



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102497803 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201080030265. 6

GO1N 21/47(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 05

GO1N 21/64(2006. 01)

(30) 优先权数据

0950313-7 2009. 05. 05 SE

61/215, 881 2009. 05. 12 US

61/255, 139 2009. 10. 27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/056127 2010. 05. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/128090 EN 2010. 11. 11

(73) 专利权人 卢米托股份有限公司

地址 瑞典隆德

(72) 发明人 斯蒂芬·安德森·恩格斯 C. 徐

H. 刘 约翰·阿克塞尔森

尼克拉斯·斯文森

庞图斯·斯文马克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘春元 卢江

(51) Int. Cl.

A61B 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5451785 A, 1995. 09. 19, 全文.

CN 1582394 A, 2005. 02. 16, 全文.

RATIVA D J等.Silver nanoparticles in nonlinear microscopy. 《Microwave And Optoelectronics Conference, 2007》. 2007, 478-482.

Can T. Xu 等.Autofluorescence insensitive imaging using upconverting nanocrystals in scattering media. 《APPLIED PHYSICS LETTERS》. 2008, 第 93 卷 (第 17 期), 1-3.

Ma. Obiminda Cambaliza 等.Advantages of two-color excitation fluorescence microscopy with two confocal excitation beams. 《Optics Communications》. 2000, 第 184 卷 25-35.

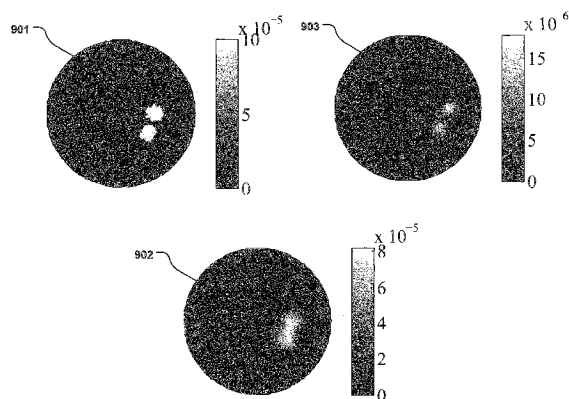
审查员 高瑞玲

(54) 发明名称

用于散射介质中改进的扩散发光成像或者断层照相的系统、方法和发光标记物

(57) 摘要

公开一种用于散射介质中的感兴趣区域的发光分子成像或者断层照相的方法和系统。该系统包括布置于散射介质中的非线性发光标记物材料。因此改进成像或者断层照相的对比度和分辨率。非线性标记物例如被配置成上变频照射波长的传入光。标记物的非线性功率依赖性通过使用同时以两个或者更多激励束拍摄的图像来实现进一步的成像改进。



1. 一种通过扩散发光分子成像对散射介质中的区域成像的方法,所述区域包括:在标记物位置处布置于所述散射介质中的至少一个发光标记物,其中所述发光标记物是非线性发光标记物;所述方法包括:

一个或者多个光源从至少一个光源位置向激励体积中发射的激励光激励所述发光标记物,以及

检测器在发光光检测位置检测由于所述激励光而来自所述发光标记物的发光,

提供在所述光源位置与所述标记物位置之间的移动,

通过基于所述检测的发光对所述激励光强度的非线性依赖性和相对于所述标记物位置的所述光源位置对所述发光标记物成像来提供所述激励体积的减小。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述非线性依赖性由以下关系给定:

$$L=k \cdot E^x,$$

其中 E 是所述激励体积中的激励光强度,

L 是来自所述发光标记物的发光光强度,

k 是正常数,

x 是大于1的正数。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中提供所述移动包括:

相对于所述标记物位置移动所述光源位置。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中提供所述移动包括:

相对于所述光源位置移动所述标记物位置。

5. 根据权利要求3所述的方法,包括:

在多个所述光源位置之间扫描一个或者多个激励束,使得所述光源位置相对于所述标记物位置移动。

6. 根据权利要求5所述的方法,包括:

检测用于所述多个光源位置中的每个光源位置的所述发光,所述发光具有所述发光标记物的用于所述多个光源位置中的每个光源位置的总发光强度,

通过产生用于所述多个光源位置中的每个光源位置的所述总发光强度的图像对所述发光标记物成像。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中通过对所述发光标记物的所述发光求和来提供所述总发光强度。

8. 根据权利要求5所述的方法,其中所述多个光源位置形成网格图案,所述发光标记物在所述网格图案上具有投影区域。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述投影区域少于所述网格图案覆盖的区域。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中在所述多个光源位置之间扫描所述一个或者多个光源,使得所述激励体积在所述网格图案中的两个连续光源位置之间基本上不重叠。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述激励体积基本上局部化为所述多个光源位置中的每个光源位置,使得如果所述光源位置与所述投影区域部分地重叠,则部分地激励所述发光标记物。

12. 根据权利要求1-11中的任一权利要求所述的方法,包括两个或者更多光源同时激励所述发光标记物。

13. 根据权利要求 1-11 中的任一权利要求所述的方法,包括:

由具有第一波长的第一光源从第一光源位置激励所述发光标记物,

由具有第二波长的第二光源从第二光源位置激励所述发光标记物。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述第一波长与所述第二波长基本上相同。

15. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述第一和第二光源同时激励所述发光标记物。

16. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述第一和第二光源位置中的至少一个光源位置相对于所述标记物位置移动。

17. 根据权利要求 1-11 中的任一权利要求所述的方法,其中所述扩散发光分子成像包括扩散发光断层照相。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,包括:

在多个不同光源位置之间扫描所述一个或者多个光源,使得所述光源位置相对于所述标记物位置移动,以及

检测用于为所述多个不同光源位置中的每个光源位置提供所述发光标记物的发光图像的所述发光,

根据所述发光图像重构所述发光标记物的三维断层照相图像。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中重构所述三维断层照相图像包括:

计算来自所述激励光的激励场,

计算来自所述发光标记物的发射场,

根据所述非线性依赖性计算所述激励场的乘积,以及

其中所述发射场的所述计算是基于所述乘积的。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中计算所述乘积包括:

使所述激励场的场强度相乘,以便得到所述场强度的与所述非线性关系的幂依赖关系相对应的次方。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,包括计算所述场强度的二次乘积。

22. 根据权利要求 1 所述的方法,其中提供所述移动包括相对于所述标记物位置移动所述发光光检测位置。

23. 一种用于散射介质中的感兴趣区域的扩散发光分子成像的系统,所述系统包括用于在所述散射介质的所述扩散发光分子成像中使用的发光标记物,其中所述发光标记物是布置于所述散射介质中的非线性发光标记物,所述系统包括:

