

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514150

(P2004-514150A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int. Cl.⁷

G01N 21/64

A61B 10/00

G01N 21/17

F I

G01N 21/64

A61B 10/00

G01N 21/17

Z

E

620

テーマコード(参考)

2G043

2G059

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 100 頁)

(21) 出願番号 特願2002-543944 (P2002-543944)
 (86) (22) 出願日 平成13年11月27日 (2001.11.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年5月27日 (2003.5.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/044764
 (87) 国際公開番号 W02002/041760
 (87) 国際公開日 平成14年5月30日 (2002.5.30)
 (31) 優先権主張番号 09/723, 033
 (32) 優先日 平成12年11月27日 (2000.11.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

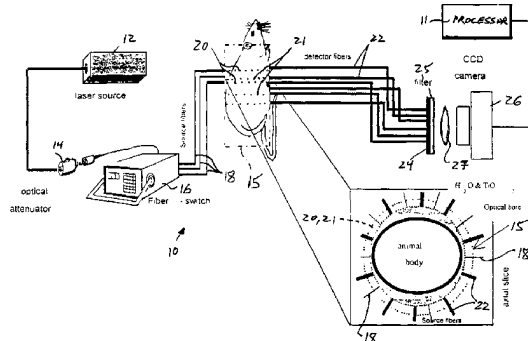
(71) 出願人 399037243
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレー
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
 ストン フルート ストリート 55
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 ニツィアクリストス バシリス
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
 ンブリッジ メモリアル ドライブ 81
 2 アパートメント 1212

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光媒介式分子断層撮影法

(57) 【要約】

本発明は、深部組織における近赤外蛍光賦活の検出を目的として設計された、蛍光媒介式の分子断層撮影撮像システムに関する。システムでは、標的蛍光分子プローブまたは活性化可能な高感度の蛍光分子プローブを使用することができる。このようなプローブにより分子の特異度が向上し且つ高い蛍光コントラストがもたらされ、したがって、癌などの疾患組織をインビボで早期に検出および分子標的の評価することが可能になる。本発明の新規の断層撮影撮像システムにより、分子プローブの定量および深部組織における三次元の位置特定が可能になる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、蛍光媒介式分子断層撮影法 (F M T) 撮像システム :

入射光を供給するための光源 ;

2 つ以上の別々の励起点から対象物内へと光を誘導するための多点入射光照射アレイ ;

光源から多点入射光照射アレイの各点へと光を伝送するための複数の光ファイバー ;

対象物から放出された光を 2 つ以上の別々の収集点から収集するための多点検出アレイ ;

対象物から放出された光を検出器へと伝送するための二次元発光アレイ ;

各収集点から二次元発光アレイ上の対応する点へと光を伝送するための複数の光ファイバー ; および

二次元発光アレイの各点から放出された光を検出し且つ対象物から放出された光に対応するデジタル信号に変換するための検出器。

10

【請求項 2】

光源が近赤外 (N R) 光源である、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 3】

対象物がヒトの患者であり、且つ、多点検出アレイが患者の一部に適合するように構成された、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 4】

発光が蛍光である、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 5】

発光が、連続波 (C W) 光、時間分解 (T R) 光、輝度変調 (I M) 光、またはこれらの任意の組合せである、請求項 1 記載のシステム。

20

【請求項 6】

検出器が生成したデジタル信号を処理して出力装置に画像を提供するプロセッサをさらに含む、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 7】

出力装置が複数の画像を同時に提供する、請求項 6 記載のシステム。

【請求項 8】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム :

30

i) 収集された蛍光測定結果からバックグラウンド信号およびフィルターにじみ信号を減算することによって、補正蛍光測定結果を生成する段階 ;

i i) 収集された固有信号から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正固有拡散信号を生成する段階 ; ならびに

i i i) 補正蛍光測定結果を補正固有拡散信号で除することによって、自己較正蛍光測定結果を生成する段階。

【請求項 9】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム :

i) 収集された蛍光測定結果からバックグラウンド信号およびフィルターにじみ信号を減算することによって、補正蛍光測定結果を生成する段階 ;

40

i i) 収集された固有信号測定結果から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正固有信号測定結果を生成する段階 ;

i i i) 補正蛍光測定結果を補正固有測定結果で除することによって、自己較正蛍光測定結果を生成する段階 ;

i v) 収集された拡散信号から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正バックグラウンド - 媒体拡散信号を生成する段階 ; ならびに

v) 補正固有信号測定結果を補正バックグラウンド - 媒体拡散信号で除することによって、自己較正固有測定結果を生成する段階。

【請求項 10】

50

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム：

i) 自己較正測定結果 $M = M_1 - M_3 / M_2 - M_4$ を生成する段階であって、 M_1 は発光波長の蛍光信号であり、 M_2 は固有信号であり、 M_3 はバックグラウンドにじみ信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号である段階。

【請求項 1 1】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム：

i) 自己較正測定結果 $M = (M_1 - (q_1(r) \times M_2 - c_t)) / (M_2 - M_4)$ を生成する段階であって、 M_1 は発光波長の蛍光信号であり、 M_2 は固有信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号であり、 q_1 は固有場のフィルター減衰であり、 c_t はバックグラウンド暗雑音測定結果の像を表す定数である段階。 10

【請求項 1 2】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム：

i) 自己較正測定結果 $M = M_1 - M_3 / M_2 - M_4$ を生成する段階であって、 M_1 は発光波長の蛍光信号であり、 M_2 は固有信号であり、 M_3 はバックグラウンドにじみ信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号である段階；ならびに

ii) $(M - P \times U)$ の関数 $F(U)$ を最小にすることによって U の分布および大きさを得る段階であって、 U は撮像対象物中の標的の未知濃度のベクトルであり、 P は蛍光モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算される M のフォーワード予測子である段階。 20

【請求項 1 3】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム：

i) 自己較正固有測定結果 $M' = \log(M_2 - M_4) / (M_5 - M_4)$ を生成する段階であって、 M_2 は固有信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号であり、 M_5 はバックグラウンド - 媒体拡散信号である段階；

ii) $(M' - P' \times O)$ の関数 $F'(O)$ を最小にすることによって O の分布および大きさを得る段階であって、 O は対象物中の蛍光体の未知濃度のベクトルであり、 P' は吸収 / 散乱モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算される M' のフォーワード予測子である段階； 30

iii) 活性化比 $AR = U / O$ を計算する段階；ならびに

iv) AR に対応する画像を生成する段階。

【請求項 1 4】

プロセッサが、以下の段階によってデジタル信号を処理するようプログラムされている、請求項 6 記載のシステム：

i) 自己較正測定結果 $M = M_1 - M_3 / M_2 - M_4$ を生成する段階であって、 M_1 は発光波長の蛍光信号であり、 M_2 は固有信号であり、 M_3 はバックグラウンドにじみ信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号である段階； 40

ii) 自己較正固有測定結果 $M' = \log(M_2 - M_4) / (M_5 - M_4)$ を生成する段階であって、 M_5 はバックグラウンド - 媒体拡散信号である段階；

iii) 関数 $F(U) = (M - P \times U)^2$ を最小にすることによって U の分布および大きさを得る段階であって、 U は撮像対象物中の標的の未知濃度のベクトルであり、 P は蛍光モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算される M のフォーワード予測子である段階；

iv) 関数 $F'(O) = (M' - P' \times O)^2$ を最小にすることによって O の分布および大きさを得る段階であって、 O は対象物中の蛍光体の未知濃度のベクトルであり、 P' は吸収 / 散乱モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算される M' のフォーワード予測子である段階； 50

v) 活性化比 $AR = U/O$ を計算する段階；ならびに

vi) AR に対応する画像を生成する段階。

【請求項 15】

多点入射光アレイが、少なくとも 12 個の光点を含むシリンダーである、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 16】

シリンダーが多点検出アレイをさらに含む、請求項 15 記載のシステム。

【請求項 17】

多点入射光アレイが、少なくとも 12 個の光点を含むベルトである、請求項 1 記載の撮像システム。

10

【請求項 18】

ベルトが多点検出アレイをさらに含む、請求項 17 記載の撮像システム。

【請求項 19】

検出アレイの各収集点からの光を伝送する複数の光ファイバーが 100 本を超える別々のファイバーを含み、且つ、検出アレイが少なくとも 100 個の収集点を含む、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 20】

多点入射光アレイが平らなプレートを含む、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 21】

多点入射光アレイが、間隔を空け且つ平行に配置された 2 つの平らなプレートを含む、請求項 1 記載の撮像システム。

20

【請求項 22】

二次元発光アレイが、患者から放出された三次元の光に対応する複数の光点の二次元パターンであって、1 つの励起点から他の 2 つ以上の励起点への照明切り替えに対応した速度で経時的に変化するパターンを検出器へと伝送する、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 23】

2 つ以上の励起点、光源によって一度に 1 つずつ照明される、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 24】

対象物へと誘導される光の波長が 550 ~ 950 ナノメートルである、請求項 1 記載の撮像システム。

30

【請求項 25】

検出器が電荷結合素子 (CCD) カメラを含む、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 26】

検出器が光電子倍增管を含む、請求項 1 記載の撮像システム。

【請求項 27】

NIR 蛍光 (NERF) 分子プローブ、賦活可能な蛍光プローブ、標的蛍光プローブ、または非特異的な蛍光プローブをさらに含む、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 28】

NIRF プローブが賦活可能な分子プローブである、請求項 27 記載のシステム。

40

【請求項 29】

(1) 患者に投与された蛍光体を含む分子プローブの濃度と (2) 患者体内の特定の標的に対応する活性化蛍光体の濃度との比に対応する光学分子マップを表示する方法であって、以下の段階を含む方法：

i) 固有吸収に基づいて蛍光体濃度に関する第一のデータセットを提供する段階；

ii) 校正した蛍光に基づいて、活性化蛍光体の濃度に関する第二のデータセットを提供する段階；

iii) 各点ごとに第一のデータセットを第二のデータセットで除することによって第三のデータセットを提供する段階；および

iv) 第三のデータセットを処理することによって、(1) 蛍光体を含む分子プローブの

50

濃度と(2)患者体内の特定の標的に対応する活性化蛍光体の濃度との比に対応する光学分子マップを提供する段階。

【請求項30】

患者体内の標的領域の三次元定量的分子断層撮影像を得る方法であって、以下の段階を含む方法：

蛍光分子プローブを患者に投与する段階であって、分子プローブが患者体内の標的領域内に選択的に蓄積する段階；

光を複数の点から患者体内に誘導する段階；

患者から放出される蛍光を検出する段階；および

検出された光を処理することによって、患者体内の三次元標的領域と標的領域内に蓄積した分子プローブの量とに対応する三次元画像を提供する段階。 10

【請求項31】

光が近赤外(NIR)光であり、且つ、プローブがNIR蛍光(NIRF)分子プローブである、請求項30記載の方法。

【請求項32】

三次元画像が二次元の出力装置に描出される、請求項30記載の方法。

【請求項33】

処理が、患者から放出された蛍光信号をデジタル化する段階、患者およびバックグラウンド媒体からの蛍光信号および固有信号の測定結果を組み合わせることによりデジタル信号を自己校正する段階、ならびに、三次元定量画像を再構成する段階を含む、請求項30記載の方法。 20

【請求項34】

処理が以下の段階を含む、請求項30記載の方法：

i) 収集された蛍光測定結果からバックグラウンド信号およびフィルターにじみ信号を減算することによって、補正蛍光測定結果を得る段階；

ii) 収集された固有信号測定結果からバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正固有信号測定結果を得る段階；

iii) 補正蛍光測定結果を補正固有測定結果で除することによって、自己校正蛍光測定結果を得る段階；

iv) 収集された拡散信号から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正バックグラウンド-媒体拡散信号を得る段階；ならびに 30

v) 補正固有信号測定結果を補正バックグラウンド-媒体拡散信号で除することによって、自己校正固有測定結果を得る段階。

【請求項35】

処理が以下の段階を含む、請求項30記載の方法：

i) 自己校正測定結果 $M = M_1 - M_3 / M_2 - M_4$ を生成する段階であって、 M_1 は発光波長の蛍光信号であり、 M_2 は固有信号であり、 M_3 はバックグラウンドにじみ信号であり、 M_4 はバックグラウンド周辺光信号である段階；

ii) 自己校正固有測定結果 $M' = \log(M_2 - M_4) / (M_5 - M_4)$ を生成する段階であって、 M_5 はバックグラウンド-媒体拡散信号である段階； 40

iii) $(M - P \times U)$ の関数 $F(U)$ を最小にすることによってUの分布および大きさを得る段階であって、Uは撮像対象物中の標的の未知濃度のベクトルであり、Pは蛍光モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算されるMのフォーワード予測子である段階；

iv) $(M' - P' \times O)$ の関数 $F'(O)$ を最小にすることによってOの分布および大きさを得る段階であって、Oは対象物中の蛍光体の未知濃度のベクトルであり、P'は吸収/散乱モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について拡散方程式を解くことによって計算されるM'のフォーワード予測子である段階；

v) 活性化比 $AR = U / O$ を計算する段階；ならびに

vi) ARに対応する画像を生成する段階。 50

【請求項 36】

分子プローブを投与する段階が、賦活可能な分子プローブを全身的に注射する段階を含む、請求項 30 記載の方法。

【請求項 37】

分子プローブを投与する段階が、賦活可能な分子プローブを標的領域に局所的に注射する段階を含む、請求項 30 記載の方法。

【請求項 38】

分子プローブを投与する段階が、賦活可能な分子プローブを非標的領域に局所的に注射する段階を含む、請求項 30 記載の方法。

【請求項 39】

患者体内に誘導される光の波長が 550 ~ 950 ナノメートルである、請求項 30 記載の方法。

10

【請求項 40】

光が、固定の三次元形状に配置された少なくとも 32 個の別々の光点から患者体内へと誘導される光である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 41】

光が、少なくとも 12 個の光点を有するベルトを含む多点入射光アレイにより患者体内に誘導される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 42】

ベルトが多点検出アレイをさらに含む、請求項 41 記載の方法。

20

【請求項 43】

多点入射光照射アレイおよび多点検出アレイの空間位置が画像の位置合わせによって決定される、請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

患者から放出された蛍光が、二次元発光蛍光アレイから電荷結合素子 (CCD) カメラによって検出される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 45】

光子パルスが患者体内に誘導され、且つ、患者から放出された光子の到着が別の光子検出器アレイによって時間分解される、請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

放出される光が、連続波 (CW) 光、時間分解 (TR) 光、輝度変調 (IM) 光、またはこれらの任意の組合せである、請求項 30 記載の方法。

30

【請求項 47】

患者から放出された蛍光が三次元多点検出アレイにより収集され、二次元発光アレイ上に表示され、且つ、検出器により撮像される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 48】

方法が時間の関数として動的に実施される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 49】

測定結果 M5 の代わりに時刻 0 における測定結果 M2 が使用される、請求項 35 記載の方法。

40

【請求項 50】

画像が磁気共鳴映像法またはコンピュータ断層撮影法により取得された画像と位置合わせされる、請求項 30 記載の方法。

【請求項 51】

多点入射光照射アレイが基準点を含み、且つ、基準点が対象物上のアレイの空間位置特定に使用される、請求項 1 記載のシステム。

【請求項 52】

多点検出アレイが基準点を含み、且つ、基準点が対象物上のアレイの空間位置特定に使用される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 53】

50

患者体内の細胞異常を検出する方法であって、特定の細胞異常に標的する分子プローブを使用して請求項 30 記載の方法を用いることを含む方法。

【請求項 54】

方法が疾患の早期検出に用いられる、請求項 53 記載の方法。

【請求項 55】

疾患が、癌、心血管疾患、AIDS、神経変性疾患、炎症性疾患、または免疫疾患である、請求項 54 記載の方法。

【請求項 56】

特定の分子標的により活性化される分子プローブを使用して請求項 30 記載の方法を用いることを含む、分子標的に対する化合物の効果を評価する方法であって、プローブを標的に接触させ、標的を化合物に接触させる前および後に標的を撮像して、対応する画像を比較する方法であって、且つ、分子標的の変化により化合物の有効性が示される方法。 10

【請求項 57】

特定の分子標的がプロテアーゼであり、且つ、化合物がプロテアーゼ阻害剤である、請求項 56 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、蛍光色素および新規な光学断層撮影撮像法を用いて、生きている哺乳動物および患者から定量的且つ三次元の分子情報を抽出する方法に関する。 20

【0002】

背景技術

分子撮像は、広範には、哺乳動物およびヒトの患者において細胞レベルおよび分子レベルでの生物学的プロセスを特徴決定および測定することであると定義できる。例えば磁気共鳴映像法(MR)、コンピュータ断層撮影法(CT)、および超音波撮像法(US)などの「古典的な」診断用撮像法と対照的に、分子撮像では、分子の変化による最終的な影響を撮像するのではなく、むしろ疾患の基礎となっているこれら分子の異常を分析する。分子標的を特異的に撮像することにより、疾患をより早期に検出および特徴決定でき、ならびに、治療有効性の分子的評価を直接的且つより早期に行うことができる。分子撮像は、理論的には種々の撮像技術により実施可能であり、現在のところ好ましい撮像技術はプローブ検出の感度が高い核撮像技術(例えばPET撮像法およびSPECT撮像法など)である。典型的には静脈から投与されたプローブによって目的の標的が認識される。MRIにより検出可能なプローブもいくつか開発されている(Moatsら, Angewandte Chemie Int. Ed., 36:726-731, 1997; Weisslederら, Nat. Med., 6:351-5, 2000)。ただし、アイソトーププローブの検出閾値がピコ/フェムトモルのレンジであるのに対して、これらMRI用プローブの検出閾値は通常マイクロモルのレンジにある。 30

【0003】

別の方法として、蛍光プローブを用いた標的認識がある。例えば、酵素による活性化が可能な蛍光色素プローブがワイスレーダー(Weissleder)ら, 米国特許第6, 083, 486号に記載されており、DNAハイブリダイゼーションによって蛍光性となる蛍光分子標識がティアギ(Tyagi)ら, Nat. Biotechnol., 16:49-53, 1998に報告されている。組織培養および組織学用切片では蛍光による活性化が可能なプローブが使用され、蛍光顕微鏡による検出が行われている。インビボ投与においては、表面加重反射撮像法(surface-weighted reflectance imaging)を用いて蛍光賦活可能プローブの検出が行われている(Weisslederら, Nat. Biotechnol., 17:375-8, 1999; Mahmoodら, Radiology, 213:866-70, 1999)。しかし、吸収性且つ散乱性の媒体(哺乳動物の組織など)における深い組織(表面から> 5mm)の撮像、および、蛍光(特に蛍光の活性化)の定量化については、これ 50

まで報告がない。

【0004】

深部組織における光の相互作用を撮像するには、可視スペクトルではなく近赤外域（近IRまたはNIR）の光が好ましい。近赤外（近IRまたはNIR）光による撮像は、組織機能の解明および定量に関する研究の最先端で利用されている。光を用いることにより独特のコントラスト機序が得られる。このコントラスト機序は吸収に基づくもの（例えば、ヘモグロビン濃度または血中飽和度のプロービング）であってもよく、且つ/または、蛍光に基づくもの（例えば、微弱な自家蛍光または体外から投与した蛍光プローブのプロービング）であってもよい（Neriら, Nat. Biotech., 15:1271-1275, 1997; Ballouら, Cancer Immunol. Immunother., 41:257-63, 1995; および、Weissleder, 1999）。いずれの用途においても、NIR光子は組織中を通過する際に顕著な弾性散乱を生じる。この結果、組織中で光の「拡散（diffusion）」が生じる。この拡散によって分解能が低下し、且つ、診断的読影が可能な画像をX線撮像のような単純な「投影（projection）」手法（透視）によって生成することが困難となる。

【0005】

過去10年間に、組織中の光の伝搬の数値モデルと、光子供給源および検出技術の技術的進歩とにより、断層撮影原理を応用した拡散光の撮像が可能となった（KakおよびSlaney, 「コンピュータ断層撮影法の原理（Principles of Computerized Tomographic Imaging）」, IEEE Press, New York, 1988, pp. 208-218; Arridge, Inverse Problems, 15:R41-R93, 1999）。拡散光学断層撮影法（Diffuse Optical Tomography; DOT）は、複数の投影を使用し、且つ、組織の散乱効果の逆畳み込み（デコンボリューション）を行う方法である。DOT撮像法は固有の吸収および散乱の定量的三次元撮像に用いられている（例えばNtziachristosら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97:2767-72, 2000、および、Benaronら, J. Cerebral Blood Flow Metabol., 20(3):469-77, 2000を参照）。これらの基礎的な数量は、組織のオキシヘモグロビンおよびデオキシヘモグロビンの濃度の決定、血中酸素飽和度の決定（Liら, Appl. Opt., 35:3746-3758, 1996）、または拡散媒体中の血腫検出に利用できる。

【0006】

DOT撮像の固有コントラストは、機能的な脳活性化研究または血腫検出など特定の状況では有用となりうるが、これらの用途では、生きた組織から特異度の高い分子情報を抽出することができない。蛍光色素濃度は、吸収測定（Ntziachristosら, 2000）またはファントム中の蛍光測定（Changら, IEEE Trans. Med. Imag., 16:68-77, 1997; Sevic-Muracaら, Photochem. Photobiol., 66:55-64, 1997）による測定が行われている。しかし、生きた哺乳動物の深部組織における蛍光の三次元的定量化には、前述のDOTシステムおよび/または撮像アルゴリズムはこれまで有用ではなかった。

【0007】

発明の概要

本発明は、専用に設計された撮像システムを使用し、且つ、自己較正型の画像再構成と分子マップを抽出するための新規なアルゴリズムとを利用することによって、特定の標的分子プローブ（例えば、特定の酵素活性またはDNA配列に標的するプローブ）など種々の分子プローブが発するインビボ蛍光色素信号を、深部組織内で三次元的に位置特定し且つ高感度で定量化できるという発見を基礎としている。

【0008】

全般的には、本発明は、蛍光を媒介とした分子断層撮影法（FMT）撮像システムであっ

て、入射光を提供する光源（例えば、N I R光源または可視光源）と、2つ以上の別々の励起点から対象物（例えば、動物またはヒト患者）内へと光を誘導するための多点入射光照射アレイと、光源から多点入射光照射アレイの各点へと光を伝送するための複数の光ファイバーと、対象物から放出された光（例えば、蛍光）を2つ以上の別々の収集点から収集するための多点検出アレイと、対象物から放出された光を検出器へと伝送するための二次元発光アレイと、各収集点から二次元発光アレイ上の対応する点へと光を伝送するための複数の光ファイバーと、二次元発光アレイの各点から放出された光を検出し且つ対象物から放出された光に対応するデジタル信号に変換するための検出器とを含むシステムを特徴とする。

【0009】

10

このシステムにおいて、放出される光は、連続波（C W）光、時間分解（T R）光、輝度変調（I M）光、またはこれらの任意の組合せであってもよい。

【0010】

このシステムは、検出器が生成したデジタル信号を処理して出力装置に画像を提供するプロセッサをさらに含んでもよい。出力装置は複数の画像を同時に提供することができる。プロセッサは、以下の段階のうち任意のいずれかまたは任意の組合せによりデジタル信号を処理するようプログラムされていてもよい：i）収集された蛍光測定結果からバックグラウンド信号およびフィルタにじみ（b l e e d - t h r o u g h）信号を減算することによって、補正蛍光測定結果を生成する段階；i i）収集された固有信号測定結果からバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正固有信号測定結果を生成する段階；i i i）補正蛍光測定結果を補正固有測定結果で除することによって、自己較正蛍光測定結果を生成する段階；i v）収集された拡散信号から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正バックグラウンド - 媒体拡散信号を生成する段階；および、v）補正固有信号測定結果を補正バックグラウンド - 媒体拡散信号で除することによって、自己較正固有測定結果を生成する段階。

20

【0011】

他の態様において、プロセッサは、以下の段階のうち任意のいずれかまたは任意の組合せによりデジタル信号を処理するようプログラムされていてもよい：i）自己較正測定結果 $M = M_1 - M_3 / M_2 - M_4$ またはその他 M の関数を生成する段階。ただし、 M_1 は発光波長の蛍光信号、 M_2 は固有信号、 M_3 は蛍光バックグラウンド信号および / またはにじみ信号、 M_4 は固有波長のバックグラウンド周辺光信号である；i i）自己較正固有測定結果 $M' = \log (M_2 - M_4) / (M_5 - M_4)$ またはその他 M' の関数を生成する段階。ただし、 M_5 はバックグラウンド - 媒体拡散信号である；i i i）関数 $F(U) = (M - P \times U)^2$ またはその他 $(M - P \times U)$ の関数（絶対値または三乗値など）を最小にし、これによって U の分布および大きさを得る段階。ただし、 U は撮像した領域内における未知の蛍光色素濃度および / または蛍光色素寿命の空間依存性ベクトルであり、 P は、伝達方程式を解くことによって計算される M のフォーワード予測子、または、 M を構成している適切なモードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体について伝達方程式（拡散方程式など）を近似した近似値である；i v）関数 $F'(O) = (M' - P' \times O)^2$ または $(M' - P' \times O)$ の関数を最小にし、これによって O の分布および大きさを得る段階。ただし、 O は対象物中の蛍光体の未知の吸収のベクトルであり、 P' は、伝達方程式を解くことによって計算される M' のフォーワード予測子、または、適切な吸収 / 散乱モードにおける適切な幾何学形状およびバックグラウンド媒体についてこの伝達方程式（拡散方程式など）を近似した近似値である；v）活性化比 $AR = U / O$ を計算する段階；ならびにv i） AR に対応する画像を生成する段階。

30

40

【0012】

測定結果 M_3 は較正用媒体を用いて実験的に取得してもよく、または、場 M_2 に基づいて推測または計算してもよい。具体的には、この測定結果は $M_3 = q_1(r) \times M_2 + c t$ という式で表現できる。この式において、 q_1 は固有場のフィルター減衰であり

50

、半径依存的なフィルター異方性をもたらさうような空間依存性の因子である。因子 $q_1(r)$ は平坦場測定によって実験的に決定してもよく、または、フィルターの仕様に基づいて計算してもよい。定数 c_t は CCD カメラのバックグラウンド暗雑音測定結果の像を表す。さらに、 M_3 は $M_3 = q_1(r) \times M_2' + c_t$ という式でも記述できる。この式において、 M_2' は、伝達方程式の解を用いて、または、測定対象媒体の平均的な光学特性を有する均質な媒体についてもしくは既知の情報を利用して得た不均質な媒体についてこの伝達方程式（拡散方程式など）を近似した近似値を用いて、理論的に計算される。

【0013】

撮像システムは、患者の内部へとおよび／または検出アレイの各収集点から光を伝送するための 100 本を超える光ファイバーを有していてもよく、検出器アレイは少なくとも 100 個の収集点を有していてもよい。

【0014】

この撮像システムにおいて、二次元発光アレイは、患者から放出された三次元の光に対応する複数の光点の二次元パターンを検出器へと伝送してもよい。このパターンは、1つの励起点から他の2つ以上の励起点間への照明切り替えに対応した速度で経時的に変化する。さらに、2つ以上の励起点は、光源によって一度に1つずつ照明される。特定の態様において、対象物へと誘導される NIR 光の波長は 550 ~ 950（例えば、670）ナノメートルまたは 750 ~ 850 ナノメートルであってもよく、且つ検出器は、電荷結合素子（CCD）カメラであっても、または光電子倍增管を含んでいてもよい。

【0015】

システムはまた、それ自体が NIR 蛍光（NERF）分子プローブなどの分子プローブを含んでいてもよい。プローブは賦活可能な分子プローブであってもよい。

【0016】

本発明はまた、(1) ベクトル U によって解が得られる蛍光色素の分布および／もしくは寿命を表示する方法、ならびに／または、(2) i) 固有吸収に基づいて蛍光体濃度に関する第一のデータセットを提供する段階； ii) 蛍光に基づいて、活性化蛍光体の濃度に関する第二のデータセットを提供する段階； iii) 各点ごとに第一のデータセットを第二のデータセットで除することによって第三のデータセットを提供する段階； および、 iv) 第三のデータセットを処理することによって、蛍光体を含む分子プローブの濃度と患者体内の特定の標的に対応する活性化蛍光体の濃度との比に対応する光学分子マップを生成する段階； によって、患者に投与された蛍光体を含む分子プローブの濃度と患者体内の特定の標的に対応する活性化蛍光体の濃度との比に対応する光学分子マップを表示する方法を特徴とする。

【0017】

別の局面において、本発明は、以下の段階によって患者体内の標的領域の三次元定量的分子断層撮画像を得る方法を特徴とする：近赤外蛍光（NERF）分子プローブを患者に投与する段階であって、分子プローブが患者体内の標的領域内に選択的に蓄積する段階；近赤外光を複数の点から患者体内に誘導する段階；患者から放出される蛍光を検出する段階； および、検出された光を処理することによって、患者体内の三次元標的領域と標的領域内に蓄積した分子プローブの量とに対応する三次元画像を提供する段階。

