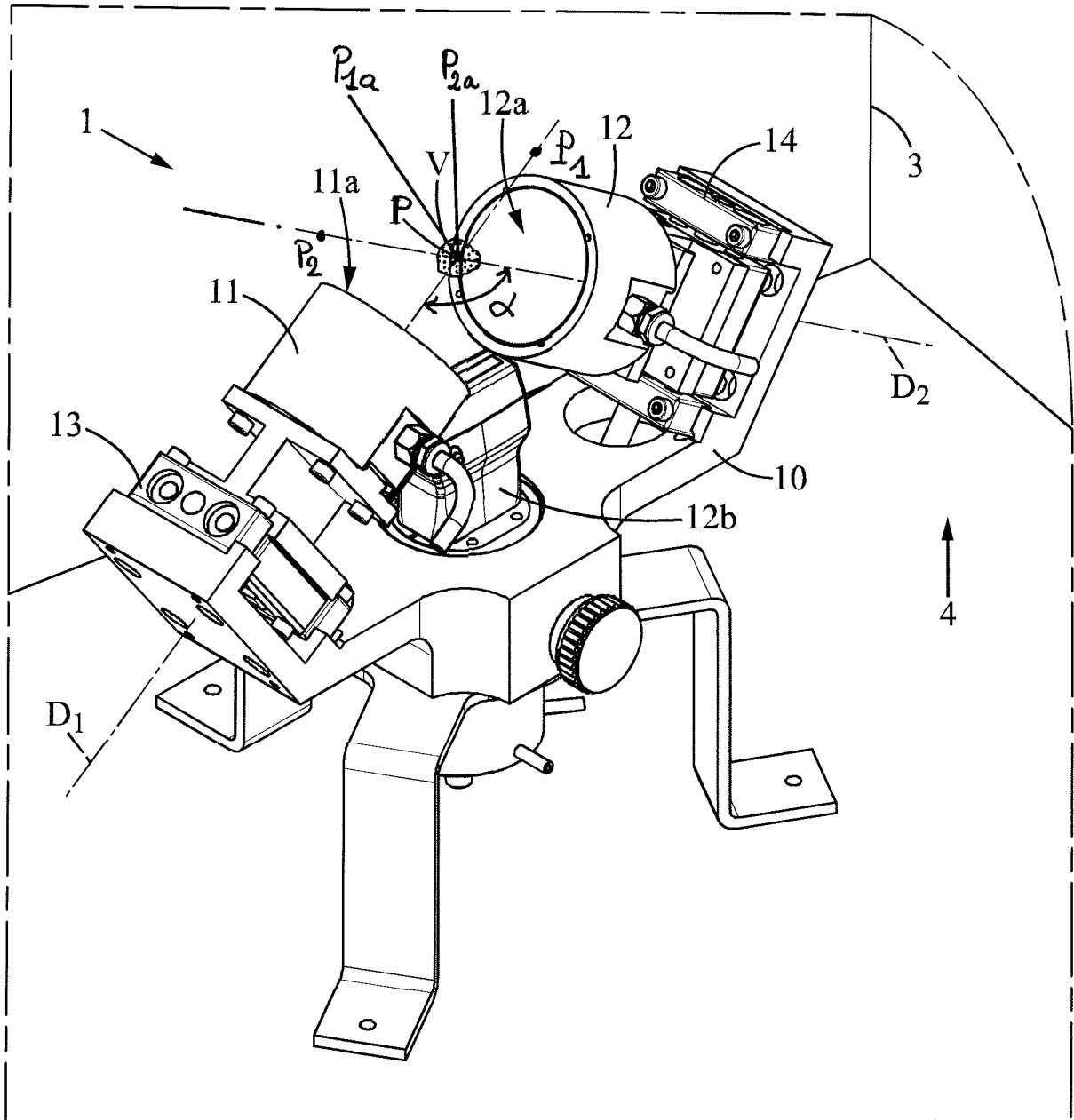


FIG. 3

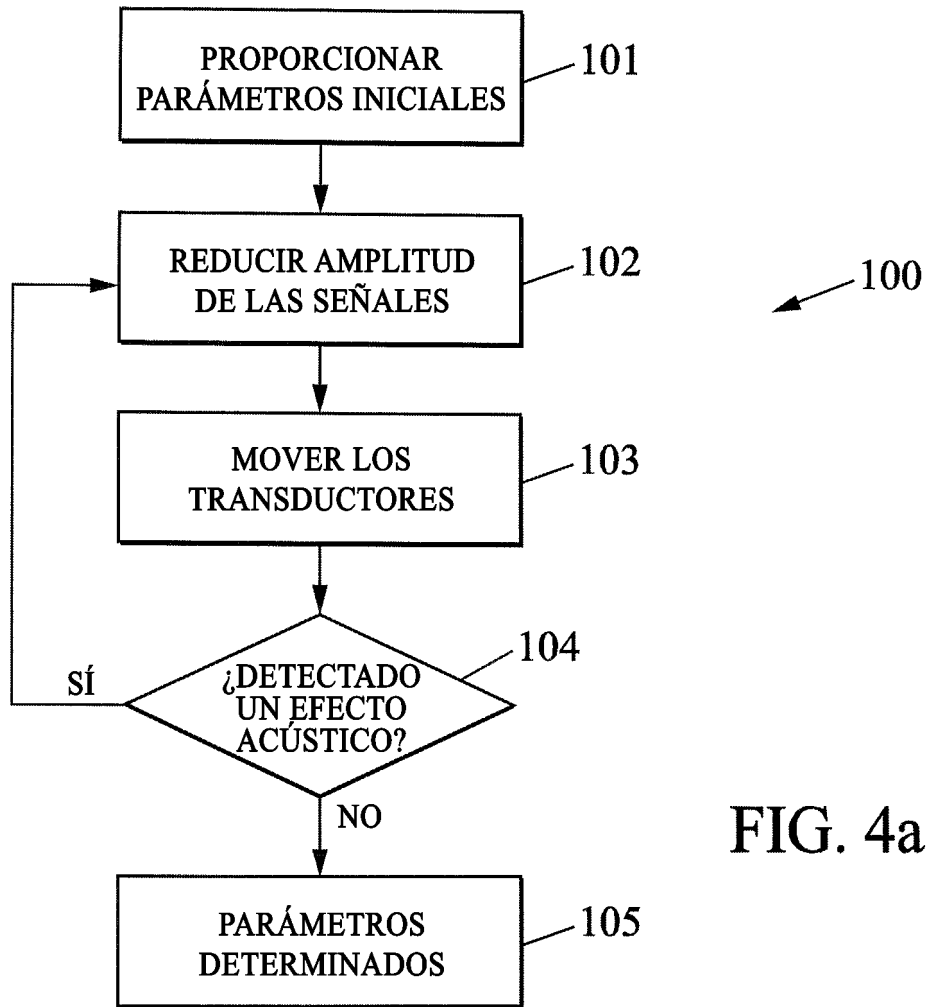