一个或者多个光源,由至少一个光源位置定位用于通过由所述一个或者多个光源向激励体积中发射的激励光来激励所述发光标记物,

检测器,在发光光检测位置检测由于所述激励光而来自所述发光标记物的发光,其中所述扩散发光分子成像包括通过基于所述检测的发光对所述激励光强度的非线性依赖性和相对于所述标记物位置的所述光源位置对所述发光标记物成像来提供所述激励体积的减小。

24. 根据权利要求 23 所述的系统,其中所述发光标记物包含于配置成对照射波长的传入光进行上转换的一组非线性发光标记物中,使得当用所述传入光照射所述发光标记物时在比所述照射波长短的发光波长处出现发光。

25. 根据权利要求 23 所述的系统,其中所述发光标记物是发光生物标记物,并且所述散射介质是人类或者动物的组织,所述发光生物标记物布置于所述组织中。

26. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中所述发光标记物包括纳米大小的上转换粒子。

27. 根据权利要求 26 所述的系统,其中所述纳米大小的上转换粒子是由 $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 或者 $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 共同掺杂的四氟化钇钠 NaYF_4 。

28. 根据权利要求 23 至 25 中任一权利要求所述的系统,其中所述非线性发光标记物包括水可溶的粒子。

29. 根据权利要求 28 所述的系统,其中所述粒子是由极性结构涂覆的纳米大小的上转换粒子。

30. 根据权利要求 28 所述的系统,其中所述粒子是纳米大小的上转换粒子,所述纳米大小的上转换粒子具有附着到所述上转换粒子的表面上的羟基团。

31. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中所述标记物具有保护层。

32. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中所述发光标记物是生物功能化的生物标记物。

33. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中设计所述系统用于发光分子断层照相。

34. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中所述非线性发光标记物附着到用于与所述扩散发光分子成像的模式不同的成像模式的造影剂。

35. 根据权利要求 34 所述的系统,其中所述非线性发光标记物附着到具有顺磁性质的有机钆络合物或者钆化合物,并且其中所述系统还包括用于通过磁共振成像 MRI 和发光分子断层照相对所述感兴趣区域同时成像的磁共振成像 MRI 装置。

36. 根据权利要求 24 所述的系统,其中照射波长的所述传入光同时包括两个或者更多激励束。

37. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,其中具有第一波长的第一光源从第一光源位置和具有第二波长的第二光源从第二光源位置提供所述激励光。

38. 根据权利要求 37 所述的系统,其中所述第一和第二光源同时提供所述激励光。

39. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,所述系统用于片剂的发光成像或者发光断层照相。

40. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,所述系统用于小动物的活体内或者体外发光成像或者发光断层照相。

41. 根据权利要求 23 至 25 中的任一权利要求所述的系统,所述系统通过所述发光成像或者发光断层照相用于功能诊断。

42. 根据权利要求 41 所述的系统,所述系统通过所述发光成像或者发光断层照相用于癌症诊断。

用于散射介质中改进的扩散发光成像或者断层照相的系统、方法和发光标记物

技术领域

[0001] 本发明主要地涉及吸收和散射介质的光致发光(photoluminescence)成像或者光致发光断层照相领域,以及用于散射介质的此类光致发光成像或者用于散射介质的此类光致发光断层照相的光致发光标记物。

背景技术

[0002] 对于光致发光成像(简称为发光成像)或者光致发光断层照相(简称为发光断层照相)而言令人感兴趣的散射介质的例子为生物组织。组织光学是致力于研究光与此类组织交互的领域。最近十年,该领域迅速增长。随着对光-组织交互的了解与日俱增,受益于来自基础研究的成果,也出现了将对应用组织光学作为诊断工具应用的兴趣。

[0003] 组织光学中的为本公开部分地涉及的领域是包括光致发光断层照相的如下光致发光成像,该光致发光成像是用于人类或者动物活体内成像的非入侵方式。这些成像方式是基于发光的并且需要用于激励发光生物标记物的外部光源。

[0004] 光致发光是物质吸收光子并且然后重新辐射光子的过程。具体光致发光形式是荧光,其中通常发射的光子的能量低于用于照射的光子。因此在荧光中,关于照射光的波长,荧光波长被 Stokes 频移至更长的波长。

[0005] 荧光成像已知并且可以例如用来研究在一段时间内来自小动物中药物的生物响应而无需牺牲它们。

[0006] Shimomura、Chalfie 和 Tsien 由于发现和开发已经变成很重要的荧光标记物的绿色荧光蛋白质而于 2008 年荣获诺贝尔奖。

[0007] 然而迄今为止,用于吸收和散射介质中的扩散发光成像或者扩散发光断层照相的荧光分子成像和断层照相系统遭受多个缺点。它们例如具有使基于成像结果的诊断任务困难的低分辨率或者对比度。因此存在对于例如通过所提供的二维或者三维图像的改进的对比度和/或分辨率而让此类系统具有改进的图像质量的需要。

[0008] 另外,这些系统对经常出现的内生组织自发荧光 autofluorescence 灵敏,这恶化了测量结果。由于来自荧光生物标记物的荧光信号和背景自发荧光经常重叠,所以分离它们是困难的并且经常在可靠性上不可能。

[0009] 自发荧光在使用 Stokes 频移荧光团时隐藏荧光信号,这有效地限制信号比对背景的灵敏度。

[0010] 因此,存在对一种尤其允许通过改进的对比度和/或改进的成像分辨率来增加有效性的用于发光成像或者发光断层照相的改进型扩散发光成像或者发光断层照相系统、方法或者发光标记物。

发明内容

[0011] 因而,本发明的实施例优选地寻求通过提供根据所附专利权利要求的系统、方法

和用途来个别或者在任何组合中减轻、缓解或者消除本领域中的诸如上述一个或者多个缺陷、劣势或者问题。

[0012] 在本公开中,示出了通过将传统 Stokes 频移荧光团替换为新型发光标记物(即非线性标记物)来实现上述目的和改进。

[0013] 根据本发明的第一方面,提供一种通过扩散发光分子成像对散射介质中的区域成像的方法。该区域包括在标记物位置处布置于散射介质中的至少一个发光标记物,其中发光标记物为非线性发光标记物。该方法包括:由一个或者多个光源从至少一个光源位置向激励体积(excitation volume)中发射的激励光来激励发光标记物;检测器在发光光检测位置处检测由于激励光而来自发光标记物的发光;提供在光源位置与标记物位置之间的移动;并且基于检测的发光对激励光强度的非线性依赖性和相对于标记物位置的光源位置对发光标记物成像。

