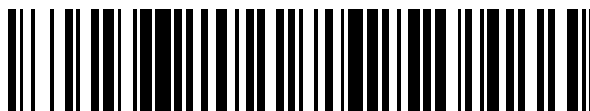


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 054**

51 Int. Cl.:

**A61N 5/06** (2006.01)

**A61B 17/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2013** **E 13193028 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2737926**

54 Título: **Dispositivo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante en un tejido biológico**

30 Prioridad:

**28.11.2012 FR 1261339**

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

**08.09.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE (100.0%)  
34 Cours Léopold, CS 25233  
54052 Nancy Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**BASTOGNE, THIERRY y  
TYLCZ, JEAN-BAPTISTE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 632 054 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**

Dispositivo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante en un tejido biológico

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante en un tejido biológico.

El campo de la invención es más particularmente, pero de manera no limitativa, el de las terapias fotodinámicas, en particular para el tratamiento de las células cancerosas.

**Estado de la técnica anterior**

10 Las terapias fotodinámicas (PDT) son técnicas utilizadas para tratar los tejidos biológicos y eliminar selectivamente células. Se utilizan especialmente para tratar lesiones cancerosas y precancerosas, en particular de la piel. Se utilizan también para tratar otras afecciones tales como el acné quístico, las queratosis actínicas, las manchas de pigmentación, la degeneración macular relacionada con la edad, las rugosidades, los vasos dilatados, la psoriasis, o para tratamientos anti-infecciosos, de pequeñas arrugas o en la depilación.

El principio de las terapias fotodinámicas es el siguiente:

- 15 – en un primer tiempo, se introduce un producto fotosensibilizante (PS) en los tejidos biológicos;
- al ser variable la velocidad de eliminación del producto fotosensibilizante en función de la naturaleza de las células y de su entorno (vascularización, ...), después de un cierto tiempo el producto que queda en el tejido biológico se concentra esencialmente alrededor de las células diana (por ejemplo, en el tumor);
- 20 – el tejido biológico y el producto fotosensibilizante se iluminan entonces con una luz de una longitud de onda apropiada;
- el producto está diseñado de manera que bajo el efecto de la iluminación se "active" y genere especies reactivas del oxígeno, tales como el oxígeno singlete, a dosis alta;
- 25 – estas especies reactivas del oxígeno tienen por efecto destruir o degradar las moléculas cercanas. Así, si el producto se concentra más específicamente en ciertas zonas del tejido biológico, estas zonas son dañadas o destruidas selectivamente.

Los productos fotosensibilizantes utilizados pueden ser, por ejemplo, compuestos de la familia de las porfirinas o de las clorinas.

30 Las aplicaciones de la terapia fotodinámica se refieren en particular a las afecciones y a los cánceres de la piel, o a los tratamientos de la degeneración macular asociada a la edad. En este caso, los tejidos son fácilmente accesibles para la iluminación.

La técnica se puede utilizar también para el tratamiento de tumores intersticiales, es decir, en los tejidos. En este caso, la iluminación se puede efectuar por medio de fibras ópticas introducidas en los tejidos.

35 Un inconveniente importante de las terapias fotodinámicas, que limita su desarrollo para aplicaciones clínicas, es su baja reproducibilidad *in vivo*. En efecto, el comportamiento y la respuesta de los tejidos al tratamiento varían mucho de un sujeto a otro, lo que supone una gran incertidumbre y una gran variabilidad de las respuestas terapéuticas.

De manera habitual, los tratamientos consisten en iluminar la zona a tratar durante un tiempo predeterminado, según una o varias secuencias. No hay por lo tanto control de la eficacia a lo largo del tratamiento.

40 Las aplicaciones clínicas actuales de la terapia fotodinámica se basan en un modelo macroscópico estático simplificado del fenómeno fotofísico inherente para determinar la concentración de producto fotosensibilizante necesario y de la iluminación energética o irradiancia a aplicar:

$$[R] = k_s b \epsilon \phi_{\lambda_A} T [S_0] \Phi f, \tag{Ecuación 1}$$

45 donde  $[R]$  es una concentración de especies reactivas del oxígeno que, si están situadas en una región sensible de las células cancerosas, desencadenan una cascada de reacciones que conducen a la muerte de la célula.  $\phi_{\lambda_A}$  significa la irradiancia o la potencia luminosa por unidad de superficie recibida por la superficie del tejido a tratar y  $\lambda_A$  corresponde a una longitud de onda de absorción del producto fotosensibilizante.  $T$  es el tiempo de exposición a la luz y  $[S_0]$  es la concentración intracelular de agente fotosensibilizante.  $k_s$  es el coeficiente de retrodifusión del tejido,  $b$  es un rendimiento de conversión,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción del agente fotosensibilizante y  $\Phi$  es un rendimiento cuántico de conversión del medicamento en radicales oxidantes.  $f$  significa la fracción de especies

reactivas del oxígeno generadas que atacan las dianas sensibles de las células, mientras que la otra fracción  $(1 - f)$  no causa más que efectos menores.

A pesar de su utilización actual en las aplicaciones clínicas, este modelo está sujeto a varias controversias:

- 5 – la Ecuación 1 muestra una simple reciprocidad entre la concentración del agente fotosensibilizante y la luz, mientras que varios experimentos han demostrado resultados contradictorios;
- el rendimiento cuántico  $\Phi$  es en realidad una función del nivel de oxigenación del tumor. Este último es a menudo variable en el tiempo y es difícil de medir durante el tratamiento;
- 10 – los sitios intracelulares dañados por la terapia fotodinámica (PDT) dependen en gran medida de la localización del producto fotosensibilizante (PS) en las células. Los sitios de acción de la terapia fotodinámica son principalmente las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los lípidos membranales. Durante la terapia fotodinámica se puede producir una relocalización del producto fotosensibilizante. Algunos sitios son más críticos que otros, pero este factor no se tiene en cuenta en la Ecuación 1;
- 15 – varias cantidades implicadas en esta ecuación son en realidad variables con el tiempo. En particular, se ha demostrado que una reducción de la concentración del producto fotosensibilizante durante el tratamiento era un factor no despreciable, pero ausente de esta fórmula. De manera más general, la Ecuación 1 no es más que una descripción estática del proceso dinámico de la terapia fotodinámica.

20 Es necesario, por lo tanto, poner a punto los métodos de dosimetría para mejorar la reproducibilidad de las respuestas terapéuticas de la terapia fotodinámica. Un método de dosimetría de este tipo debe permitir determinar la dosificación de los factores incidentes (tales como la concentración local de producto fotosensibilizante, la densidad de los fotones enviados, el tiempo de iluminación, el intervalo entre la administración del producto y las fases de iluminación), para obtener un efecto deseado (por ejemplo, la destrucción selectiva de ciertas células).

La determinación de un método de dosimetría preciso constituye una vía de investigación primordial. Existen varias clases de dosimetría potencialmente utilizables en la terapia fotodinámica, y todas se basan en un modelo:

#### 25 La dosimetría explícita

Este tipo de técnica implica la medida de los principales componentes de la terapia, es decir, las dosis de luz, de oxígeno y la concentración intracelular del agente fotosensibilizante. Estos tres constituyentes se reagrupan en un modelo de dosis de las especies reactivas del oxígeno producidas, definido por la Ecuación 1. Sin embargo, ninguno de estos elementos es fácilmente medible. Además, otros inconvenientes ya mencionados anteriormente, como la variación de las dosis de los tres elementos a lo largo del tratamiento, constituyen otros límites para el desarrollo de este método.

#### La dosimetría implícita

35 Este tipo de método propone utilizar una única magnitud cuya evolución depende del efecto conjugado de las tres variables básicas de la terapia fotodinámica (dosis de luz, de producto administrado y de oxígeno). Esta magnitud debe ser capaz de informar sobre los daños biológicos previsibles y por lo tanto sobre los resultados terapéuticos del tratamiento. Una variable interesante para desempeñar este papel es la concentración intratumoral del agente fotosensibilizante (PS).

40 Una técnica de medida conocida consiste en utilizar un método invasivo, que necesita la exéresis de tumores de xenoinjertos en ratones "desnudos" (con un sistema inmunitario deficiente) que hayan recibido el agente fotosensibilizante, y después estimar las concentraciones del agente fotosensibilizante antes y después de iluminación por cromatografía líquida de alta resolución. Este método proporciona resultados precisos sobre la concentración del agente fotosensibilizante y de los fotoproductos. Pero no permite observar en tiempo real la evolución del agente fotosensibilizante durante el tratamiento.

#### La medida de las respuestas biológicas/biofísicas de los tejidos

45 Se trata de un método alternativo para seguir la evolución del tratamiento y predecir los daños sobre los tejidos tales como los daños vasculares y las necrosis inducidos por el tratamiento.

50 Los procedimientos utilizados para este fin incluyen la espectroscopia de impedancia eléctrica, la medida del flujo sanguíneo por láser Doppler, el análisis de la difusión por espectroscopia de correlación de fluorescencia, la tomografía Doppler de coherencia óptica, así como los procedimientos de imagen molecular o radiológica tales como la tomografía con emisión de positrones (PET). Todavía es difícil saber si estas técnicas podrán predecir eficazmente las respuestas terapéuticas de la terapia fotodinámica, puesto que requieren en particular cambios rápidos y significativos de las características biológicas y espectrales de los tejidos.