FIG. 4a

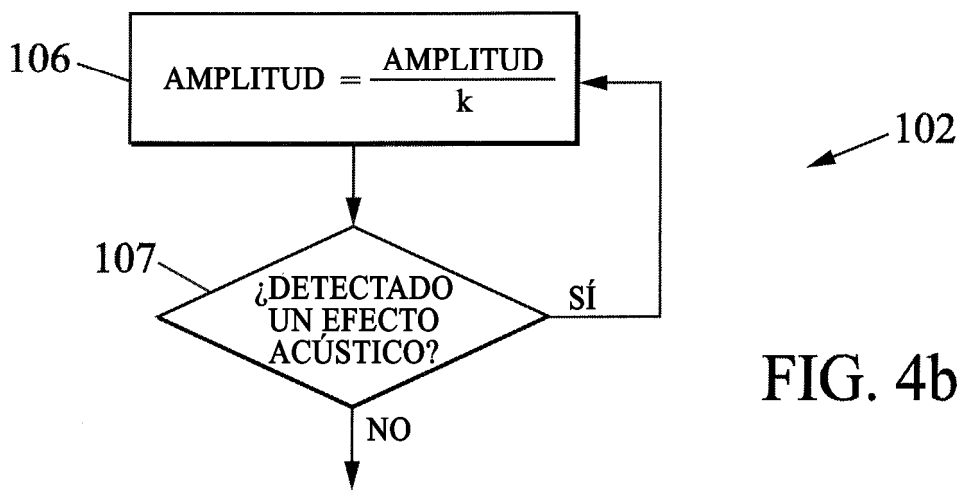


FIG. 4b