【0018】

この方法において、三次元画像を二次元の出力装置に描出してもよい。処理は、患者から放出された蛍光信号をデジタル化する段階、患者およびバックグラウンド媒体から放出された蛍光信号および固有信号の測定結果を組み合わせることによりデジタル信号を自己較正する段階、ならびに、三次元定量画像を再構成する段階を含んでいてもよい。特定の態様において、処理は以下の段階を含む： i) 収集された蛍光測定結果からバックグラウンド信号およびフィルターにじみ信号を減算することによって、補正蛍光測定結果を得る段階； ii) 収集された固有信号測定結果からバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正固有信号測定結果を得る段階； iii) 補正蛍光測定結果を補正固有測定

結果で除することによって、自己較正蛍光測定結果を得る段階；i v) 収集された拡散信号から、収集されたバックグラウンド周辺光信号を減算することによって、補正バックグラウンド - 媒体拡散信号を得る段階；および、v) 補正固有信号測定結果を補正バックグラウンド - 媒体拡散信号で除することによって、自己較正固有測定結果を得る段階。

【0019】

処理はまた、本明細書に記載の他の段階を含んでいてもよい。これらの方法において、分子プローブは、分子プローブ（例えば、活性化可能なプローブ）を注射することによって全身的または局所的に投与してもよい。分子プローブは、標的領域または非標的領域に局所的に注射してもよい。例えば全身的な吸収を伴う腹腔内投与、および、埋植した徐放性化合物またはポンプなどの装置による投与がある。

10

【0020】

本発明の新規な方法の特定の態様において、NIR光は、固定の三次元形状に配置された別々の光点（例えば、12、24、32個、またはそれ以上の点）から患者の体内に照射してもよく、または、互いに独立した光点（例えば、少なくとも12個以上の点）を有するベルトを含む多点入射光照射アレイを用いて照射してもよい。さらに、画像の位置合わせ（co-registration）によって、多点入射光照射アレイおよび多点検出アレイの空間的な位置特定を行ってもよい。他の態様では、光子パルスが患者体内に誘導され、且つ、患者から放出された光子の到着が別の光子検出器アレイまたは時間ゲート増感CCDカメラ（iCCD）によって時間分解される。輝度変調した光を使用する場合は、イメージ増強管に向けて配置された復調配列およびiCCDカメラを用いることによって、光電子倍增管の復調にしばしば適用されるダイノード復調技術と同様の方式で上述と同様の検出を実現してもよい。

20

【0021】

これらの方法において放出される蛍光は、連続波（CW）光、時間分解（TR）光、輝度変調光、またはこれらの任意の組合せであってもよい。さらに、これらの方法は時間の関数として動的に実施してもよく、且つ、画像を磁気共鳴映像法またはコンピュータ断層撮影法により取得された画像と位置合わせしてもよい。多点入射光照射アレイ（または検出アレイ）は、対象物上のアレイの空間位置特定に使用するための基準点を有していてもよい。

【0022】

本発明はまた、特定の細胞異常（例えば、癌、心血管疾患、AIDS、神経変性疾患、炎症性疾患、または免疫疾患などに関連した異常）に標的する分子プローブを用いて患者の細胞異常を検出する方法を特徴とする。本発明はまた、特定の分子標的により活性化される分子プローブを用いて、分子標的に対する化合物の効果を評価する方法を特徴とする。この方法においては、プローブを標的に接触させ、標的を分子プローブに接触させる前および後に標的を撮像し、且つ、対応する画像を比較する。分子標的の変化はその化合物が有効であることを示す。例えば、特定の分子標的はプロテアーゼであってもよく、且つ、化合物はプロテアーゼ阻害剤であってもよい。

30

【0023】

分子プローブとは、細胞表面の受容体または抗原、細胞内の酵素、プローブがハイブリダイズする特異的な核酸（例えば、DNA）などの分子構造に対して標的するプローブである。蛍光体とは蛍光を発する物質である。蛍光色素とは、蛍光を発し（例えば、蛍光体）且つ色を有する物質である。

40

【0024】

特にことわりがない限り、本明細書中の技術用語および科学用語はすべて、本発明の当分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味で使われている。以下に、本発明の実施または検証に適した適切な方法および材料について説明するが、本明細書に記載のものと同等または同等の、当業者に周知の他の方法および材料も使用可能である。本明細書に記載の発表物、特許出願、特許、およびその他の引用物はすべて参照として完全に本明細書に組み入れられる。衝突が生じた場合は、定義も含めた本明細書によって統制されると

50

思われる。さらに、本明細書に記載の材料、方法、および実施例は説明を目的としたものであり、本発明を制限する意図はない。

【0025】

本発明の新規な方法およびシステムは種々の利点を有する。例えば、この新規な方法およびシステムにより、関心対象物の撮像中に複数の測定結果の組合せが提供されることに加えて、初めて、事前較正またはその他の補正測定をせずに蛍光色素の分布を検出する能力が提供される。さらに、この新規な方法およびシステムにより、深部組織の蛍光活性化（例えば酵素賦活による活性化）を撮像すること、ならびに、位置特定および定量化を三次元で行うことが可能になる。さらに、この新規な方法は、細胞下レベルの情報を提供するための非侵襲的な分子撮像法を提供する。

10

【0026】

本発明の新規な分子撮像技術は多大な影響を有する。第一に、この新規な方法およびシステムは、例えば癌においては、アップレギュレートされたプロテアーゼ、他の酵素、細胞表面受容体、サイクリン、サイトカイン、または増殖因子など、多数の疾患の基礎となっている特定の分子の異常に関する知見をもたらし得る。第二に、この新規な方法を用いて、新規の標的療法の有効性を表現型変化が生じるよりはるか以前から分子レベルで評価することができる。このことは、薬剤の開発、薬剤の試験、ならびに、所定の患者における適切な治療法および治療法変更の選択に影響を与えると予測される。第三に、この新規な分子撮像/定量化の方法およびシステムにより、生きた系の無傷な微小環境内で疾患の発生を研究できるようになる可能性がある。第四に、この新規な蛍光媒介式分子断層撮影撮像法は、新規の薬剤送達戦略の試験に有用である。第五に、この撮像法により、時間がかかり且つ労働集約的な従来の基本科学技術の場合よりもはるかに迅速に三次元情報を得ることが可能になる。

20

【0027】

本発明の新規な撮像のシステムおよび方法は、癌、心血管疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、感染症、およびその他の疾患など、多数の疾患のコントロールおよび撲滅を促進することを目的として設計された種々の新しい生物学的療法、免疫学的療法、および分子療法に幅広い用途を有すると考えられる。さらに、本明細書に記載の検出のシステムおよび方法は、複合的な状況において途切れなく疾患を検出および治療するために幅広い用途を有していると考えられる。

30

【0028】

本発明のその他の特徴および利点は以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲から明らかになるものと思われる。

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、蛍光色素（例えば、活性化可能な蛍光色素）および新規の光学断層撮影撮像法を用いて、生きている哺乳動物および患者から定量的な分子情報を抽出することに関する。この蛍光媒介式分子断層撮影法（FMT）撮像システムは、深部組織内で活性化するNIR蛍光（NIRF）などの蛍光を高感度で定量的且つ経時的に検出することを目的として専用に設計したものである。1つの態様においては、関心対象組織の撮像中に取得される測定結果のみを用いて、蛍光色素の分布に関する絶対的な光学特性（例えば、蛍光色素の濃度および/または寿命）の再構成を行うため、撮像精度が高く且つ実験が単純になる。このシステムでは、消光状態にあり且つ活性化されるまで蛍光を発しないような活性化可能なNIRF分子プローブ、または、高感度に標的するNIRF分子プローブを使用してもよい。活性化可能な分子蛍光色素プローブにより分子の特異度が向上し且つ高い蛍光コントラストがもたらされ、したがって、癌およびその他の疾患組織をインビボで早期に検出および分子標的評価することが可能になる。本発明のシステムは、画像データを取得するための種々の構成要素と、データを処理して高水準の情報および分解能を提供するための新規なアルゴリズムを含む1つ以上のプロセッサとを有する。

40

【0030】

50

FMT撮像の方法およびシステムにより、疾患組織から分子情報を抽出することが可能になる。したがって、本発明のシステムおよび方法を用いて、癌、心血管疾患、炎症、免疫疾患、関節炎、皮膚疾患、眼疾患、およびその他の疾患で生じるような多くの分子異常を検出することが可能である。

【0031】

以下に、まず適切なプローブと光学撮像の一般的な方法論とについて概説し、次に、有用な三次元定量情報の取得に必要とされる新規な撮像システムおよび処理について説明する。

【0032】

活性化可能なNIR蛍光プローブ

近年、特定の酵素により変化した後明るい蛍光を発するプローブ(Weisslederら, Nat. Biotechnol., 17:375-378, 1999)、またはDNAハイブリダイゼーションによって蛍光を発するプローブ(Tyagiら, Nat. Biotechnol., 14:303-308, 1996)の合成により、注射造影剤に基本的なパラダイムシフトがもたらされた。自然状態にあるプローブは、低分子消光剤(例えば、DABCYL(分子標識のすべての蛍光体に対する共通消光剤として作用する非蛍光性の色素; 4-(4-ジメチルアミノフェニルアゾ)-安息香酸またはQSY-7)によって、または複数の蛍光色素によって(例えば、エネルギー共鳴転移を介して)消光されている。図1Aおよび1Bは、それぞれ特定の酵素(1A)および特定のDNA配列(1B)を標的として設計した2つのプローブの略図である。蛍光色素が放出されるかまたは消光剤から空間的に分離されると、蛍光は最大1000倍まで増強しうる。消光した蛍光色素の空間的再配置は特定の相互作用後にしか生じないため、これらのプローブを用いて生きた生物から分子情報を抽出することが可能である。単一の蛍光色素を親和性分子に結合させた場合、これらの賦活可能プローブは他の方法に対して以下の4つの主たる利点を有する:(1)1つの酵素で複数の蛍光色素を切断することが可能であり、したがって一種の信号増強が生じる、(2)バックグラウンド「雑音」を数桁低減させることが可能である、(3)非常に特異的な酵素活性を測定対象にできる可能性がある、および(4)送達システムに複数のプローブを配列することにより、一定のスペクトルの酵素を同時にプロービングすることが可能である。

【0033】

マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP-2)、カテプシンB/H、カテプシンD、カテプシンK、PSA、およびカスパーゼ-3を標的とし、且つ、600~900 nmで蛍光活性化可能な、特異度の高い酵素感受性分子プローブの一群が合成されている。これらプローブの詳細はワイスレーダーら, 米国特許第6,083,486号; ワイスレーダーら, Nat. Biotechnol., 17:375(1999); タン(Tung)ら, Cancer Research, 60:4953-8, 2000; および、タンら, Bioconj. Chem., 10:892-896, 1999に記載されている。活性化可能な感受性プローブは、一般的に以下の3つの構成要素からなる:(1)レポーター蛍光色素、(2)標的基質、および(3)送達用媒質。

【0034】

レポーター蛍光色素

顕微鏡観察および光力学療法用に数百種類の光学プローブが開発されている。これらのうち、蛍光プローブ(すなわち、短波長で励起し長波長で発光するプローブ)は、蛍光顕微鏡観察で広範に利用されているように、生物学的現象の研究に理想的である。生きた系で蛍光プローブを使用する場合は、ヘモグロビン(< 550 nm)または水(> 1200 nm)など生理学的に豊富な吸収体による吸収を最小限に抑えて組織への浸透を最大限に高めるため、選択できる波長が近赤外域(600~1000 nm)に限定されるのが普通である。理想的には、蛍光色素は800±50 nmで発光するように設計される。種々のNIRF分子が報告および/または市販されており、このようなNIRF分子としては、Cy5.5(アマシャム(Amersham)、イリノイ州Arlington

10

20

30

40

50

H e i g h t s)) ; N I R - 1 (同 仁 化 学 研 究 所 (D o j i n d o) 、 日 本 、 熊 本)
; I R D 3 8 2 (L I - C O R 、 ネ バ ダ 州 L i n c o l n) ; L a J o l l a B l u e
(ダ イ ア ト ロ ン (D i a t r o n) 、 フ ロ リ ダ 州 M i a m i)) ; I C G (ア コ ー ン (A
k o r n) 、 イ リ ノ イ 州 L i n c o l n s h i r e) ; お よ び I C G 誘 導 体 (セ ル プ ・ ラ
ブ ズ (S e r b L a b s) 、 フ ラ ン ス 、 P a r i s)) な ど が あ る 。 理 想 的 な イ ン ビ ボ
用 N I R F プ ロ ー プ は 以 下 の 特 徴 を 有 す る : (1) 発 光 帯 域 が 狭 い ; (2) 蛍 光 効 率 (量
子 収 量) が 高 い ; (3) 生 体 適 合 性 を 有 す る ; お よ び (4) 吸 収 ス ペ ク ト ル と 励 起 ス ペ ク
ト ル と が 離 れ て い る 。

【 0 0 3 5 】

標 的 基 質

個 々 の 蛍 光 色 素 の 放 出 お よ び / ま た は 利 用 可 能 性 は 、 標 的 基 質 と 標 的 と の 相 互 作 用 に よ っ
て 決 定 さ れ る 。 標 的 基 質 は 、 例 え ば 、 酵 素 に よ っ て 切 断 さ れ る ペ プ チ ド 配 列 (表 1 を 参 照
) 、 特 定 の キ ナ ー ゼ に よ っ て 転 移 さ れ る リ ン 酸 基 、 ま た は 特 定 の 相 補 的 D N A モ チ ー フ を
認 識 す る ハ イ ブ リ ダ イ ズ D N A 配 列 (図 1 B を 参 照) で あ っ て も よ い 。

【 0 0 3 6 】

【 表 1 】 ペ プ チ ド 基 質 の 例 (ド ッ ト は 切 断 部 位 を 示 す)

プロテアーゼ標的	ペプチド配列
カテプシンD	GPIC(Et)F•FRLG
カテプシンB	GRR•G
マトリックスメタロプロテイナーゼ2	GPLG•VRG
カスパーゼ3	DEV D•G
前立腺特異抗原	HSSKLQ•G

【 0 0 3 7 】

送 達 媒 質

消 光 状 態 の プ ロ ー プ が 目 的 の 標 的 に 到 達 す る た め に は 、 急 速 な ク リ ア ラ ン ス / 排 除 を 回 避
し 、 且 つ 、 送 達 に 対 す る い く つ か の 構 造 的 障 壁 を 克 服 す る 必 要 が あ る 。 こ う し た 障 壁 と し
て は 、 (1) 血 管 か ら の 管 外 遊 出 、 (2) 組 織 を 通 過 す る 拡 散 、 お よ び (3) 細 胞 内 酵 素
の 場 合 は 細 胞 膜 ト ラ ン ス ロ ケ ー シ ョ ン (分 泌 酵 素 の 場 合 は 当 し な い) な ど が あ る 。 送 達 に
対 す る こ れ ら の 障 壁 は 詳 し く 研 究 さ れ て お り 、 標 準 的 な 技 術 お よ び 情 報 を 用 い て 送 達 媒 質
を 選 択 す る こ と が 可 能 で あ る 。 蛍 光 色 素 お よ び 基 質 を 体 内 の 標 的 (例 え ば 、 腫 瘍) に 送 達
す る の に 適 し た 媒 質 は 、 ポ リ エ チ レ ン グ リ コ ー ル (P E G) 、 ポ ラ キ サ マ ー (p o l a x
a m e r) 、 お よ び / ま た は 炭 水 化 物 を 含 む 保 護 グ ラ フ ト 共 重 合 体 (M a r e c o s ら 、
B i o c o n j u g . C h e m . , 9 : 1 8 4 - 1 9 1 , 1 9 9 8) を 含 む 重 合 体 か
ら な る 群 よ り 選 択 さ れ る 。 他 の 送 達 媒 質 と し て は 、 デ ン ド リ マ ー 、 タ ン パ ク 質 、 炭 水 化 物
、 脂 質 球 (例 え ば 、 エ マ ル ジ ョ ン 、 リ ポ ソ ー ム 、 お よ び 脂 質 自 己 集 合 体) 、 ナ ノ 粒 子 、 お
よ び 、 浸 透 性 の 薬 剤 送 達 に 一 般 に 使 用 さ れ て い る そ の 他 の 物 質 が あ る 。

【 0 0 3 8 】

本 発 明 の 新 規 な 方 法 で 使 用 す る こ と を 目 的 と し た 、 上 記 に 基 づ く 特 異 的 プ ロ ー プ は 、 ワ イ
ス レ ー ダ ー ら 、 米 国 特 許 第 6 , 0 8 3 , 4 8 6 号 ; ワ イ ス レ ー ダ ー ら 、 N a t . B i
o t e c h n o l . , 1 7 : 3 7 5 - 8 , 1 9 9 9 ; お よ び タ ン ら 、 B i o c o n j
. C h e m . , 1 0 : 8 9 2 - 8 9 6 , 1 9 9 9 に 詳 述 さ れ て い る 方 法 で 調 製 し て も
よ い 。

【 0 0 3 9 】

本 発 明 の 新 規 な 方 法 で 使 用 で き る 酵 素 賦 活 可 能 プ ロ ー プ の 具 体 的 な 一 例 は 以 下 の よ う に し
て 調 製 し て も よ い (W e i s s l e d e r ら 、 米 国 特 許 第 6 , 0 8 3 , 4 8 6 号 ; W e
i s s l e d e r ら 、 N a t . B i o t e c h n o l . , 1 7 : 3 7 5 - 8 , 1 9 9
9 を 参 照) 。 ま ず 、 ポ リ - L - リ シ ン (P L) 骨 格 と メ ト キ シ ポ リ - e - エ チ レ ン グ リ コ
ー ル (M P E G) 側 鎖 と か ら な る 保 護 グ ラ フ ト 共 重 合 体 (P C G) を 合 成 す る (B o g d

10

20

30

40

50

anovら, J. Drug Targeting, 4:321-330, 1997)。
 1つの実施例では、Cy5.5 (吸収 = 675 nm、発光 = 694 nm、アマシ
 ャム (Amersham、イリノイ州 Arlington Heights)) をポリ-
 リシン骨格に直接結合させ、これによって、カテプシン B / H およびトリプシンによる切
 断が可能で且つ後述の実験にすでに使用されている賦活可能プローブを得てもよい。簡潔
 には、モノ活性化した過量の Cy5.5 を pH 8.0 の環境下で PGC と反応させてプ
 ローブを得る。サイズ排除クロマトグラフィーにより最終産物を自由色素から分離する。
 ところどころに存在する自由リシン残基が酵素基質として作用するため、トリプシンおよ
 びカテプシン B / H 様プロテアーゼによってこのようなプローブを切断することができる
 。

10

【0040】

もしくは、酵素特異性を与える特定のペプチドを PGC に直接結合させてもよい。例えば
 、カテプシン D 感受性のプローブが合成されている (Tungら, Cancer Res
 ., 60:4953-8, 2000; および Tungら, Bioconj. Chem., 10:892-896, 1999)。簡潔には、PGC を過量の無水ヨードアセ
 チルと反応させることにより、ポリ-リシン骨格上のアミノ基をすべてヨード (iodo
 l) 基に変換させる。チオール特異反応により、カテプシン D 特異的ペプチド GIC (E
 t) FFKK (Fitt) C を、ヨウ化した PGC に結合させる。次に、カテプシン D 基
 質ペプチドの N 末端および自由リシン側鎖に Cy5.5 を結合させる。この設計には以下
 の2つの利点がある: (1) ローディング容量が大きい (すべてのリシンが修飾可能である
 ことによる)、および (2) 蛍光色素スペーサーが酵素に容易に到達でき、したがって
 放出動態および信号収集が向上する。

20

【0041】

その他の NIR 蛍光プローブ

上述のプローブは、標的の相互反応 (例えば、標的-酵素相互反応) によって活性化され
 るよう特別に設計されたものである。本発明の新規な検出法に使用できるその他のプロー
 ブとしては以下のものがある: (1) 標的相互反応後に失活する (消光する) プローブ、
 (2) 標的相互反応によって量子収量が変化するプローブ、(3) 標的相互反応後に蛍光
 寿命が変化するプローブ、(4) 標的相互反応後に蛍光スペクトルが変化するプローブ、
 (5) 波長シフト標識 (Tyagiら, Nat. Biotechnol., 18:1
 191-1196, 2000)、(6) 多色蛍光プローブ (Tyagiら, Nat. Bi
 otechnol., 16:49-53, 1998)、(7) 標的に対して高い結合親
 和性を有するプローブ、すなわち、非特異的プローブが体外に排出されても標的領域内に
 残存するプローブ。このようなプローブの例としては、受容体に標的する NIR 蛍光色素
 (Achilefuら, Invest. Radiol., 35:479-485, 2
 000) または抗体に標的する NIR 蛍光色素 (Ballouら, Biotechno
 l. Prog., 13:649-658, 1997) などがある、(8) 区画的分布
 を示す非特異的な物質、(9) 量子ドット、および / または (10) 蛍光色素に影響を与
 える任意の蛍光分子。他の適切な蛍光プローブ群としては、ゲート検出の使用を可能にし
 且つ感度をより増強させる、長寿命のランタニド金属リガンドプローブがある。

30

40

【0042】

一般的な方法論

本発明の新規なシステムでは、三次元光学走査用に、間隔をあけた多数の発光体を備えた
 シリンダーなどの多点入射光アレイの周囲から「断層撮影測定結果」を取得するための電
 荷結合素子 (CCD) カメラおよびレンズ系を使用してもよい。NIR 画質の向上は、使
 用する抗原および検出器の数と関連性がある。CCD 技術の利点は、検出密度を向上させ
 るには光ファイバーを追加してより大きなアレイをつくればよく、検出用ハードウェアの
 追加を必要しない点にある。

【0043】

蛍光媒介式分子断層撮影法 (FMT)

50

本明細書で説明する断層撮影法の方法論は、回折源を使用した一般的なカテゴリーの断層撮影法の改良である（例えば、KakおよびSlaney, 「コンピュータ断層撮影法の原理 (Principles of Computerized Tomographic Imaging)」, IEEE Press, New York, 1988, pp. 208 - 218を参照）。この技術は、複数の投射に関する光の測定結果を利用して、混濁した媒体（組織など）中の光学コントラストに関する情報を取得するものである。簡潔には、回折断層撮影法では観察対象領域を複数の不連続なボクセルに分割する。これは「メッシュ」と呼ばれる。分析は2つの段階に分かれている。第一の段階は、拡散方程式を用いて想定媒体（例えば、組織）内への光子の伝搬を記述し、且つ、拡散方程式を用いてこの媒体から検出される場を予測する「順問題」である。第二の段階は、想定媒体の各ボクセルの光学特性を更新することにより場の予測値と実測値との誤差を最小にする「逆問題」である。解を求める方法は、順問題（拡散方程式の分析的解法および数値的解法）、逆問題（直接解法 (direct inversion)、² 適合法、および代数的再構成法）とも複数存在する。ここでは、順問題の数値的解法を用いて、蛍光信号および固有信号の測定結果に対する予測ベクトルを生成している（図5も参照）。逆問題は準代数再構成法に基づいて解を求める。解を順問題にフィードバックしてより正確な順方向伝搬モデルを構築する場合は、必要に応じてより高次の解を求めることも可能であり、この過程を反復してもよい。

10

【0044】

本発明の新規なFMT撮像システムでは、1つ以上のレーザー源を使用して特定の発色団または蛍光団を検出し、且つ、使用する特定の波長について順問題の解を求める。レーザーダイオードは十分なパワーを出力し、FDAのクラスIおよびIIの範疇に入り、且つ、安定性、波長特異性、および経済性が良好であるため、これを光源として使用してもよい。光はファイバーガイドを用いて組織へとおよび組織から誘導される。これによって形状面で柔軟な設定が可能となる。光学的な連結を得るため、ファイバーは組織に接触させる必要がある。または、空気-シリカ-組織の屈折率不整合に起因する反射を防ぐため、整合液を使用する。

20

【0045】

光源検出法としては3つの異なる技術が存在する。以下に示すように、FMTの用途にはこれらの任意の組合せを使用することができる。最も単純な技術は連続波 (CW) 撮像である。この技術では、強度が一定の光を使用し、且つ、複数の光源-検出器ペアを用いて以下のいずれかを測定する：(1) 励起した蛍光体の分布に起因する信号、または(2) 光の減弱（組織の吸収および散乱によるもの）。これは技術的に比較的単純な方法であり、通常は信号対雑音比 (SNR) 特性も最も優れている。しかし、吸収係数および散乱係数の計算結果と撮像結果との間に大きなクロストークを生じることが多いため、固有組織コントラストの撮像には最適でない。一方、バックグラウンドの光学特性が既知であれば、定常状態の蛍光体濃度の撮像にはよく適している。活性化の情報を生成するには、この技術的に単純な手法と情報量が豊富な技術とを組み合わせることにより蛍光像および固有コントラスト像の両方を取得してもよい。以下に、一度に1つのみの発光体が発光するよう、多点アレイ上の光源が1つの発光体から別の発光体へと連続的に切り替えられるような具体的な設計を説明する。

30

40

【0046】

より複雑な手法としては、単一または複数の周波数の輝度変調 (IM) 光を使用する方法がある。この方法では、複数の光源-検出器ペアについて、入射光に対する変調光の減弱および位相ずれを測定することができる。輝度減弱が測定できるCW測定と比較して、IM法では各光源-検出器ペアについて輝度減弱と位相ずれという2種類の情報が得られる。通常、振幅および位相は互いに相関しない測定値であり、固有コントラストの吸収係数および散乱係数をより効率的に求めることができる。蛍光モードでは、この技術により蛍光体濃度と蛍光寿命という2セットの情報を画像化できる。

【0047】

50

第三の手法である時間分解 (TR) 法では、組織内に短パルス光を照射する。この技術により、複数の光源 - 検出器ペアについて、検出された光子が媒体内を通過する時間分布を明らかにすることができる。時間分解法は各光源 - 検出器ペアに関する情報量が最も多く、これに匹敵するのはIM法を複数周波数で同時に行った場合のみである。このことは、以下によって簡単に説明できる。すなわち、時間分解データをフーリエ変換すると、前述の2つの方法で使用される連続波成分 ($f = 0 \text{ MHz}$) を含む最大 1 GHz の複数の周波数での情報が得られる。したがって、時間分解法では、CW系と直接比較可能なCW成分が得られるのみならず、固有吸収および固有散乱を画像化できる輝度減弱および位相ずれの測定結果を複数の周波数について (フーリエ変換により) 得ることができ、且つ、蛍光体濃度および蛍光寿命の情報も得られる。

10

【0048】

以下に、費用対効果の高い本発明の態様を詳しく説明する (図2A ~ 2Cおよび図4を参照)。この態様では、経済的で並列度が非常に高いCW測定 (~ 1000 チャンネル) を用いてバルク情報が収集され、且つ、時間領域型の光源 - 検出チャンネル (~ 50 から 100 チャンネル) の比較的小さいアレイを用いて吸収および散乱のパラメーターに関する非常に特異的な情報が収集される。時間領域情報は以下の3つの方法で利用される。第一に、発光波長および励起波長について、平均吸収係数と平均縮小散乱係数とを独立に決定する。第二に、時間領域データをフーリエ変換することによって、固有信号の時間領域測定結果を固有再構成系に変換し、これによって複数周波数の測定結果を得る。断層撮影の問題は周波数領域で記述されるため (CW測定の周波数はゼロとなる)、高周波数測定結果の追加は直接的に行うことができる (実数分解および虚数分解のいずれについても、適切な周波数について構成した重み行列に行を追加すればよい)。時間領域系の第三の用途は、時間領域データをフーリエ変換することによって蛍光信号の時間領域測定結果を蛍光再構成系に変換すること、および、NIRFプローブの蛍光寿命に関する情報を取得することである。パルス光を用いて検出した信号と輝度変調光を用いて複数周波数で検出した信号とがフーリエ変換を介して同等になることから、複数周波数で輝度編徴候を用いた場合も方法およびシステムはまったく同じとなる可能性がある。より簡単化した手法としては、少数または単一の周波数で輝度変調光を使用する方法がある。

20

【0049】

蛍光媒介式分子断層撮影法 (FMT) 撮像システム

30

本発明の新規な撮像システムは、患者または動物の体から放出されたアナログの蛍光からデジタル信号データを生成するための種々の構成要素、および、デジタル信号データを処理して診断および予後に関する情報を提供する有用な画像を生成できるアルゴリズムでプログラミングしたプロセッサを含む。システムはまた、入射光が組織内に伝搬した後に入射光の測定結果を取得し、且つ、撮像対象体の固有コントラストに関する情報を取得する。

【0050】

装置

回折断層撮影法と単純な投影撮影法との相違点は、前者では複数の投影について組織の透照を要することである。したがって、NIR光を用いて分子断層撮影像を取得するうえで、適切な光誘導装置を構成することは基本的な要素である。本発明のシステムは、1つの態様において、いずれも単一のシリンダー内に組み込まれた多点入射光照射アレイおよび多点検出アレイを特徴とし、これらアレイは動物または患者の体の周りに配置される。このような装置の1つを図2Aおよび図4に示す。これら2つの機器は連続的に作動してもよい。

40

【0051】

システム10は連続波 (CW) レーザー源12を含む。レーザー12は一定輝度の光を使用する。NIRFプローブの使用前に、2つの異なるレーザーから得た2つの波長を用いて固有コントラストを撮像してもよい。蛍光色素Cy 5.5を撮像するには、1つの波長を 673 nm (励起波長) に、もう1つの波長を 694 nm (発光波長) に設定する