Se conoce por ejemplo el documento EP 2 431 072 A1 que divulga un procedimiento de control de la iluminación en

la terapia fotodinámica de tumor intersticial basado en una medida de las propiedades ópticas de los tejidos y un método de cálculo para determinar el estado del tejido durante el tratamiento.

La dosimetría directa

5 Esta técnica implica la medida directa de las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno y en particular el oxígeno singlete. Como ocurre con el método de la dosimetría implícita, esta estrategia reduce el problema de dosimetría a una sola dimensión, la del oxígeno singlete, pero directamente esta vez. Varios trabajos han mostrado los primeros resultados *in vivo* en el laboratorio, pero la instrumentación actual requerida para estos trabajos no permite considerar las aplicaciones clínicas por el momento.

10 El documento EP 1 637 182 A1 describe un dispositivo de terapia fotodinámica que comprende un elemento de control de una fuente luminosa en función de una información de fluorescencia o de fosforescencia determinada al nivel de una lesión en profundidad.

El documento DE 197 21 489 A1 describe un dispositivo de terapia fotodinámica que comprende una fuente luminosa capaz de adaptarse a la sustancia fotosensibilizante utilizada.

15 El documento WO 99/06113A1 describe un sistema de control de la dosimetría en la terapia fotodinámica en el cual se mide la fluorescencia con el fin de determinar la cantidad de sustancia fotosensibilizante producida, y deducir el instante en que se debe suspender la terapia.

El documento EP 1 808 198 A1 describe un dispositivo de terapia fotodinámica que comprende un dispositivo de control previsto para vigilar la activación de la sustancia fotosensibilizante en un tejido sano situado delante de una lesión a tratar.

20 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un dispositivo de ajuste automático de la radiación electromagnética de activación del agente fotosensibilizante durante una sesión de tratamiento en terapia fotodinámica *in vivo*, y que resuelve los inconvenientes de la técnica anterior.

25 Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un dispositivo de ajuste automático de la radiación electromagnética de activación del agente fotosensibilizante que permite controlar de manera reproducible la aplicación de un tratamiento de terapia fotodinámica.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un dispositivo de ajuste automático de la radiación electromagnética de activación del agente fotosensibilizante en la terapia fotodinámica que puede ser utilizado con una instrumentación sencilla y adecuada para las aplicaciones *in vivo*.

### Exposición de la invención

30 Un procedimiento que sirve de ejemplo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante introducida previamente en un tejido biológico, que comprende una etapa de exposición de dicha sustancia fotosensibilizante a una radiación electromagnética de activación de manera que la active,

caracterizado porque comprende además las etapas de:

- obtención de una información de luminiscencia procedente de dicha sustancia fotosensibilizante, y
- 35 – ajuste de la exposición de la sustancia fotosensibilizante a la radiación electromagnética de activación de manera que dicha información de luminiscencia siga una evolución temporal correspondiente a una consigna temporal predeterminada.

Se entiende que el término de luminiscencia reagrupa todas las formas de emisión de luz denominadas "frías", tales como por ejemplo la quimioluminiscencia, la fosforescencia o la fluorescencia.

40 La sustancia fotosensibilizante puede ser introducida en el tejido biológico, especialmente por inyección, o por simple contacto en el caso de una superficie accesible tal como la piel.

La consigna temporal predeterminada puede comprender todo tipo de perfiles de curvas, descritas por ejemplo por ecuaciones (rectas, curvas lineales por tramos, polinomios...) o tablas de puntos.

Esta consigna temporal puede proceder, por ejemplo, de protocolos de medida.

45 La radiación electromagnética de activación puede comprender una radiación ionizante (rayos X) y/o una radiación no ionizante.

Según modos de realización, la radiación electromagnética de activación puede comprender una radiación luminosa de activación con longitudes de ondas ópticas.

Según modos de realización, el procedimiento puede comprender además una etapa de medida de una información

de luminiscencia procedente del oxígeno singlete generado por la activación de la sustancia fotosensibilizante.

Esta información de luminiscencia puede ser resultante especialmente de una fosforescencia a una longitud de onda de 1,27  $\mu\text{m}$  del oxígeno singlete que se genera por sustancias fotosensibilizantes tales como las porfirinas o las clorinas.

5 Según modos de realización, el procedimiento puede comprender además las etapas de:

- exposición de la sustancia fotosensibilizante a una radiación luminosa de activación aplicada en forma de impulsos luminosos de activación, y
- medida de la luminiscencia entre dichos impulsos.

10 Esta exposición de la sustancia fotosensibilizante a una radiación luminosa de activación aplicada en forma de impulsos luminosos separados por períodos de oscuridad permite así efectuar medidas de luminiscencia en tiempo real, a lo largo del tratamiento, incluido el caso en que tales medidas no sean posibles en presencia de la radiación luminosa de activación.

La medida de la luminiscencia puede incluir las etapas de:

- 15
- iluminación de la sustancia fotosensibilizante con una luz de excitación a una longitud de onda de excitación,
  - medida de una intensidad de fluorescencia.

En este caso, la medida de la luminiscencia comprende una medida de fluorescencia efectuada sobre la sustancia fotosensibilizante. La evolución temporal de esta fluorescencia permite evaluar el fenómeno de fotoblanqueo de la sustancia fotosensibilizante que resulta de su degradación.

20 El procedimiento puede comprender además una etapa de cálculo de un observador de luminiscencia que utiliza de entrada al menos una medida de la luminiscencia y un comando de los impulsos luminosos de activación, y que produce de salida una estimación de la luminiscencia.

Preferiblemente, estas medidas de luminiscencia comprenden las medidas de fluorescencia efectuadas sobre la sustancia fotosensibilizante.

25 El observador de luminiscencia puede ser modelado bajo la forma de un observador de estado que comprende una variable de estado que corresponde a una estimación de la luminiscencia (o de la fluorescencia) asociada al efecto sólo del tratamiento.

30 Este observador de estado puede ser derivado de un modelo autorregresivo con entradas externas como la estructura del modelo ARX ("Auto Regressive Model with eXternal inputs" en inglés) o un modelo de tipo representación de estado.

El observador de luminiscencia puede comprender parámetros que se determinan durante una etapa previa de calibración a partir de medidas experimentales.

35 El observador de luminiscencia permite realizar una interpolación inteligente de las medidas de luminiscencia o de fluorescencia. En efecto, en la práctica estas medidas no se pueden realizar durante las fases de impulsos de rayos electromagnéticos porque estos últimos ciegan por su gran intensidad el sistema de medida de la luminiscencia.

El observador de luminiscencia permite también reducir muy sensiblemente la intensidad del ruido de la medida de luminiscencia.

El observador de luminiscencia permite así mejorar considerablemente el funcionamiento de un bucle de regulación de la luz de activación.

40 Además, el observador de luminiscencia se determina a partir de parámetros experimentales relativamente fáciles de obtener. No se requiere necesariamente una gran precisión puesto que el observador de luminiscencia puede ser suspendido periódicamente por las medidas de luminiscencia. Así, sus parámetros se pueden determinar, por ejemplo, para un tipo de tejido biológico dado, y pueden ser aplicables directamente a diferentes sujetos tratados.

45 El procedimiento puede comprender además una etapa de comparación de la estimación de la luminiscencia procedente del observador de luminiscencia con la consigna temporal de tal manera que se genere una señal de error, que se utiliza para el ajuste de la exposición a la radiación electromagnética de activación.

El ajuste de la exposición a la radiación electromagnética de activación puede comprender un ajuste de la amplitud y/o de la duración de los impulsos luminosos.

Así, el procedimiento permite una retroalimentación en bucle cerrado de la exposición a la radiación

electromagnética de activación de tal manera que una variable de medida (la luminiscencia medida o estimada por el observador de estado) siga una trayectoria predeterminada (la consigna temporal).

5 El procedimiento se puede implementar con una sustancia fotosensibilizante cuya activación produce sustancias capaces de destruir las células. En particular se puede implementar con sustancias fotosensibilizantes tales como las porfirinas o las clorinas, que liberan el oxígeno singlete.

Según otro aspecto, se da a conocer un dispositivo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante introducida previamente en un tejido biológico, que comprende:

- medios de exposición capaces de permitir una exposición de dicha sustancia fotosensibilizante a una radiación electromagnética de activación de manera que la active,
- 10 – medios de adquisición capaces de producir una información de luminiscencia procedente de dicha sustancia fotosensibilizante, y
- medios electrónicos y de cálculo capaces de controlar los medios de exposición de manera que permitan un ajuste de la exposición de la sustancia fotosensibilizante a la radiación electromagnética de activación para que dicha información de luminiscencia siga una evolución temporal correspondiente a una consigna temporal predeterminada.

Los medios de exposición pueden comprender una fuente luminosa de activación capaz de producir impulsos de luz en función de una señal de control.

Los medios de adquisición pueden comprender un espectrómetro o un espectrofluorímetro.