[0014] 根据本发明的第二方面,提供一种用于散射介质中感兴趣区域的扩散发光分子成像的系统。该系统包括用于在散射介质的发光分子成像中使用的发光标记物,其中发光标记物是布置于散射介质中的非线性发光标记物。该系统包括:一个或者多个光源,由至少一个光源位置定位用于通过由一个或者多个光源向激励体积中发射的激励光来激励发光标记物。该系统包括在发光光检测位置处检测由于激励光而来自发光标记物的发光的检测器,其中发光分子成像包括基于检测的发光对激励光强度的非线性依赖性和相对于标记物位置的光源位置对发光标记物成像。

[0015] 在实施例中,发光标记物包含于被配置成对照射波长的传入光上转换(upconvert)的一组非线性发光标记物中,,这当用所述传入光照射所述发光标记物时在比所述照射波长短的发光波长处出现发光。

[0016] 发光标记物在某些实施例中是生物发光标记物。

[0017] 根据本发明的另一方面,提供一种将本发明第二方面的系统用于片剂的发光成像或者断层照相的用途。

[0018] 根据本发明的另一方面,提供一种将本发明第二方面的系统用于小动物的活体内或者活体外发光成像或者断层照相的用途。

[0019] 根据本发明的另一方面,提供一种将本发明第二方面的系统用于通过所述发光成像或者发光断层照相的功能诊断(诸如癌症诊断)的用途。

[0020] 在一个实施例中,非线性标记物附着到用于另一成像模态(modality)的成像造影剂(imaging contrast agent)。例如非线性标记物附着到用于用诸如磁共振成像(MRI)、X射线等常规成像模态进行成像的造影剂。在一个具体实施例中,非线性标记物附着到具有顺磁(paramagnetic)性质的有机钆络合物(gadolinium complex)或者钆化合物。

[0021] 在从属权利要求中限定本发明的其他实施例,其中用于本发明第二和后续方面的特征在必要的修改下同样用于第一方面。

[0022] 一些实施例在扩散发光分子成像中和在荧光分子断层照相中提供增加的分辨率。

[0023] 一些实施例提供确定片剂中的成分分布。例如非线性发光标记物或者荧光团可以附着到片剂中的活性成分。因此可以有利地确定活性成分的空间分布。

[0024] 一些实施例在非线性标记物被用作 MRI 造影剂时提供用于医学磁共振成像中的增强对比度。同时可以进行发光成像或者断层照相,这提供用于同一个相同感兴趣区域并

且在活体内的与高分辨率 MRI 组合的功能诊断信息。

[0025] 应当强调,术语“包括”在使用于本说明书中时解释为指定存在所言特征、整体、步骤或者部件、但是并未排除存在或者添加一个或者多个其他特征、整体、步骤、部件或者其组。

附图说明

[0026] 根据参照以下附图对本发明实施例的下文描述将清楚并且阐明本发明实施例能够实现的这些和其他方面、特征以及优势:

[0027] 图 1 是示出具有自发荧光背景的典型信号的图;

[0028] 图 1A 是 Jablonski 图;

[0029] 图 1B 是示出来自一些组织荧光团的荧光谱的图;

[0030] 图 2a)-c) 是 a) 辐射和无辐射能量转移、b) 共振和非共振能量转移以及 c) 比较 ETU (左) 和 ESA (右) 上转换的示意图;

[0031] 图 3a) 和 b) 是 a) 单激励荧光和 b) 上转换荧光中的多激励的示意图;

[0032] 图 4A 是上转换纳米晶体(nanocrystal)的 Yb^{3+} - Tm^{3+} 离子对中的上转换过程的示意图;

[0033] 图 4B 是示出用于图 4A 的上转换纳米晶体的发射谱的图;

[0034] 图 5a)、b) 和 c) 是平面成像实施(即(a)用于荧光团成像(落射荧光(epi-fluorescence))的设置、(b)将用于透照法(transillumination)中的荧光团重构的设置和 c)用于荧光扩散光学断层照相的另一设置)的示意图;

[0035] 图 6a)至 d) 是示出各种荧光强度分布的图像和图;

[0036] 图 7a)至 c) 是在利用线性和非线性荧光团的荧光成像之间的差异的示意图;

[0037] 图 8 是散射介质中的激励和发射光传播的示意图;

[0038] 图 9 示出在线性与非线性荧光团之间的断层照相重构比较;

[0039] 图 10A 和 10B 示出用于具有线性(10A)和二次(quadratic)(10B)幂依赖关系的荧光团的灵敏度分布图;并且

[0040] 图 11 是荧光断层照相问题的示意图。

[0041] 图 12 是示出用于单束激励以及组合的单束激励和双束激励的权重矩阵的归一化奇异值分布的图。

[0042] 图 13A 和 13B 是使用(10A)仅单束图像以及使用(10B)单束和双束图像两者的上转换纳米粒子(nanoparticle)的三维重构。

[0043] 图 14A 至 14F 示出用于使用(14A-14C)仅单束图像以及使用(14D-14F)单束和双束图像两者进行重构的重构的相对纳米粒子分布的横截面切片。

[0044] 图 15A 至 15F 示出用于使用(15A-15C)仅单束图像以及使用(15D-15F)单束和双束图像两者进行重构的重构的相对若丹明 6G 分布的横截面切片。

[0045] 图 16A 至 16C 示出用于 a) 线性常规荧光染料和 b) 上转换纳米粒子以及 c) 在 a) 和 b) 中的图像的横截面的荧光图像。

具体实施方式

[0046] 本公开的一些实施例涉及前述组织光学内的涉及扩散发光成像和断层照相的领域。对于多数可见光波长,光穿透到组织中不多于几毫米。但是在诊断窗(波长为 600 至 1600 nm)中,光穿透足以允许贯穿直至若干厘米的成像。这开辟对深入组织中的荧光造影剂成像的可能性。扩散散射光的荧光成像在生物医学应用中具有明显的重要性。

[0047] 荧光断层照相是基于人类或者动物内造影剂分布的三维重构。三维重构是基于荧光成像技术。

[0048] 如上文提到的那样,扩散散射光的荧光成像和断层照相领域长久以来受到经常出现的内生组织自发荧光不利地影响并且遭受不良对比度和分辨率。自发荧光在使用 Stokes 频移荧光团时隐藏来自造影剂的信号,这有效地限制了信号比对背景的灵敏度。