50

。光源から蛍光体までの励起場および蛍光体から検出器までの発光場について正確な順方向モデルを作成するため、両方の波長で撮像することが必要である。もう一つの波長の組合せでは、蛍光色素 I C G を標的にして 750 nm (励起) および 800 nm (発光) を使用する。測定の時間効率面での要求度は高くないため、2つの波長は時分割で使用され、且つ、光減衰器 14 を介して 1 x 32 の光スイッチ 16 (例えば、ダイコン・ファイバーオプティクス (Dicon Fiber Optics)、カリフォルニア州 Irvine) から販売されている光スイッチ) に結合される。光スイッチ 16 は、レーザー 12 から出た光を、複数 (この態様では 16 本) の光源ファイバー 18 のうち任意の 1 本へと誘導する。もしくは、全てのファイバーをそれぞれ異なる波長で同時に照射してもよい。重要な点は、多点入射光照射アレイ 20 で各照射点を区別できることである。

10

【0052】

この態様において、多点入射光照射アレイ 20 は樹脂シリンダー 15 (本明細書中で「撮像チャンパー」とも呼ぶ) の中に配置され、且つ、シリンダーの周囲には複数の光源ファイバー 18 によるいくつかのリングが形成される。本質的に、シリンダー 15 は、中心軸に対して垂直な一連の「リング」としてシリンダーの様々な高さに穿孔された多数の孔を有する。これらの孔はシリンダーの外周上に等間隔で作成されていてもよい。光源ファイバー 18 はシリンダー 15 の孔を通過し且つ内壁と同一面上で終端する。多点検出アレイ 21 は、光源ファイバー 18 のリングに (交互に) 挟み込まれた検出用ファイバー 22 のリングの形式で、同じシリンダー 15 に組み込まれる。光源ファイバーと同様、各検出用ファイバーについてもシリンダーに孔が穿孔されている。これによってシリンダー内部の三次元領域がカバーされる。検出用ファイバー 22 はシリンダー 15 の検出アレイ 21 を構成し、且つ、光源ファイバーと同様にシリンダーの内壁と同一面上で終端する。この第一の態様では、各 12 本の検出用ファイバーによる 3 つのリングが、各 16 本の光源ファイバーによる 2 つのリングと交互に配置されている。各リングは隣接するリングから 3 mm 離れており、これによって合計 1.2 cm のシリンダー高をカバーしている。

20

【0053】

シリンダー 15 (多点入射光照射アレイ 20 および多点検出アレイ 21 を含む) には液体のオプティカルコンタクト媒体 (例えば、Intralipid (登録商標)、または観察対象組織の光学特性をシミュレートする適量の吸収性蛍光体または蛍光色素と TiO₂ 粒子とのエマルジョン) を充填してもよい。オプティカルコンタクトは、動物の対表面から検出用ファイバーへと拡散光子を伝搬する「連結」液として作用する。整合液および樹脂シリンダーに対する TiO₂ 粒子の濃度は、マウスの平均縮小散乱係数と同程度の散乱特性をもたらすように決定する。

30

【0054】

多点検出アレイ 21 で収集された蛍光は検出用ファイバー 22 を介して二次元発光蛍光アレイ 24 に供給される。二次元アレイ 21 は、被検体から放出されたアナログの蛍光を、ロングパスフィルター 25 (使用する蛍光色素によって異なる) を介して CCD カメラ 26 へと伝送する。ロングパスフィルター 25 は、表面反射方の撮像システムの場合と同様に、適切なカットオフ波長のものを選択する (Mahmood, Radiology, 213: 866 - 870, 1999)。固有コントラストを撮像するにはフィルターを外す。CCD カメラ 26 はブレッドボードに取り付ける。レンズ 27 またはマクロレンズ系によって二次元発光蛍光アレイの像を CCD カメラ上に取得する。

40

【0055】

測定によって CCD カメラが飽和しないよう、光減衰器 14 によって光の減衰を最適な状態に設定する。典型的な 16 ビット CCD カメラの場合、有用なダイナミックレンジは約 3 ~ 4 桁である。これは、体の直径が約 2 ~ 3 cm の小動物の拡散光測定について予測されるダイナミックレンジでもある。ヒトの場合のダイナミックレンジは標的器官ごとに異なる可能性がある。例えば、直径約 8 cm のヒト乳房を撮像する場合、必要なダイナミックレンジは約 6 ~ 8 桁になる。このダイナミックレンジは、複数のフレームを高速取得することによって CCD 技術でカバーすることができる。1 秒あたり 10 フレームの現

50

在のCCD技術では、1秒間の画像取得で6桁のダイナミックレンジを得ることができる。脳を測定する場合は、既知のレベルの減衰で高信号を選択的に減衰するプログラマブル減衰器を用いて時間効率を向上させるかまたは画像取得時間を延長することによって、より大きいダイナミックレンジを得てもよい。

【0056】

さらに、図2Bに示すように、位置決め器具23を用いて動物をシリンダー15内の最適な位置に配置してもよい。この態様の位置決め器具は、シリンダー15の中にぴったり入る単純なシリンダーである。3つの位置決め器具23（円筒形挿入部）を作製した。第一の挿入部はLexan（登録商標）（ポリカーボネート）またはPlexiglas（登録商標）で、第二の挿入部はwhite Delrin（登録商標）、ポリプロピレン、またはKel-F（登録商標）で作製した。これらの挿入部はいずれも、シリンダー20、21の内径にちょうど納まる外径を有し、厚さは1 mmである。第三の挿入部は壁厚が直径0.1 mmとなるよう、Mylar（登録商標）フィルムおよびKel-F（登録商標）フィルムで作製した。この設計の利点は、撮像中に動物を安定させることができ、且つ、位置合わせを行うための体表マークに対する位置精度が得られることである。

10

【0057】

多点検出アレイ21および多点入射光照射アレイ20を含む、シリンダー15（撮像チャンバー）の詳細な外観を図2Cに示す。光源ファイバー18および検出用ファイバー22は、三次元再構成が可能となるよう、測定がシリンダー全体にわたって行われるように配置される。光源ファイバー18は検出用ファイバーと交互に配置される。

20

【0058】

図2Dおよび2Eに2通りのファイバー連結システムを示す。図2Dは図2Aで使用されているシステムを示したものである。このシステムでは、離れた二次元発光蛍光アレイ24を用いて全ての検出用ファイバー22の信号を1つの平面で収集し、フィルター25を介してこの信号をCCDカメラ26で撮像する。図2Eに、フィルター25が検出用ファイバー22に直接接触する（すなわち、フィルター25が二次元アレイ24として機能する）より単純な態様を示す。

【0059】

多点入射光照射アレイの他の態様を図3A～3Fに示す。図3Aは、上述の円筒形アレイの上面図である。図3Bは反射率モードおよび/または透過率モードの操作で使用される平面アレイである。別の態様ではアレイはシリンダーの一部であり、例えば図3Cに示すように一定半径の曲線を描く。図3Dは成形アレイの略図である。このアレイにおいて、光源ファイバーの先端は、体の特定の形状に合った剛性体上に配置されるか、または照射光ファイバーを固定でき且つ体系にあわせて成形できるような、プラスチック、ゴム、もしくは布などの曲げが可能な弾性材料上に配置される。図3Eにベルト状の平坦でないアレイを示す。このアレイでは、光源ファイバーの先端は、必要に応じて患者または患者の肢の周囲にかけることのできる柔軟なベルトの中に配置される。このアレイの正確な照射点は、CT、US、またはMR撮像を同時に行うことによって測定および補正することができる。別の態様では、図3Fに示すようにカテーテル様器具の中に光源ファイバーの先端が配置される。

30

40

【0060】

これらの各態様において、検出用ファイバー22の先端は、図2Aに示したシリンダー15の内部と同様に光源ファイバー18の先端と交互に配置されていてもよい。または、検出用ファイバーの先端が光源ファイバーの先端に対して規定の幾何学的間隔で配置されている限り、検出アレイが入射光照射アレイから分離していてもよい。例えばカテーテル様アレイでは、例えば前立腺、肺、脈管構造、または胃腸管を撮像するため、入射光アレイを体内に配置し、且つ、独立した検出アレイを用いて検出用ファイバーの先端を体外に配置するのが好ましい使用様式である。

【0061】

図2Aの装置10は、例えばPC内に配置された、プロセッサ11とともに使用される。

50

これについて以下に詳述する。図 4 に示すように、このようなプロセッサ 11 は一般的に入力 / 制御装置 60、メモリ 62、および出力装置 64 を有する。プロセッサ 11 は 1 つ以上の構成要素を含む電気回路であってもよい。プロセッサはデジタル回路、アナログ回路、もしくはその両方に組み込んでもよく、ソフトウェアに組み込んでもよく、または、統合状態の機械もしくはそのハイブリッドであってもよい。入力 / 制御装置 60 はキーボードもしくはその他の従来装置であってもよく、出力装置 64 は陰極線管 (CRT)、その他のビデオディスプレイ、プリンター、またはその他の画像表示システムであってもよい。メモリ 62 は電子式 (例えば固体メモリ)、磁気式、または光学式のメモリであってもよい。メモリは光学ディスク (例えば CD)、電磁式のハードディスクもしくはフロッピーディスク、またはこれらの組合せに構築してもよい。

10

【0062】

図 2 A の高効率光子収集装置は上述のものと同じかまたは類似の構成要素を用いて構築してもよい。ただし、専用の検出用ファイバー 22 は図 2 A および 2 D のようにレンズ系に接続するのではなく、(図 2 E に示すように) CCD に直接結合させる。全体的に、このシステム設計により光子の計数効率が少なくとも 300 % 向上すると考えられる。より高効率の CCD チップを使用すれば光子検出能がさらに向上する。

【0063】

画像分解能の高い設計を実現するため、図 2 A の装置に、レンズ撮像系 (図 2 A および 2 D) または直接結合 (図 2 E) によって、より多数 (例えば 64×100) の光源 - 検出器ペアを組み込んでもよい。直接結合の場合は、より大きな検出器セットを組み込むために、より寸法の大きいチップ CCD カメラを必要とする場合がある。

20

【0064】

実際の使用においては、励起波長および発光波長についてフィルターを使用せずに対象組織の基本測定結果を取得してもよい。適切なカットオフフィルターを挿入した後に発光波長で蛍光測定を行ってもよい。

【0065】

断層撮影の精度を大幅に向上させる増設システムを図 4 A に示す。これは時間分解 FMT 撮像システム 30 である。優れた再構成を実現するため、CW 測定とともに 16×16 チャンネルアレイが作動する。CW 系と TR 系とを独立に使用することも可能であるが、両方の系の測定結果を同じ再構成系で組み合わせることにより利点をもたらされる。

30

【0066】

一般に、システム 30 はパルスレーザー源 32、波長カブラー 34、および波長スプリッター 36 を含む。図 2 A の CW システムのように、2 つのパルスレーザーダイオード 2 セット (パルス幅 ~ 70 ピコ秒、平均パワー ~ 150 μ W) を同波長で使用する。波長は遅延 10 nm で時分割多重化して使用し、16 チャンネルの単一光子計数時間分解システム 44 (例えば、ピコ・クアント (Pico-Quant)、ドイツ、Berlin より販売されている SPC-600 (登録商標)) で同時に検出する。時間分解系では、CW 系の光源ファイバー 18 と同じ光源ファイバー 18' を (CW 光源および TR 光源の両方を光スイッチに接続することによって) 共用してもよく、または、専用の光源ファイバーを別途使用してもよい。時間分解 (TR) 検出用ファイバー 22' は、CW 検出用ファイバー 22 とインターレースさせる。CW 系と TR 系とのクロストークを避けるため、TR の取得は CW の取得とは異なるタイミングで行う。TR 系の比較的小さい光源 - 検出アレイ 18' および 22' (これもシリンダー 15 に組み込んでよい) で、有用な拡散画像を生成することができる。しかし、TR データの貢献度が特に大きいのは次の 2 点である：(1) 式 1 の反転において TR データを同時利用することにより、CW データと併せて周波数情報を取得して独立型の CW - TR 断層撮影装置を提供する；および (2) TR データを同時の磁気共鳴 (MR) 情報とともに使用することによって、MR 像で同定された腫瘍病変部について蛍光の濃度および寿命の測定結果を取得する。

40

【0067】

パルスレーザー源 32 が発するレーザー光は波長カブラー 34 で結合され、次にスプリッ

50

ター 36 で分割される。スプリッターはレーザー光の ~ 99 % を光路 39 a を介して光スイッチ 16 へと誘導し、1 % を光路 39 b を介して検出器モジュール 40 へと誘導する。このとき、それぞれ対応する減衰器 38 a および 38 b を通過させる。減衰器 38 b を通過して光路 39 b を通る光は「基準信号」となり、システムの時間的ドリフトおよび信号安定性のモニタリングに用いられる。光路 39 a を通過して光スイッチ 16 に誘導される 99 % のレーザー光は CW 系と同じ方式で切り替えられ、選択された 16 本（または必要に応じてそれ以上）の CW 光源ファイバー 18 に入る。2 つの異なるスイッチおよび光源ファイバーを使用する必要はない。光チャンバー 15 内の測定対象組織に光子パルス照射する際にも、CW 系で使用されるものと同じ光学系を使用してよい。ファイバー 18 はファイバー 18' と物理的に同一であってもよい（しかし、必ずしも同一である必要はない）。これらファイバーが図面上で異なっているのは、CW 信号または TR 信号を通過させるこれらファイバーの作動をわかりやすく図示するためである。2 対 1 光スイッチ 16'（例えば、Disc on スwitch 16 に付属のもの）で CW 源と TR 源とを切り替えてもよい。しかし、時間分解検出システム 44 で収集された光子を誘導するには、独立した TR 検出用ファイバーアレイ（ファイバー 16 本）が必要である。シリンダー 15 は図 2 A のものと同じである。被検体から放出された蛍光または固有の光は、図 2 A のように TR 系を通過し検出器モジュール 40 に入る。ファイバー 22 は図 2 A の CW 系の検出用ファイバーである。

10

【0068】

検出器モジュール 40 は、光子を検出し且つ単一光子を電氣的なアナログパルスに変換する光電子増倍管（PMT）41 を含む。これらのアナログパルスはルーター 42 を通過し、ルーター 42 は経路 43 を介して SPC - 600 ボード 44 へとこのアナログパルスを誘導する。パルスは、レーザー 32 から経路 52 に出力されるトリガーパルスに対する各パルスの到着時刻（TOA）を表すデジタル値に変換される。収集された各パルスは、ルーター 42 内でデジタルアドレスを生成する。このアドレスはその光子が検出された検出チャンネルを固有に示す。このデジタルアドレスはデジタルケーブル 45 を介してコンピュータメモリ 62 に伝送され、このアドレスを用いて、各チャンネルに割り当てられた適切なメモリービンに TOA が保存される。この態様で使用される 16 のチャンネルは、16 の個別のメモリービンに対応する 16 の個別のデジタルアドレスを有する。システム 44 内では、コンスタントフラクショナルディスクリミネーター（CFD）50 が振幅が非常に小さく光電子雑音に起因している可能性のあるパルスを排除し、時間波高変換器（TAC）がパルスの到着時刻をアナログの振幅値に変換し、且つ、マルチチャンネル分析器（MCA）がこのアナログ振幅を高速でデジタル値に変換する。システム 44 の出力 47 はデジタル値であり、このデジタル値はケーブル 45 で伝送されるアドレスに対応したコンピュータメモリービンに保存される。

20

30

【0069】

時間分解測定を用いて、測定対象媒体の平均的なバックグラウンド特性を独立に取得してもよい。これは吸収、散乱、および蛍光の再構成に関する重要な入力パラメーターである。TR 測定結果と CW 測定結果とを組み合わせることにより、固有コントラストおよび蛍光の再構成に関する順問題をより正確に記述できる。さらに、CW データと TR データとを同時に使用することにより、全体的な画質および忠実度が向上する。別の方法としては、時間分解データを用いてバックグラウンドの固有コントラストの低分解像を生成し、この情報を用いて各動物の CW 再構成に関する順問題をより正確に記述してもよい。

40

【0070】

CW 情報、および特に TR 情報（またはフーリエ変換によって得た IM 情報）をさらに MR 像データと組み合わせて、蛍光体濃度および蛍光寿命の正確な定量的測定結果を生成してもよい。時間分解法または輝度変調法により、組織中に分布している既存の蛍光色素と新規の蛍光色素とについて蛍光減衰を識別するためのスペクトルが大幅に広がると考えられる。前述のシアニン蛍光色素の減衰時間は一般的に 1 ~ 20 ns である。この時間スケールは多くの生物物理学的測定に有用であるものの、これより長い減衰時間が所望され

50

る場合も多数存在する。例えば、大型タンパク質または膜結合タンパク質の回転運動を測定したい場合が考えられる。マイクロ秒またはミリ秒単位のプロセスの測定には、減衰時間が $100 \text{ ns} \sim 10 \text{ } \mu\text{s}$ であるリン光が利用されている。特定のランタニド金属リガンドプローブは寿命が長いためゲート検出の利用が可能である。ゲート検出を利用することによって生物試料の自家蛍光による干渉を抑制し、これにより感度をさらに向上させることができる。

【0071】

1つの魅力的な特徴は、FMT撮像で得られた分子マップを、磁気共鳴映像法(MR)、X線コンピューター断層撮影法(CT)、超音波撮像法(US)、さらには単光子放出断層撮影法(SPECT)、または陽電子放出断層撮影法(PET)等で取得した解剖学的断層像と組み合わせることである。具体的には、空間分解能が高い撮像法であるMRIまたはCTとの組合せが好ましい。DOT撮像(吸収のみ)ではすでにMRIとの組合せが行われており(Ntziachristosら, P.N.A.S., U.S.A., 97: 2767-72, 1999)、この用途の1例から、FMT撮像とMRIとの組み合わせ方が開示される。このMRIとの組合せにより、以下が可能となる: (1) MR像と工学的に取得した像とを直接比較することによりインピボFMT撮像の妥当性を検証すること; (2) T2強調MR像とGd増強パターンとにより取得した解剖学的画像、および光学撮像で観察される分子活性に基づいて、癌描出能および検出限界を直接比較すること; および(3) MRによる構造的および機能的情報を光学反転系で先験的な情報として利用することによって、局所の蛍光体の濃度および寿命について高精度の測定結果を得ること。MRIとFMTとの組合せにより、蛍光体の濃度および寿命の定量化における精度も向上する。全体的に、分子プロービングにより検出精度が向上し且つ分子標的評価が可能になる。

10

20

【0072】

磁場との干渉を回避するため、励起光および放射光を励起/検出システムから患者に、およびその逆方向に伝送するためのファイバー束は非磁性体のものを使用してもよい。ヒトに適用する場合は、任意のMR施設で利用できる市販または特注のMRIコイルを使用してもよい。MRコイルは用途に応じて図3A~3Fに示す形状のうち1つに連結してもよい。皮膚に接触させた多点入射光照射アレイおよび検出アレイの正確な位置を確認するためにMR像またはCT像自体を使用してもよい。平坦でない表面上の光源ファイバー端および検出用ファイバー端の空間位置を把握していることにより光学的再構成が向上する。皮膚接触型ファイバー(例えば、図3Eのファイバー)または体内留置型ファイバー(例えば、図3Fのアレイの直腸内使用)は、アレイが固有検出可能な材料(例えば、磁気/X線吸収性の化合物、特定の化学物質、またはプラスチックで充填された微小基準ファントムを含む材料)で構成されている場合は撮像によって検出してもよい。例えば、多点入射光照射アレイおよび検出アレイのシリンダー、ならびに光ファイバーの位置をMR像上で確認するには、MR像で明るいスポットとして現れるよう水と CuSO_4 とを充填した小さい基準毛管をシリンダーに取り付けてもよい。

30

【0073】

図4Cおよび4Dは位置合わせに使用される磁気共鳴(MR)コイル65の例である。コイル65は図2Bの動物用挿入部23を収容できるよう専用に作製したものである。1つの態様では、FMT撮像後、動物を入れた挿入部23を撮像チャンバー15から取り出し、MRコイル65の中で位置決めする。専用に設計した1つ以上のガラス毛管66(水および硫酸銅を充填した1mmのガラス管)を挿入部23に取り付け、これによってMR像とFMT像との位置合わせを可能にする。このような基準マーカーは、図8Aに示すようにMR像の左側に明るい円形スポットとして描出される(詳しくは後述)。図4Dは、MRIコイル65の中で挿入部23内にマウスを位置決めした様子である。第二の態様では、MR撮像とFMT撮像とを同時に行えるよう、図2Aの撮像チャンバー15の周囲にコイルを直接構築する。

40

【0074】

50

データ収集

図5のフローチャートに示すように、TRおよびCWのそれぞれについて5セットの測定結果M1～M5が取得される。測定結果M3は測定結果M2から導出するかまたは理論的に構成することができるため、この取得は省略してもよい。用途の要件に応じて収集したデータの部分集合を使用してもよいが、精度を最も高くするには、蛍光色素の再構成にM1セット、M2セット、M4セットを使用し、光学マップの導出にM1セット、M2セット、M4セット、M5セットのを使用する。

【0075】

図5に示すように、初期段階70で取得されるのは5セットの単純な測定結果(M1、71; M2、72; M3、73; M4、74; およびM5、75)である。第一の段階71では蛍光測定結果M1が取得される。これは、複数の点で光源を走査し、且つ、発光波長(蛍光)のみが収集されるようバンドパスフィルターを使用した状態で組織からの発光を検出器で取得したときの測定結果である。段階72では、段階71と同様にして第二の測定結果M2が取得される。ただし、バンドパスフィルターを使用せずに、各波長について組織の固有信号を測定する。固有信号と比較して蛍光信号が非常に小さい場合、フィルターは不要である。しかし、測定対象組織が発する蛍光(M1)がM2の1%より大きい場合は、蛍光波長を排除するためカットオフフィルターを使用する。段階73では、段階71で使用した蛍光フィルター(ハイパスフィルター)を通過する固有光の量を取得するため、測定結果M3を得る。この測定を行うには、測定対象の組織をシリンダーから取り出し、蛍光フィルター(バンドパスフィルター)を使用した状態で整合液の測定結果を取得する。この測定結果は、光源1つあたりの周辺光、光子雑音、および電子雑音の影響を確認するためにも使用される。

【0076】

別の手法としては、M3の実験的測定を行う代わりに、 $M3 = q1(r) \times M2 + ct$ により構成した測定結果を使用する。この式において、 $q1$ は固有場のフィルター減衰であり、半径依存的なフィルター異方性をもたらさうような空間依存性の因子である。因子 $q1(r)$ は平坦場測定によって実験的に決定してもよく、またはフィルターの仕様に基づいて計算してもよい。定数 ct はCCDカメラのバックグラウンド暗雑音測定結果の像を表す。さらに、M3は $M3 = q1(r) \times M2' + ct$ という式でも記述できる。この式において、 $M2'$ は、伝達方程式の解を用いて理論的に計算されるか、または測定対象媒体の平均的な光学特性を有する均質な媒体についてもしくは既知の情報を利用して得た不均質な媒体についてこの伝達方程式(拡散方程式など)を近似した近似値を用いて、理論的に計算される。

【0077】

段階74では、周辺(バックグラウンド)光およびCCD雑音のみを取得するために、すべての光源をオフにした状態で測定結果M4を取得する。段階75では、フィルターおよび組織を置かない状態で、適切なレーザーダイオードを用いて励起波長および発光波長について測定結果M5を取得する。この測定によりバックグラウンド信号が得られる。

【0078】

実際には、CW測定では測定結果M1、M2、M3、およびM5はそれぞれ一連のNs枚の画像(Nsは使用する光源の数)である。M4はバックグラウンド雑音の1枚の像である。TR光源またはIM光源の場合は、M1、M2、M3、およびM5はそれぞれセットがNs x Nd(Ndは検出器の数)である。多スペクトル撮像の場合は、取得した測定結果の数と、対応する使用波長数とを乗算する。

【0079】

複合測定結果(CM)

これらの単純な測定結果を組み合わせることにより、次式により蛍光M(段階80a)および固有コントラストM'(段階80b)の自己較正(または複合)測定結果を生成する。

$$M = (M1 - M3) / (M2 - M4) \quad \text{式 1}$$

10

20

30

40

50

および

$$M' = \log (M_2 - M_4) / (M_5 - M_4) \quad \text{式 2}$$

【0080】

上式には明らかに表されていないが、測定結果 $M_1 \sim M_5$ は周波数の関数である。したがって、CWデータおよびTRデータ（フーリエ変換後の）はまったく同様に扱われる。この構成の理論的根拠は、これらの複合測定ベクトルが、異なる光源ファイバーまたは検出ファイバー間の減衰の差異およびCCDチップないの不均質性といった機器利得の変動に対して独立である、という点にある。さらに、これらのベクトルにより、実際の測定結果からバックグラウンド雑音（ M_4 ）またはハイパスフィルターの不完全性（ M_3 ）などの系統誤差が減算される。測定結果を較正する方法は複数存在すると考えられるが、これらの具体的な構成は蛍光信号および固有信号を理論的に予測した後に行われる。この理論的予測の段階は定量的な再構成に不可欠である。次に、この点について詳述する。

10

【0081】

自己較正された複合測定結果を較正するには、特定の用途に応じて別の方法を用いてもよい。例えば、蛍光体の濃度および活性を時間の関数として観察する動的撮像においては、測定結果 M_5 の代わりに時刻 0 における測定結果 M_2 を使用してもよい。これは、好ましくはNIRFプローブを動物に投与する前の時点とする。これによって、蛍光色素吸収を固有の組織吸収からの差異信号として正確にモニターすることができる。

【0082】

順問題の構成

20

断層撮影測定を行うには、複合測定結果（ CM ）（すなわち測定結果 M および測定結果 M' ）の理論的予測が必要である。これを「フォーワード予測子」（ P ）または「重み行列」と呼ぶ。 P と CM とを組み合わせることにより、後述のように分子断層撮影測定結果を生成する。本明細書では、回折断層撮影法の断層撮影原理（KakおよびSlaney, 1988）を適用した具体的な理論的構成について説明する。

【0083】

順問題の修正ボルン（Born）予測に基づいて蛍光の P を記述する（Ntziachristsos V, Weissleder R, Opt. Lett., 26(12): 893-895, 2001）。一般に、媒体には弱い吸収を示す蛍光体が分布しているとみなす。蛍光体はこの光子分布によって励起され、蛍光の二次点光源として作用する。投与するNIRFプローブの濃度が低いため、2レベル量子系としての蛍光体および飽和効果は無視する。蛍光測定結果に対する標準ボルン拡張は次式で表される。

30

$$\phi_f(\vec{r}_d, \vec{r}_s) = \int g_f(\vec{r} - \vec{r}_d) \frac{\sigma c N_t(\vec{r})}{1 - i\omega\tau} \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{式 3}$$

上式において、

$$\phi_f(\vec{r}_d, \vec{r}_s)$$

は位置

$$\vec{r}_s$$

40

の光源に対して位置

$$\vec{r}_d$$

で測定された蛍光のフルエンス、

$$\phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s)$$

は所定の位置の光源によって均質な媒体内で生じた光子のフルエンス、

$$g_f(\vec{r} - \vec{r}_d)$$

50

は発光波長における拡散媒体内の光子の伝搬を記述する関数である。

$$N_i(\vec{r}) = [F] \cdot \gamma$$

は蛍光体 F の未知濃度に位置
 \vec{r}

の蛍光収率 を掛けたもの、 は蛍光色素の吸収断面、 c は拡散媒体中の光の速度、
 $1 /$ は蛍光寿命、 は光源輝度の変調周波数である。輝度が一定の光源の場合は
 0 である。段階 8 8 で決定されたフォーワード予測子 (P) により、測定結果 M (段階
 8 0 a) は次式のように予測される。

$$M = \frac{M1 - M3}{M2 - M4} = \frac{1}{\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)} \int g_{fl}(\vec{r} - \vec{r}_d) \frac{\sigma c N_i(\vec{r})}{1 - i\omega\tau} \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{式 4}$$

10

【 0 0 8 4 】

これは、標準ボルン拡張を入射場

$$\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)$$

で正規化する修正ボルン拡張である。したがって、光源および検出器の利得は各光源 - 検
 出器ペアについて独立に打ち消される。

【 0 0 8 5 】

固有コントラストの再構成を行うには、例えば O ' レアリー (O ' L e a r y) ら , O
 p t . L e t t . 2 0 : 4 2 6 - 4 2 8 , 1 9 9 5 および N t z i a c h r i s t o
 s ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 9 7 : 2 7 6 7 - 7 2
 2 0 0 0 に記載されているように、周波数領域のリトフ (R y t o v) 拡張を用いてフ
 ォーワード予測子 P ' を決定する (段階 8 8) 。測定結果 M ' (段階 8 0 b) は次式のよ
 うに記述される。

20

$$M' = \log \frac{M2 - M4}{M5 - M4} = \frac{1}{\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)} \int g_0(\vec{r} - \vec{r}_d) o(\vec{r}) \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{式 5}$$