20 Los medios electrónicos y de cálculo pueden utilizar un bucle de control que comprende un observador de luminiscencia,

- utilizando dicho observador de luminiscencia de entrada al menos una medida de luminiscencia y una señal de control de la fuente luminosa de activación, y produciendo de salida una estimación de la luminiscencia,
- siendo utilizada dicha estimación de la luminiscencia para generar una señal de control de la fuente luminosa de activación.

## 25 Descripción de las figuras y modos de realización

Otras ventajas y particularidades de la invención aparecerán con la lectura de la descripción detallada de las implementaciones y de los modos de realización en absoluto limitativos, y de los dibujos adjuntos siguientes:

- la Fig. 1 presenta los resultados de simulación de un proceso de fotorreacción con, Fig. 1(a) la concentración del agente fotosensibilizante PS en el estado fundamental (variable de salida), Fig. 1(b) la señal de irradiancia (variable de entrada), Fig. 1(c) la concentración de oxígeno singlete (variable de estado), y Fig. 1(d) la cantidad acumulada de oxígeno singlete producido,
- 30 – la Fig. 2 presenta un esquema sinóptico de la invención,
- la Fig. 3 presenta un organigrama del procedimiento divulgado,
- la Fig. 4 ilustra una comparación entre las medidas de fotoblanqueo *in vitro* y una estimación del fotoblanqueo obtenido con el modelo de estado según la invención,
- 35 – la Fig. 5 ilustra los resultados del observador de fotoblanqueo, a través de medidas simuladas,
- la Fig. 6 presenta los resultados de la regulación del fotoblanqueo, en condiciones *in vitro*.

### Modelo citotóxico

El proceso de reacción básico de las terapias fotodinámicas es el siguiente:

- 40 – se introduce un fotosensibilizador (PS) en los tejidos, por ejemplo, por vía intravenosa o incluso por aplicación directa, para las aplicaciones sobre la piel. En el marco de los modos de realización presentados, se considera que este fotosensibilizador puede ser por ejemplo una porfirina o una hematoporfirina;
- el fotosensibilizador se concentra más o menos selectivamente en los tejidos a destruir (por ejemplo, los tejidos tumorales), o se elimina más lentamente, lo que produce el mismo resultado;
- 45 – la zona a tratar se ilumina a continuación con una luz de activación que contiene las longitudes de onda necesarias para el desencadenamiento de las reacciones. Idealmente, estas longitudes de onda

corresponden a las bandas de absorción del fotosensibilizador, o al menos a un compromiso entre las longitudes de onda capaces de penetrar los tejidos biológicos (en rojo) y estas bandas de absorción. Por ejemplo, para las hematoporfirinas, la iluminación se efectúa a menudo con longitudes de onda del orden de 630-650 nm;

- 5 – la acción de la luz sobre el fotosensibilizador provoca la formación de oxígeno singlete  $^1O_2$ . Esta molécula es una forma de oxígeno de más alta energía que el oxígeno clásico, que se forma por excitación de este último. Es una molécula de vida corta que es muy reactiva frente a los componentes celulares y por lo tanto muy tóxica.

10 El conjunto de estos procesos da como resultado la degradación de un gran número de constituyentes celulares, lo que lleva a la muerte de las células por necrosis o por apoptosis.

El proceso fotoquímico al principio de la formación de oxígeno singlete es el siguiente:

- el fotosensibilizador absorbe los fotones de la luz de activación;
- pasa entonces de un estado de singlete fundamental  $S_0$  a un estado de singlete excitado  $S_1$ ;
- 15 – el retorno al estado inicial  $S_0$  se puede realizar, especialmente, pasando a un estado de triplete  $T_1$ , por el cruce intersistemas (ISC), así pues, una transición no radiativa;
- al ser el tiempo de vida de este estado de triplete  $T_1$  relativamente largo, la molécula del fotosensibilizador puede interactuar entonces con los sustratos situados en su entorno próximo, como por ejemplo el oxígeno presente en los tejidos. Son posibles dos tipos de reacciones, conocidas con los nombres de fotorreacciones de tipo I y II. Las fotorreacciones de tipo II son predominantes en la terapia fotodinámica con los fotosensibilizadores de tipo porfirinas;
- 20 – en una fotorreacción de tipo II, el estado de triplete  $T_1$  del fotosensibilizador reacciona directamente con el oxígeno presente transfiriéndole su exceso de energía, lo que hace pasar al oxígeno de su estado inicial  $^3O_2$  a su estado de singlete  $^1O_2$ .

25 Hay que tener en cuenta que el oxígeno singlete formado puede reaccionar también con el fotosensibilizador y destruirlo. Esta degradación, llamado fotoblanqueo, es una consecuencia de las reacciones de tipo I y II. Este fotoblanqueo conduce a una disminución de la absorbancia del fotosensibilizador, y por lo tanto a una disminución de su eficacia.

El fotoblanqueo implica dos mecanismos:

- 30 – la fotodegradación, que corresponde a una modificación profunda de la estructura del fotosensibilizador que conduce a la formación de fotoproductos que absorben poco o nada de la luz de activación;
- la fototransformación que corresponde a una pérdida de la absorbancia y de la fluorescencia del fotosensibilizador a ciertas longitudes de onda, pero se conserva el cromóforo.

35 Además, si se irradia un fotosensibilizador a una longitud de onda de excitación apropiada, es posible observar una fluorescencia. Esta fluorescencia corresponde a un retorno del fotosensibilizador en un estado de singlete excitado  $S_1$  hacia el estado fundamental  $S_0$  por emisión de fotones de fluorescencia.

Esta fluorescencia se puede utilizar especialmente para determinar la localización del fotosensibilizador en las células, y para verificar su eliminación completa después del tratamiento.

La intensidad de fluorescencia se ve afectada también por el fotoblanqueo. Así, el fenómeno de fotoblanqueo se puede evaluar por la medida de la disminución de la intensidad de fluorescencia fotoinducida del fotosensibilizador.

40 En el marco de la invención, se ha desarrollado un modelo no lineal de los procesos de fotorreacción básicos de las terapias fotodinámicas (PDT) y se ha descrito por una representación de estado. Este modelo se ha obtenido a partir de ecuaciones cinéticas, conocidas en la literatura, que describen las reacciones de tipo II específicas de la terapia fotodinámica:

$$\begin{cases}
 \frac{d[S_0]}{dt} = u_p + k_f[S_1] - k_{pb}[S_0][^1O_2] + k_p[T_1] + k_T[T_1][^3O_2] - k_A u_L[S_0] \\
 \frac{d[S_1]}{dt} = k_A u_L[S_0] - (k_f + k_{ISC})[S_1] - k_{SM}[S_1][M] \\
 \frac{d[T_1]}{dt} = k_{ISC}[S_1] - k_p[T_1] - k_T[T_1][^3O_2] - k_{TM}[T_1][M] \\
 \frac{d[^3O_2]}{dt} = u_O - k_T[T_1][^3O_2] + k_I[^1O_2] \\
 \frac{d[^1O_2]}{dt} = k_T[T_1][^3O_2] - k_I[^1O_2] - k_{ox}[M][^1O_2] - k_{pb}[S_0][^1O_2] \\
 [M] = [M]_0 \\
 y = \gamma[S_0] + v \\
 v \sim \mathcal{N}(0, s^2)
 \end{cases} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Las variables del modelo son las siguientes:

[S<sub>0</sub>]: concentración de fotosensibilizador en el estado de singlete fundamental (milimolar, mM);

[S<sub>1</sub>]: concentración de fotosensibilizador en el estado de singlete excitado (mM);

5 [T<sub>1</sub>]: concentración de fotosensibilizador en el estado de triplete excitado (mM);

[<sup>3</sup>O<sub>2</sub>]: concentración de oxígeno en el estado de triplete inicial (mM);

[<sup>1</sup>O<sub>2</sub>]: concentración de oxígeno en el estado de singlete excitado (mM);

[M]: concentración de células orgánicas (mM);

$u_p$ : velocidad de absorción de las moléculas de fotosensibilizador en los tejidos (mM·s<sup>-1</sup>);

10  $u_L$ : irradiancia energética de la iluminación (W·cm<sup>-2</sup>);

$u_O$ : velocidad de absorción de las moléculas de oxígeno (mM·s<sup>-1</sup>);

$y$ : intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.).

$x(t) = [[S_0], [S_1], [T_1], [^3O_2], [^1O_2], [M]]^T \in \mathbb{R}^6$  son las variables de estado del modelo.

15 La penetración de las moléculas fotosensibilizantes (PS) en las células es un proceso con una dinámica muy lenta, en comparación con las fotorreacciones. Además, la velocidad de absorción de las moléculas fotosensibilizantes  $u_p$  se puede considerar como nula ( $u_p = 0$ ) durante el periodo de tratamiento, que corresponde a un período de tiempo relativamente corto, inferior a 1 hora.

La velocidad de absorción de moléculas de oxígeno  $u_O(t)$  se puede considerar constante durante el tratamiento.

20 El ruido de medida  $v(t)$  se puede considerar como una secuencia de realización de variables gaussianas independientes y distribuidas de manera uniforme en los instantes de medida  $\{t\}$ , según una distribución normal  $\mathcal{N}(0, \sigma^2)$ .