[0049] 执行具有逼真光学性质的对组织体模(phantom)的实验并且示出有可能检测无自发荧光的信号。也公开将纳米晶体用于三维断层照相重构。

[0050] 因此示出非线性标记物(诸如上转换纳米晶体)是用于组织成像目的的重要生物标记物。

[0051] 下文描述了荧光成像和断层照相在生物医学成像内的若干应用。这是用于散射介质的具体情况。

[0052] 在非生物领域中提供其他应用。用于此类领域的例子是用于材料测试(包括片剂质量控制、具有非线性标记物的介质流过的用于液体或者气体的过滤器等)的发光成像或者断层照相。

[0053] 在本应用和本发明实施例的上下文中,荧光成像代表所有类型的发光成像。讨论的任何成像或者断层照相也是在高度散射介质中,这在传统上由于检测的光的扩散特性而提供不良分辨率。本发明的实施例有利地改进了此类发光成像(包括在发光断层照相中)的对比度和分辨率。

[0054] 现在将参照附图描述本发明的具体实施例。然而本发明可以用诸多不同形式来体现而不应理解为限于这里阐述的实施例;实际上,提供这些实施例使得本公开将透彻和完整并且将向本领域技术人员完全传达本发明的范围。在对附图所示实施例的具体描述中使用的术语并非旨在限制本发明。在附图中,同样标号指代同样元素。

[0055] 下文给出荧光成像和组织光学的基本原理概况,之后是对非线性标记物(诸如上转换纳米晶体)的描述和使用上转换纳米晶体的荧光光学断层照相。另外,公开来自实验和仿真的结果。在下文中,荧光成像代表所有类型的荧光成像。讨论的任何成像或者断层照相是在高度散射介质中,这由于检测的光的扩散特性而提供不良分辨率。

[0056] 荧光对比度

[0057] 可以在 Jablonski 图中描述从发荧光分子(荧光团)发光的过程(参见图 1A)。图 1A 示出如下 Jablonski 图,该 Jablonski 图示出来自分子受激状态的各种衰变路径。在图的下部,示出来自乙醇中的血卟啉(haematoporphyrin)的荧光谱。缩写词为:Sn:单体状态;Tn:三联体状态;Abs:吸收;Sc:散射;IC:内部转换;F:荧光;IX:系统间交叉;P:磷光;A:向其他分子转移。用于一些过程的近似时间标度也在图 1A 中的右下方示出为生命期(LT),也记为 τ 。

[0058] 如果传入光子具有与在分子中的两个能带之间的间隙对应的能量,则它可以被吸收。光子能量将由此用于将分子激励到更高能带。受激状态不稳定,并且分子将返回到基

态(ground state)。解激励可以跟随如图 1A 中所示多个不同路径。标记的级别是与原子的能级对应的电子级别。S0、S1 等是电子自旋量子数量之和为零的单体状态,而 T0、T1 等是一个电子的自旋具有改变的符号的三联体状态。对于大分子,在级别之间的间隔很小,并且状态由于分子交互而重叠。当光子由分子吸收时,它未必将分子激励到受激电子级中的最低振动级而是更可能激励到更高振动状态。这是如下 Franck-Condon 原理的结果,该原理规定:在迅速(10^{-15} s)吸收过程期间,原子在振动运动中不改变它们的位置。当分子被激励到高能级时,将继而为迅速驰豫(relaxation)到 S1 的最低旋转振动状态。该驰豫的短时间标度(10^{-12} s)归因于旋转振动级别的高密度。分子可以通过无辐射运动(radiationless kinetic)交互从 S1 继续到状态 S0。这称为内部转换(IC)。

[0059] 替代地,解激励可以造成发射光子,并且该过程被称为荧光。由于跃迁可以在 S0 的任何旋转振动状态中终止,所以不同光子的能量将不具有相异值而实际上具有宽分布。因此,来自分子的荧光谱将是宽的(最常见为无任何显著结构)。谱的形式将反映向更低级别(S0)跃迁的概率。在图 1A 的下部中示出血卟啉(该血卟啉为肿瘤标记物或者光敏剂并且后文将加以讨论)的荧光谱。一旦路径吸收-IC-荧光完成,分子就回到它的原始状态和配置。因此,荧光过程非破坏性并且可逆的,这例如在医疗诊断中是一个优势。

[0060] 虽然禁止自旋,但是可以出现向三联体系统的转变。在三联体系统中也将出现向最低受激状态的迅速内部转换。由于向 S0 跃迁受自旋禁止,所以这将按照比跃迁 S1-S0 慢得多的速率($t \sim 10^{-6}$ -1s)进行。该过程被称为磷光并且在室温更少被观察到。

[0061] 若干其他路径也可能用于受激分子,诸如向其他分子转移能量、电子转移、受激准分子形成和激励到造成分子离解的排斥状态。在图 1A 中用 A 指示这些过程。

[0062] 诸多荧光分子共有一个重要特征、也就是共轭双键(即每第二个键是双键)的未断开链。血卟啉的结构是用于该未断开链的例子(未示出)。这是用于肿瘤的荧光诊断和光力学治疗的荧光分子。

[0063] 了解重要组织荧光团的荧光性质,未知样本的荧光记录将产生每个荧光团的相对贡献。如果荧光特性与隔离荧光团相同,则可以估计荧光团的浓度。然而情况并非总是如此。实际上,荧光性质依赖于环境因素,诸如极性和 pH。

[0064] 荧光的另一重要方面是在受激状态以及基态中的迅速驰豫。分子由于驰豫而失去它的一些激励能量。溶剂偶极子在荧光团周围的重新分布和特有交互(诸如氢键合)对该驰豫过程有贡献。因此,荧光光子的能量低于激励的能量,或者换而言之,荧光波长比激励波长更长。这称为 Stokes 频移并且对于不同分子环境而言不同。因此充分荧光诊断需要对分子环境的一般了解。

[0065] 荧光成像

[0066] 对照点监视设备,荧光成像系统可以检测大量点中的荧光信号。因此创建感兴趣区域的二维图像。典型系统包括相机以及可调谐滤波器(参见图 5A)。在图 5b 中示意地图示透照法中的相似设置。利用可调谐滤波器可以容易选择所需检测波长并且可以实现约 20 nm 宽的谱分辨率。