上式において、

$$\phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s)$$

30

は位置

$$\vec{r}_s$$

の光源から位置

$$\vec{r}$$

までの入射場、

$$o(\vec{r})$$

40

は仮定した均質なバックグラウンド媒体に対する未知の吸収係数および拡散係数の変化の
 ベクトルである。

【 0 0 8 6 】

関数 g_{f1} および o は、特定の撮像チャンバー形状および拡散理論について発光波長 (段階 8 2) および励起波長 (段階 8 4) の光子伝搬をシミュレーションすることによって
 計算する。これは、分析的手法かまたは数値的手法のいずれかにより行うことができる。
 これらのシミュレーションを行うには、関心対象波長における組織の平均的な光学特性が
 既知である必要がある。光学特性は、全ての固有コントラストの T R 測定結果を適切な形
 状の拡散モデルに適合させることによって得られる。分析的には、 L i ら , A p p l .
 O p t . , 3 6 : 2 2 6 0 - 2 2 7 2 (1 9 9 7) に記述されているように、標準的な

50

方法を（円筒形状に適合させたうえで）適用することも可能である。しかし本発明者らは、部分的境界条件を用いて円筒形状の拡散近似問題を解く自作の定差数値アルゴリズムを使用することを提唱する（Arridge, Inverse Problems, 15 : R41 - R93, 1999）。これにより、光源 - 検出器間の間隔が小さくても正確にモデルを構成できる。これは、規模の比較的小さい問題に対してより正確な伝搬モデルを得るために使用されなければならない。以上により、式4および式5の中で未知の要素は、それぞれ蛍光体の分布、または吸収係数および拡散係数のみとなる。次に式4および式5の最小化について説明する。

【0087】

データの反転

蛍光コントラストおよび固有コントラストはいずれも、関数を記述し、後にこの関数を最小化することに基づいて再構成する。段階80aで複合測定結果Mを用いて関数 $F(U) = (M - P \times U)^2$ を記述し、段階80bで複合測定結果M'を用いて関数 $F'(O) = (M' - P' \times O)^2$ を記述する。Uは消光していない（活性状態の）蛍光色素の未知濃度、Oは吸収および拡散の未知の分布のベクトルである。吸収分布はベール - ランベルトの法則（Beer - Lambert Law）によって蛍光色素濃度に変換してもよい。行列PおよびP'は前述のとおりである。段階92aおよび92bにおいて、関数F(U)およびF'(O)を最小化しこれによりUおよびOの分布および大きさをそれぞれ求める。最小化は代数的再構成法によって行うことができるが、他の任意の最小化法を使用して、記述した関数の解を求めてもよい。

【0088】

活性化される蛍光色素が少量である場合は、反復法を用いる必要はない。多くの場合はこれに当する。しかし、特定の用途で高濃度の蛍光色素が活性化されることが予測される場合（すなわち、吸収摂動による固有信号の変動が10%を超える場合）は反復が必要となる。反復プロセス95の第一段階では、測定対象媒体の平均的な光学特性を有する均質なバックグラウンドを仮定する。次の段階では、像UおよびOをバックグラウンドマップとして用いて行列PおよびP'を記述する。反復を行う場合は、拡散方程式の数値解を用いて行列PおよびP'を記述する必要がある。蛍光色素のバックグラウンド分布が、局所的な高集積領域（腫瘍など）のコントラストと同程度である場合も、反復が必要となる。一般には、各反復段階の計算結果が有意に変化しなくなった時点で反復を終了する。

【0089】

分子マップ

本発明の新規なシステムおよび方法により、分子マップおよび分子活性化マップの三次元定量的な計算が可能となる。計算によって得られる像Uは、蛍光状態または活性化状態の蛍光色素の濃度を含む。一方、Oに含まれる吸収像は全蛍光色素（消光状態および非消光状態の蛍光色素）の濃度を定量的に表したものである。全蛍光体濃度に対する活性状態の蛍光体の濃度は次式の活性化比マップで表される（段階93）。

$$AR = U / O \quad \text{式 6}$$

上式は、測定対象領域に実際に分布している蛍光色素の量に対して正規化した活性化の量を表す。吸収がゼロである領域については、比ARは定義されない。蛍光色素の分布がゼロであれば活性化は生じないのでこれは当然である。したがって、デフォルトでは、吸収がゼロでない領域要素に対してのみ比ARが適用される。

【0090】

図6A～6Cに、分子マップ（酵素トリプシンの活性を示す分子マップ）の生成の様子を示す。分子マップは分子の内部プロセスを表したものである。分子マップ（MM）は式 $MM = k * AR$ 、すなわち $MM = k * (U / O)$ によって最も適切に記述される。

kは定数である。

【0091】

図6Aは、トリプシンの変性に対して感受性である分子プローブの濃度を示す吸収マップである。図6A中の明るいスポットは、消光状態のものも非消光状態のものも含めたプロ

10

20

30

40

50

ープの全量を表す。図 6 B は、消光されていない（すなわち酵素賦活された）トリプシン感受性プローブのみを測定した、対応する蛍光マップである。図 6 C は「蛍光賦活」を画像として表示した A R 像または「分子マップ」である。明るいスポットは、この実験で使
用した酵素トリプシンの添加量に比例している。

【 0 0 9 2 】

実施例

以下に実施例によって本発明を説明するが、これら実施例は特許請求の範囲で定義される本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 9 3 】

実施例 1 ファントムの F M T 像

1 つの態様において、三次元位置および測定精度を確認するためファントム実験を行った。実験の設定を図 7 A の上面図に示す。簡潔には、3 本の毛管 1 0 3（内径 1 m m）を有するファントム 1 0 0 を三角形の形状に構成し、混濁媒体 1 0 2（0 . 5 % I n t r a l l i p i d（登録商標）水溶液）の入った光学チャンバー（図 2 A の 1 5）に入れた。毛管 1 0 3 は図 7 A に示すように 8 m m および 1 1 m m の間隔で配置し、吸収を最大にするため黒い蛍光色素でコーティングした。この毛管を三次元で撮像した。

【 0 0 9 4 】

図 7 B に、撮像チャンバー 1 5 の長軸方向に対して垂直で、且つ、撮像した三次元領域のほぼ中央の面で再構成した像 1 1 0 を示す。高いコントラストにより、3 本の毛管の高分解像が高い位置精度で得られた。使用した再構成メッシュは 0 . 8 x 0 . 8 x 2 m m³ である。再構成には 2 4 個の光源 x 3 6 個の検出器を使用した。

【 0 0 9 5 】

実施例 2 経時的なトリプシン活性の F M T 像

別の実験では、蛍光活性に関する定量的且つ空間局所的な情報を時間の関数として取得した。図 8 A および 8 B に示すように、組織様流体（I n t r a l l i p i d（登録商標））に 3 m m の毛管 1 2 3 を浸漬してファントム 1 0 2 を作製した。毛管には C y 5 . 5 プローブ 1 . 5 μ M を入れ、時刻 0 に酵素トリプシンを毛管に添加することによってこのプローブを活性化した。この実験では、1 2 個の発光点を曲線矢印 1 2 5 の方向に順に発光させることによって 1 平面のみを撮像した。図 8 B にファントムの立体図を示す。

【 0 0 9 6 】

図 8 C ~ 8 F は種々の時刻に取得し軸方向に再構成した一連のフレームである。これらのフレームにはプローブの活性化が時間の関数として表示されている。例えば、図 8 C が示しているように、毛管にトリプシンを添加してから 2 0 分後の時点では、~ 2 0 % のプローブしか活性化されていない。しかし酵素添加から 2 0 0 分後の図 8 F では ~ 7 5 % のプローブが活性化されている。各フレームは、シリンダーに沿って同一面上に配置された 1 2 本の光源ファイバーの各々に順次光を誘導することによって取得した。各光源について、検出用ファイバーから出た光を C C D で 5 秒間取得した。したがって、フレーム 1 枚あたりの総取得時間は 1 分間（1 2 光源 x 各 5 秒間）であった。

【 0 0 9 7 】

実施例 3 マウスのカテプシン B 活性を撮像した複数の位置合わせ画像

別の実験では、組み合わせた M R / F M T 像を用いて、ヌードマウスに移植したヒト腫瘍中のカテプシン B プロテアーゼの活性のマップを作製した（図 9 A ~ 9 C）。腫瘍はカテプシン B を多量に含む H T 1 0 8 0 線維肉腫であり、実験前にマウスの脂肪パッド内に 7 ~ 1 0 日間移植した。撮像実験の 2 4 時間前に、カテプシン B 感受性撮像プローブを静脈注射によりマウスに投与した（W e i s s l e d e r ら, N a t . B i o t e c h n o l . , 1 7 : 3 7 5 - 3 7 8 , 1 9 9 9）。マウスを 9 0 m g / k g ケタミンおよび 9 m g / k g キシラジンの腹腔内投与により麻酔し、図 2 B に示した挿入部 2 3 の中に入れた。挿入部およびマウスを撮像チャンバー 1 5 の中に置き、M 1、M 2、M 3、および M 4 を測定した。

【 0 0 9 8 】

続いて、挿入部内のマウスを撮像チャンバーから取り出した。水による基準点（本明細書中で説明しているもの）を、挿入部の外周のあらかじめ定めた位置に取り付けた。次に、挿入部をMRコイルに入れ、1セットの横断面T2強調画像を取得した。基準点の役割は、後の画像位置合わせのため、選択した光源ファイバーおよび検出用ファイバーの位置をMR像上で確認することである。例えば、図9A、10A、および11Aの画像の左側に明るいスポットとして描出されている基準点（シリンダー外壁に沿って長軸方向に配置されたガラス毛管）は、対応するスライス上の検出器1、13、および25の位置を示している。

【0099】

実験結果として、MR像（図9A）、カテプシンBの分子マップ（FMT）（図9B）、およびMRスライスのうち1枚をFMT像と融合して作製したMR/分子マップ（図9C）を示す。腫瘍の位置で取得した画像の光学的コントラストとMRコントラストとは極めてよく一致している。腫瘍にはカテプシンBの強い分子活性（蛍光活性）が認められ、このことは免疫組織化学法およびウェスタンブロッティングにより確認された。蛍光活性とT2強調画像との位置合わせの様子は図9Cの融合像に示されている。残りの2段の画像は、他の組織におけるカテプシンの有無を示すスライスである。具体的には、図10Aおよび10Bはそれぞれ心臓部のMR像およびFMT像である。予測されたとおり、肺および心臓ではカテプシンBが活性化しておらず、したがって図10BのFMT像には何も描出されていない。図11Aおよび11Bはそれぞれ腎臓部のMR像およびFMT像である。腎臓内で描出されている蛍光色素は恐らく排泄された余剰分であり、カテプシン活性を反映したものではないと思われる。

10

20

【0100】

これは、全測定アレイのうち一部を使用して（M1～M4のCW測定結果のみを使用し、M5およびTRデータは使用していない）、酵素活性像を生成した例である。この画像により、以下の実施例で説明する臨床例に有用な情報が提供されている。さらに、図9A～11Bの一連の画像により、本発明の新規な方法およびシステムを用いて生きた動物の多スライス像を生成できることが確認された。

【0101】

実施例4 分子マップ

分子マップ生成の用途を示すため、実施例3と同じ設定を用い、CWモードで測定結果M1～M5の全アレイを取得した。Intralipid（登録商標）の光学特性を時間分解系で独立に測定した。次に、吸収マップ（図6A）と、トリプシン賦活から50分後に収集した蛍光マップ（図6B）とを、図5のフローチャートに示したアルゴリズムによって作成した。段階93で計算した分子マップ（AR像）を図6Cに示す。活性化50分後で、酵素感受性プローブの40%が活性化されている。

30

【0102】

実施例5 酵素特異的プローブ

感受性および酵素特異性を有する、FMT撮像に有用な種々の撮像用プローブを合成した。これらのプローブは、酵素の中でも特にカテプシンD、カテプシンK、酵素的に活性状態の前立腺特異抗原（PSA）、およびマトリックス・メタロプロテアーゼ2に対して特異性を示す。これらプローブの特異性は、精製または組換えヒト酵素を添加したインキュベーションと、蛍光測定器による蛍光活性測定とによって確認した。これら全てのプローブについて、NIR蛍光体Cy5.5を消光レポーターとして使用した。これらプローブはいずれも、深部組織（正常組織および疾患組織のいずれも）における酵素活性を測定するために、本明細書に記載のように動物およびヒトに使用することができる。例えば、MMP-2阻害剤（例えば、Prinomastat（登録商標）、アグーロン・ファーマシューティカルズ（Agouron Pharmaceuticals, Inc.、カリフォルニア州San Diego）の投与前および投与後に腫瘍中のMMP-2活性を測定してもよい。分子標的評価でこのような測定を行うことは、動物モデルを用いた迅速なインビボ薬剤有効性スクリーニングに有用である。さらに、このようなスクリーニング法

40

50

を用いて、特定の患者における特定の治療法の有効性を評価してもよい。

【0103】

実施例6 臨床使用

本発明の新規なFMT法は広範な臨床用途を有すると予測される。1つの用途として、分子の異常は存在するが表現型の異常には至らない早期の段階での疾患発見がある（例えば、腫瘍塊が形成される前の癌における突然変異）。別の用途としては、以下を目的とした疾患組織における分子標的評価である：（1）所定の標的が患者の体内に存在するか否かを決定する（例えば、プロテアーゼの発現レベル）；（2）実験段階の薬剤が、意図されたインビボ分子標的に対して効果を示すか否かを決定する；（3）所定の患者に対して治療を個別化およびテーラード化する；ならびに（4）所定の患者に対する所定の分子の投与量を最適化する。この点において、本発明の新規なFMT撮像法は薬剤有効性試験に近い。このような測定は、酵素阻害薬、受容体ブロッカー、およびその他の分子薬剤の有効性を決定するための臨床設定においても価値があると考えられる。これらの方法を、癌、心血管疾患、AIDS、感染症、免疫疾患、炎症、皮膚疾患、眼疾患、神経変性疾患、およびその他の疾患を含む広範な疾患のモニタリングに使用してもよい。

10

【0104】

実施例7 複数のプローブ

本発明の新規なFMT法は、1回のFMT像取得で複数の分子の異常を調べるため、複数の分子プローブ（それぞれが独自の特異的な励起波長および発光波長を有する分子プローブ）を同時に用いて実施してもよい。追加の蛍光分子プローブを励起するための1つ以上のレーザーを追加することによって、本明細書に記載のシステムをこのような用途に適合させてもよい。異なるチャンネル間でスペクトルが重複していないことを確認した上で、適切なフィルター系を介して画像信号を収集する。画像再構成、アルゴリズム、および表示は、本明細書に記載の単一波長撮像のものと同様である。

20

【0105】

実施例8 周波数領域技術

好ましくは複数の周波数において、1つ以上の周波数領域光源を使用することによって、本明細書に記載のTRシステムを改変してもよい。周波数領域技術を既存のアルゴリズムに直接適用できるよう、その周波数領域で理論式を記述する。周波数領域技術を用いることの理論的根拠はTR技術の場合と同様である。すなわち、周波数領域技術により、固有コントラストモードでは吸収と散乱とを、蛍光モードでは蛍光体の濃度と寿命とを区別できるような多周波数情報が得られる。周波数領域技術を用いる場合は、図4Aの機器の代わりに、1つまたは複数の周波数で変調される光源、および、信号復調を担当する検出チャンネル（ロックイン増幅器、または好ましくは、MR信号の検出に使用されるものと同様の直角復調器）を使用する。

30

【0106】

実施例9 差分動的撮像（DDI）

蛍光コントラストおよび固有コントラストの取得、ならびにAR像の構成を行うため、前述の複合測定結果の利用を種々の方法で適用してもよい。例えば、NIRF分子プローブを注射した動物の一般的な系は式4および5で与えられるが、NIRFプローブ注射前の動物で測定を行い、次に、NIRFプローブ注射後の吸収コントラストおよび蛍光コントラストの差分測定を行ってもよい。この技術は、取り込み及び活性化の動態のモニタリングに重要な用途を有する（実施例2でも示している）。差分測定では蛍光色素/発色団の吸収をバックグラウンド吸収とは独立に再構成できるため（これは吸収の変化のみが再構成されることによる）、このアプローチにより、測定結果の精度も最も高くなる。したがって、より正確なARマップを時間の関数として生成することが可能である。

40

【0107】

実施例10 複数の波長での撮像

実施例9とは別の複合測定結果の利用方法として、各測定セットにつき4つ以上の波長を使用する方法がある。N個の組織発色団について、NIRFプローブが吸収しないスペク

50

トル領域でN個以上の波長を選択する。したがって真の「固有」コントラスト、すなわち、自然状態の組織発色団濃度にのみ起因するコントラストが得られる。これら発色団のスペクトル情報を用いて、NIRFプローブの発光波長および励起波長でのこれら発色団の吸収を計算することができる。他の2つの波長は、励起波長および発光波長での吸収像を構成するために使用する。この後者の像では、自然状態の組織発色団濃度と蛍光色素分布との両方に起因する吸収が再構成される。自然状態の組織発色団のみについて計算した吸収像から、励起波長および発光波長で得られた像を減算することによって、真の蛍光色素／発色団濃度が得られる。

【0108】

実施例 1 1 臨床用 F M T システム

本明細書に記載の新規なシステムおよび方法は容易に臨床設定に適用できる。例えば、円形／円筒形の多点入射光照射アレイまたは圧縮／平面アレイを用いて乳癌検出を行ってもよい。頭蓋に取り付けた光ファイバーの弾性バンドを用いるか、または平面／反射幾何学形状を適用して、脳の測定を行ってもよい。種々のアレイについては図3A～Fを参照。本明細書に記載のFMT撮像法の光学技術は他の放射線モダリティと適合性があるため、FMT撮像をMR測定またはCT測定と連続的にまたは同時に行ってもよい。

10

【0109】

臨床設定においては、多数の測定結果を経済的に収集するうえでCW測定が有用であると考えられる。しかし、より高度な技術（例えば、前述のIMまたはTR）を限られた回数行うことによって、CW測定の情報内容を大幅に向上できる可能性がある。ただし、CW技術のみに基づいて臨床システムを構築することも可能であると考えられる。周波数領域技術または時間領域技術がより安価になってから、周波数領域技術または時間領域技術のみに基づいて全システムを構築してもよい。

20

【0110】

その他の態様

本明細書に記載した分子活性化の一般的な再構成系のサブカテゴリーとして、組織の単純な透照を利用して分子事象を検出する方法がある。これは、断層撮影による撮像から単純な投射撮像への拡張であり、既報の反射撮像法（Weisslederら，米国特許第6,083,486号）と似ているが同じではない。透照により、組織全体にわたる蛍光色素の吸収を測定することが可能になる。したがって、最大でも2～3センチメートルしか到達できない反射撮像法とは対照的に、透照法では数センチメートルの深さまで到達できる。分子事象の透照では分子活性を三次元で分解または定量することはできないが、分子活性化の相対的な変化を定性的にモニターすることは可能である。

30

【0111】

別の態様では、本発明の新規なシステムおよび方法を使用して動物の内因性の蛍光を撮像してもよい。例えば、緑色蛍光タンパク質またはフルオレセイン等の蛍光性タンパク質をコードしている遺伝子を、動物または患者の体内で発現させたい関心対象遺伝子の近傍に、標準的な遺伝子療法技術により導入してもよい。蛍光性タンパク質を撮像することにより、関心対象遺伝子の発現を間接的に測定できる。このタンパク質が発現していれば、関心対象の遺伝子も発現している。

40

【0112】

以上、本発明をその詳細な説明との関連によって説明したが、上記の記述は説明を目的としたものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を制限するものではないと理解されるべきである。この他の局面、利点、および改変も添付の特許請求の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の新規な方法に特に適した、活性化可能な自己消光性近赤外（NIR）蛍光プローブの例である。

【図2A】三次元蛍光断層撮影装置の略図である。

【図2B】動物を撮像に適した体位に保持するため図2Aの装置とともに使用される位置

50

決め装置の略図である。

【図 2 C】図 2 A のシステムの光学撮像チャンバーの写真である。撮像チャンバーにより、光源および検出ファイバーが適切な位置に配置される。

【図 2 D および 2 E】本発明の新規な蛍光断層撮影装置に使用できるファイバー連結システムの別の態様を示した図である。

【図 3】多点入射光アレイの別の態様を示した略図である。それぞれ、円形アレイ（図 2 A にも示す）、平面アレイ、曲線アレイ、成形アレイ、ベルトアレイ、およびカテーテルアレイである。これらの態様はすべて図 2 A のシステムで使用する。

【図 4 A】図 2 A のシステムとともに使用できる、時間分解三次元蛍光媒介式分子断層撮影法（FMT）の略図である。

【図 4 B から 4 D】位置決め用挿入部の写真である。それぞれ、図 2 A のシステムの撮像チャンバー内で使用した状態（図 4 B）、磁気共鳴映像法の MRI コイル内で使用した状態（図 4 C）、および、MRI コイル内でマウスを保持した状態（図 4 D）である。

【図 5】三次元のアナログの蛍光信号データおよび固有（吸収）信号データを処理して以下（i）～（iii）を提供するための段階を示したフローチャートである：（i）与えられた領域内における活性化蛍光プローブの濃度のベクトル U、（ii）非活性化プローブおよび活性化プローブの濃度のベクトル D、および、（iii）全 NIRF プローブに対する活性化 NIRF プローブの比であるベクトル AR。

【図 6】吸収マップ（図 6 A）、蛍光マップ（図 6 B）、および吸収比（AR）を示す分子マップを表す画像である。

【図 7】高分解能での吸収の撮像を示した略図である。図 7 A はファントムの設定を示した図、図 7 B は再構成した画像である。

【図 8 A および 8 B】円形の多点入射光アレイを使用して組織様媒体中の酵素活性を三次元で撮像するための実験の設定を示した略図である。多点入射光アレイを断面図（図 8 A）および立体図（図 8 B）で示した。

【図 8 C から 8 F】図 8 A の実験設定において低速度撮像ビデオで観察した酵素活性の静止画像である。それぞれ、20 分（図 8 C）、50 分（図 8 D）、115 分（図 8 E）、および 200 分（図 8 F）後の画像である。

【図 9】ヒト腫瘍を移植した生きたマウスの移植領域全体を撮像した横断面像である。図 9 A は T2 強調 MR 像である。図 9 B は、活性化可能なカテプシン B 検出用 NIR 撮像プローブを静脈注射してから 24 時間後に撮像した、移植腫瘍の NIR 蛍光媒介式分子断層撮影（FMT）像である。図 9 C は融合像である。T2 強調 MR 画像と NIRF 賦活 FMT 画像とで腫瘍の位置がよく一致している。