El modelo de la Ecuación 2 utiliza también un conjunto de parámetros que se enumeran a continuación, con los valores y las condiciones iniciales utilizados para realizar los cálculos:

| Símbolo   | Definición  | Valor   |
|-----------|---|---|
| $k_A$     | Constante de absorción del fotosensibilizador para una iluminación $u_L = 76$ MW·cm <sup>-2</sup>     | 1   |
| $k_{pb}$  | Constante de fotoblanqueo   | $1,6 \cdot 10^6$ mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> |
| $k_T$     | Constante de velocidad bimolecular para la reacción de <sup>3</sup> O <sub>2</sub> con T <sub>1</sub> | $10^5$ mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>           |
| $k_f$     | Constante de fluorescencia para la reacción S <sub>1</sub> → S <sub>0</sub>                           | $2 \cdot 10^7$ s <sup>-1</sup>                    |
| $k_p$     | Constante de fosforescencia para la reacción T <sub>1</sub> → S <sub>0</sub>                          | $1250$ s <sup>-1</sup>                            |
| $k_{ISC}$ | Constante de velocidad para la reacción S <sub>1</sub> → T <sub>1</sub>                               | $8 \cdot 10^7$ s <sup>-1</sup>                    |



|             |   |                                       |
|-------------|---|---------------------------------------|
| $k_l$       | Constante de luminiscencia para la reacción $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$ | $10^5 \text{ s}^{-1}$                 |
| $k_{ox}$    | Constante bimolecular de la reacción de oxidación entre $^1O_2$ y $M$ | $10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
| $y$         | Coefficiente de medida  | 43,15 u.a.                            |
| $[S_0]_0$   | Condición inicial para $[S_0]$  | $8,5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$        |
| $[S_1]_0$   | Condición inicial para $[S_1]$  | 0 mM                                  |
| $[T_1]_0$   | Condición inicial para $[T_1]$  | 0 mM                                  |
| $[^3O_2]_0$ | Condición inicial para $[^3O_2]$                                      | $83 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$         |
| $[^1O_2]_0$ | Condición inicial para $[^1O_2]$                                      | 0 mM                                  |
| $[M]_0$     | Condición inicial para $[M]$  | $830 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$        |

La Fig. 1 presenta los resultados de una simulación numérica de un proceso de fotorreacción con un agente fotosensibilizante presente en un tejido biológico. Esta simulación se calcula implementando el modelo de la Ecuación 2. Los ejes de abscisas corresponden al tiempo  $t$ (s).

- 5 La señal luminosa de activación utilizada para iluminar los tejidos biológicos y el agente fotosensibilizante se presenta en la Fig. 1(b). Se trata de una onda cuadrada de periodo 60 s, con una relación cíclica  $\frac{1}{2}$  y con irradiancia o iluminación energética  $u_L = 95 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ .

La Fig. 1(a) ilustra la evolución temporal de la concentración  $[S_0]$  del agente fotosensibilizante en el estado de singlete fundamental. Esta curva corresponde también a la curva de fotoblanqueo del agente fotosensibilizante.

- 10 La Fig. 1(c) ilustra la evolución temporal de la concentración  $[^1O_2]$  de oxígeno singlete producido por la activación del agente fotosensibilizante por la señal luminosa de activación.

La Fig. 1(d) ilustra la evolución de la cantidad acumulada de oxígeno singlete producido por la activación del agente fotosensibilizante por la señal luminosa de activación.

- 15 En la medida en que el oxígeno singlete es la especie fotocitotóxica que está verdaderamente al principio de los daños biológicos, una medida de su concentración a lo largo del tratamiento puede permitir controlar con gran precisión la aplicación del tratamiento y desarrollar así técnicas de dosimetría capaces de llevar a una mejor reproducibilidad de los resultados.

- 20 Una medida directa de la concentración de oxígeno singlete se puede realizar especialmente midiendo la luminiscencia producida a una longitud de onda de  $1,27 \mu\text{m}$  por este oxígeno singlete. Sin embargo, en la práctica, esta concentración de oxígeno singlete es muy difícilmente medible en condiciones *in vivo*.

Las simulaciones de la Fig. 1 muestran también que la curva de fotoblanqueo del agente fotosensibilizante (Fig. 1(a)) es un buen indicador de la producción de oxígeno singlete (Fig. 1(d)). Así, según un modo de realización preferente de la invención, es la señal de fotoblanqueo la que se utiliza como marcador temporal de la eficacia del tratamiento.

- 25 Como se ha explicado anteriormente, la invención tiene por objeto dar a conocer un método de control en bucle cerrado que permite, a partir del seguimiento a lo largo del tratamiento de una variable testigo de la eficacia del tratamiento (tal como el fotoblanqueo), ajustar las modalidades de aplicación de la irradiación para que este parámetro objetivo siga una evolución temporal predeterminada. Así, el tratamiento puede ser adaptado en tiempo real de manera que la señal de fotoblanqueo siga una evolución predeterminada siendo poco o nada afectada por las variabilidades biológicas entre los sujetos, de tal manera que se mejore la reproducibilidad del tratamiento. La determinación de la evolución temporal o de la curva deseada depende de consideraciones que se salen del campo de la presente invención.

Como se ha explicado anteriormente, el fotoblanqueo se estima midiendo una intensidad de fluorescencia del agente fotosensibilizante. Esta medida no se puede realizar al mismo tiempo que la iluminación porque la señal de fluorescencia no sería discernible.

- 35 Así, en el marco de la invención, la iluminación se aplica en forma de impulsos luminosos tales como los presentados en la Fig. 2(b), de tal manera que se puedan efectuar medidas de fotoblanqueo en tiempo real entre estos impulsos.

Dosimetría

El funcionamiento del dispositivo según la invención se ilustra en la Fig. 2.

El dispositivo según la invención comprende una fuente de luz de activación 2 capaz de generar una luz de activación 10.

5 Esta luz de activación 10 se dirige, por ejemplo, por medio de fibras ópticas hacia los tejidos biológicos 3 de la zona a tratar, en los cuales se ha introducido previamente un agente fotosensibilizante PS. Como se ha explicado anteriormente, este agente fotosensibilizante excitado por la luz de activación provoca la generación de especies fototóxicas que causan la destrucción de las células.

10 La fuente de luz de activación 2 está dirigida por una señal de control de activación 9 de forma temporal  $u(t)$ , que resulta del bucle de retroalimentación 1. Esta señal de control de activación 9 se presenta bajo la forma de una secuencia de impulsos tal como se ilustra en la fig. 1(b). Así, la luz de activación procedente de la fuente 2 dirigida por la señal de activación 9 se aplica bajo la forma de una secuencia temporal  $L(t)$  de impulsos luminosos separados por momentos de extinción. La duración (y/o la amplitud) de los impulsos luminosos es controlada por la señal de control 9.

15 El dispositivo según la invención comprende también un espectrofluorímetro 4 para efectuar las medidas de fotoblanqueo del agente fotosensibilizante. Este espectrofluorímetro 4 comprende una fuente de luz de excitación que emite una luz a longitudes de onda capaces de excitar la fluorescencia del agente fotosensibilizante. La fuente luminosa puede ser por ejemplo un diodo de láser a 410 nm. Esta luz de excitación se dirige hacia los tejidos biológicos 3 de la zona a tratar por medio de al menos una fibra óptica de iluminación. La fluorescencia 11 generada por el agente fotosensibilizante se recoge por fibras ópticas reagrupadas en haz alrededor de la fibra o fibras ópticas de iluminación, para ser llevada al espectrómetro del espectrofluorímetro 4. Se recoge un espectro de fluorescencia de forma  $I(t, \lambda)$ , donde  $\lambda$  es la longitud de onda de emisión de fluorescencia, para varios instantes  $t$  con un periodo de muestreo definido por el usuario. La intensidad de fluorescencia  $y(t)$  emitida por el agente fotosensibilizante se puede determinar entonces por la siguiente fórmula:

25 
$$y(t) = J(t, \lambda_2) - J(t, \lambda_1) \tag{Ecuación 3}$$

donde  $J(T, \lambda)$  es una integral del espectro:

$$J(t, \lambda) = \int_{\lambda_0}^{\lambda} I(t, l) dl, \tag{Ecuación 4}$$

y el intervalo  $[\lambda_1; \lambda_2]$  corresponde a la anchura de banda de emisión de fluorescencia del agente fotosensibilizante. Esta intensidad de fluorescencia  $y(t)$  se utiliza después como señal de medida del fotoblanqueo 12.

30 El dispositivo según la invención se puede utilizar para tratar afecciones en la superficie de la piel o de una pared biológica (esófago, ...). Se puede utilizar también para tratar afecciones o tumores intersticiales. En este caso, la luz de activación 10 puede ser llevada a la zona a tratar 3 y la fluorescencia 11 puede ser recogida con las fibras ópticas insertadas en los tejidos biológicos.

35 Como se ha explicado anteriormente, la medida del fotoblanqueo 12 no se puede efectuar más que cuando la fuente de activación 2 está apagada, porque en el caso contrario la fluorescencia 11 no es discernible.