[0067] 利用非线性荧光团的荧光成像

[0068] 荧光成像的特别令人感兴趣的部分是使用本实施例的非线性荧光团的部分。在本申请的上下文中,“非线性标记物”是发光标记物,其中标记物的发光(L)非线性依赖于激励

光(E)的发光流量(luminous flow)。非线性标记物因此具有根据以下的发光： $L=k \cdot E^x$ ，其中 $x>1$ 并且其中k是正常数。非线性标记物也可以具有根据以下关系的发光： $L=k \cdot E^x + b$ ， $L=k(E) \cdot E^x + b$ ， $L=k(E) \cdot E^x + b(E)$ 或者 $L=k \cdot E^x + b(E)$ ，其中k和b是如下材料常数，这些材料常数恒定或者依赖于激励光(E)的局部场(即对于k(E)和b(E))。与常规荧光成像比较，非线性标记物(或者荧光团)因此可能需要不止一个光子用于激励。这明显减少了激励体积并且提供更局部化的激励点。以该方式如下文示范的那样改进发光成像的对比度和分辨率。具体而言，改进吸收和散射介质的发光成像中的扩散光的对比度和分辨率。本发明的实施例利用该效果。

[0069] 为了说明在利用线性和非线性荧光团的荧光成像之间的差异，参照图7a-7c。图7a图示灰度级的线性荧光图像。每个像素(705)对应于网格图案(701)中的一个激励点(704)。图7b图示利用两个光子的非线性荧光团(即非线性发光标记物(702))获得的图像。在图7c中，用红色(较大圆圈)(703)示出荧光团(702)，并且黑色点(704)指示网格图案(701)中的激励点。圆圈(703)对应于标记物(702)在网格图案(701)上的投影图像。激励点(704)对应于光源(即激光器(503))在扫描发光激光器(702)时的位置。可以清楚地看到使用非线性荧光团增加了荧光图像的对比度和分辨率。下文描述的图9和图10A、B进一步支持该点。具体而言，当光源在图7c中标记为706的与标记物(702)或者标记物(702)在网格图案(701)上的对应投影图像(703)接近的位置时，激励体积充分小并且局部化到用于非线性标记物的光源位置(706)，这在图7b中的对应像素(708)中未检测到发光。对于图7a中的线性发光图像，对应像素(707)由于散射介质中的激励体积增加而接收发光。两个光子的非线性依赖性提供激励体积的窄光子密度。因此基于检测的发光对激励光强度的非线性依赖性对标记物(702)成像可以增加分辨率。

[0070] 通过并非产生荧光分布本身的而实际上为用于不同激励位置的荧光强度的图像，可以获得如同图16(a)和(b)中的图像。由于激励体积对于非线性荧光团而言较小，所以它将产生将发亮的荧光标记物的较小部分，并且因此与常规线性荧光团相比增加分辨率。

[0071] 非线性荧光团与线性荧光团比较一般需要更高激励强度，并且一些非线性荧光团甚至需要相干激励。在散射介质中，难以实现高强度，因为光不能聚焦而实际上在每个方向上散布。这使一些非线性荧光团比其他非线性荧光团更适合于散射介质中的荧光成像。荧光团需要具有异常高的产出，并且它们可以无需相干激励。上转换纳米粒子是一种此类具有高产出并且无需相干激励的非线性荧光团。

[0072] 荧光成像的应用

[0073] 荧光断层照相

[0074] 从对象的表面发射的荧光的平面图像包含关于若干方面的信息。光谱特征产生荧光团的类型，并且强度与荧光团的浓度有关。

[0075] 这对于在对象表面上放置或者激励的荧光团成立。考虑深度放置的荧光团，复杂性多倍增加。这归因于如下事实：光谱特征以及强度相联系并且受对象体组织(即周围组织)的光学性质影响、必须考虑若干因素、即：

[0076] 激励光吸收和散射。必须激励荧光团以便发光，因此激励光必须到达荧光团位置。

[0077] 激励光源位置。在给定相同激励光时，与荧光团接近定位的源将比远离源定位的源激励荧光团更多。

[0078] 荧光团位置和大小。这里,荧光团被视为内部有结构,即如下适当限定的区域,该区域包含荧光标记物的均匀分布。根据大小和位置,发射的荧光将在边界上具有不同表现。

[0079] 发射光吸收和散射。发射在它经过组织传播时衰减。用于发射的光学性质通常与激励光不同。

[0080] 发射光收集位置。收集的强度依赖于检测到它的位置(在边界上)。这归因于从发射部位(荧光团位置)和收集部位(边界)的传播路径的不相等。

[0081] 由于这些因素以不断改变的方式相联系事实,对于用于解释收集的信号的的工具的需要是不可避免的。在将光学断层照相技术用于深度放置的荧光标记物的荧光成像时的基本目标在于然后

[0082] 量化和局部化在吸收和散射对象内的荧光团。

[0083] 术语“量化”意味着寻求荧光团的真实浓度,而术语“局部化”意味着寻求对象的每个三维体元中的浓度。两个术语也导致有可能基于荧光团对比度形成对象内部的三维图像,因此促成对名称断层照相的使用。

[0084] 荧光断层照相的应用

[0085] 小动物成像

[0086] 如今仅靛青绿(ICG)已经被FDA批准使用于人类患者身上进行医疗诊断,但是对于小动物成像,可能的荧光团众多。这是在过去数年内通过使用不同显微技术(这些技术将荧光用于对细胞中的生物学现象成像)而触发的在探针开发内的加速研究的结果。

[0087] 荧光团可以被分类为活性(active)探针和可活化(activateable)探针。

[0088] 活性探针是如下非特有荧光团,这些荧光团附着到靶特有的亲合配位体(affinity ligand)。这些配位体可以是抗体、缩氨酸和标记小分子。活性探针即使在它未附着到靶配位体的情况下在激励时发射荧光。这造成非特有的背景荧光,即没有关于待成像的靶的信息。