【図 10】生きたマウスの心臓部の横断面を撮像したもので、それぞれ MR 像および FMT 像である。

【図 11】生きたマウスの腎臓部の横断面を撮像したもので、それぞれ MR 像および FMT 像である。

これら図面内の同じ参照記号は同等の要素を指す。

10

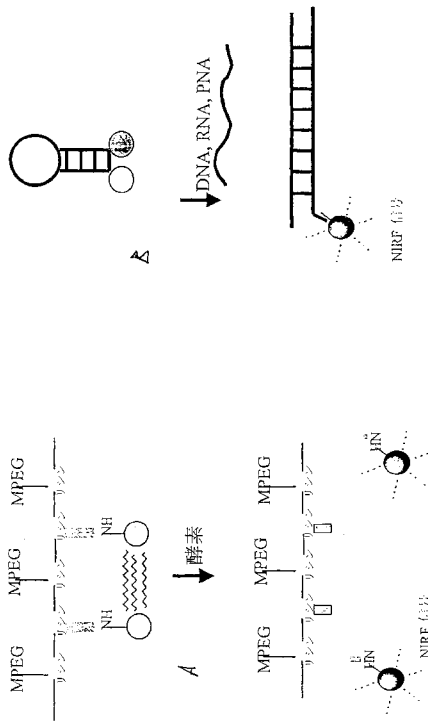
20

30

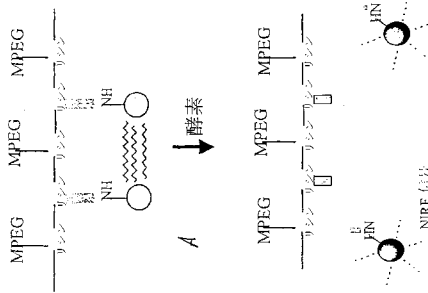
【図 1】

本発明の新規な方法で使用するための分子-NIRF 撮像プローブ

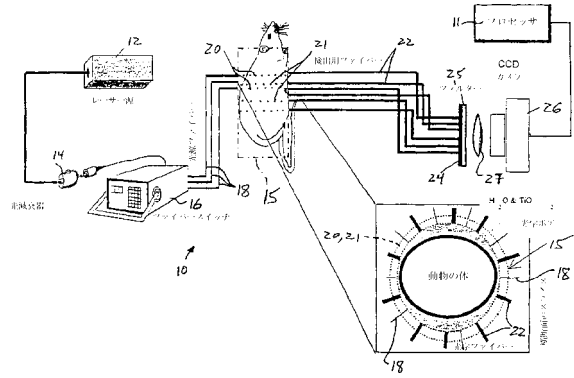
例 2: 特異的な DNA 標的



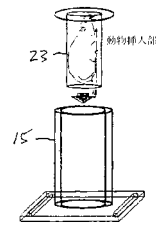
例 1: 特異的な酵素標的



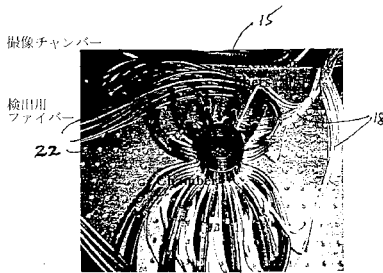
【図 2 A】



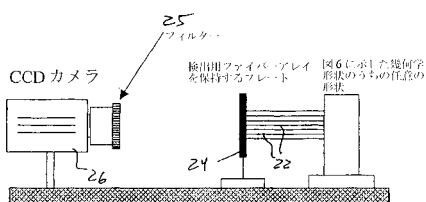
【図 2 B】



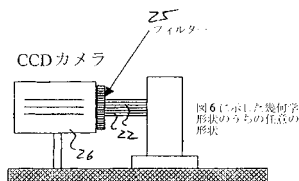
【図 2 C】



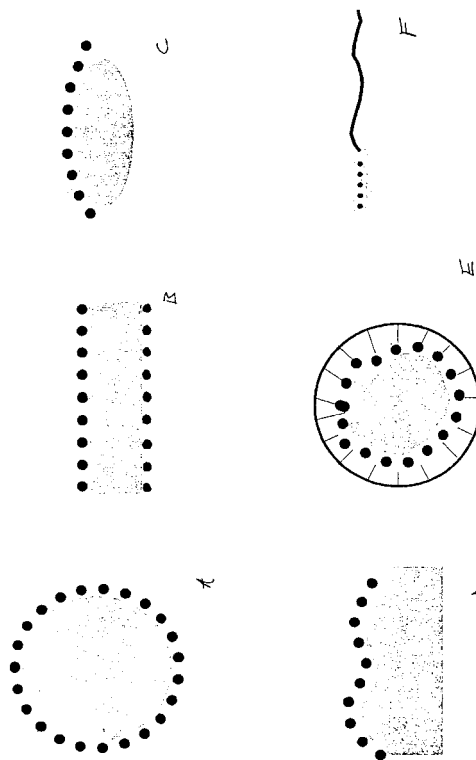
【図 2 D】



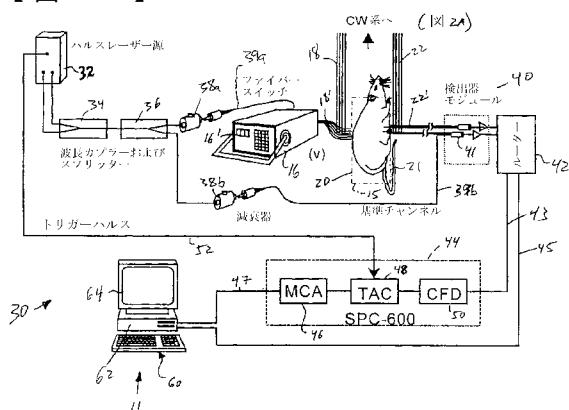
【図 2 E】



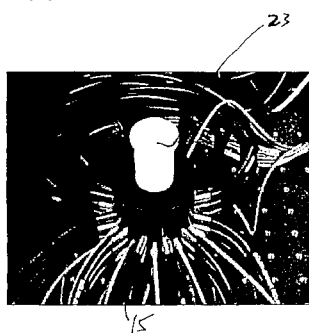
【図 3】



【 図 4 A 】



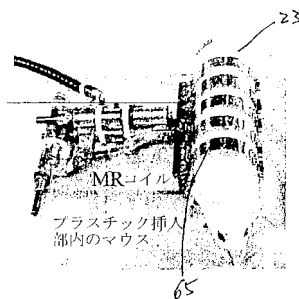
【 ㄨ 4 B 】



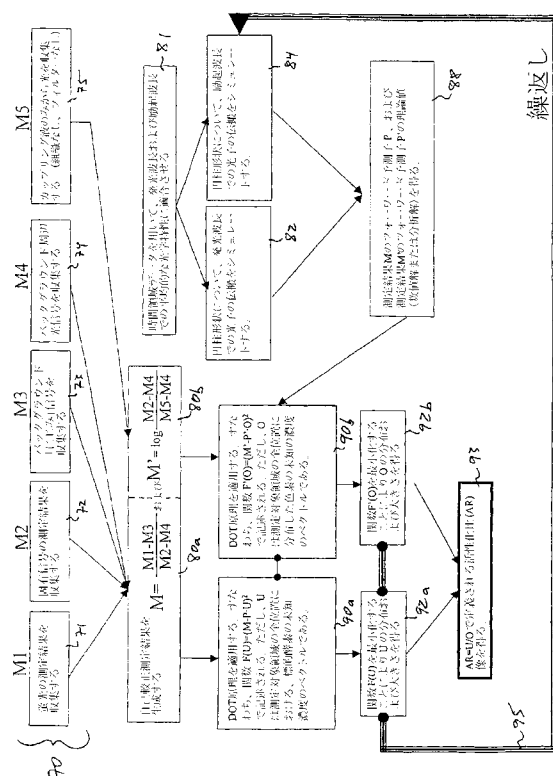
【 図 4 C 】



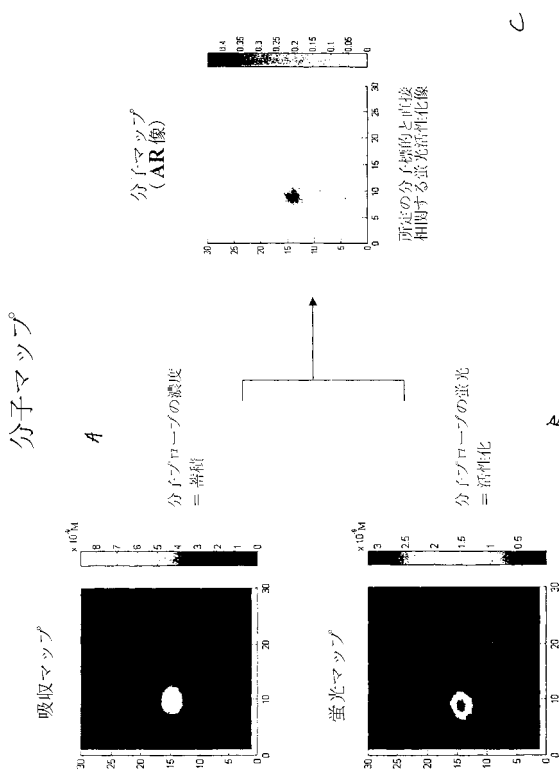
【 図 4 D 】



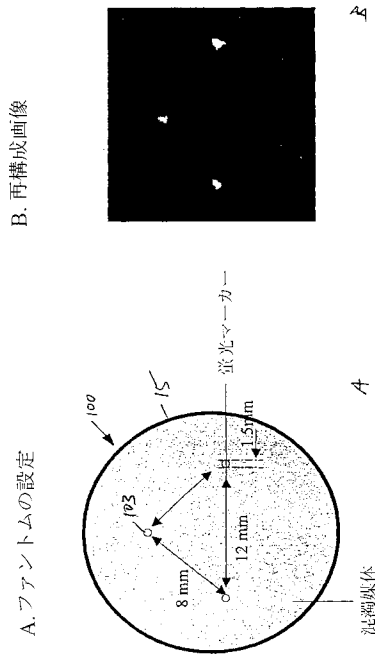
【 図 5 】



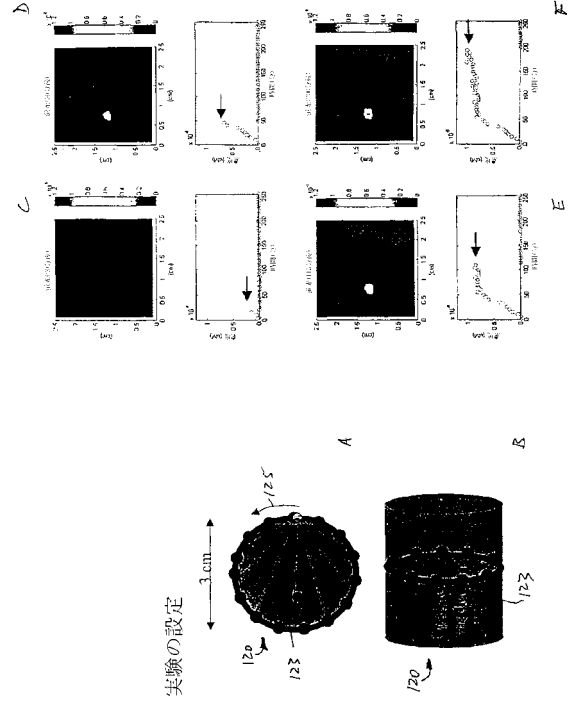
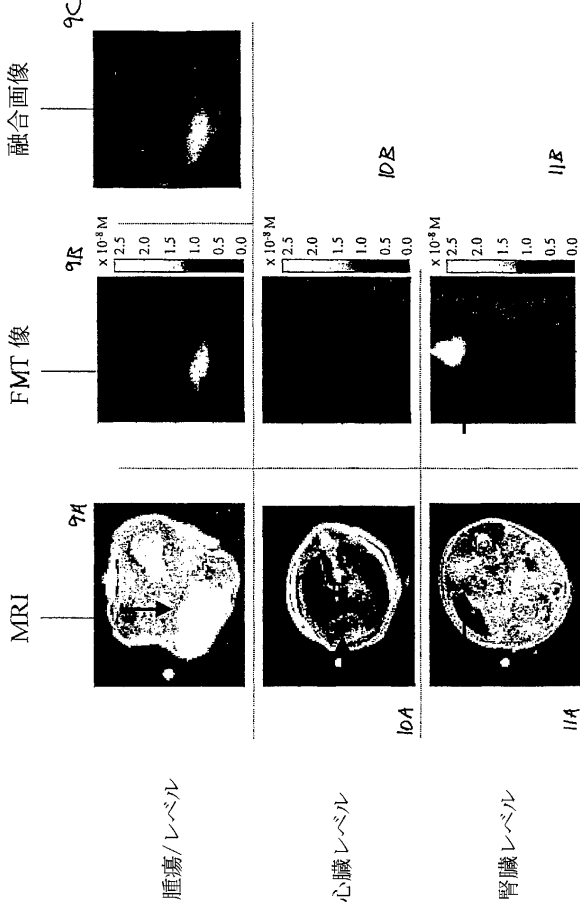
【 図 6 】



【図 7】



【図 8】

【図 9 - 11】
【図9から図11】

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/41760 A2

(51) International Patent Classification: A61B

(21) International Application Number: PCT/US01/44764

(22) International Filing Date:
27 November 2001 (27.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

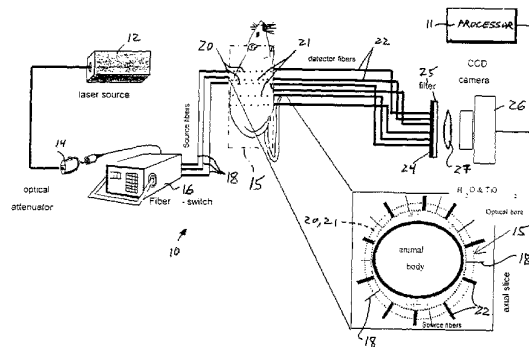
(30) Priority Data:
09/723,033 27 November 2000 (27.11.2000) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 09/723,033 (CIP)
Filed on 27 November 2000 (27.11.2000)(71) Applicant (for all designated States except US): THE
GENERAL HOSPITAL [US/US]; 55 Fruit Street,
Boston, MA 02114 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NTZIACHRISTOS,
Vasilis [GR/US]; Apt. 1212, 812 Memorial Drive, Cam-
bridge, MA 02139 (US); WEISSELER, Ralph [US/US];
197 Eighth Street, Apt. 731, Charlestown, MA 02129 (US).(74) Agent: FASSE, J. Peter; Fish & Richardson, P.C., 225
Franklin Street, Boston, MA 02118-2804 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

[Continued on next page]

(54) Title: FLUORESCENCE-MEDIATED MOLECULAR TOMOGRAPHY

(57) Abstract: This invention relates to a fluorescence-mediated molecular tomographic imaging system, designed to detect near-infrared fluorescence activation in deep tissues. The system can use targeted fluorescent molecular probes or highly sensitive activatable fluorescence molecular probes. Such probes add molecular specificity and yield high fluorescence contrast, to allow early detection and molecular target assessment of diseased tissue, such as cancers, *in vivo*. The new tomographic imaging system enable three-dimensional localization in deep tissues and quantitation of molecular probes.

WO 02/41760 A2

WO 02/41760 A2

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

WO 02/41760

PCT/US01/44764

FLUORESCENCE-MEDIATED MOLECULAR TOMOGRAPHY**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to extracting quantitative, three-dimensional molecular information from living mammals and patients using fluorochromes and new optical tomographic imaging methods.

BACKGROUND

5 Molecular imaging can be broadly defined as the characterization and measurement of biological processes at the cellular and molecular level in mammals and human patients. In contradistinction to "classical" diagnostic imaging, for example, magnetic resonance (MR), computed tomography (CT), and ultrasound (US) imaging, molecular imaging
10 analyses molecular abnormalities that are the basis of disease, rather than imaging the end-effects of these molecular alterations. Specific imaging of molecular targets allows earlier detection and characterization of disease, as well as earlier and direct molecular assessment of treatment efficacy. Molecular imaging can theoretically be performed with different imaging technologies, up to now preferably with nuclear imaging technologies, e.g., PET and
15 SPECT imaging) which have high sensitivity of probe detection. The IV administered imaging probes typically recognize a given target. Alternatively, some probes detectable by MR imaging have been developed (Moats et al., *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 36:726-731, 1997; Weissleder et al., *Nat. Med.*, 6:351-5, 2000), although their detection threshold is generally in the micromolar instead of the pico/femtomolar range of isotope probes.

20 An alternative method is to use fluorescent probes for target recognition. For example, enzyme activatable fluorochrome probes are described in Weissleder et al., U.S. Patent No. 6,083,486, and fluorescent molecular beacons that become fluorescent after DNA hybridization are described in Tyagi et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:49-53, 1998. Fluorescence
25 activatable probes have been used in tissue culture and histologic sections and detected using fluorescence microscopy. When administered in vivo, fluorescence activatable probes have been detected by surface-weighted reflectance imaging (Weissleder et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:375-8, 1999); Mahmood et al., *Radiology*, 213:866-70, 1999. However, imaging in deep tissues (> 5 mm from the surface), in absorbing and scattering media such as mammalian

WO 02/41760

PCT/US01/44764

tissues, and quantitating fluorescence (and in particular fluorescence activation) has not been described.

To image light interactions in deeper tissues, light in the near infrared (near-IR or NIR) instead of the visible spectrum is preferred. Imaging with near infrared (near-IR or NIR) light has been in the frontier of research for resolving and quantifying tissue function. Light offers unique contrast mechanisms that can be based on absorption, e.g., probing of hemoglobin concentration or blood saturation, and/or fluorescence, e.g., probing for weak auto-fluorescence, or exogenously administered fluorescent probes (Neri et al., *Nat. Biotech.*, 15:1271-1275, 1997; Ballou et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 41:257-63, 1995; and Weissleder, 1999). In either application, NIR photons undergo significant elastic scattering when traveling through tissue. This results in light "diffusion" in tissue that hinders resolution and impairs the ability to produce diagnostically interpretable images using simple "projection" approaches (transillumination), as in x-ray imaging.

During the last decade, mathematical modeling of light propagation in tissue, combined with technological advancements in photon sources and detection techniques has made possible the application of tomographic principles (Kak and Slaney, "Principles of Computerized Tomographic Imaging," IEEE Press, New York, 1988, pp. 208-218); Arridge, *Inverse Problems*, 15:R41-R93, 1999) for imaging with diffuse light. Diffuse Optical Tomography (DOT) uses multiple projections and deconvolves the scattering effect of tissue. DOT imaging has been used for quantitative, three-dimensional imaging of intrinsic absorption and scattering (see, e.g., Ntziachristos et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97:2767-72, 2000, and also Benaron et al., *J. Cerebral Blood Flow Metabol.*, 20(3):469-77, 2000). These fundamental quantities can be used to derive tissue oxy- and deoxy-hemoglobin concentrations, blood oxygen saturation (Li et al., *Appl. Opt.*, 35:3746-3758, 1996) or hematoma detection in diffuse media.

Although intrinsic-contrast for DOT imaging may be useful in certain situations, e.g., for functional brain activation studies or hematoma detection, these applications do not allow the extraction of highly specific molecular information from living tissues. Fluorochrome concentration has been measured by absorption measurements (Ntziachristos et al., 2000) or by fluorescence measurements in phantoms (Chang et al., *IEEE Trans. Med. Imag.*, 16:68-77, 1997; Sevick-Muraca et al., *Photochem. Photobiol.*, 66:55-64, 1997). However,

WO 02/41760

PCT/US01/44764

previously described DOT systems and/or image algorithms have not been useful to obtain three-dimensional quantitation of fluorescence in deep tissues in living mammals.

SUMMARY

5 The invention is based on the discovery that in vivo fluorochrome signals from a variety of molecular probes, such as specific targeted molecular probes, e.g., probes targeted for specific enzyme activities or DNA sequences, can be localized in three dimensions in deep tissues and can be quantitated with high sensitivity using a specially designed imaging system for this purpose and relying on self-calibrated image reconstruction and new
10 algorithms to extract molecular maps.

In general, the invention features a fluorescence-mediated molecular tomography (FMT) imaging system that includes a light source (e.g., an NIR or visible light source) to provide incident light; a multipoint incident illumination array to direct light into an object, e.g., an animal or human patient, from two or more separate excitation points; multiple optic
15 fibers to transmit light from the light source to each point in the multipoint incident illumination array; a multipoint detection array to collect light, e.g., fluorescent light, emitted from the object from two or more separate collection points; a two-dimensional emitted light array to transmit light emitted from the object to a detector; multiple optic fibers to transmit light from each collection point to a corresponding point on the two-dimensional emitted
20 light array; and a detector to detect and convert light emitted from each point of the two-dimensional emitted light array into a digital signal corresponding to the light emitted from the object.

In this system, the emitted light can be continuous wave (CW) light, time-resolved (TR) light, intensity modulated (IM) light, or any combination of the above.

25 The system can further include a processor that processes the digital signal produced by the detector to provide an image on an output device. The output device can provide multiple images simultaneously. The processor can be programmed to process the digital signal by any one or combinations of: i) generating a corrected fluorescence measurement by subtracting a background signal and filter bleed-through signal from collected fluorescence
30 measurements; ii) generating a corrected intrinsic signal measurement by subtracting a background ambient light signal from collected intrinsic signal measurements; iii) generating

WO 02/41760

PCT/US01/44764

a self-calibrated fluorescence measurement by dividing the corrected fluorescence measurement by the corrected intrinsic measurement; iv) generating a corrected background-medium diffuse signal by subtracting the collected background ambient light signal from a collected diffuse signal; and v) generating a self-calibrated intrinsic measurement by dividing the corrected intrinsic signal measurement by the corrected background-medium diffuse signal.

In other embodiments, the processor can be programmed to process the digital signal by any one or combinations of: i) generating a self-calibrated measurement $M = M1 - M3 / M2 - M4$, or another function of M , wherein $M1$ is an emission wavelength fluorescence signal, $M2$ is an intrinsic signal, $M3$ is a fluorescence background and/or bleed-through signal, $M4$ is an intrinsic wavelength background ambient light signal; ii) generating a self-calibrated intrinsic measurement $M' = \log(M2 - M4)/(M5 - M4)$, or some other function of M' , wherein $M5$ is a background-medium diffuse signal; iii) minimizing a function $F(U) = (M - P \times U)^2$, or any other function of $(M - P \times U)$ (such as the absolute value, or cubed value), to obtain a distribution and magnitude of U , wherein U is a spatially dependent vector of unknown fluorochrome concentration and/or fluorochrome lifetime within the volume imaged, and P is a forward predictor of M calculated by solving the transport equation, or an approximation of the transport equation such as the diffusion equation, for an appropriate geometry and background medium in the appropriate mode that M is constructed; iv) minimizing a function $F'(O) = (M' - P' \times O)^2$ or functions of $(M' - P' \times O)$ to obtain a distribution and magnitude of O ; wherein O is a vector of unknown absorption of a fluorophore in the object, and P' is a forward predictor of M' calculated by solving the transport equation or an approximation of it such as the diffusion equation for the appropriate geometry and background medium in the appropriate absorption/scattering mode; v) calculating an activation ratio $AR = U/O$; and vi) generating an image corresponding to AR .

The measurement $M3$ can be experimentally obtained using calibration media or can be estimated or calculated based on the field $M2$. In particular, the measurement can be written as $M3 = q1(r) \times M2 + ct$, where $q1$ is the filter attenuation of the intrinsic field and is a spatially dependent factor that can account for radially dependent filter anisotropy. The factor $q1(r)$ can be determined experimentally by flat field measurements or calculated based of filter specifications. The constant ct represents an image of the background dark noise

WO 02/41760

PCT/US01/44764

measurement of the CCD camera. In addition, M_3 can be written as $M_3 = q_1(r) \times M_2' + ct$, where M_2' is theoretically calculated using a solution of the transport equation or an approximation of it such as the diffusion equation for a homogeneous medium with the average optical properties of the medium of investigation or for a heterogeneous medium obtained by using known information.

The imaging system can include more than 100 optic fibers to transmit light into the patient and/or from each collection point of the detection array, and the detector array can include at least 100 collection points.

In this imaging system, the two-dimensional emitted light array can transmit to the detector a two-dimensional pattern of multiple points of light corresponding to light emitted from the patient in three-dimensions, wherein the pattern varies over time at a rate corresponding to switching of illumination from one to another of the two or more excitation points. In addition, the two or more excitation points are illuminated by the light source one at a time. In certain embodiments the NIR light directed into the object can be at a wavelength of from 550 to 950, e.g., 670 or 750 to 850, nanometers, and the detector can be a charge-coupled device (CCD) camera or can include photomultiplier tubes.

The system can also include molecular probes, such as NIR fluorescent (NIRF) molecular probes, themselves. The probes can be activatable molecular probes.

The invention also features a method for displaying i) a fluorochrome distribution and/or lifetime as resolved by vector U and/or ii) an optical molecular map corresponding to a ratio of a concentration of a molecular probe comprising a fluorophore administered to a patient to a concentration of an activated fluorophore corresponding to a specific target in the patient by: i) providing a first data set of fluorophore concentration based on intrinsic absorption; ii) providing a second data set of activated fluorophore concentration based on fluorescence; iii) dividing the first data set by the second data set on a point-by-point basis to provide a third data set; and iv) processing the third data set to provide an optical molecular map corresponding to a ratio of a concentration of a molecular probe comprising a fluorophore to a concentration of an activated fluorophore corresponding to a specific target in the patient.

In another aspect, the invention features a method of obtaining a three-dimensional, quantitative, molecular tomographic image of a target region within a patient, by

WO 02/41760

PCT/US01/44764

administering a near-infrared fluorescent (NIRF) molecular probe to the patient, wherein the molecular probe selectively accumulates within a target region in the patient; directing near-infrared light from multiple points into the patient; detecting fluorescent light emitted from the patient; and processing the detected light to provide a three-dimensional image that corresponds to the three-dimensional target region within the patient and to the quantity of molecular probe accumulated in the target region.

In this method, the three-dimensional image can be visualized on a two-dimensional output device. The processing can include digitizing the fluorescent signal emitted from the patient, self-calibrating the digital signal by combining fluorescent and intrinsic signal measurements from the patient and background medium, and reconstructing a three-dimensional, quantitative image. In certain embodiments, the processing includes i) generating a corrected fluorescence measurement by subtracting a background signal and filter bleed-through signal from collected fluorescence measurements; ii) generating a corrected intrinsic signal measurement by subtracting a background ambient light signal from collected intrinsic signal measurements; iii) generating a self-calibrated fluorescence measurement by dividing the corrected fluorescence measurement by the corrected intrinsic measurement; iv) generating a corrected background-medium diffuse signal by subtracting the collected background ambient light signal from a collected diffuse signal; and v) generating a self-calibrated intrinsic measurement by dividing the corrected intrinsic signal measurement by the corrected background-medium diffuse signal.

The processing can also include other steps described herein. In these methods, the molecular probes can be administered systemically or locally by injecting a molecular probe, e.g., an activatable probe. The molecular probe can be locally injected into the target region or into a non-target region, for example, by intraperitoneal administration with systemic absorption and administration by an implanted slow-release compound or device such as a pump.

In certain embodiments of the new methods, the NIR light can be directed into the patient from separate points of light (e.g., 12, 24, 32, or more points) arranged in a fixed three-dimensional geometry, or with a multipoint incident illumination array comprising a belt having independent points of light (e.g., at least 12 or more points). In addition, the spatial localizations of the multipoint incident illumination array and the multipoint detector

WO 02/41760

PCT/US01/44764

array can be determined by image co-registration. In other embodiments, photon pulses are directed into the patient and the arrival of photons emitted from the patient is time-resolved using a separate array of photon detectors or time-gated intensified CCD camera (iCCD). Similar detection can be achieved using when using light of modulated intensity employing an iCCD camera and a demodulation arrangement directed onto the image intensifier in a manner similar to dynode demodulation techniques often applied to photo-multiplier tube demodulation.

The emitted fluorescent light in these methods can be continuous wave (CW) light, time-resolved (TR) light, intensity modulated light or any combination of the above. In addition, the methods can be performed dynamically as function of time, and the image can be co-registered with an image obtained by magnetic resonance or computed tomography imaging. The multipoint incident illumination array (or detector array) can include a fiducial, and wherein the fiducial is used to determine the spatial localization of the array on the object.

The invention also features a method of detecting a cellular abnormality in a patient by using molecular probes targeted to a particular cellular abnormality, e.g., associated with a disease such as cancer, a cardiovascular disease, AIDS, a neurodegenerative disease, an inflammatory disease, or an immunologic disease. The invention also features a method of assessing the effect of a compound on a specified molecular target by using a molecular probe that is activated by the molecular target, wherein the probe is contacted to the target, the target is imaged prior to and after contact with the molecular probe, and the corresponding images are compared, wherein a change in the molecular target indicates the compound is effective. For example, the specified molecular target can be a protease, and the compound can be a protease inhibitor.

A molecular probe is a probe that is targeted to a molecular structure, such as a cell-surface receptor or antigen, an enzyme within a cell, or a specific nucleic acid, e.g., DNA, to which the probe hybridizes. A fluorophore is an agent that fluoresces. A fluorochrome is an agent that fluoresces (e.g., a fluorophore) and has a color.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although suitable methods and materials for the practice or testing of the present

WO 02/41760

PCT/US01/44764

invention are described below, other methods and materials similar or equivalent to those described herein, which are well known in the art, can also be used. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

The new methods and systems provide various advantages. For example, the new methods and systems provide for the first time the ability to detect a fluorochrome distribution in the absence of pre-calibration or otherwise correcting measurements in addition to a combination of measurements obtained during imaging of the object of interest. Furthermore, the new methods and systems enable the ability to image fluorescence activation, e.g., by enzyme activation, in deep tissue and to provide localization and quantitation in three dimensions. In addition, the new methods provide non-invasive, molecular imaging to provide information at subcellular levels.

The impact of the new molecular imaging techniques is significant. First, the new methods and systems can provide insight into specific molecular abnormalities that form the basis of many diseases, e.g., up-regulated proteases, other enzymes, cell surface receptors, cyclins, cytokines or growth factors in cancer. Second, the new methods can be used to assess efficacy of novel targeted therapies at a molecular level, long before phenotypic changes occur. This, in turn, is expected to have an impact in drug development, drug testing, and choosing appropriate therapies and therapy changes in a given patient. Third, the new molecular imaging/quantitation methods and systems potentially enable one to study the genesis of diseases in the intact microenvironment of living systems. Fourth, the new methods of fluorescence-mediated molecular tomographic imaging are useful for testing novel drug delivery strategies. Fifth, the imaging methods allow one to gain three-dimensional information that is much faster to obtain than is currently possible with time consuming and labor intensive conventional, basic science techniques.

The new imaging systems and methods will have broad applications in a wide variety of novel biologic, immunologic, and molecular therapies designed to promote the control and eradication of numerous different diseases including cancer, cardiovascular, neurodegenerative, inflammatory, infectious, and other diseases. Furthermore, the described

WO 02/41760

PCT/US01/44764

detection systems and methods will have broad applications for seamless disease detection and treatment in combined settings.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

5

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIGs. 1A and 1B are examples of auto-quenched, activatable, near-infrared (NIR) fluorescent probes particularly suited for use in the new methods.

FIG. 2A is a schematic of a new three-dimensional, fluorescence tomography apparatus.

10

FIG. 2B is a schematic diagram of a positioning device used in conjunction with the apparatus of FIG. 2A to hold an animal in proper position for imaging.

FIG. 2C is a picture of an optical imaging chamber of the system of FIG. 2A. The imaging chamber positions the source and detector fibers.

15

FIGs. 2D and 2E are alternative embodiments of fiber-coupling systems that can be used in the new fluorescence tomography apparatus.

FIGs. 3A to 3F are a series of schematic diagrams of alternative embodiments of multipoint incident light arrays including circular arrays (as also shown in FIG. 2A), planar arrays, curved arrays, molded arrays, belt arrays, and catheter arrays. All of these embodiments can be used with the system shown in FIG. 2A.

20

FIG. 4A is a schematic of a time-resolved, three-dimensional fluorescence-mediated molecular tomography (FMT) system that can be used in conjunction with the system of FIG. 2A.

25

FIGs. 4B-4D are a series of photos of a positional insert used in the imaging chamber of the system of FIG. 2A (as shown in FIG. 4B), in a magnetic resonance imaging MRI coil (FIG. 4C), and holding a mouse in an MRI coil (FIG. 4D).

30

FIG. 5 is flow chart of the steps used to process analog fluorescent and intrinsic (absorption) signal data in three dimensions to provide (i) a vector U of concentrations of activated fluorescent probes within a given volume, (ii) a vector D of concentrations of non-activated and activated probes, and (iii) a vector AR which is the ratio of activated over total NIRF probe.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

FIGs 6A-6C are a series of images representing an absorption map (6A), a fluorescence map (6B), and a molecular map showing the absorption ratio (AR).

FIGs. 7A and 7B are schematic diagrams illustrating absorption imaging at high resolution. FIG. 7A shows the phantom setup, and FIG. 7B illustrates the reconstructed image.

FIGs. 8A and 8B are schematic diagrams of the experimental setup to image enzyme activity in three dimensions in a tissue-like medium using a circular multipoint incident light array in cross-section (8A) and in three dimensions (8B).

FIGs. 8C-8F are still images of a time-lapse video made of the enzyme activity observed in the experimental setup shown in FIG. 8A at 20 (8C), 50 (8D), 115 (8E), and 200 (8F) minutes, respectively.

FIGs. 9A-9C are a series of images from a live mouse imaged at a cross-section through the region of an implanted human tumor. FIG. 9A is a T2-weighted MR image. FIG. 9B is a NIR fluorescence-mediated molecular tomography (FMT) image of the tumor obtained 24 hours after intravenous injection of an activatable cathepsin B-reporting NIR imaging probe. FIG. 9C is a fused image that demonstrates the good co-registration of the tumor as seen on the T2-weighted MR image and on the NIRF-activated FMT image.

FIGs 10A and 10B are a pair of images, MR and FMT, respectively, from a live mouse imaged at a cross-section at the level of the heart.

FIGs. 11A and 11B are a pair of images, MR and FMT, respectively, from a live mouse imaged at a cross-section at the level of the kidney.

Like reference symbols in the various drawings indicate like elements.

DETAILED DESCRIPTION

This invention relates to extracting quantitative molecular information from living mammals and patients using fluorochromes, e.g., activatable fluorochromes, and a novel optical tomographic imaging method. This fluorescence-mediated molecular tomographic (FMT) imaging system is specifically designed to detect fluorescence, such as NIR fluorescence (NIRF), activation in deep tissues with high sensitivity, quantitatively and over time. High imaging accuracy and experimental simplicity are obtained because in one embodiment only measurements acquired during imaging of the tissue of interest are used to

WO 02/41760

PCT/US01/44764

reconstruct the absolute optical properties associated with the fluorochrome distribution, e.g., fluorochrome concentration and/or lifetime. The system can use activatable NIRF molecular probes that are quenched and do not fluoresce until activated, or highly sensitive targeted NIRF molecular probes. The activatable molecular fluorochrome probes add molecular
5 specificity and yield high fluorescence contrast, to allow early detection and molecular target assessment of cancers and other diseased tissue in vivo. The systems include various components for obtaining the image data and one or more processors that include new algorithms to process the data to provide high levels of information and resolution.

The FMT imaging methods and systems enable extraction of molecular information
10 from diseased tissue. Thus, the systems and methods can be used to detect many molecular aberrations, as they occur in cancer, cardiovascular disease, inflammation, immunological diseases, arthritis, cutaneous and ophthalmic diseases, and others.

After reviewing the suitable probes and the general methodology of optical imaging,
15 we will describe the new imaging systems and the processing required to obtain useful three-dimensional, quantitative information.