El dispositivo según la invención comprende finalmente un bucle de retroalimentación 1 implementado en un calculador numérico. La función de este bucle de retroalimentación 1 es ajustar la señal de control de activación 9 de forma temporal  $u(t)$  para que la señal de fotoblanqueo 12 de forma temporal  $y(t)$  siga una consigna 5 de forma temporal  $R(t)$  predeterminada.

40 Por supuesto, en el marco de la invención esta consigna puede ser de cualquier forma temporal  $R(t)$ .

En el bucle de retroalimentación 1, una magnitud de estado 15 de forma temporal  $x(t)$  que depende de la señal de fotoblanqueo 12 se compara con la consigna 5 en un comparador 6, de tal manera que se genera una señal de error de rastreo 7 de forma temporal  $e(t)$ .

45 La señal de error de rastreo 7 se introduce en un corrector 8 que genera una señal de control 9 de la fuente de activación 2 para reducir al mínimo este error en las siguientes repeticiones.

Esta señal de control de activación 9 tiene una forma temporal  $u(t)$  que corresponde a una sucesión de impulsos con un periodo constante, pero cuya amplitud y/o la relación cíclica se ajusta en función de la señal de error de rastreo 7. En el caso de un ajuste de la relación cíclica, que es la solución utilizada en el modo de realización presentado, estos impulsos se obtienen a partir de una señal sinusoidal a la que se añade un intervalo dependiente de la amplitud del error de rastreo  $e(t)$ . Esta señal sinusoidal desplazada en amplitud se transforma después en impulsos de período constante y de relación cíclica dependiente del intervalo calculado por medio de un comparador, para

generar la señal de control  $u(t)$ .

5 Según un primer modo de realización de la invención, el bucle de retroalimentación 1 comprende un interpolador 13 capaz de generar la magnitud de estado 15 a partir de una interpolación, por un método conocido por los expertos en la técnica, de las medidas de fotoblanqueo 12. Esta interpolación consiste en calcular los valores de la magnitud de estado  $x(t)$  a partir de un histórico de medidas de fotoblanqueo  $y(t)$ , eventualmente con una frecuencia de muestreo más elevada, y calculando un promedio del ruido de medida. Se pueden utilizar especialmente interpolaciones de tipo polinomiales o splines.

Según un segundo modo de realización preferente de la invención, el bucle de retroalimentación comprende un observador de estado 14 cuyo funcionamiento se explicará a continuación.

10 Por supuesto, el interpolador 13 y el observador de estado 14 pueden estar ambos implementados en un bucle de retroalimentación 1. La elección de la utilización de uno o de otro puede ser determinada entonces por un parámetro accesible para el usuario.

15 En la práctica, las medidas de fluorescencia en las condiciones *in vivo* son medidas difíciles. La intensidad de fluorescencia 11 es muy baja. Estas medidas necesitan tiempos de integración del orden de la segunda, y tienen mucho ruido. Además, los períodos de iluminación y de oscuridad de la señal luminosa de activación 10 son del orden de 1s a algunas decenas de segundos. Sabiendo que las medidas de fluorescencia 11 no se pueden llevar a cabo más que durante los períodos de oscuridad de la señal luminosa de activación 10, se deduce que la señal de fotoblanqueo 12 que se puede obtener tiene en general mucho ruido y comprende pocas muestras.

20 En estas condiciones, un interpolador clásico 13 corre el riesgo de dar malos resultados, y de generar una magnitud de estado 15 también con mucho ruido, que conduce a un mal funcionamiento global del bucle de regulación 1.

La estimación de la magnitud de estado 15 a partir de las medidas de fotoblanqueo 12 se puede mejorar considerablemente utilizando un observador de estado 14. Se trata de un sensor de software que se basa en un modelo dinámico 16 del fenómeno de fotoblanqueo. El acepta de entrada la señal de control de activación 9 y las medidas de fotoblanqueo 12, y proporciona de salida una estimación de la magnitud de estado 15.

25 El modelo dinámico 16 tiene por función simular la cadena de activación del agente fotosensibilizante y de la medida de fotoblanqueo, que comprende la generación de la señal luminosa de activación 10 por la fuente 2, las interacciones con los tejidos biológicos 3 y la medida del fotoblanqueo 12 con el espectrofluorímetro 4.

El modelo biológico de la Ecuación 2 es difícilmente aplicable, porque depende de un gran número de parámetros difíciles de determinar, y variables entre los sujetos y los tipos de tejidos biológicos.

30 Modelo dinámico simplificado

Se ha desarrollado por lo tanto en el marco de la invención un modelo dinámico simplificado, obtenido directamente a partir de datos experimentales, y no a partir de las ecuaciones teóricas de las reacciones fotoquímicas como el modelo de la Ecuación 2.

35 Este modelo dinámico simplificado permite al observador de estado 14 reconstruir en tiempo real una señal de fotoblanqueo "limpia" a partir de los datos parciales y con ruido 12 medidos durante el tratamiento.

En el caso de la terapia fotodinámica, obtener un modelo simplificado del comportamiento dinámico del fenómeno de fotoblanqueo es complejo. Hay dos razones para esto:

40 – el comportamiento no lineal del fenómeno de fotoblanqueo visible en las simulaciones de la Fig. 1(a) y 1(b). En efecto, se observa claramente un comportamiento asimétrico de la respuesta cuando se activa o no la señal de excitación luminosa. Ahora bien, este cambio de ritmo no se puede describir por un modelo lineal clásico;

– además, como se ha explicado anteriormente, no se pueden medir los espectros de fluorescencia del agente fotosensibilizante más que durante las fases en las que la luz de activación 10 está apagada, si no ella satura la señal debido a su alta potencia. Se está por lo tanto "a ciegas" una gran parte del tiempo.

45 Este modelo dinámico ha sido desarrollado sobre la base de una estructura ARX ("Auto Regressive Model with eXternal inputs" en inglés o modelo autorregresivo con entradas externas). Esta estructura ARX se define por la ecuación de las diferencias:

$$y(t) + a_1y(t - 1) + \dots + a_{n_a}y(t - n_a) = b_1u(t - n_k) + \dots + b_{n_b}u(t - n_k - n_b + 1) + v(t). \quad (\text{Ecuación 5})$$

$y(t)$  indica la variable de salida que es aquí la señal de fotoblanqueo 12).  $u(t)$  indica la variable de entrada que es

aquí la señal de control 9 de la fuente luminosa de activación 2. El error  $v(t)$  es una variable aleatoria cuya distribución sigue una distribución normal de media cero y de varianza  $\sigma^2$ ,  $N(0, \sigma^2)$ .  $t$  es la variable del tiempo que representa los instantes discretos muestreados con un periodo de muestreo  $T_s$ .  $n_a$ ,  $n_b$ ,  $n_k$  son índices de estructura, que comprenden, respectivamente, los órdenes de los polinomios de las partes auto-regresivas y externas, así como el retraso de la salida con respecto a la entrada.

5 Para describir el comportamiento asimétrico del fenómeno de fotoblanqueo cuando la señal de excitación luminosa está activada o no, se introduce un modelo ARX a tramos, definido por las siguientes ecuaciones,

$$\begin{aligned} & y(t) + a_{1,1}y(t-1) + \dots + a_{1,n_a}y(t-n_a) \\ & = b_{1,1}u(t-n_k) + \dots + b_{1,n_b}u(t-n_k-n_b+1) + v_1(t) \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

si  $\delta u(t) \geq 0$ , y

$$\begin{aligned} & y(t) + a_{2,1}y(t-1) + \dots + a_{2,n_a}y(t-n_a) \\ & = b_{2,1}u(t-n_k) + \dots + b_{2,n_b}u(t-n_k-n_b+1) + v_2(t) \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

si  $\delta u(t) \leq 0$ .

$\delta u(t) = u(t) - u(t-1)$  corresponde a las variaciones de la señal de control 9.  $v_1(t)$  y  $v_2(t)$  son dos procesos gaussianos centrados independientes e idénticamente distribuidos.

En el caso presente, se puede limitar a  $n_a = n_b = n_k = 1$ .

15 La Ecuación 6 y la Ecuación 7 se pueden reagrupar dentro de una misma relación,

$$\begin{aligned} & y(t) + a_{1,1}y(t-1) + (a_{2,1} - a_{1,1})y(t-1)b(t) \\ & = b_{1,1}u(t-1) + (b_{2,1} - b_{1,1})u(t-1)b(t) + v_1(t) + (v_2(t) - v_1(t))b(t). \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

La variable de secuenciación  $b(t)$  es una variable binaria necesaria para la selección de los dos patrones lineales. Se define de la siguiente manera:

$$\begin{cases} b(t) = 0 & \text{si } \delta u(t) > 0 \\ b(t) = 1 & \text{si } \delta u(t) < 0 \\ b(t) = b(t-1) & \text{si } u(t) = 0 \end{cases} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

20 El modelo de la Ecuación 8 se puede transformar en una representación de estado a tiempo discreto con la variable de estado  $x(t)$ :

$$x(t+1) = -a_{1,1}x(t) + B u(t) \quad \text{(Ecuación 10)}$$

$$y(t) = x(t) + v(t), \quad \text{(Ecuación 11)}$$

donde  $B = (-\alpha_{2,1} + \alpha_{1,1} \ b_{1,1} \ b_{2,1} - b_{1,1})$ ,  $\mathbf{u}^T(t) = (x(t)b(t) \ u(t) \ u(t)b(t))$ , y  $v(t) \sim N(0, \sigma^2)$ .