[0089] 可活化探针更为特有,因为这些仅在“接通”时发射荧光。荧光团与猝灭基团(quencher)近邻布置;替代地,若干荧光团被放置在一起以相互自猝灭。该布置由于酶特有的缩氨酸序列而是可能的。在存在酶时,缩氨酸序列可以分裂(cleave),因此荧光团自由发光而不猝灭。已经说明将可活化探针用于标识活体内的蛋白酶。可活化探针有时称为智能探针或者光学信标,因为它们仅能在靶分子存在时在激励时发光。荧光探针以特有分子或者特有生物事件为目标,因此对功能成像。这与用来将血管形成(vascularization)和渗透性可视化的其他无目标荧光染料(例如 ICG)对照。另一种增加对比度的方式是使用基因编码的探针。在细胞中插入转基因(报告基因)。转基因针对如下荧光蛋白质(FP)编码,该 FP 在转录时将固有地产生于动物内。可以使用光学技术来检测探针,并且该模态被称为间接荧光成像,因为发射的荧光可视化基因调节或者基因表达的存在。细胞可以被报告基因转染(transfected),并且可以对细胞跟踪进行成像。将 FP 融合到感兴趣基因,这有可能对活体内的几乎任何蛋白质成像。间接荧光成像中的 FP 提供令人感兴趣的成像能力,例如由于感兴趣的蛋白质可能在 FP 发射荧光之时不受影响的事实所致的蛋白质-蛋白质交互。

[0090] 存在若干类型的荧光蛋白质,但是主要家族是基于绿色荧光蛋白质(GFP)。探针开发正在向前推进以开发在 NIR 区域中发射和吸收的 GFP。如今并不存在 NIR FP,但是已经报道黄色和红色荧光蛋白质(YFP 和 RFP)。对比度依赖于荧光团浓度和荧光团位置。对比

度也受所谓的活性探针控制,如果荧光团不活跃,则将不发射荧光。使用生物介质中的荧光诊断经常出现的问题是自发荧光和背景荧光。

[0091] 自发荧光是内生发色团(chromophore)发射的荧光,而背景荧光是源于感兴趣区域以外荧光探针的荧光。已经报道在理论上减去自发荧光和背景荧光的方式。非特有荧光的存在有效地减少了对比度。

[0092] 临床癌症诊断

[0093] 迄今为止的主要应用是使用 ICG 的乳癌诊断及其衍生。荧光蛋白质显然并非用于人类应用的替代方案,因此将通过使非特有分子探针运转来实现荧光团成像。

[0094] 非线性荧光团断层照相

[0095] 由于例如上转换纳米晶体中的发射荧光的二次依赖性,改进了荧光断层照相。

[0096] 图 9 描绘在使用线性荧光团与二次荧光团之间的差异。

[0097] 图 8 是散射介质中的激励光(801)和发射光(802)传播的示意图。

[0098] 图 11 是荧光断层照相问题的示意描述。发射激励光的激励源(803)在边界上平移,而在发射强度根据源位置而改变之时发射荧光(804)在位置上静止。

[0099] 图 10A 和 10B 示出用于具有线性(10A)和二次(10B)幂依赖关系的荧光团的灵敏度分布图。源在图中的左侧上,并且与检测器的距离是 L。对于无穷均匀介质将解析表达用于格林函数来执行计算。如图 10A 和 10B 中所见,二次灵敏度分布图在绕着 x 轴的对称回旋周围在光源的附近很陡峭。这意味着有可能在一个平面中提取具有较高灵敏度(分辨率)的信息。

[0100] 在更高阶非线性荧光团(例如三次荧光团)的其他实施例中,甚至进一步改进对比度性能(未示出)。

[0101] 组织光学和组织的自发荧光

[0102] 在组织光学领域内,研究光与组织的交互。可选地,生物组织是具有比水略高的折射率的不均匀和吸收介质。当光与组织交互时,多个散射和吸收事件有望出现,其中这些事件的可能性高度依赖于波长。由于组织具有高的水浓度,所以使用来自如下波长区域的光是一个优势,在该波长区域中来自水的吸收低,这将对可用波长施加极限限制。然而,在经过皮肤(transdermal)的非入侵应用中,如在某些实施例中那样,光需要穿透皮肤,这将对可用波长施加进一步约束。

[0103] 皮肤可以被视为角质层在上面、继而为表皮而真皮在下面的分层结构。角质层和表皮主要由于来自芳香族氨基酸、核酸和尿酸的对于波长 $<300\text{ nm}$ 的高吸收度而对衰减光很有效。对于更长波长 $350\text{--}1200\text{ nm}$,表皮中的黑色素是主要吸收体。在光进入真皮时,散射开始压倒吸收。真皮因此可以被描述为混浊组织矩阵。对于真皮以下的组织类型,散射通常压倒吸收。在粗略近似中,可以使用瑞利散射对散射建模。这意味着波长较短的光将比波长较长的光被散射多得多。

[0104] 考虑组织中的散射和吸收,经过皮肤的诊断窗驻留于较长波长区域中并且可以视为范围从 600 nm 到 1600 nm 。

[0105] 组织包含若干如下内生荧光团,这些荧光团在被 $\lambda < 600\text{ nm}$ 激励时具有带有小 Stokes 频移的强荧光。对于诊断窗中的较长波长,来自组织的内生自发荧光一般弱得多。然而在诸多成像和断层照相应用中,信号本身也弱,因此仍然受引起图像的背景自发荧光

限制。在图 1 中示出具有自发荧光背景谱(虚线)的典型信号(连续线)。

[0106] 前述自发荧光或组织自身的内生荧光由若干不同荧光团引起。一些常见组织荧光团是存在于连通纤维中的胶原质和弹性蛋白质、存在于多数蛋白质和黄素中的色氨酸以及在消化细胞中活跃的二磷酸吡啶核苷酸(NADH),参见图 1B,该图示出胶原质(101)、弹性蛋白质(102)、NADH (103)和胡萝卜素(104)的谱。

[0107] 谱也受组织的光学性质影响。强吸收体(诸如血色素)可以吸收某些波长的荧光,并且因此改变荧光谱的表现,这产生虚假沉陷和高峰。血色素也可以通过吸收激励光来减少荧光谱的总强度而未改变它的形状。

[0108] 外生荧光团

[0109] 用于外生荧光团的一些例子是荧光蛋白质(FP)、NIR 染料(ND)、量子点(QD)或者光敏剂(PS)。

[0110] 量子点是发射如下信号的线性荧光团,该信号比组织自发荧光更多 Stokes 频移。量子点是主要在紫外线(UV)区域中吸收的荧光团。由于使用短波长的照射光对于经过皮肤的测量而言并不理想并且 UV 光受制于经过皮肤的浅穿透深度和在照射的组织中的 DNA 损坏风险,所以 QD 对于诸多应用而言并不适合。另外,量子点经常由对于有机体而言毒性高的材料制作。另外,研究已经示出量子点往往在暴露于生物环境时起反应并且可能很有害。