Activatable NIR Fluorescent Probes

A fundamental paradigm shift in injectable contrast agents has recently been introduced by synthesizing probes that become brightly fluorescent following conversion by
20 specific enzymes (Weissleder et al., Nat. Biotechnol., 17:375-378, 1999) or become fluorescent by DNA hybridization (Tyagi et al., Nat. Biotechnol., 14:303-308, 1996). In their native state the probes are quenched either by a small molecule quencher (e.g., DABCYL (a non-fluorescent chromophore that serves as a universal quencher for any fluorophore in a
25 molecular beacon: 4-(4-dimethylaminophenylazo)-benzoic acid) or QSY-7) or by multiple fluorochromes (e.g., through energy resonance transfer). FIGs. 1A and 1B show schematics of two probes designed to target a specific enzyme (1A) and a specific DNA sequence (1B). When the fluorochrome is released or spatially separated from its quencher, fluorescence can increase up to 1000 fold. Because the spatial rearrangement of the quenched fluorochromes occurs only after specific interactions, these probes can be used to extract molecular
30 information from living organism. These activatable probes have four major advantages over other methods when single fluorochromes are attached to affinity molecules: (1) a single

WO 02/41760

PCT/US01/44764

enzyme can cleave multiple fluorochromes, thus resulting in one form of signal amplification, (2) reduction of background "noise" by several orders of magnitude is possible, (3) very specific enzyme activities can potentially be interrogated, and (4) multiple probes can be arranged on delivery systems to simultaneously probe for a spectrum of enzymes.

A panel of highly specific enzyme-sensitive molecular probes have been synthesized that target matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), cathepsin B/H, cathepsin D, cathepsin K, PSA, and caspase-3), and which are capable of fluorescence activation at 600-900 nm. These probes are described in detail in Weissleder et al., U.S. Patent No. 6,083,486; Weissleder et al., Nat. Biotechnol., 17:375 (1999); Tung et al., Cancer Research, 60:4953-8, 2000; and Tung et al., Bioconj. Chem., 10:892-896, 1999). The activatable sensitive probes typically consist of three building blocks: (1) reporter fluorochromes, (2) target substrate, and (3) a delivery vehicle.

Reporter fluorochromes: Hundreds of optical probes have been developed for microscopy and photodynamic therapy. Of these, fluorescent probes (i.e., excitation at shorter wavelength and emission at longer wavelength) are ideally suited for studying biological phenomena, as has been done extensively in fluorescence microscopy. If fluorescent probes are to be used in living systems, the choice is generally limited to the near infrared spectrum (600-1000 nm) to maximize tissue penetration by minimizing absorption by physiologically abundant absorbers such as hemoglobin (< 550 nm) or water (> 1200 nm). Ideally the fluorochromes are designed to emit at 800 ± 50 nm. A variety of NIRF molecules have been described and/or are commercially available, including: Cy5.5 (Amersham, Arlington Heights, IL); NIR-1 (Dojindo, Kumamoto, Japan); IRD382 (LI-COR, Lincoln, NE); La Jolla Blue (Diatron, Miami, FL); ICG (Akorn, Lincolnshire, IL); and ICG derivatives (Serb Labs, Paris, France). NIRF probes for in vivo use ideally should have the following properties: (1) narrow emission bandwidths, (2) high fluorescence efficiency (quantum yield), (3) biocompatibility, and (4) spectrally separated absorption and excitation.

Target Substrates: The release and or availability of individual fluorochromes is determined by interaction of a target substrate with its target. A target substrate can, for example, be a peptide sequence that is cleaved by enzymes (see Table 1 below), a phosphate

WO 02/41760

PCT/US01/44764

group which is transferred by certain kinases, or a hybridizing DNA sequence recognizing a specific complementary DNA motif (see FIG. 1B).

Table 1: Examples of Peptide Substrates (dots indicate the cleavage site)

Protease target	Peptide sequence
Cathepsin D	GPIC(EQ)F•FRLG
Cathepsin B	GRR•G
Matrix metalloproteinase 2	GPLG•VRG
Caspase 3	DEVD•G
Prostate specific antigen	HSSKLQ•G

5

Delivery Vehicle: For a quenched probe to reach its intended target, it has to evade rapid clearance/elimination and overcome several structural barriers to delivery. These barriers include: (1) extravasation from vessels, (2) diffusion through tissue, and (3) cell membrane translocation in the case of intracellular enzymes (not required for secreted enzymes). These barriers to delivery are fairly well investigated, and delivery vehicles can be selected using standard techniques and information. Suitable vehicles to deliver fluorochromes and substrates to a target, e.g., a tumor, in the body can be selected from a group of polymers, including protected graft co-polymers (Marecos et al., Bioconj. Chem., 9:184-191, 1998) containing polyethylene glycol (PEG), polaxamers, and/or carbohydrates. Additional delivery vehicles include dendrimers, proteins, carbohydrates, lipid spheres (e.g., emulsions, liposomes, and lipid self-assemblies), nanoparticles, and other materials commonly used for parenteral drug delivery.

10

15

Specific probes based on the above design for use in the new methods can be prepared as described in detail in Weissleder et al., U.S. Patent No. 6,083,486; Weissleder et al., Nat. Biotechnol., 17:375-8, 1999; and Tung et al., Bioconj. Chem., 10:892-896, 1999.

20

One specific example of enzyme activatable probes for use in the new methods can be prepared as follows (see, Weissleder et al., U.S. Patent No. 6,083,486; Weissleder et al., Nat. Biotechnol., 17:375-8, 1999). A protected graft copolymer (PGC) consisting of a poly-L-lysine (PL) backbone and methoxy poly-e-ethylene glycol (MPEG) side chains is first synthesized (Bogdanov et al., J. Drug Targeting, 4:321-330, 1997). In one example, Cy5.5 (absorption = 675 nm, emission = 694 nm, Amersham, Arlington Heights, IL) can be directly

25

WO 02/41760

PCT/US01/44764

attached to the poly-lysine backbone, yielding an activatable probe that can be cleaved by cathepsin B/H and trypsin and has been used for the experiments described below. Briefly, an excess of monoactivated Cy5.5 was reacted with PGC at pH 8.0 to yield the probe. The final products were separated from free dye by size-exclusion chromatography. Trypsin and cathepsin B/H-like proteases are capable of cleaving such probes as occasional free lysine residues represent an enzyme substrate.

Alternatively, one can attach specific peptides conferring enzyme specificity directly to the PGC. For example, cathepsin D sensitive probes have been synthesized (Tung et al., Cancer Res., 60: 4953-8, 2000 and Tung et al., Bioconj. Chem., 10:892-896, 1999). Briefly, PGC was reacted with large excess of iodoacetyl anhydride to convert all amino groups on the polylysine backbone into iodol groups. The cathepsin D specific peptide, GIC(Et)FFKK(Fitc)C was attached to the iodinated PGC through a thiol specific reaction. Thereafter, Cy5.5 was attached to the N-terminus and the free lysine side chains of the cathepsin D substrate peptide. The advantage of this design is twofold: (1) a high loading capacity (due to the fact that all lysines can be modified), and (2) that the fluorochrome spacer is readily accessible to enzymes, thus resulting in improved release kinetics and signal recovery.

Other NIR Fluorescent Probes

The probes described above are specifically designed to become activated upon target interaction, e.g., target enzyme interaction. Alternative probes that can be used in the new detection methods include (1) probes that become deactivated (quenched) after target interaction, (2) probes that change their quantum yield upon target interaction, (3) probes that change their fluorescence lifetime after target interaction, (4) probes that change their fluorescence spectrum after target interaction, (5) wavelength shifting beacons (Tyagi et al., Nat. Biotechnol., 18:1191-1196, 2000), (6) multicolor fluorescence probes (Tyagi et al., Nat. Biotechnol., 16:49-53, 1998), (7) probes that have high binding affinity to targets, i.e., that remain within a target region while non-specific probes are cleared from the body. Examples of the latter probes include receptor-targeted NIR fluorochromes (Achilefu et al., Invest. Radiol., 35:479-485, 2000) or antibody-targeted NIR fluorochromes (Ballou et al., Biotechnol. Prog., 13:649-658, 1997), (8) non-specific agents with compartmental

WO 02/41760

PCT/US01/44764

distribution, (9) quantum dots, and/or (10) any fluorescent molecules with effects on fluorochromes. Another group of suitable fluorescent probes are long lifetime lanthanide metal-ligand probes that will allow the use of gated detection, and further increased sensitivity.

5

General Methodology

The new systems can use a charge-coupled device (CCD) camera and lens system to obtain "tomographic measurements" from the periphery of a multipoint incident light array, such as a cylinder with numerous, spaced, light emitters, for three-dimensional optical scans.

10 Improvements in NIR image quality are related to the number of sources and detectors used.

The advantage of CCD technology is that increasing the detector density does not require additions in the detection hardware, just additional optic fibers to create a bigger array.

Fluorescence-Mediated Molecular Tomography (FMT)

15 The tomographic methodology described herein is an improvement of the general category of tomography using diffracting sources (see, e.g., Kak and Slaney, "Principles of Computerized Tomographic Imaging," IEEE Press, New York, 1988, pp. 208-218). The technique uses measurements of light at multiple projections to obtain information of the optical contrast inside turbid media such as tissue. In brief, diffraction tomography segments
20 the volume under investigation into a number of discrete voxels, referred to as a "mesh." The analysis is divided into two steps. The first step is the "forward problem," in which a diffusion equation is used to describe the photon propagation into an assumed medium, e.g., tissue, and is used to predict the field detected from this medium. The second step is the "inverse problem," in which the optical properties of each voxel of the assumed medium are
25 updated to minimize the errors observed between the predicted and measured fields. There are several ways to calculate the forward problem (analytical and numerical solutions of the diffusion equation) and inverse problem (direct inversion, χ^2 - based fits, and algebraic reconstruction techniques). Here a numerical solution of the forward problem is used to generate the prediction vectors for the fluorescence and intrinsic signal measurements (See
30 also FIG. 5). Inversion is based on the relaxed algebraic reconstruction technique. Higher order solutions can be obtained if needed when a solution is fed back in the forward problem

WO 02/41760

PCT/US01/44764

to produce more accurate forward propagation models, and this process can be repeated iteratively.

The new FMT imaging systems use one or more laser sources to detect specific chromophores or fluorophores and the forward problem is calculated for the specific wavelength(s) used. Laser diodes can be used as light sources since they produce adequate power, are within FDA class I and class II limits, and are stable, wavelength-specific and economical. Light is directed to and from tissue using fiber guides, as this allows flexibility in the geometrical set-up. For optical coupling, the fibers have to be in contact with tissue. Alternatively, matching fluid is used to eliminate reflections due to air-silica-tissue index of refraction mismatch.

Three different light source-detection technologies exist. Any combination of them can be used for FMT applications as described herein. The simplest is continuous wave (CW) imaging. This technique uses light of constant intensity and measures either (1) the signal due to a distribution of excited fluorophores or (2) the attenuation of light (due to tissue absorption and scattering) employing multiple source-detector pairs. The technique is technically relatively simple and usually offers the best signal-to-noise (SNR) characteristics. However, it is not best suited for imaging of intrinsic tissue contrast since it usually introduces significant cross-talk between the calculations and imaging of absorption and scattering coefficients. On the other hand, if the background optical properties are known, the method is well-suited for imaging fluorophore concentration in the steady-state. To produce activation information, a combination of this technologically simple approach with a technology richer in information content can be used to obtain a both fluorescence and intrinsic contrast images. A specific design is described below, in which the light source is switched from one light emitter to another on a multipoint array in series, so that only one emitter is illuminated at a time.

A more elaborate approach is to use intensity modulated (IM) light at a single or at multiple frequencies. With this method, modulated light attenuation and phase shifts, relative to the incident light, can be measured for multiple source-detector pairs. Compared to a CW measurement, which yields intensity attenuation, the IM technique offers two pieces of information, i.e., intensity attenuation and phase shift per source-detector pair. Amplitude and phase are usually uncorrelated measurements and can more efficiently resolve the

WO 02/41760

PCT/US01/44764

absorption and scattering coefficient of intrinsic contrast. In the fluorescence mode, the technique can image two sets of information, fluorophore concentration and fluorescence lifetime.

5 The third approach, the time-resolved (TR) technique, uses short pulses of light injected into the tissue. The technique resolves the distribution of times that the detected photons travel into the medium for multiple source-detector pairs. Time-resolved methods contain the highest information content per source-detector pair, comparable only to the IM method performed simultaneously at multiple frequencies. This can be easily explained when one considers that the Fourier transform of the time-resolved data yields information at
10 multiple frequencies up to 1 GHz, including the continuous wave components ($f = 0$ MHz) used by the previous two methods. Therefore, the time-resolved method offers a CW component for direct comparison with the CW system, but also intensity attenuation and phase-shift measurements at multiple-frequencies (via the Fourier transform) that can image intrinsic absorption and scattering, and also fluorophore concentration and fluorescence
15 lifetime.

A cost-efficient embodiment of the invention is described in detail below (see FIGS. 2A-2C and FIG. 4). In this embodiment, the bulk information is collected using economical, massively parallel CW measurements (~1000 channels) and highly specific information of absorption and scattering parameters are collected with a smaller array of time-domain
20 source-detection channels (~50-100 channels). The time-domain information is used in three ways. The first is to independently quantify the average absorption and reduced scattering coefficient at the emission and excitation wavelength. The second is to implement time-domain measurements of intrinsic signal into the intrinsic reconstruction scheme by Fourier transforming the time-domain data, hence obtaining multiple-frequency readings. Since the tomographic problem is written in the frequency domain (with CW measurements having
25 zero frequency) the addition of extra, higher frequency measurements is straightforward (just adding additional lines in the weight matrix constructed for the appropriate frequency, for both real and imaginary decompositions). The third use of the time domain system is to implement time-domain measurements of fluorescent signal into the fluorescent
30 reconstruction scheme by Fourier transforming the time-domain data, and obtain information of the fluorescence lifetime of the NIRF probe. Due to the equivalency of signals detected

WO 02/41760

PCT/US01/44764

using pulsed light or intensity-modulated light at multiple frequencies via the Fourier transform, identical methods and systems can result when using intensity modulated light at multiple frequencies. A simplified approach is to use intensity modulated light at a few or a single frequency.

5

Fluorescence-Mediated Molecular Tomographic (FMT) Imaging Systems

The new imaging systems include an apparatus with various components used to generate digital signal data from analog fluorescence emitted from a patient or animal body, and a processor programmed with algorithms that can process the digital signal data into useful images that provide diagnostic and prognostic information. The systems can also obtain measurements of the incident light after it propagates through the tissue and obtain information on the intrinsic contrast of the body being imaged.

10

Apparatus

Diffraction tomography differs from simple projection imaging in that it requires tissue transillumination at multiple projections. Therefore, the construction of an appropriate light guiding apparatus is fundamental to obtain molecular tomographic images using NIR light. In one embodiment, the system features a multipoint incident illumination array and a multipoint detector array, both incorporated into a single cylinder, to be placed around the animal or patient body. One such apparatus is shown in FIG. 2A and FIG. 4. The two instruments can operate sequentially.

15

20

System 10 includes a continuous wave (CW) laser source 12. The laser 12 uses constant intensity light. Two wavelengths obtained from two different lasers can be used for imaging the intrinsic contrast before the administration of the NIRF probe. For imaging the fluorochrome Cy 5.5, one wavelength is set to 673 nm (excitation wavelength) and the other to 694 nm (emission wavelength). Imaging at both wavelengths is necessary so that accurate forward models are created for the excitation field from the source to the fluorophore and for the emission field from the fluorophore to the detector. The other combination of wavelengths will target the fluorochrome ICG at 750 nm (excitation) and 800 nm (emission). The two wavelengths are time-shared since the measurements are not very demanding in terms of time efficiency and are coupled through an optical attenuator 14 to a 1 x 32 optical

25

30

WO 02/41760

PCT/US01/44764

switch 16 (e.g., an optical switch from Dicon FiberOptics Irvine CA). The optical switch 16 directs light from laser 12 to any one of multiple (sixteen in this embodiment) source fibers 18. Alternatively, all fibers can be illuminated simultaneously, each at a different wavelength. The key is to be able to distinguish each point of illumination on the multipoint incident illumination array 20.

In this embodiment, the multipoint incident illumination array 20 is located within a resin cylinder 15 (also referred to herein as an "imaging chamber"), with several rings of multiple source fibers 18 connected around the cylinder. In essence, cylinder 15 has numerous holes drilled into it in a series of "rings" at different levels of the cylinder and perpendicular to the central axis. The holes can be equally spaced around the perimeter of the cylinder. The source fibers 18 pass through the holes in cylinder 15 and end flush with the inner wall. A multipoint detector array 21 is incorporated into the same cylinder 15, in the form of rings of detector fibers 22 interleaved (alternating) with the rings of the source fibers 18. Again, the cylinder has holes drilled for each detector fiber. This provides three-dimensional volume coverage within the cylinder. Detector fibers 22 form the detector array 21 of cylinder 15, and, like the source fibers, end flush with the inner wall of the cylinder. In this first implementation, three rings of twelve detection fibers each are interleaved with two rings of sixteen source fibers each, each ring at 3 mm from the next, thus covering a total cylinder height of 1.2 cm.

Cylinder 15 (including multipoint incident illumination array 20 and multipoint detector array 21) can be filled with a liquid optical contact medium (e.g., Intralipid® or an emulsion of TiO₂ particles and appropriate amounts of an absorbing fluorophore or fluorochrome that simulate the optical properties of the tissue examined), which serves as the "coupling" fluid of diffuse photons from the surface of the animal body to the detection fibers. The concentration of TiO₂ particles for the matching fluid and the resin cylinder will be such as to induce scattering properties comparable with the average reduced scattering coefficient of mice.

Fluorescent light collected by multipoint detector array 21 is fed through detector fibers 22 to a two-dimensional emitted fluorescent light array 24. The two-dimensional array 21 transmits the analog fluorescent light emitted from the body through a long-pass filter 25 (depending on the fluorochrome used) and to a CCD camera 26. The long-pass filter 25 will

WO 02/41760

PCT/US01/44764

be selected for the appropriate cut-off wavelength, similar as done for surface reflectance type on imaging systems (Mahmood, Radiology, 213:866-870, 1999). To image intrinsic contrast the filter is removed. The CCD camera 26 is mounted on a breadboard, and a lens 27, or a system of macro lenses, images the two-dimensional emitted fluorescent light array onto the CCD camera.

Optimum light attenuation will be set by the optical attenuator 14 so that measurements will not saturate the CCD camera. For a typical 16-bit CCD camera the useful dynamic range is approximately three to four orders of magnitude. This is also the dynamic range expected for measurements of diffuse light in small animals with body diameters of about 2-3 cm. The dynamic range expected for human patients may differ depending on the target organ. For example, for human breast imaging, at an approximate diameter of 8 cm, the dynamic range required is about 6-8 orders of magnitude. This dynamic range can be covered using CCD technology by rapidly acquiring multiple frames. With current CCD technology used at 10 frames per second, the dynamic range can be 6 orders of magnitude in one second of acquisition. For brain measurements, higher dynamic range may be achieved with longer acquisition times or more time-efficiency by using programmable attenuators that selectively attenuate the higher signals with a known level of attenuation.

Additionally a positional device 23 can be used for optimum placement of the animal in cylinder 15 as shown in FIG. 2B. The positional device in this embodiment is simply a cylinder that fits snugly within cylinder 15. Three positional devices 23 (cylindrical inserts) have been constructed. The first insert is constructed of Lexan® (polycarbonate) or Plexiglas®, and the second is constructed of white Delrin®, Polypropylene, or Kel-F®. Both of these inserts have an outer diameter that exactly fits the inner diameter of cylinder 20, 21, and are 1mm in thickness. The third insert is constructed out of Mylar® film and Kel-F® film to produce an insert with a wall thickness of 0.1 mm diameter. The advantages of this design are that the animal is stabilized during imaging and that positional accuracy with surface marks can be established for co-registration purposes.

A detailed view of cylinder 15 (the imaging chamber), including both the multipoint detector array 21 and the multipoint incident illumination array 20, is shown in FIG. 2C. The source fibers 18 and detector fibers 22 are arranged so that measurements are obtained along

WO 02/41760

PCT/US01/44764

the entire cylinder to allow for three-dimensional reconstructions. Source fibers 18 are interleaved between the detector fibers.

FIGs. 2D and 2E illustrate two alternative fiber-coupling systems. FIG. 2D shows the system used in FIG. 2A, in that a separate two-dimensional emitted fluorescent light array 24 is used to collect the signals of all detector fibers 22 in one plane, which is imaged by CCD camera 26 through filter 25. FIG. 2E shows a simpler embodiment in which the detector fibers 22 are directly connected to filter 25, i.e., filter 25 serves as the two-dimensional array 24.

Other embodiments of the multipoint incident illumination array are shown in FIGs 3A to 3F. FIG. 3A illustrates a top view of the cylindrical array described above. FIG. 3B shows a planar array used for reflectance and/or transmittance mode operation. In an alternative embodiment, the array is a portion of a cylinder, e.g., in the form of a curve with a set radius as shown in FIG. 3C. On the other hand, FIG. 3D shows a schematic of a molded array, in which the ends of the light source fibers are arranged on a rigid substrate that conforms to a specific shape of a body, or are arranged on a substrate of bendable, elastic material, such as a plastic, rubber, or cloth that can secure the light emitting optic fibers, and that can be molded to conform to a body shape. FIG. 3E illustrates a belt-like, uneven array, in which the ends of the source fibers are arranged in a flexible belt that can be fastened around a patient or the limb of a patient as required. The exact positions of the light emitting points within this array can be determined and corrected for by concomitant CT, US, or MR imaging. In an alternative embodiment, the ends of the light source fibers are provided in a catheter-like device as shown in FIG. 3F.

In each of these embodiments, the ends of the detector fibers 22 can be interleaved with the ends of the source fibers 18 as in the cylinder 15 shown in FIG. 2A. Alternatively, the detector array can be separate and distinct from the incident illumination array, as long as the ends of the detector fibers are spaced in a specified geometry with respect to the ends of the source fibers. For example, in the catheter-like array, the preferred mode of use is with a separate detector array that positions the ends of the detector fibers on the outside of the body while the incident light array is positioned inside the body, e.g., to image the prostate gland, lungs, vasculature, or gastrointestinal tract.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

The apparatus 10 of FIG. 2A is used with a processor 11, e.g., located in a PC, as described in further detail below. As shown in FIG. 4, such a processor 11 generally includes an input/control device 60, a memory 62, and an output device 64. The processor 11 can be an electronic circuit comprising one or more components. The processor can be
5 implemented in digital circuitry, analog circuitry, or both, it can be implemented in software, or may be an integrated state machine, or a hybrid thereof. Input/control device 60 can be a keyboard or other conventional device, and the output device 64 can be a cathode ray tube (CRT), other video display, printer, or other image display system. Memory 62 can be
10 electronic (e.g., solid state), magnetic, or optical. The memory can be stored on an optical disk (e.g., a CD), an electromagnetic hard or floppy disk, or a combination thereof.

A highly efficient photon collection apparatus of FIG. 2A can be built using the same or similar components as discussed above, but with the exception that dedicated detector
fibers 22 are directly coupled to the CCD (as shown in FIG. 2E), versus the lens system shown in FIGs. 2A and 2D. Overall, this system design should provide at least 300%
15 improved photon counting efficiency. Higher efficiency CCD chips will further improve photon detection.

To achieve a higher image-resolution design the apparatus of FIG 2A can accommodate more source-detector pairs (for example 64 x 100) either by a lens-imaging
system (FIGs. 2A and 2D) or by direct coupling (as shown in FIG. 2E). The latter system
20 could require a larger dimension chip CCD camera to accommodate the larger detector set.

In use, baseline measurements can be obtained from the tissue at the excitation wavelength and at the emission wavelength without using the filter. Fluorescence
measurements can be performed at the emission wavelength after inserting the appropriate
cut-off filter.

25 An add-on system that will significantly enhance the tomographic accuracy is shown in FIG. 4A. This is a time-resolved FMT imaging system 30. A 16 x 16 channel array is implemented together with CW measurements to yield superior reconstructions. The CW and TR system can be used independently but a benefit is achieved when the measurements
obtained from both systems are combined in the same reconstruction scheme.

30 In general, system 30 includes a pulsed laser source 32, a wavelength coupler 34 and a wavelength splitter 36. Two sets of two pulsed laser diodes (pulse width ~70 picosecond,

WO 02/41760

PCT/US01/44764

average power ~150 μ W) are employed at the same wavelengths as the proposed CW system of FIG. 2A. The wavelengths are used time-multiplexed with 10 nm delays; they are detected simultaneously by the 16-channel single photon counting time-resolved system 44 (e.g., a SPC-600® from Pico-Quant, Berlin, Germany). The time-resolved system can share the same source fibers 18' as the CW system 18 (by connecting both CW and TR light sources to the optical switch) or use separate, dedicated source fibers. The time-resolved (TR) detection fibers 22' will be interlaced with the CW detector fibers 22. The TR acquisition will be obtained at different times than the CW acquisition to avoid cross-talk between the CW and TR systems. The relatively small source-detector array 18', 22' of the TR system (which can also be incorporated into cylinder 15) is capable of producing useful diffuse images. However, the two main contributions of the TR data will be (1) their simultaneous implementation is the inversions of Eq. 1 to obtain multi-frequency information in addition with the CW data offering a stand-alone CW-TR tomographer, but also (2) their use with the concurrent magnetic resonance (MR) information to obtain measurements of fluorescence concentration and lifetime from the tumor lesions as identified on the MR images.

The pulsed laser source 32 produces laser light that is coupled by wavelength coupler 34 and then split by splitter 36. The splitter directs ~99% of the laser light along path 39a into the optical switch 16 and 1% of the light along path 39b into the detector module 40 via the corresponding attenuators 38a and 38b. The light traveling along path 39b from attenuator 38b provides a "reference signal" that is used to monitor the system's temporal drifts and signal stability. The 99% part of the laser light on path 39a that is directed to the optical switch 16 is switched in the same manner as in the CW system to selected sixteen (or more, if needed) CW source fibers 18. There is no need to use two different switches and source fibers. The same optical system used for the CW system can be used to also direct the photon pulses onto the tissue of investigation in the light chamber 15. Fibers 18 can be (but need not be) physically identical to fibers 18' and the only differentiation is made for ease of illustration to indicate their operation passing CW or TR signals. A 2-to-1 optical switch 16', e.g., provided within the Dicon switch 16, can select between the CW or TR source. However, an independent TR detector fiber array (sixteen fibers) is required to direct the collected photons at the time resolved detection system 44. Cylinder 15 is the same as in

WO 02/41760

PCT/US01/44764

FIG. 2A. Fluorescent or intrinsic light emitted from the body is passed to the TR system as in FIG. 2A and to detector module 40. Fibers 22 indicate the detector fibers of the CW system shown on FIG 2A.

Detector module 40 includes photomultiplier tubes (PMT) 41 that detect photons and convert single photons to electrical analog pulses. These analog pulses pass to router 42, which directs the pulses via path 43 to the SPC-600 board 44. Here the pulses are converted to digital values that indicate the time of arrival (TOA) of each coming pulse relative to the trigger pulse on path 52 coming from laser 32. Each collected pulse generates in router 42 a digital address, which uniquely marks the detection channel from which this photon was detected. This digital address is directed to the computer memory 62 via digital cable 45 and is used to store the TOA in the appropriate memory bin allocated for each individual channel. For the sixteen channels used in this embodiment, there are sixteen separate digital addresses corresponding to sixteen separate memory bins. Within system 44, constant fraction discriminator CFD 50 rejects pulses that have a very small amplitude and are probably due to photo-electronic noise, the Time-to-Amplitude Converter (TAC) converts the time of pulse arrival to an analog amplitude value, and the Multi-Channel Analyzer (MCA) converts this analog amplitude to a digital value at high speed. The output 47 of system 44 is a digital value stored in the computer memory bin that corresponds to the address carried on cable 45.

Time-resolved measurements can be used independently to obtain average background properties of the medium measured, an important input parameter for absorption, scattering, and fluorescence reconstructions. The combination of TR and CW measurements will produce more accurate forward problems for the intrinsic contrast and fluorescence reconstructions. Furthermore, the simultaneous use of CW and TR data will enhance the overall image quality and fidelity. Another alternative would be to use the time-resolved data to produce low-resolution images of background intrinsic contrast and use this information to create more accurate forward problems for the CW reconstructions for each animal.

The CW and especially the TR information (or the IM information by consequence of the Fourier transform) can further be combined with MR imaging data to produce accurate quantitative measures of fluorophore concentration and fluorescence lifetime measurements. Time-resolved or intensity-modulated methods would significantly open the spectrum to

WO 02/41760

PCT/US01/44764

differentiate the fluorescence decay of existing and novel fluorochromes distributed in tissue. The cyanine fluorochromes that are described above typically have decay times ranging from 1 to 20 ns. While this timescale is useful for many biophysical measurements, there are numerous instances where longer decay times are desirable. For instance, one may wish to measure rotational motions of large proteins or membrane-bound proteins. Processes on the microsecond or even the millisecond timescale have been measured using phosphorescence, which displays decay times ranging from 100 ns to 10 μ s. The long lifetimes of specific lanthanide metal-ligand probes will allow the use of gated detection, which could be employed to suppress interfering autofluorescence from biological samples and can thus provide further increased sensitivity.