25 En el contexto de la invención, se puede imponer que el comportamiento esperado sea constante durante las fases en que la luz de activación está apagada. Este comportamiento puede ser descrito por un modelo de integrador con una ganancia cero. En otras palabras, esto equivale a establecer  $\alpha_{2,1} = -1$  y  $b_{2,1} = 0$ .

Finalmente, para describir completamente el modelo, faltan por determinar los parámetros  $\alpha_{1,1}$  y  $b_{1,1}$ . Estos parámetros se pueden estimar a partir de medidas experimentales realizadas en condiciones próximas a las condiciones de aplicación del tratamiento, por ejemplo, durante experimentos *in vivo* en animales.

30 La determinación de estos parámetros se puede realizar con el montaje de la Fig. 2, en una fase de identificación efectuada en bucle abierto, explotando las medidas de fotoblanqueo  $y(t)$  obtenidas en respuesta a una señal de control  $u(t)$  conocida. Los parámetros  $\alpha_{1,1}$  y  $b_{1,1}$  se ajustan para que la Ecuación 10 y la Ecuación 11 describan lo mejor posible las medidas.

35 La Fig. 4 ilustra la calidad de ajuste de este tipo de modelo sobre los datos de fotoblanqueo obtenidos en condición *in vitro*. La curva 35 representa las medidas de fotoblanqueo  $y(t)$  obtenidas en respuesta a una señal de control  $u(t)$ , y la curva 36 representa la respuesta del modelo de la Ecuación 10 y de la Ecuación 11 en estas condiciones. La

correspondencia entre la respuesta del modelo y las medidas (coeficiente de determinación) es del orden de 95 %.

La Ecuación 10 y la Ecuación 11 constituyen así el modelo dinámico 16 del fenómeno de fotoblanqueo, con lo que se puede ver que se puede obtener de manera sencilla haciendo un mínimo de hipótesis sobre los parámetros fisiológicos.

5 Se puede deducir también directamente un modelo para el observador de estado 14 como sigue:

$$x(t+1) = -a_{1,1}x(t) + \mathbf{B} u(t) + K\varepsilon(t) \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$\hat{y}(t) = x(t) \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$\varepsilon(t) = y(t) - \hat{y}(t), \quad (\text{Ecuación 14})$$

10 Con  $\hat{y}(0) = y(0)$ .  $\hat{y}(t)$  es el fotoblanqueo estimado por el observador de estado 14, y  $K$  un factor multiplicativo (ganancia de innovación).

Cabe señalar que este modelo también es capaz de tener en cuenta el fotoblanqueo del agente fotosensibilizante debido a la luz de excitación emitida por el espectrocolorímetro 4 para generar la fluorescencia.

El desarrollo de las etapas del procedimiento de aplicación de la terapia fotodinámica se ilustra en la figura 3:

- etapa 20: en un primer tiempo, se programa una trayectoria de fotoblanqueo  $R(t)$  predeterminada;
- 15 – etapa 21: se realiza una medida de fotoblanqueo por medio del espectrofluorímetro 4 para obtener un valor de fotoblanqueo medido  $y(t)$ ;
- etapa 22: la variable de estado  $x(t)$  (que corresponde a un valor estimado de fotoblanqueo  $\hat{y}(t)$ ) es calculada por el observador de estado 14, teniendo en cuenta el último valor de la señal de control de la fuente luminosa de activación  $u(t)$ ;
- 20 – etapa 23: se calcula el error de rastreo  $e(t)$ ;
- etapa 24: la señal de control de la fuente luminosa de activación  $u(t)$  es calculada por el corrector 8;
- etapa 25: la señal luminosa de activación  $L(t)$  es aplicada por la fuente de activación 2 a la zona a tratar 3 en la forma de un impulso de iluminación cuya duración se determina por la señal de control  $u(t)$ ;
- etapa 26: el sistema espera el final del impulso luminoso  $L(t)$ ;
- 25 – etapa 27: si la trayectoria de fotoblanqueo  $R(t)$  está completamente recorrida, se para el tratamiento (etapa 28). En el caso contrario la ejecución del algoritmo continúa de manera iterativa en la etapa 21 por una nueva medida de fotoblanqueo (vuelta a la etapa 21).

Se debe observar que este algoritmo comprende dos bucles anidados:

- 30 – un primer bucle de medida 29 entre las etapas 27 y 21 que está sincronizado con las medidas de fotoblanqueo;
- un segundo bucle de medida 30 entre las etapas 24 y 22 que permite tener en cuenta las variaciones de la señal de control  $u(t)$  en las estimaciones del fotoblanqueo  $\hat{y}(t)$  proporcionadas por el observador de estado 14.

35 El bucle de contra-reacción 30 puede así ser ejecutado a un ritmo muy superior al bucle de medida 29 (por ejemplo, del orden de 10 veces) basándose en las estimaciones producidas por el observador a un ritmo regular, incluso cuando las medidas de fotoblanqueo son imposibles (durante la iluminación). Así se puede reducir en gran medida, el ruido en el bucle de contra-reacción.

El período del bucle de medida 29 determina el período de la señal de control  $u(t)$ . La duración de los impulsos de esta señal de control  $u(t)$  o su relación cíclica es ajustada por el bucle de contra-reacción 30.

40 Finalmente, el observador de estado 14 puede ser "suspendido" en cada iteración del bucle de medida, lo que permite relajar considerablemente las obligaciones sobre la precisión necesaria para el modelo dinámico 16.

45 La Fig. 5 ilustra los resultados del observador de fotoblanqueo. La curva 40 es una curva de fotoblanqueo teórica calculada con el modelo citotóxico de la Ecuación 2. Esta curva simula, de manera ideal y sin ruido de medida, un procedimiento de regulación del fotoblanqueo efectuado según la invención, que sigue una trayectoria de fotoblanqueo  $R(t)$ , que es una línea recta. A partir de esta curva, las medidas de ruido 41 han sido generadas

añadiendo a las mismas el blanco de ruido para simular las medidas de fotoblanqueo  $y(t)$ , tal como si se hubieran obtenido con el espectrofluorímetro 4 en las condiciones reales. La curva 42 presenta los valores estimados de fotoblanqueo  $y(t)$  producidos por el observador de estado 14 a partir del control  $u(t)$  y de las medidas de ruido  $y(t)$  en estas condiciones. Se observa la capacidad del observador de estado 14 para estimar con precisión la curva del fotoblanqueo teórico 40 a pesar del ruido de medida.

La Fig. 6 presenta medidas de la regulación del fotoblanqueo obtenida con el dispositivo según la invención, en condiciones *in vitro*. La curva 52 corresponde a la trayectoria de fotoblanqueo deseada  $R(t)$ , la curva 50 corresponde a las medidas de fotoblanqueo  $y(t)$ , y la curva 51 corresponde a la señal de control de la activación  $u(t)$ . Se puede observar que a pesar de una distancia importante en un principio entre la consigna  $R(t)$  y las medidas  $y(t)$ , el sistema es capaz de hacer converger rápidamente y después controlar el fotoblanqueo lo más cerca posible de la trayectoria de consigna.

Según variantes de modos de realización, la fuente de luz de activación 2 y el corrector 8 pueden ser diseñados para generar:

- impulsos de luz 10 de amplitud variable en función del error de rastreo 7. Estos impulsos pueden ser de relación cíclica constante (por ejemplo, de 50 %) y de periodo constante;
- impulsos de luz 10 de duración y de periodo variable en función del error de rastreo 7.