[0111] 非线性荧光团

[0112] 用于非线性荧光团的例子是下文更详细描述纳米粒子(NP)。

[0113] 上转换

[0114] 上转换是在吸收两个或者更多光子并且释放能量比传入光子的能量更高的光子时出现的非线性过程。

[0115] 例如在包含如下亚稳定状态(meta-stable)的材料中观察到该过程,该状态可以将一个电子俘获很长时间,这增加了与另一到来光子交互的可能性。

[0116] 在一些实施例中,由不同稀土离子掺杂的固体形式的发光标记物用来获得上转换。

[0117] 例如通过用稀土离子掺杂材料来制作固态上转换材料。即使在束缚于固体材料中时,稀土仍然填充在它们的内壳之前的它们的外电子壳,这向它们给予原子状谱线。

[0118] 由于诸多如下过程而发生上转换,这些过程根据离子对和激励强度而不同地影响上转换过程。

[0119] 在图 2a)-c) 中图示一些上转换过程。

[0120] 一些过程涉及到在离子之间的能量转移。该能量扩散可以是辐射或者无辐射的、共振或非共振的(参见图 2a 和图 2b)。在辐射情况下,光子从感光剂释放并且由活化剂吸收,而在无辐射情况下,激励能量将经由静电交互从一个离子跃至另一离子。可以用实验区分两种情况。辐射转移依赖于样本的形状并且也影响发射谱以及活化剂的寿命。当跃迁是非共振的时,它必须是光子辅助的。尤其在无辐射情况下,由于在稀土离子之间的能量差比其他固体材料高而遇到非共振跃迁。

[0121] 另外,在图 2c 中分别在图的左侧和右侧上图示能量转移上转换(ETU)和受激状态吸收(ESA)过程。当在受激状态中的离子吸收一个更多光子时发生受激状态吸收。该过程的概率通常很小并且可能仅在相干泵浦(pump)之下被观察到。能量转移上转换是涉及到

在离子之间转移能量的过程。这里考虑在受激状态中的活化剂。然后可以从感光剂无辐射地转移能量。这之所以可能是因为能量差仅在保持能量时显著。

[0122] 图 3a) 和 b) 分别是荧光和在上转换发光中的多激励的示意图。在图 3a) 中, 发射波长(EM) 比激励波长(EX) 长。图 3b) 示出在步骤 1 (EX1) 和步骤 2 (EX2) 中出现的多激励, 其中发射波长(EM) 比激励波长短。

[0123] 纳米大小(nanosized) 的上转换晶体

[0124] 这里由于上转换纳米晶体在近红外线(NIR) 激励时高效发射反 Stokes 频移光的独特性质而公开它们作为生物医学成像应用中的荧光团。这提供用于在自发荧光不存在的区域中检测荧光信号。

[0125] 纳米大小的上转换粒子例如是易于制作的镧系元素掺杂氧化物(Y_2O_3)。

[0126] 其他纳米大小的上转换粒子例如是具有比 Y_2O_3 效率高的氟化物。氟化物中的低光子能量(这降低无辐射衰变的可能性) 可以说明更高效率。

[0127] 更多纳米大小的上转换粒子例如由 Yb^{3+}/Er^{3+} 或者 Yb^{3+}/Tm^{3+} 共同掺杂(co-doped) 的四氟化钇钠($NaYF_4$) 制成。

[0128] $NaYF_4$ 可以在立方体或者六边形这两相(分别称 α - $NaYF_4$ 和 β - $NaYF_4$) 中结晶。来自 β 相材料的上转换发光比来自 α 相的上转换发光高近似一个数量级。目前也有可能在立方体或者六边形相中制作纳米大小的粒子。

[0129] 忽略效率差异, 粒子也示出其他依赖于大小的性质。例如不同发射线之间的比对于纳米粒子和体材料而言不同。

[0130] 上转换纳米粒子由于它们的独特光学性质而适合作为用于不同生物成像应用的生物标记物。有激励波长为 980nm 的廉价激光二极管, 该波长是很适合于生物成像应用的波长, 因为光在组织中穿透相对深, 这降低光损坏风险。

[0131] 利用上转换纳米晶体, 发光成像不遭受任何自发荧光。发光成像配备有例如比 Stokes 频移荧光团的生物标记物更好的对比度。

[0132] 此外, 非线性荧光团(诸如上转换纳米粒子) 也可以被生物功能化(biofunctionalize), 这向它们例如给予肿瘤寻求能力。

[0133] 非线性荧光团可以水可溶得, 这允许在某些应用中(诸如在用于静脉、口腔或者肠道服用的解决方案中) 易于服用。

[0134] 一种提供上转换纳米粒子为水可溶的方式向粒子涂覆有极性的结构。涂层例如可以由聚合物或者硅石制成。两种合成聚合物(例如聚乙二醇(PEG) 和天然聚合物) 可以用于涂层。这些聚合物在生物环境中稳定并且未以任何明显负面方式干扰纳米晶体的光学性质。

[0135] 向粒子涂覆硅石通常给予很稳健的涂层, 这在生物环境中特别有利。

[0136] 可以提高水可溶的上转换纳米粒子而无涂层。羟基团可以通过化学键或者物理吸收来附着到上转换纳米粒子的表面。羟基团按照定义通过共价键和来形成, 并且最终结构具有极性性质。

[0137] 此外, 可以向纳米粒子涂敷稳定保护涂层用于使它们有利地适合于在生物环境中使用。

[0138] 功能化

[0139] 可以用与诸如 X. Gao 等人在 In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, Nature Biotechnology, 22, 8:969-976, 2004 (出于所有目的的整体而将其全文结合于此) 中描述的量子点功能化相似的方式进行上转换粒子的功能化。在 Gao 等人中, 描述了适用于上转换转换稀土掺杂纳米粒子的方法。

[0140] 在本公开中的一个实施例中使用的上转换纳米粒子是由 Yb^{3+} 与 Tm^{3+} 的组合掺杂的根据 G. Yi 等人在 Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er infrared-to-visible upconversion phosphors (Nano Letters, 4, 11:2191-2196, 2004) 中描述的方法制备的 NaYF_4 晶体。在图 4A 中示出了两个离子的能量图。图 4A 是 $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 离子对中上转换过程的示意图。用虚线箭头图示无辐射上转换过程, 并且为了清楚而省略无辐射衰变。图 4B 是示出用于这些上转换纳米粒子的发射谱的图。在 477nm 的蓝色发射线仅对于更高泵浦强度而言可见。如图 4B 的插图中所见, 使用低强度来测量 800nm 线的泵 - 幂依赖关系为二次, 该插图在 x 轴上示出强度(I) 而在 y 轴上示出计数(C), 并且其中拟合线(401) 的斜率(S) 等于 2。