One attractive feature is to combine molecular maps derived from FMT imaging with anatomical tomographic images, e.g., those derived from magnetic resonance (MR), X-ray computed tomography (CT), ultrasound (US) or even single photon emission tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET) imaging. In particular, the combination with MRI or CT is preferable given the high spatial resolution of these imaging techniques. DOT imaging (absorption only) has already been combined with MR imaging (Ntzachristos et al., P.N.A.S., USA, 97:2767-72, 1999) while one of the examples in this application teaches how to combine FMT imaging with MRI. This combination with MRI will enable: (1) the validation of FMT imaging in vivo by direct comparison of the MR and optically acquired images, (2) a direct comparison of cancer appearance and detection limits based on the anatomical images obtained by T2-weighted MR images, the Gd-enhancement pattern, and molecular activity as resolved with optical imaging, and (3) the implementation of MR structural and functional information as a priori information in the optical inversion scheme to obtain highly accurate measures of localized fluorophore concentration and lifetime. The combination of MRI and FMT also improves quantitation accuracy of fluorophore concentration and lifetime. Overall, molecular probing will improve the detection accuracy and introduce the ability of molecular target assessment.

To avoid interference with the magnetic field, non-magnetic fiber bundles can be used to transport excitation and emission light to and from exciter/detection systems to the patient. For human applications, available commercial or custom-built MRI coils available in any MR facility can be used. The MR coils can be coupled to one of the geometries

WO 02/41760

PCT/US01/44764

described in FIGs. 3A-3F depending on the application. To identify the exact position of the multi-point incident illumination array and detector arrays, coupled to the skin, MR or CT imaging itself can be used. Knowledge of the spatial location of source fiber ends and detector fiber ends on uneven surfaces improves optical reconstructions. The skin-coupled fibers as shown in, e.g., FIG. 3E, or internally placed fibers, e.g., endorectally using the array of FIG. 3F, can be detected by imaging if the arrays are constructed of materials that are uniquely detectable, e.g., materials that include microreference phantoms filled with magnetic/x-ray absorbing compounds, certain chemicals, or plastics. For example, to identify the position of the multipoint incident illumination array and detector array cylinder and the optical fibers on the MR images, small reference capillaries filled with water and CuSO_4 can be attached to the cylinder to appear as bright spots on the MR images.

FIGs. 4C and 4D are representations of a magnetic resonance (MR) coil 65 used for co-registration purposes. Coil 65 is specially built to accommodate the animal insert 23 shown in FIG. 2B. Two implementations are considered. In one embodiment, after FMT imaging is performed, insert 23 containing the animal is removed from the imaging chamber 15 and positioned within MR coil 65. One or more specially designed glass capillaries 66 (1 mm glass tubes filled with water and copper sulfate) are attached to insert 23 and enable the MR and FMT images to be co-registered. Such a fiducial marker is visible as a bright circular spot on the left side of the MR image in FIG. 8A (discussed below). FIG. 4D shows a mouse positioned within positioning insert 23, within MRI coil 65. The second embodiment has the coil built directly around imaging chamber 15 of FIG. 2A so that concurrent MR and FMT examinations can be performed.

Data Collection

Five sets of measurements M1-M5 for each of the TR and CW used are obtained as shown in the flowchart of FIG. 5. The M3 measurement can be theoretically constructed or derived by means of the M2 measurement and therefore its acquisition be eliminated. Although subsets of the collected data can be used depending on the requirements of the application, the highest accuracy is obtained when the M1, M2, M4 sets are utilized for fluorochrome reconstructions and the M1, M2, M4, M5 sets are used for deriving optical maps.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

As shown in FIG. 5, there are five sets of simple measurements (M1, 71; M2, 72; M3, 73; M4, 74; and M5, 75) to be obtained in initial step 70. In the first step 71, the fluorescence measurement M1, is obtained. This is a measurement where the source is scanned at multiple positions, and the detector acquires the light emitted from the tissue with the band-pass filter on, so that only the emission wavelength (fluorescence) is collected. In step 72, the second measurement, M2, is made as in step 71, but without the band-pass filter to acquire the intrinsic signal from the tissue at each wavelength. If the fluorescence signal is very small compared to the intrinsic signal no filter is required. However, if the fluorescence (M1) from the tissue of investigation is more than 1% of M2, then a cut-off filter is used to reject the fluorescence wavelength. In step 73, measurement M3 is made to acquire the amount of intrinsic light that passes through the fluorescence filter (high-pass filter) used in step 71. To achieve this measurement, the tissue to be investigated is removed from the cylinder, and a measurement is made from the matching fluid with the fluorescence filter (band-pass filter) on. This measurement is also used to acquire the contribution of ambient light and other photonic and electronic noise on a per source basis.

In another approach, the experimental measurement of M3 is circumvented and substituted by a constructed measurement $M3 = q1(r) \times M2 + ct$, where $q1$ is the filter attenuation of the intrinsic field and is a spatially dependent factor that could account for radially dependent filter anisotropy. The factor $q1(r)$ can be determined experimentally by flat field measurements or can be calculated based of filter specifications. Constant ct represents an image of the background dark noise measurement of the CCD camera. In addition, M3 can be written as $M3 = q1(r) \times M2' + ct$, where $M2'$ is theoretically calculated using a solution of the transport equation or an approximation of this equation such as the diffusion equation for a homogeneous medium with the average optical properties of the medium of investigation or for a heterogeneous medium obtained by using known information.

In step 74, measurement M4 is obtained with all sources turned off to acquire only the ambient (background) light and CCD noise. In step 75, measurement M5 is obtained without a filter and without tissue at the excitation and the emission wavelength using appropriate laser diodes. This measurement acquires the background signal.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

Practically, for CW measurements each of measurements M1, M2, M3, and M5 is a series of N_s images (where N_s is the number of sources used). M4 is a single image of background noise. For the TR or IM light sources, each of M1, M2, M3, and M5, is a set $N_s \times N_d$, where N_d is the number of detectors. For multispectral imaging the number of measurements acquired is multiplied by the corresponding number of wavelengths employed.

Composite Measurements (CM)

These simple measurements are combined to create self-calibrated (or composite) measurements of fluorescence M (step 80a) and intrinsic contrast M' (step 80b), i.e:

10

$$M = (M1 - M3)/(M2 - M4) \quad \text{Eq. 1}$$

And

$$M' = \log((M2 - M4)/(M5 - M4)) \quad \text{Eq. 2}$$

15

Although not explicit in the above equation, the measurements M1-M5 are functions of the frequency. Therefore, CW and TR data (after Fourier transformation) are handled in exactly the same way. The rationale for this construction is that these composite measurement vectors are independent of instrumental gain variation, such as differences in the attenuation between different source or detector fibers and inhomogeneities within the CCD chip. Furthermore, these vectors subtract from the actual measurements systematic errors such as background noise (M4) or high-pass filter imperfectness (M3). Although several ways would exist to calibrate the measurements, these particular constructions are directed after the theoretical predictions of fluorescent and intrinsic signals, which is a necessary step for quantitative reconstructions. This point is elucidated in the following paragraph.

25

Depending on the specific application, other alternatives can be used to construct self-calibrated composite measurements. For example in dynamic imaging, where the fluorophore concentration and activation is monitored as a function of time, measurement M5 could be substituted by measurement M2 at time 0, preferably before the NIRF probe has been administered to the animal. Therefore the fluorochrome absorption can be accurately monitored as a difference signal from intrinsic tissue absorption.

30

WO 02/41760

PCT/US01/44764

Construction of the Forward Problem

To perform tomographic measurements a theoretical prediction of our composite measurements (CM) (i.e., the measurement M and the measurement M') is required, which is referred to as the "forward predictor" (P) or the "weight matrix." The P and CM are combined to produce molecular tomographic measurements as described in the following section. Herein the specific theoretical constructions that adapt tomographic principles of diffraction tomography (Kak & Slaney 1988) are presented.

The P for fluorescence is constructed based on a modified Born prediction of the forward problem (Ntziachristos V, Weissleder R, Opt. Lett., 26(12): 893-895, 2001). Generally, the medium is assumed to contain a weakly absorbing distribution of fluorophores. The fluorophores are excited by this photon distribution and act as a secondary point source of fluorescent light. The fluorophores as two-level quantum systems and saturation effects are ignored because of the small concentration of NIRF probes that are administered. Then the standard Born expansion for fluorescence measurements can be written as:

$$\phi_f(\vec{r}_d, \vec{r}_s) = \int_V g_f(\vec{r} - \vec{r}_d) \frac{\sigma c N_f(\vec{r})}{1 - i\omega\tau} \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{Eq. 3}$$

where $\phi_f(\vec{r}_d, \vec{r}_s)$ is the detected fluorescence fluence at position \vec{r}_d for a source at position \vec{r}_s , $\phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s)$ is the established photon fluence in the homogeneous medium due to a source at position, and $g_f(\vec{r} - \vec{r}_d)$ is a function that describes the propagation of photons in the diffuse medium at the emission wavelength. $N_f(\vec{r}) = [F] \cdot \gamma$ is the unknown concentration of the fluorophore F multiplied by the fluorescent yield γ at a position \vec{r} , σ is the absorption cross-section of the fluorochrome, c is the speed of light in the diffuse medium, $\tau = 1/\Gamma$ is the fluorescent lifetime and ω is the modulation frequency of the source light intensity. For sources of constant intensity $\omega = 0$. Our construction of the forward predictor (P) in step 88, which predicts measurement M (step 80a) is:

WO 02/41760

PCT/US01/44764

$$M = \frac{M1 - M3}{M2 - M4} = \frac{1}{\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)} \int g_R(\vec{r} - \vec{r}_d) \frac{\sigma c N_f(\vec{r})}{1 - i\omega\tau} \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{Eq. 4}$$

This is a modified Born expansion that normalizes the standard Born expansion with the incident field $\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)$. Therefore, the gain of sources and detectors are canceled out for each source-detector pair independently.

For intrinsic contrast reconstructions, the forward predictor P' is determined (in step 88) using the Rytov expansion in the frequency domain, as described, e.g., in O'Leary et al., Opt. Lett. 20:426-428, 1995; and Ntziachristos et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 97:2767-72 2000. Then the measurement M' (step 80b) can be written as:

$$M' = \log \frac{M2 - M4}{M5 - M4} = \frac{1}{\phi_0(\vec{r}_d, \vec{r}_s)} \int g_0(\vec{r} - \vec{r}_d) o(\vec{r}) \phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s) d\vec{r} \quad \text{Eq. 5}$$

where $\phi_0(\vec{r}, \vec{r}_s)$ is the incident field from the source at position \vec{r}_s to position \vec{r} and $o(\vec{r})$ is the vector of the unknown absorption and diffusion coefficients changes relative to the assumed homogeneous background medium.

The functions g_R and ϕ_0 are calculated by simulating photon propagation at the emission (step 82) and excitation (step 84) wavelengths for the specific imaging chamber geometry and diffusion theory. This can be achieved either analytically or numerically. To perform these simulations, knowledge of the tissue average optical properties in the wavelengths of interest are required. The optical properties can be obtained by fitting all the intrinsic contrast TR measurements to the diffusion model for the appropriate geometry. Analytically, standard methods can be applied (adapted for the cylindrical geometry) as described in Li et al., Appl. Opt., 36:2260-2272 (1997). Here however, we propose to use a homemade finite-differences numerical algorithm that solves the diffusion approximation for a cylindrical geometry using a partial boundary condition (Arridge, Inverse Problems, 15:R41-R93, 1999), which accurately models even small source-detector separations. This must be used to obtain more accurate propagation models for the smaller scale problem. The only unknown in Eq. 4 and Eq. 5 are then the distribution of the fluorophore or the

WO 02/41760

PCT/US01/44764

absorption and diffusion coefficients respectively. The minimization of Eqs. 4 and 5 is described in the next section.

Data Inversion

5 Both fluorescence and intrinsic contrast reconstructions are based on the creation of a function that is subsequently minimized. In step 80a the composite measurement M is used to construct the function $F(U) = (M - P \times U)^2$ and in step 80b the composite measurement M' is used to construct a function $F(O) = (M' - P' \times O)^2$, where U is the vector of unknown non-quenched (activated) fluorochrome concentration and O is the vector of unknown absorption and diffusion distributions. The absorption distribution can be converted to fluorochrome concentration via the Beer-Lambert Law. The matrices P, P' are described in the previous section. In steps 92a and 92b, the functions F(U) and F(O) are minimized to obtain the distribution and magnitude of U and O, respectively. The minimization is obtained using algebraic reconstruction techniques although any other minimization method can be used to find the solution of the constructed functions.

15 Iteration is not necessary when only small amounts of fluorochrome are activated. This is the most typical case. However, if for certain applications large concentrations of activated fluorochrome are expected (namely the absorption perturbation yielding more than 10% variation in the intrinsic signal), then iterative steps are necessary. The first step of the iterative process 95 assumes a homogeneous background with the average optical properties of the medium of investigation. Subsequent steps use images U and O as background maps in the creation of matrices P, P'. When iteration is used, the creation of P, P' using numerical solutions of the diffusion equation is necessary. Iteration is also necessary when the background distribution of the fluorochrome is comparable to the contrast obtained from localized areas of high accumulation such as the tumor. Iteration is typically stopped when each iteration step does not significantly change the calculated result.

Molecular Maps

20 The new systems and methods enable the quantitative, three-dimensional calculation of molecular and molecular-activation maps. The resolved image U contains the concentration of fluorescing or activated fluorochrome, whereas the absorption image

WO 02/41760

PCT/US01/44764

contained in O is a quantitative representation of the total fluorochrome concentration (quenched and de-quenched). The ratio of activated over total fluorophore concentration is the activation ratio map (step 93):

5

$$AR = U/O$$

Eq. 6

which represents the amount of activation normalized by the amount of fluorochrome actually distributed in the volume of investigation. For volumes in which the absorption is zero the ratio AR is not defined. This is natural, since for zero fluorochrome distribution there should be no activation. Therefore, the ratio AR is by default applied only in the volume elements with non-zero absorption.

The generation of a molecular map (reporting the activity of the enzyme trypsin) is shown in FIGs. 6A-6C. A molecular map is a representation of an endogenous process or molecule. A molecular map (MM) is best described as $MM = k * AR$, where k is a constant; i.e., $MM = k * (U/O)$.

FIG. 6A is an image of an absorption map, showing the concentration of a molecular probe sensitive to degradation by trypsin. The bright spot in FIG. 6A is a representation of the total amount of the probe, both the quenched and the unquenched fractions. FIG. 6B is the corresponding fluorescence map, which measures only the fraction of de-quenched (i.e., enzyme activated) trypsin sensitive probe. FIG. 6C provides the AR image, or "molecular map," displaying the "fluorescence activation" as an image where the bright spot is directly proportional to the amount of added trypsin enzyme used in this experiment.

EXAMPLES

The invention is further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

Example 1 -- FMT Images of a Phantom

In one embodiment, phantom experiments were performed to verify the three-dimensional position and accuracy of measurements. The experimental set-up is illustrated in top view in FIG. 7A. Briefly, a phantom 100 containing 3 capillary tubes (1 mm internal

WO 02/41760

PCT/US01/44764

diameter) 103, was constructed using a triangular geometry and inserted into the optical chamber (15 in FIG. 2A) containing a turbid medium 102 (0.5% Intralipid® in water). The capillaries 103 were separated 8 and 11 mm from each other as shown in FIG. 7A, and were coated with a black fluorochrome to maximize absorption. The capillaries were imaged three dimensionally.

FIG. 7B depicts the reconstructed image 110 at a plane perpendicular to the longitudinal axis of the imaging chamber 15, at about the middle of the three-dimensional volume imaged. The high contrast allowed for high-resolution imaging of the three capillaries with high positional precision. The reconstruction mesh used was $0.8 \times 0.8 \times 2 \text{ mm}^3$. The reconstruction used 24 sources \times 36 detectors.

Example 2 – FMT Images of Trypsin Activity Over Time

In another experiment, quantitative, spatially localized information on fluorescence activation was obtained as a function of time. As shown in FIGs. 8A and 8B, a 3mm tube 123 was immersed in a tissue-like fluid (Intralipid®) to form phantom 102. The tube contained $1.5 \mu\text{M}$ of a Cy5.5 probe, which was activated by the addition of the enzyme trypsin into the tube at time 0. Only a single plane was imaged in this experiment by sequentially illuminating each of twelve light emitting points in the direction of curved arrow 125. FIG. 8B illustrates the phantom in a three-quarter view.

FIGs. 8C to 8F illustrate a series of axially reconstructed frames obtained at different time points. The frames show the probe activation as a function of time. For example, as shown in FIG. 8C, at 20 minutes after trypsin was added to the capillary, only ~20% of the probe had been activated. However, as shown in FIG. 8F, at 200 minutes after the enzyme was added, ~75% of the probe had been activated. Each frame was acquired by sequentially directing light in each one of twelve source fibers located on the same plane along the cylinder. For each source, the CCD acquired light from the detector fibers for 5 seconds. The total acquisition time per frame was therefore 1 minute (12 sources \times 5 seconds each).

Example 3 – Multiple Co-Registered Images of Cathepsin B Activity in a Mouse

In another experiment, combined MR/FMT imaging was used to obtain maps of cathepsin B protease activity in human tumors implanted in nude mice (FIGs. 9A-(C)). The

WO 02/41760

PCT/US01/44764

tumors were cathepsin B rich HT1080 fibrosarcoma, which had been implanted into the mammary fat pad 7-10 days prior to the experiment. The animals received an IV injection of a cathepsin B sensitive imaging probe (Weissleder et al., Nat. Biotechnol., 17:375-378, 1999) at 24 hours prior to the imaging experiments. The animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of 90 mg/kg ketamine and 9 mg/kg xylazine and were placed into the insert 23 shown in FIG. 2B. The insert and animal were placed into the imaging chamber 15 and measurements M1, M2, M3, and M4 were obtained.

Subsequently, the mouse within the insert was removed from the imaging chamber. Fiducials (as described herein) with water were attached to predetermined positions on the periphery of the insert. The insert was subsequently placed in the MR coil and a set of axial T2-weighted images were obtained. The role of the fiducials was to identify on the MR images the position of selected source and detector fibers for later co-registration of the images. The fiducial (a glass capillary tube arranged longitudinally along the outside cylinder wall) shown on the slices of FIGs. 9A, 10A, and 11A as a bright spot on the left side of the image, for example, indicates the position of detectors 1, 13, and 25 on the corresponding slices.

The results show an MR image (FIG. 9A), a cathepsin B molecular map (FMT)(FIG. 9B), and one of the MR slices fused with the FMT image to produce a combined MR/molecular map (FIG. 9C). There is excellent congruence of optical and MR contrast from the images obtained at the tumor level. The tumor demonstrates strong molecular activity of cathepsin B (fluorescence activation), corroborated by immunohistochemistry and Western blotting. The co-registration of the fluorescent activation and T2 image are shown on the fused image in FIG. 9C. The remaining two rows of images are slices that show cathepsin B absence and/or presence in other tissues. Specifically, FIGs. 10A and 10B show an MR image and FMT image at heart level, respectively. As expected, there is no cathepsin B activity in the lung and heart, and thus nothing lights up on the FMT image in FIG. 10B. FIGs. 11A and B show an MR image and FMT image at kidney level, respectively. The fluorochrome appearing in the kidney is likely excreted excess, and does not reflect cathepsin activity.

This is an example where a subset of the full measurement array is used (only M1 through M4 CW measurements, no M5 and no TR data) to produce an enzymatic activity

WO 02/41760

PCT/US01/44764

image that conveys useful information for the clinical examples describes in the following examples. Moreover, this series of images in FIGs. 9A to 11B confirms that the new methods and systems can be used to generate multi-slice images of living animals.

5 Example 4 – Molecular Maps

To demonstrate the use of producing molecular maps we have used the set-up of Example 3, but acquired the full array of M1 through M5 measurements in CW mode. The optical properties of Intralipid® were independently measured with a time-resolved system. Then a fluorescence map (FIG. 6B) collected 50 minutes after trypsin activation and an
10 absorption map (FIG. 6A) were constructed according to the algorithm described in the flowchart in FIG. 5. The molecular map (AR image) calculated according to step 93 is shown in FIG. 6C and demonstrates 40% activation of the enzyme sensitive probe 50 minutes after activation.

15 Example 5 – Enzyme-Specific Probes

We have synthesized a number of different sensitive enzyme-specific imaging probes useful for FMT imaging. The probes are specific for cathepsin D, cathepsin K, the enzymatically active form of prostate specific antigen (PSA), and matrix metalloprotease-2, among other enzymes. The specificity of these probes was shown by incubation with
20 purified or recombinant human enzymes and by measurement of fluorescence activation in a fluorometer. The NIR fluorophore Cy5.5 was used as a quenched reporter in all of these probes. Any of these probes can be used in animals and human patients as described herein to measure enzyme activity within deep tissues (both normal and diseased tissues). For example, MMP-2 activity can be measured in tumors before and after treatment with an
25 MMP-2 inhibitor (e.g., Prinomastat®, Agouron Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA). Such measurements of molecular target assessment are useful for rapid drug efficacy screening in vivo in animal models. Moreover, such screening methods can be used to assess the efficacy of a particular therapy in a specific patient.

30

WO 02/41760

PCT/US01/44764

Example 6 - Clinical Use

The new FMT methods are expected to have broad clinical implications. One use is for early detection of disease at a stage when molecular abnormalities are present, but have not yet led to phenotypic abnormalities (e.g., mutations in cancers which have not yet produced a tumor mass). Another use is for molecular target assessment in diseased tissues (1) to determine if a given target is present in a patient (e.g., level of expression of a protease), (2) to determine whether an experimental drug has an effect on its intended molecular target in vivo, (3) to individualize and tailor treatments for a given patient, and (4) to optimize the dose of a given molecular drug for a given patient. In this sense, the new FMT imaging methods are an adjunct to testing drug efficacy. Such measurements would also be of value in a clinical setting to determine the effects of enzyme inhibitor drugs, receptor blockers, and other molecular drugs. The methods could be used to monitor a wide variety of disease including cancer, cardiovascular disease, AIDS, infection, immunologic diseases, inflammation, dermatological and ophthalmic diseases, neurodegenerative disease and others.

Example 7 - Multiple Probes

The new FMT methods can be performed with the concomitant use of multiple molecular probes (each with their own, specific excitation and emission wavelengths) to report multiple molecular abnormalities during the same FMT imaging acquisition. The described system can be adapted by adding one or more new laser sources to excite the additional fluorescent molecular probes. Imaging signals are collected through appropriate filter systems, making sure that there is not spectral overlap among the different channels. Image reconstruction, algorithms, and displays are similar to those for single wavelength imaging described herein.

Example 8 - Frequency Domain Technology

The TR system described herein can be modified by using one or more frequency domain sources, preferably at multiple frequencies. The theoretical formulation is written in the frequency domain so that the use of frequency technology is directly applied to the existing algorithms. The rationale behind using frequency domain technology is similar to

WO 02/41760

PCT/US01/44764

TR technology in that it yields multi-frequency information that can differentiate absorption and scattering in intrinsic contrast mode and fluorophore concentration and life-time in fluorescence mode. If frequency technology is used, the instrument in FIG. 4A is substituted by sources modulated at one or several frequencies and detection channels that are responsible for signal demodulation, such as lock-in amplifiers or preferably quadrature demodulators, similar to the ones used for the detection of MR signals.

Example 9 - Differential Dynamic Imaging (DDI)

The implementation of the composite measurements described above can be applied in several ways to obtain fluorescent and intrinsic contrast, and to construct the AR images. For example, whereas a general scheme of an animal injected with a NIRF molecular probe is considered in Eqs. 4 and 5, one can obtain measurements from an animal before injection of the NIRF probe and then obtain differential measurements of absorption and fluorescent contrast after NIRF probe injection. This technique has important applications in monitoring the kinetics of uptake and activation (as also demonstrated in Example 2). This approach also yields the most accurate results since differential measurements allow for the reconstruction of the fluorochrome/chromophore absorption independently of background absorption (since only the absorption change can be reconstructed). Therefore, more accurate AR maps can be produced as a function of time.

Example 10 - Imaging at Multiple Wavelengths

An alternative implementation of composite measurements than the one used in Example 9 is to employ four or more wavelengths for each measurement set. For N tissue chromophores, N or more of these wavelengths are selected at a spectral region where the NIRF probe does not absorb. Therefore, true "intrinsic" contrast is obtained, i.e., contrast that is due only to the natural tissue chromophore concentrations. Using the spectral information of these chromophores, one can calculate their absorption at the emission and excitation wavelengths of the NIRF probe. The other two wavelengths are used to construct absorption images at the excitation and emission wavelengths. Those latter images reconstruct absorption due to both the natural tissue chromophore concentration and the fluorochrome distribution. By subtracting the images obtained at the excitation or emission

WO 02/41760

PCT/US01/44764

wavelength from the absorption images calculated only for the tissue natural chromophores, one can obtain the true fluorochrome/chromophore concentration.

Example 11 - Clinical FMT System

5 The new systems and methods described herein are easily applied to a clinical setting. For example breast cancer detection can be achieved with a circular/cylindrical multipoint incident illumination array or with a compression/planar array. Brain measurements can be made with an elastic band of optical fibers attached to the skull or a planar/reflectance geometry could be applied. See FIGs. 3A-F for various arrays. The described FMT imaging
10 methods can be conducted sequentially or simultaneously with MR or CT measurements, because the optical technology is compatible with other radiological modalities.

 In a clinical setting, CW measurements would be useful for the economical collection of large numbers of measurements. However, even a limited number of more advanced technologies (e.g., IM or TR as described above) can significantly improve the information
15 content of the CW measurements. However, it is envisaged that a clinical system can be built entirely based on CW technology. As frequency-domain or time-domain technologies become cheaper, the whole system can be based only on frequency-domain or time-domain technologies.

20 OTHER EMBODIMENTS

 A subcategory of the general reconstruction scheme of molecular activation described is the use of simple transillumination of tissue for the detection of molecular events. This is a relaxation of the tomographic imaging to simple projection imaging, similar, but not same as the one described previously for reflectance imaging (Weissleder et al., U.S. Patent No.
25 6,083,486). Transillumination allows for measurements of absorbers of fluorochromes through the whole tissue, therefore it achieves penetration of several centimeters, in contrast to reflectance imaging, which can penetrate only for a few centimeters at the most. Transillumination of molecular events cannot resolve or quantify molecular activity in three dimensions, but can still be used to qualitatively monitor relative changes of molecular
30 activation.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

In another embodiment, the new systems and methods can be used to image endogenous fluorescence in an animal. For example, a gene encoding a fluorescent protein, such as green fluorescent protein or fluorescein, can be included adjacent to a gene of interest that is to be expressed in an animal or human patient using standard gene therapy techniques.

5 The expression of the gene of interest can be determined indirectly by imaging the fluorescent protein. If this protein is expressed, then the gene of interest has also been expressed.

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not
10 limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A fluorescence-mediated molecular tomography (FMT) imaging system comprising
 - a light source to provide incident light;
 - a multipoint incident illumination array to direct light into an object from two or more separate excitation points;
 - multiple optic fibers to transmit light from the light source to each point in the multipoint incident illumination array;
 - a multipoint detection array to collect light emitted from the object from two or more separate collection points;
 - a two-dimensional emitted light array to transmit light emitted from the object to a detector;
 - multiple optic fibers to transmit light from each collection point to a corresponding point on the two-dimensional emitted light array; and
 - a detector to detect and convert light emitted from each point of the two-dimensional emitted light array into a digital signal corresponding to the light emitted from the object.
2. The system of claim 1, wherein the light source is a near-infrared (NIR) light source.
3. The system of claim 1, wherein the object is a human patient and the multipoint detection array is configured to fit onto a portion of the patient
4. The system of claim 1, wherein emitted light is fluorescent light.
5. The system of claim 1, wherein the emitted light is continuous wave (CW) light, time-resolved (TR) light, intensity modulated (IM) light, or any combination thereof.
6. The system of claim 1, further comprising a processor that processes the digital signal produced by the detector to provide an image on an output device.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

7. The system of claim 6, wherein the output device provides multiple images simultaneously.

8. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

- i) generating a corrected fluorescence measurement by subtracting a background signal and filter bleed-through signal from collected fluorescence measurements;
- ii) generating a corrected intrinsic diffuse signal by subtracting the collected background ambient light signal from a collected intrinsic signal; and
- iii) generating a self-calibrated fluorescence measurement by dividing the corrected fluorescence measurement by the corrected intrinsic diffuse signal.

9. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

- i) generating a corrected fluorescence measurement by subtracting a background signal and filter bleed-through signal from collected fluorescence measurements;
- ii) generating a corrected intrinsic signal measurement by subtracting a collected background ambient light signal from collected intrinsic signal measurements;
- iii) generating a self-calibrated fluorescence measurement by dividing the corrected fluorescence measurement by the corrected intrinsic measurement;
- iv) generating a corrected background-medium diffuse signal by subtracting the collected background ambient light signal from a collected diffuse signal; and
- v) generating a self-calibrated intrinsic measurement by dividing the corrected intrinsic signal measurement by the corrected background-medium diffuse signal.

10. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

- i) generating a self-calibrated measurement $M = M1 - M3 / M2 - M4$, wherein M1 is an emission wavelength fluorescence signal, M2 is an intrinsic signal, M3 is a background bleed-through signal, and M4 is a background ambient light signal.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

11. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

i) generating a self-calibrated measurement $M = (M1 - (q1(r) \times M2 - ct)) / (M2 - M4)$, wherein M1 is an emission wavelength fluorescence signal, M2 is an intrinsic signal, M4 is a background ambient light signal, q1 is a filter attenuation of an intrinsic field, and ct is a constant that represents an image of background dark noise measurement.

12. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

i) generating a self-calibrated measurement $M = M1 - M3 / M2 - M4$, wherein M1 is an emission wavelength fluorescence signal, M2 is an intrinsic signal, M3 is a background bleed-through signal, and M4 is a background ambient light signal; and

ii) minimizing a function $F(U)$ of $(M - P \times U)$ to obtain a distribution and magnitude of U, wherein U is a vector of unknown concentration of a target in the object being imaged and P is a forward predictor of M calculated by solving a diffusion equation for an appropriate geometry and background medium in fluorescence mode.

13. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

i) generating a self-calibrated intrinsic measurement $M' = \log (M2 - M4) / (M5 - M4)$, wherein M2 is an intrinsic signal, M4 is a background ambient light signal, and M5 is a background-medium diffuse signal;

ii) minimizing a function $F'(O)$ of $(M' - P' \times O)$ to obtain a distribution and magnitude of O; wherein O is a vector of unknown concentration of a fluorophore in the object, and P' is a forward predictor of M' calculated by solving a diffusion equation for the appropriate geometry and background medium in absorption/scattering mode;

iii) calculating an activation ratio $AR = U/O$; and

iv) generating an image corresponding to AR.

14. The system of claim 6, wherein the processor is programmed to process the digital signal by

WO 02/41760

PCT/US01/44764

- i) generating a self-calibrated measurement $M = M1 - M3 / M2 - M4$, wherein M1 is an emission wavelength fluorescence signal, M2 is an intrinsic signal, M3 is a background bleed-through signal, and M4 is a background ambient light signal;
- ii) generating a self-calibrated intrinsic measurement $M' = \log (M2 - M4) / (M5 - M4)$, wherein M5 is a background-medium diffuse signal;
- iii) minimizing a function $F(U) = (M - P \times U)^2$ to obtain a distribution and magnitude of U, wherein U is a vector of unknown concentration of a target in the object being imaged and P is a forward predictor of M calculated by solving a diffusion equation for an appropriate geometry and background medium in fluorescence mode;
- iv) minimizing a function $F(O) = (M' - P' \times O)^2$ to obtain a distribution and magnitude of O; wherein O is a vector of unknown concentration of a fluorophore in the object, and P' is a forward predictor of M' calculated by solving a diffusion equation for the appropriate geometry and background medium in absorption/scattering mode;
- v) calculating an activation ratio $AR = U/O$; and
- vi) generating an image corresponding to AR.

15. The system of claim 1, wherein the multipoint incident illumination array is a cylinder that comprises at least 12 points of light.

16. The system of claim 15, wherein the cylinder further comprises the multipoint detection array.

17. The imaging system of claim 1, wherein the multipoint incident illumination array is a belt that comprises at least 12 points of light.

18. The imaging system of claim 17, wherein the belt further comprises the multipoint detection array.

19. The imaging system of claim 1, wherein the multiple optic fibers to transmit light from each collection point of the detection array comprise more than 100 separate fibers, and wherein the detector array comprises at least 100 collection points.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

20. The imaging system of claim 1, wherein the multipoint incident illumination array comprises a flat plate.

21. The imaging system of claim 1, wherein the multipoint incident illumination array comprises two flat plates spaced apart and arranged in parallel.

22. The imaging system of claim 1, wherein the two-dimensional emitted light array transmits to the detector a two-dimensional pattern of multiple points of light corresponding to light emitted from the patient in three-dimensions, wherein the pattern varies over time at a rate corresponding to switching of illumination from one to another of the two or more excitation points.

23. The imaging system of claim 1, wherein the two or more excitation points are illuminated by the light source one at a time.

24. The imaging system of claim 1, wherein the light directed into the object has a wavelength of from 550 to 950 nanometers.

25. The imaging system of claim 1, wherein the detector comprises a charge-coupled device (CCD) camera.

26. The imaging system of claim 1, wherein the detector comprises a photomultiplier tube.

27. The system of claim 1, further comprising NIR fluorescent (NIRF) molecular probes, activatable fluorescent probes, targeted fluorescent probes, or non-specific fluorescent probes.

28. The system of claim 27, wherein the NIRF probes are activatable molecular probes.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

29. A method for displaying an optical molecular map corresponding to a ratio of (1) a concentration of a molecular probe comprising a fluorophore administered to a patient, and (2) a concentration of an activated fluorophore corresponding to a specific target in the patient, the method comprising:

- i) providing a first data set of fluorophore concentration based on intrinsic absorption;
- ii) providing a second data set of activated fluorophore concentration based on calibrated fluorescence;
- iii) dividing the first data set by the second data set on a point-by-point basis to provide a third data set; and
- iv) processing the third data set to provide an optical molecular map corresponding to a ratio of (1) a concentration of a molecular probe comprising a fluorophore, and (2) a concentration of an activated fluorophore corresponding to a specific target in the patient.

30. A method of obtaining a three-dimensional, quantitative, molecular tomographic image of a target region within a patient, the method comprising

- administering a fluorescent molecular probe to the patient, wherein the molecular probe selectively accumulates within a target region in the patient;
- directing light from multiple points into the patient;
- detecting fluorescent light emitted from the patient; and
- processing the detected light to provide a three-dimensional image that corresponds to the three-dimensional target region within the patient and to the quantity of molecular probe accumulated in the target region.

31. The method of claim 30, wherein the light is near-infrared (NIR) light, and the probe is a NIR fluorescent (NIRF) molecular probe.

32. The method of claim 30, wherein the three-dimensional image is visualized on a two-dimensional output device.

33. The method of claim 30, wherein the processing comprises digitizing the fluorescent signal emitted from the patient, self-calibrating the digital signal by combining

WO 02/41760

PCT/US01/44764

fluorescent and intrinsic signal measurements from the patient and background medium, and reconstructing a three-dimensional, quantitative image.

34. The method of claim 30, wherein the processing comprises

- i) generating a corrected fluorescence measurement by subtracting a background signal and filter bleed-through signal from collected fluorescence measurements;
- ii) generating a corrected intrinsic signal measurement by subtracting a background ambient light signal from collected intrinsic signal measurements;
- iii) generating a self-calibrated fluorescence measurement by dividing the corrected fluorescence measurement by the corrected intrinsic measurement;
- iv) generating a corrected background-medium diffuse signal by subtracting the collected background ambient light signal from a collected diffuse signal; and
- v) generating a self-calibrated intrinsic measurement by dividing the corrected intrinsic signal measurement by the corrected background-medium diffuse signal.

35. The method of claim 30, wherein the processing comprises

- i) generating a self-calibrated measurement $M = M1 - M3 / M2 - M4$, wherein M1 is an emission wavelength fluorescence signal, M2 is an intrinsic signal, M3 is a background bleed-through signal, M4 is a background ambient light signal;
- ii) generating a self-calibrated measurement $M' = \log (M2 - M4) / (M5 - M4)$, wherein M5 is a background-medium diffuse signal;
- iii) minimizing a function $F(U)$ of $(M - P \times U)$ to obtain a distribution and magnitude of U, wherein U is a vector of unknown concentration of a target in the object being imaged and P is a forward predictor of M calculated by solving a diffusion equation for an appropriate geometry and background medium in fluorescence mode;
- iv) minimizing a function $F'(O)$ of $(M' - P' \times O)$ to obtain a distribution and magnitude of O; wherein O is a vector of unknown concentration of a fluorophore in the object, and P' is a forward predictor of M' calculated by solving a diffusion equation for the appropriate geometry and background medium in absorption/scattering mode;
- v) calculating an activation ratio $AR = U/O$; and
- vi) generating an image corresponding to AR.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

36. The method of claim 30, wherein administering the molecular probe comprises systemically injecting an activatable molecular probe.

37. The method of claim 30, wherein administering the molecular probe comprises locally injecting an activatable molecular probe into the target region.

38. The method of claim 30, wherein administering the molecular probe comprises locally injecting an activatable molecular probe into a non-target region.

39. The method of claim 30, wherein the light directed into the patient is at a wavelength of from 550 to 950 nanometers.

40. The method of claim 30, wherein the light is directed into the patient from at least 32 separate points of light arranged in a fixed three-dimensional geometry.

41. The method of claim 30, wherein the light is directed into the patient with a multipoint incident illumination array comprising a belt having at least 12 points of light.

42. The method of claim 41, wherein the belt further comprises a multipoint detector array.

43. The method of claim 42, wherein the spatial localizations of the multipoint incident illumination array and the multipoint detector array are determined by image co-registration.

44. The method of claim 30, wherein fluorescent light emitted from the patient is detected by a charge-coupled device (CCD) camera from a two-dimensional emitted fluorescent light array.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

45. The method of claim 44, wherein photon pulses are directed into the patient and the arrival of photons emitted from the patient is time-resolved using a separate array of photon detectors.

46. The method of claim 30, wherein the emitted light is continuous wave (CW) light, time-resolved (TR) light, intensity-modulated (IM) light, or any combination thereof.

47. The method of claim 30, wherein the fluorescent light emitted from the patient is collected with a three-dimensional multipoint detection array, displayed on a two-dimensional emitted light array, and imaged with a detector.

48. The method of claim 30, wherein the method is performed dynamically as a function of time.

49. The method of claim 35, wherein the measurement M5 is substituted by a measurement M2 at time 0.

50. The method of claim 30, wherein the image is co-registered with an image obtained by magnetic resonance or computed tomography imaging.

51. The system of claim 1, wherein the multipoint incident illumination array comprises a fiducial, and wherein the fiducial is used to determine the spatial localization of the array on the object.

52. The method of claim 30, wherein the multipoint detection array comprises a fiducial, and wherein the fiducial is used to determine the spatial localization of the array on the object.

53. A method of detecting a cellular abnormality in a patient, the method comprising use of the method of claim 30 with a molecular probe targeted to a particular cellular abnormality.

WO 02/41760

PCT/US01/44764

54. The method of claim 53, wherein the method is used for early detection of disease.

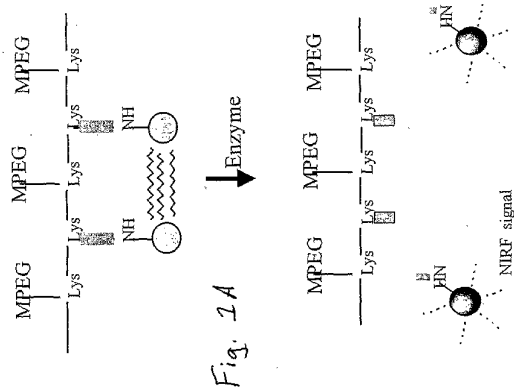
55. The method of claim 54, wherein the disease is cancer, a cardiovascular disease, AIDS, a neurodegenerative disease, an inflammatory disease, or an immunologic disease.

56. A method of assessing the effect of a compound on a specified molecular target, the method comprising the use of the method of claim 30 with a molecular probe that is activated by the molecular target, wherein the probe is contacted to the target, the target is imaged prior to and after contact with the compound, and the corresponding images are compared, wherein a change in the molecular target indicates the compound is effective.

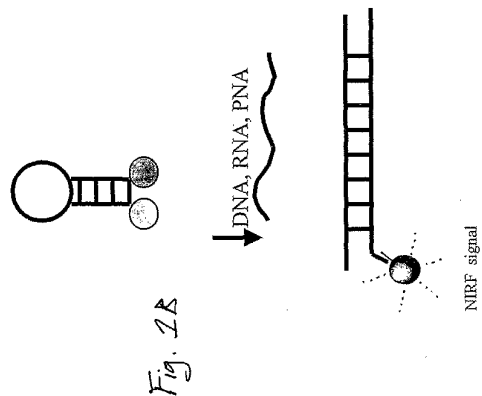
57. The method of claim 56, wherein the specified molecular target is a protease, and the compound is a protease inhibitor.

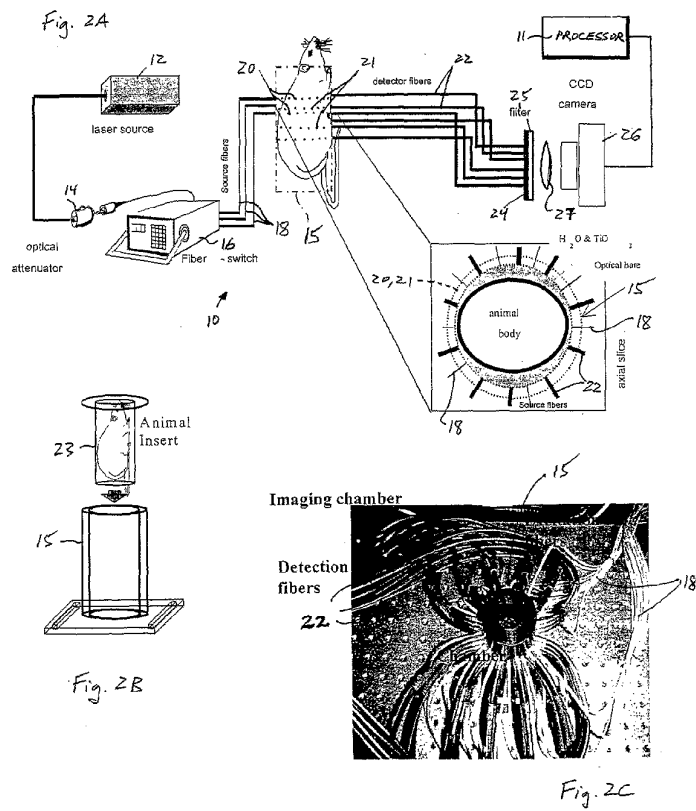
Molecular NIRF imaging probes for use in new methods

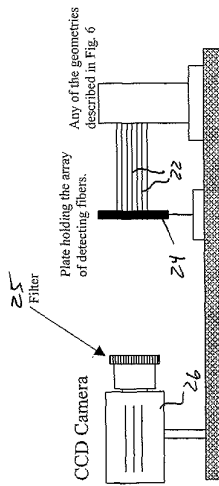
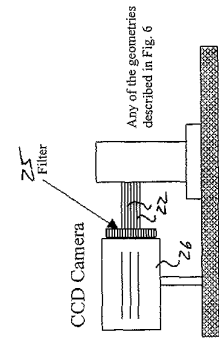
Example 1: Specific enzyme target



Example 2: Specific DNA target







WO 02/41760

4/11

PCT/US01/44764



Fig. 3C



Fig. 3F



Fig. 3B

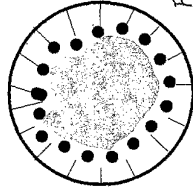


Fig. 3E

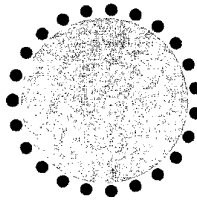


Fig. 3A

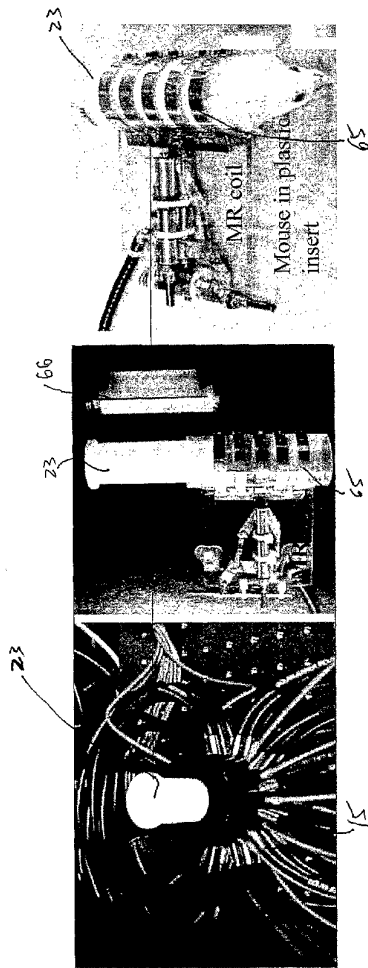


Fig. 3D

WO 02/41760

5/11

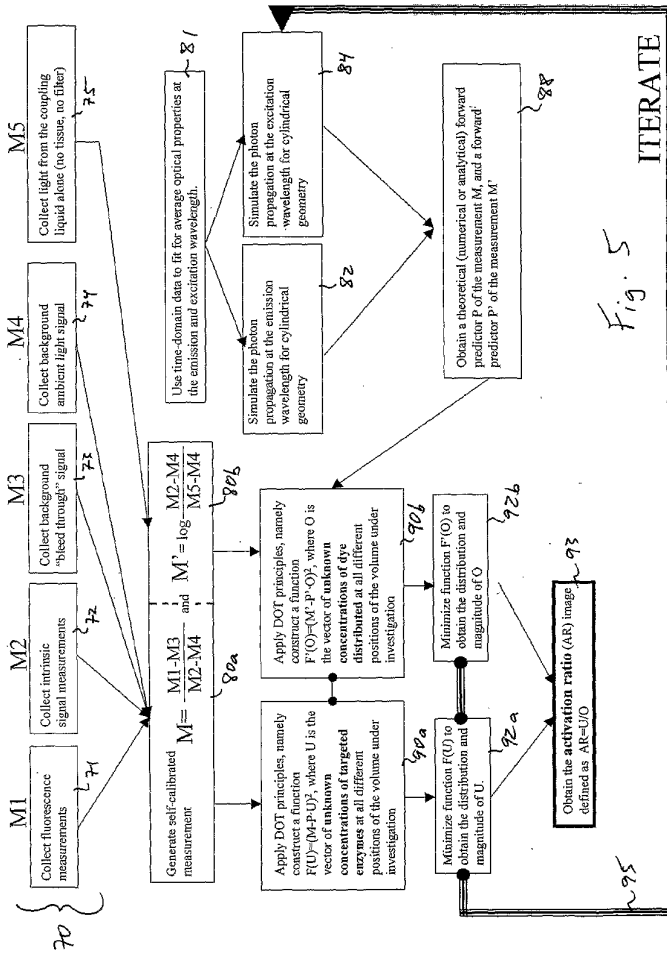
PCT/US01/44764



WO 02/41760

6/11

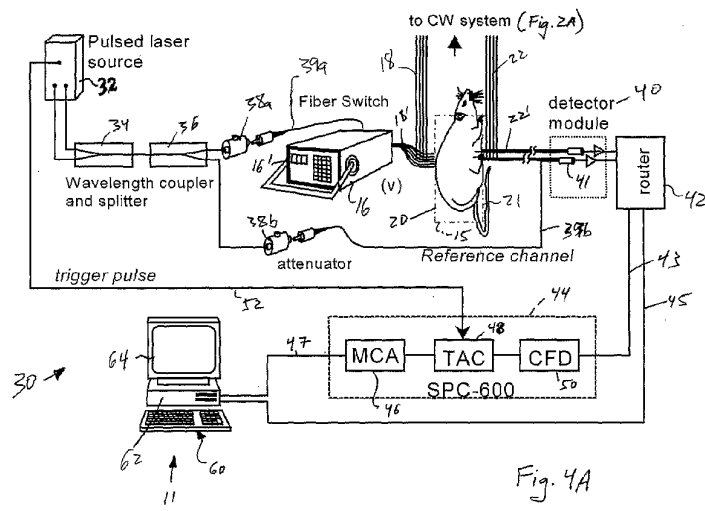
PCT/US01/44764



WO 02/41760

7/11

PCT/US01/44764

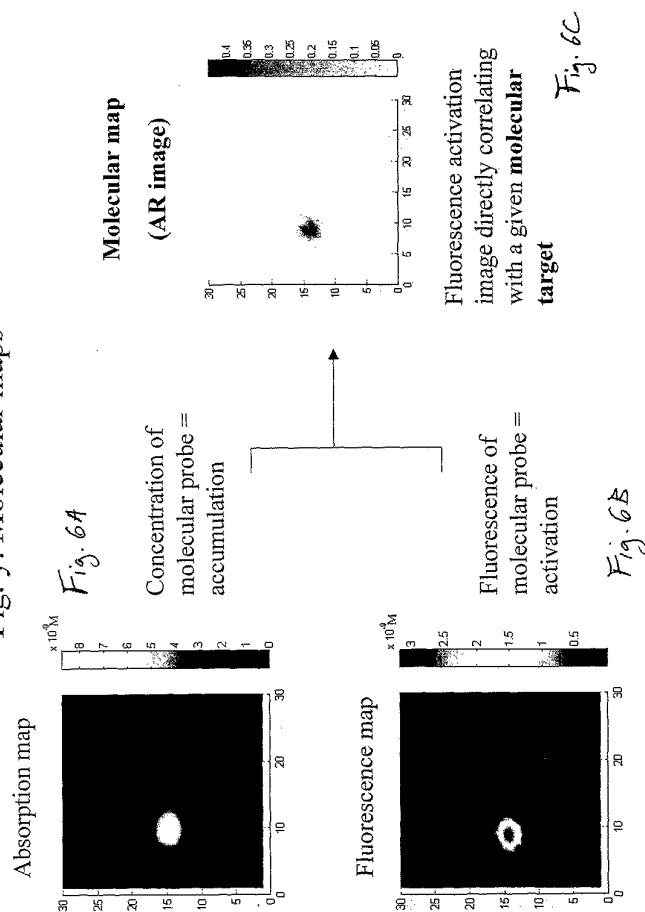


WO 02/41760

8/11

PCT/US01/44764

Fig. y: Molecular maps



WO 02/41760

9/11

PCT/US01/44764

B. Reconstructed images

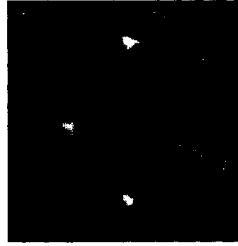


Fig. 7B

A. Phantom set-up

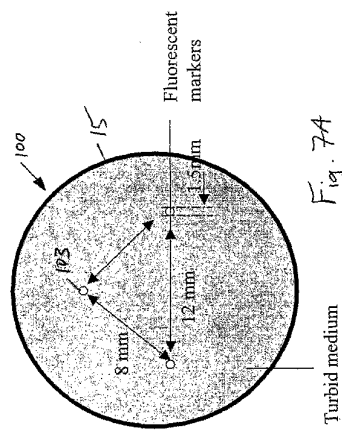
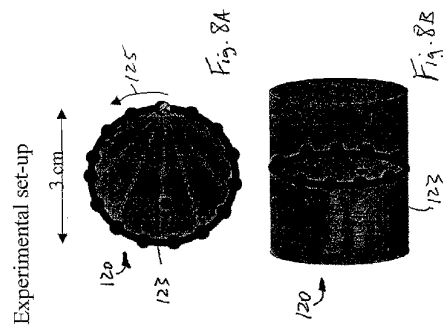
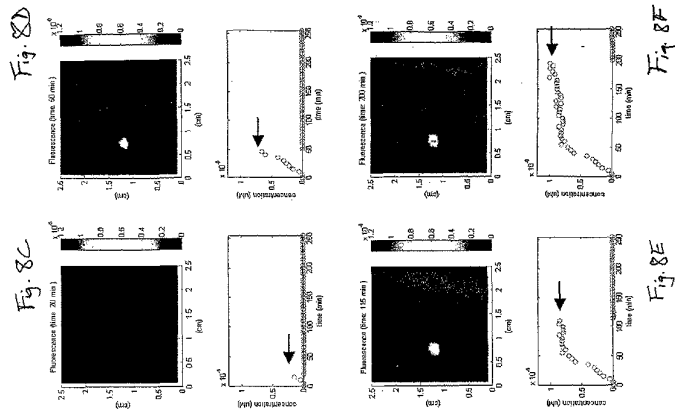


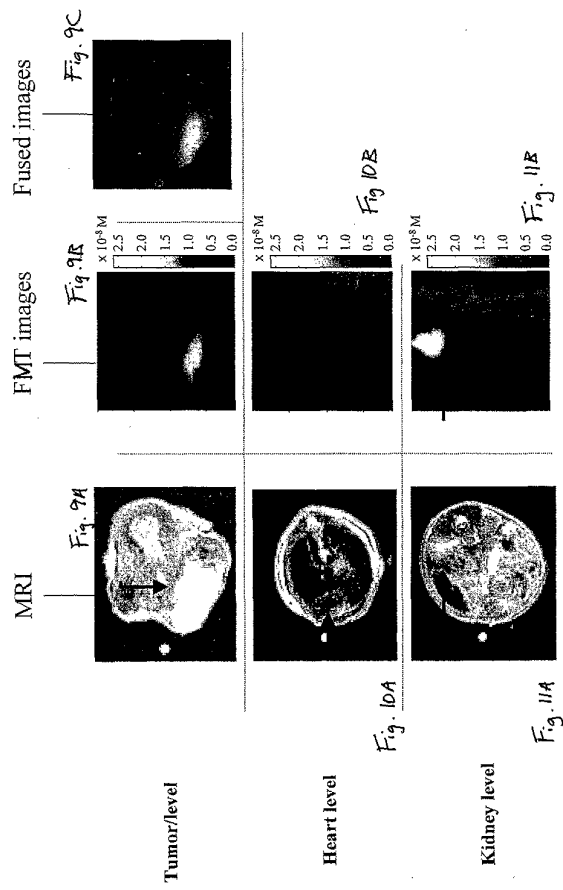
Fig. 7A



WO 02/41760

11/11

PCT/US01/44764



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

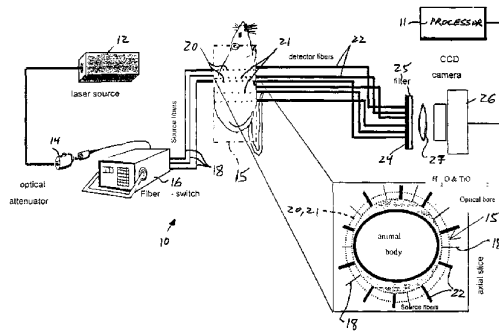
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/041760 A3

- (51) International Patent Classification: **A61B 5/00**
- (21) International Application Number: PCT/US01/44764
- (22) International Filing Date:
27 November 2001 (27.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/723,033 27 November 2000 (27.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 09/723,033 (CIP)
Filed on 27 November 2000 (27.11.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE GENERAL HOSPITAL** [US/US]; 55 Fruit Street, Boston, MA 02114 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **NTZIACHRISTOS, Vasilis** [GR/US]; Apt. 1212, 812 Memorial Drive, Cambridge, MA 02139 (US). **WEISSELEDER, Ralph** [US/US]; 197 Fifth Street, Apt. 731, Charlestown, MA 02129 (US).
- (74) Agent: **FASSE, J., Peter**; Fish & Richardson, P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02118-2804 (US).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

[Continued on next page]

(54) Title: FLUORESCENCE-MEDIATED MOLECULAR TOMOGRAPHY



(57) Abstract: System (10) includes a continuous (CW) laser source (12). The laser (12) uses constant intensity light. Two wavelengths obtained from the two lasers can be used for imaging the intrinsic contrast. The optical switch (16) directs light from laser (12) to any one of multiple fibers (18). Fluorescent light collected by multipoint detector array (21) is fed through detector fibers (22) to a two-dimensional emitted fluorescent light array (24). The two-dimensional array (21) transmits the fluorescence signals to a long pass filter (25) and to CCD camera (26) providing an image.

WO 02/041760 A3

WO 02/041760 A3 

(BI), BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG). **(88) Date of publication of the international search report:**
1 May 2003

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/44764															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61B 5/00 US CL : 600/473 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 600/312, 473, 476; 356/317, 318 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A, E</td> <td>US 6,377,842 B1 (POGUE et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.</td> <td>1-57</td> </tr> <tr> <td>A, E</td> <td>US 6,377,841 B1 (LIN et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.</td> <td>1-57</td> </tr> <tr> <td>A, P</td> <td>US 6,304,771 B1 (YODH et al.) 16 October 2001 (16.10.2001), see entire document.</td> <td>1-57</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5,865,754 A (SEVICK-MURACA et al.) 02 February 1999 (02.02.1999), see entire document.</td> <td>1-57</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A, E	US 6,377,842 B1 (POGUE et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.	1-57	A, E	US 6,377,841 B1 (LIN et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.	1-57	A, P	US 6,304,771 B1 (YODH et al.) 16 October 2001 (16.10.2001), see entire document.	1-57	A	US 5,865,754 A (SEVICK-MURACA et al.) 02 February 1999 (02.02.1999), see entire document.	1-57
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A, E	US 6,377,842 B1 (POGUE et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.	1-57															
A, E	US 6,377,841 B1 (LIN et al.) 23 April 2002 (23.04.2002), see entire document.	1-57															
A, P	US 6,304,771 B1 (YODH et al.) 16 October 2001 (16.10.2001), see entire document.	1-57															
A	US 5,865,754 A (SEVICK-MURACA et al.) 02 February 1999 (02.02.1999), see entire document.	1-57															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified)</td> <td>"G" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified)	"G" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified)	"G" document member of the same patent family																
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 28 June 2002 (28.06.2002)		Date of mailing of the international search report 13 NOV 2002															
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Marvin H. Rosen Telephone No. 703 308-0858															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(72)発明者 ワイスレーダー ラルフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チャールスタウン アpartment 731 エイス ス
トリート 197

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 EA01 FA01 FA06 GA02 GA04 GB01 HA05
JA02 KA01 KA02 KA05 KA08 KA09 LA03 NA01 NA06
2G059 AA06 BB12 CC16 EE01 EE07 EE11 FF01 FF06 FF12 GG01
GG02 GG03 GG06 HH01 HH02 HH06 JJ02 JJ17 KK04 MM01
MM09 MM14 PP04