Por supuesto, la invención no se limita a los ejemplos que acaban de ser descritos y se pueden aportar numerosas modificaciones a estos ejemplos sin salirse del marco de la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo para controlar la activación de una sustancia fotosensibilizante introducida previamente en un tejido biológico (3), siendo seleccionada la sustancia fotosensibilizante entre las porfirinas y las clorinas, comprendiendo el dispositivo:
- 5 – medios de exposición (2) capaces de permitir una exposición de dicha sustancia fotosensibilizante a una radiación electromagnética de activación (10) de manera que la active, cuyos medios de exposición comprenden una fuente luminosa de activación (2) capaz de producir impulsos de luz (10) en función de una señal de control (9), y
- 10 – medios de adquisición (4) capaces de producir una información de luminiscencia (11, 12) procedente de dicha sustancia fotosensibilizante,
- estando caracterizado el dispositivo porque comprende, además;
- medios electrónicos y de cálculo capaces de controlar los medios de exposición (2) de manera que permitan un ajuste de la exposición de la sustancia fotosensibilizante a la radiación electromagnética de activación (10) para que dicha información de luminiscencia (11, 12) siga una evolución temporal correspondiente a una consigna temporal predeterminada (5),
- 15 utilizando los medios electrónicos y de cálculo un bucle de retroalimentación (1) que comprende:
- un observador de luminiscencia (14) que utiliza de entrada al menos una medida de luminiscencia (12) y una señal de control (9) de la fuente luminosa de activación (2), y que produce de salida una estimación de la luminiscencia (15),
- 20 – medios (6) para efectuar una comparación de la estimación de la luminiscencia (15) procedente del observador de luminiscencia (14) con la consigna temporal (5) de tal manera que se genere una señal de error (7),
- un corrector (8) capaz de generar dicha señal de control (9) de la fuente luminosa de activación (2) utilizando la señal de error (7).
- 25 2. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende medios de adquisición (4) capaces de producir una información de luminiscencia (11, 12) a partir del oxígeno singlete generado por la activación de la sustancia fotosensibilizante.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende medios de adquisición (4) capaces de medir una intensidad de fluorescencia de la sustancia fotosensibilizante entre los impulsos de luz (10) de la fuente luminosa de activación (2).
- 30 4. El dispositivo de la reivindicación 3, que comprende medios de adquisición (4) que comprenden:
- una fuente de luz de excitación para emitir una luz a longitudes de onda de excitación capaces de excitar la fluorescencia de la sustancia fotosensibilizante,
- medios de medida de una intensidad de fluorescencia (11).
- 35 5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que los medios de adquisición (4) comprenden un espectrómetro o un espectrofluorímetro.
6. El dispositivo de una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un observador de luminiscencia modelado bajo la forma de un observador de estado (14) que comprende una variable de estado (15) que corresponde a una estimación de la luminiscencia.
- 40 7. El dispositivo de la reivindicación 6, en el que el observador de estado (14) se deriva de un modelo autorregresivo (16) con entradas externas ARX, o de un modelo de tipo representación de estado.
8. El dispositivo de una de las reivindicaciones precedentes, en el que el observador de luminiscencia (14) comprende parámetros que se determinan por calibración a partir de medidas experimentales.
- 45 9. El dispositivo de una de las reivindicaciones precedentes, en el que el corrector (8) es capaz de generar una señal de control (9) que corresponde a una secuencia de impulsos con un periodo constante y cuya amplitud y/o relación cíclica se ajusta en función de la señal de error (7).
10. El dispositivo de una de las reivindicaciones precedentes, que se utiliza con una sustancia fotosensibilizante cuya activación produce sustancias capaces de destruir las células.

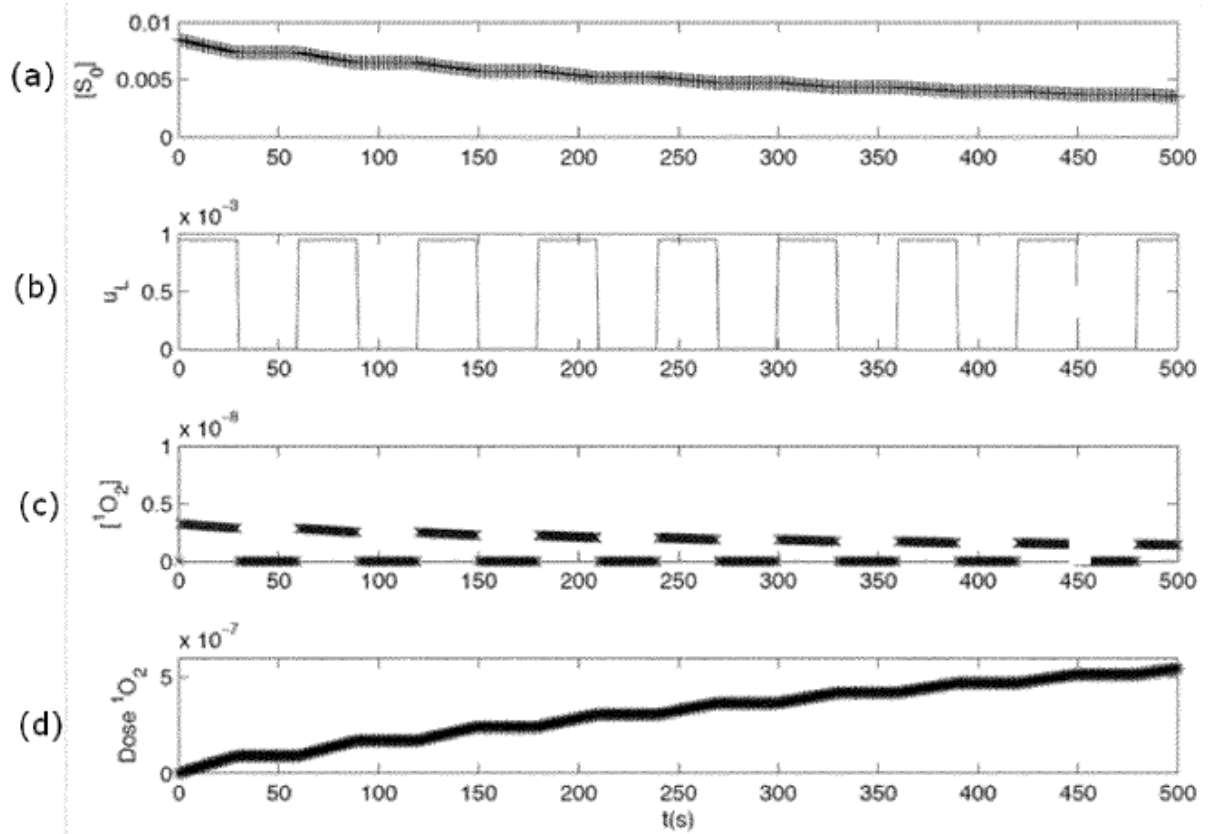


Fig. 1

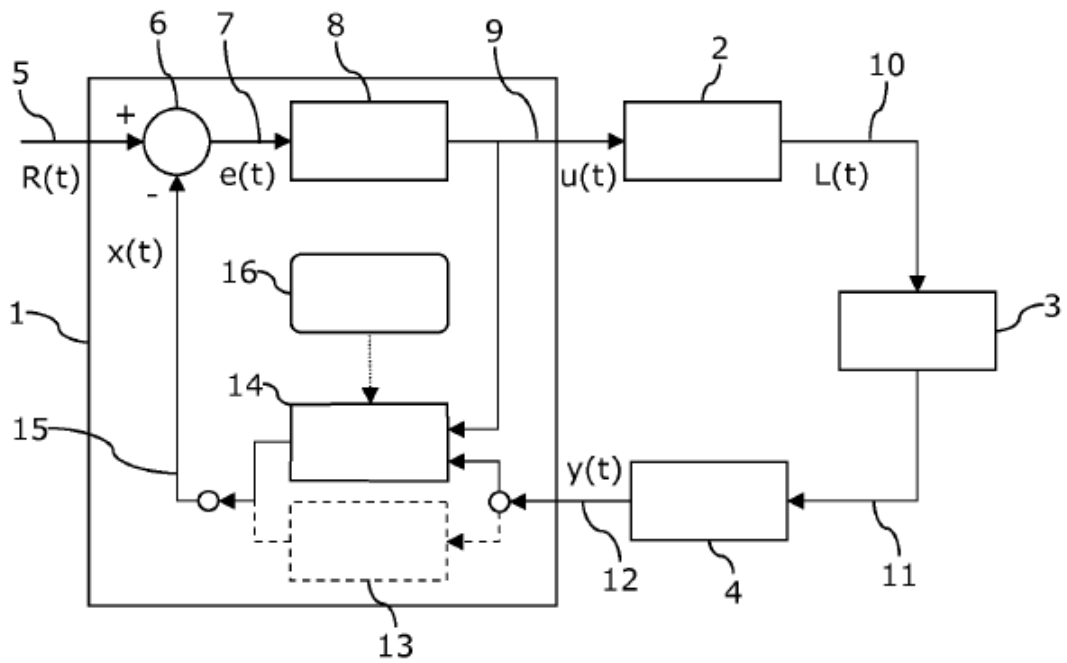


Fig. 2



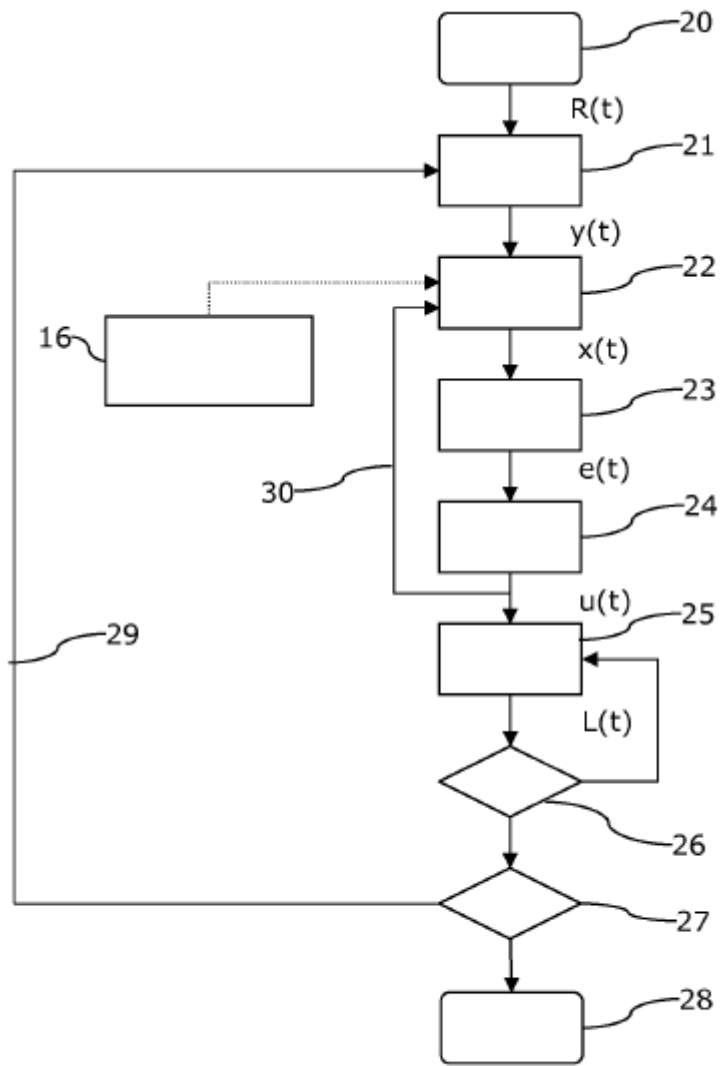


Fig. 3

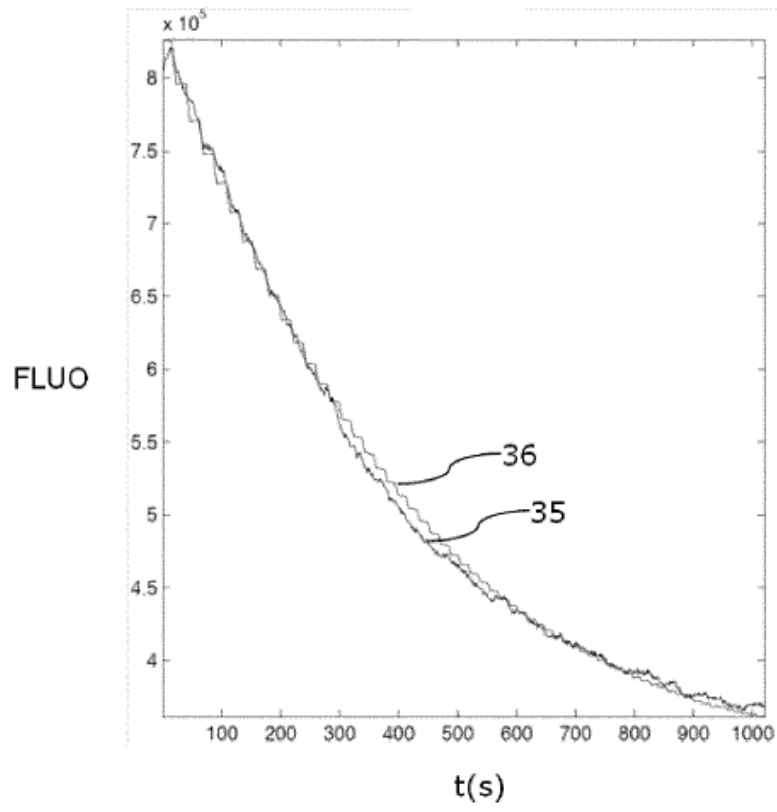


Fig. 4

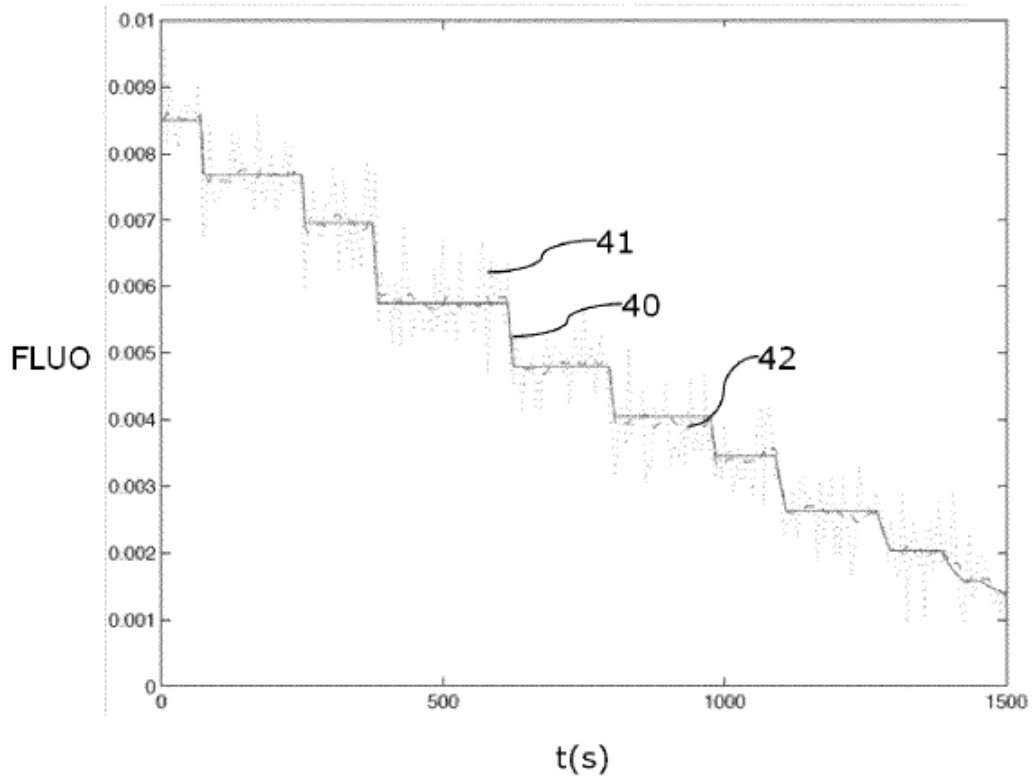


Fig. 5

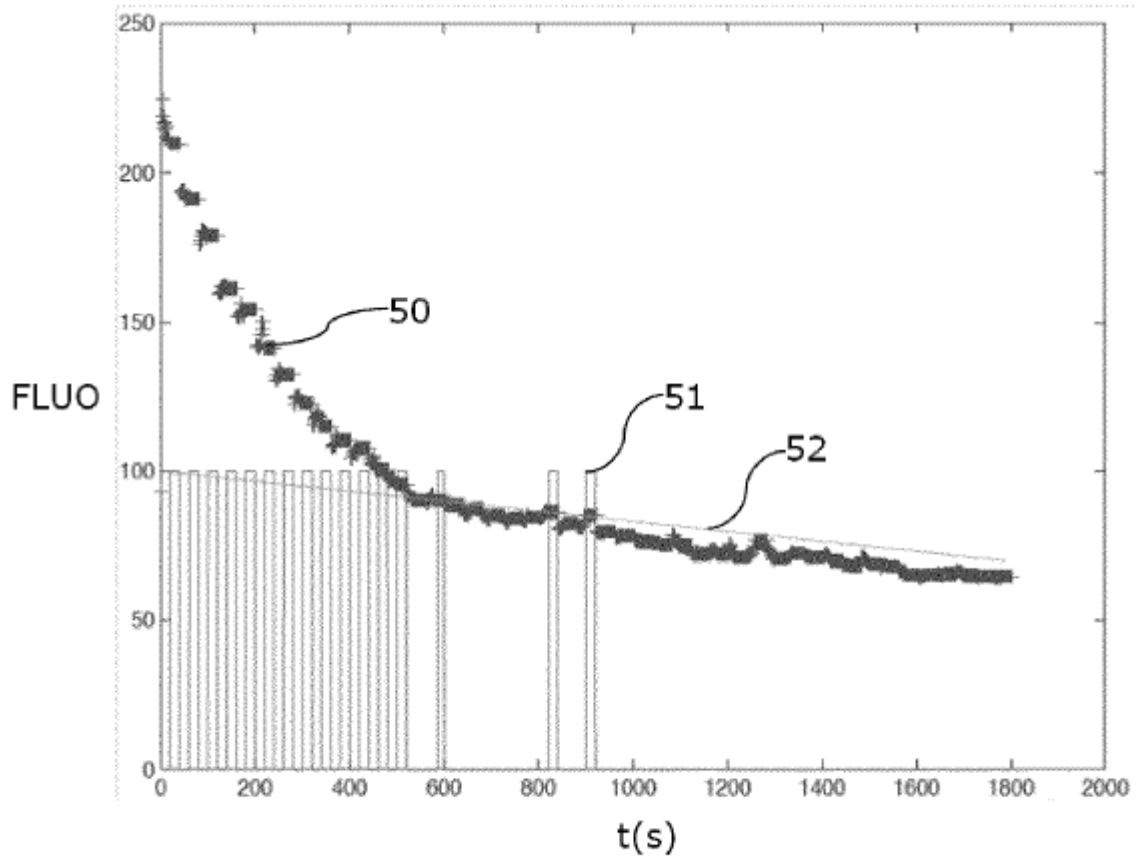


Fig. 6