[0141] 在一个实施例中, 非线性标记物附着到用于另一成像模态的造影剂。例如非线性标记物附着到用于用诸如磁共振成像(MRI)、X 射线等常规成像模态进行成像的造影剂。在一个具体实施例中, 非线性标记物附着到具有顺磁性质的有机钆络合物或者钆化合物。当用作 MRI 造影剂时, 在医学磁共振成像中增强对比度。同时可以进行发光成像或者断层照相, 这提供同一个感兴趣区域并且在活体内的与高分辨率 MRI 组合的功能诊断信息。

[0142] 在非生物领域中提供其他应用。用于此类领域的例子是用于材料测试(包括片剂质量控制、具有非线性标记物的介质流过的用于液体或者气体的过滤器等) 的发光成像或者断层照相。

[0143] 实验

[0144] 在实验设置中使用上转换纳米晶体以便确认非线性标记在发光成像中的适用性。为了示范足以用作用于活体内应用的荧光团, 执行两个实验。

[0145] 首先示范使用传统下转换荧光团和上转换纳米晶体形式的二次荧光团的对比度差异。

[0146] 其次执行针对使用非线性荧光团(诸如上转换纳米晶体形式的二次荧光团) 的断层照相重构执行的仿真。

[0147] 在图 5a 和 5b 中示意地示出用于数据收集的平面成像系统。图 5a 是用于荧光团成像(落射荧光) 的设置示意图; 并且图 5b 是用于透照法中的荧光团重构的设置。

[0148] 使用由如下精制卵磷脂(Intralipid) 墨溶液构成的组织体模(501), 该溶液具有由飞行时间光谱系统(500) 确定的光学性质。在内径为 2.4mm 的毛细管中包含荧光团(502)。荧光团的浓度对于纳米粒子而言为 1wt% 而对于 DY-781 型传统下转换荧光团而言为 $1\mu\text{M}$ 。

[0149] 选择纳米粒子的浓度以具有与使用量子点的研究的合理对应性、即使用浓度 1wt%。

[0150] 使用来自 CNC 机器的两个步进马达, 可以光栅扫描纤维耦合激光器(503)。激光器在光栅扫描中的位置可以由如图 7 中所示网格图案(701) 描述。对于每个扫描位置获取图像而空气冷却的 CCD (503) 相机放在居中于 800nm 的两个电介质带通滤波器后面。图 5c

示出光栅扫描设置(507),其中激光器从下方位置(505)扫描组织体模(501)。CCD(504)可以对于激光器的每个位置(506)捕获一个图像。位置(506)描述与图7中的网格图案(701)相似的网格图案(508)。对于激光器的每个位置(506),测量来自体模(501)的整侧的发射荧光(即总发光器强度)并且求和以组成所得图像中的一个像素。因此图像中的像素数量由激励位置(506)而不是由CCD像素数量给定。分辨率因此可以由来自激光光源(505)的激励光的光子密度而不是由荧光发射光的光子密度确定。以该方式,由于激励体积中的两个光子的光子密度比单个光子的光子密度更窄,所以可以增加分辨率。当对总发光强度求和时,阈值可以应用于检测的发光。以该方式,可以增加分辨率。例如,仅当发光强度高于限定阈值时,才将它与总发光强度相加。阈值可以限定为CCD(504)中的值,例如如果发光强度低于峰值的30%,则它将被丢弃,因为它可以视为背景信号。另外,如果用于像素或者激光器的位置(506)的所得总发光低于另一阈值,则它可以视为背景信号并且被移除。替代地,可以对发光信号的二次强度求和。以该方式,可以进一步增加分辨率。例如CCD(504)检测的发光强度(该发光强度按照CCD中的峰强度值的定义可以具有在0与1之间的相对值)可以在与用于当前像素或者位置(506)的总发光强度相加之前与自身相乘。另外,总发光强度可以对于每个像素或者位置(506)与自身相乘。图16A至16C示出使用扫描成像技术的图像,其中图像中的每个像素对应于单个激励点(即光源位置(506))诱发的荧光。图16A示出用于线性常规荧光染料的图像,并且图16B示出来自非线性上转换纳米粒子的图像,而图16C中的比较横截面分布图显示FWHM分别为10.5mm和8.0mm,这给予1.3倍的改进。

[0151] 对自发荧光不灵敏的荧光分子成像

[0152] 落射荧光设置用于该实验。选择体模的光学性质为在660nm时 $\mu's=6.5\text{cm}^{-1}$ 和 $\mu_a=0.44\text{cm}^{-1}$,这些落入在小动物中发现的光学性质的范围。

[0153] 包含荧光团DY-781和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 的毛细管浸没至5mm的深度,其中该深度取为从管的前表面到体模的表面的距离。选择DY-781以便获得公正比较,因为它在800nm也发射并且具有与更常用的染料(例如若丹明类)同等的量子效率。

[0154] 两个二极管激光器用来激励荧光团。在780nm激励DY-781并且在980nm激励纳米粒子。

[0155] 在由121个位置构成的 $4.4\times 4.4\text{cm}^2$ 区域内光栅扫描激光器。然后对图像求,这给予表面上的光子分布的表示。这提供是否可以检测包括荧光。为了抑制不良像素对相机的影响,内核为 3×3 个像素的中值滤波器被应用于求和的图像。为了模拟自发荧光,向体模中添加DY-781直至如下点,对比度在该点如此之差以至于不能以可感测的方式使用数据。

[0156] 使用的照射强度视为对组织无害。最终所用激励光在体模的表面上具有来自两个激光器的 1cm^2 斑大小,这给予对于780nm激光器而言为 $40\text{mW}/\text{cm}^2$ 而对于980nm激光器而言为 $85\text{mW}/\text{cm}^2$ 的强度。

[0157] 图6a)至d)是示出实验获得的各种荧光强度的图像和图。具体而言,分别参照有和无自发荧光的DY-781染料(图6(a)和(c)中所见)和纳米粒子(图6(b)和6(d)中所见)示出比较图像以及示出在竖直方向上的求和的绘图。图像中的白色点已经人工添加并且表示用于激励光的位置。左列示出使用DY-781的结果,而右列示出使用上转换纳米粒子的结果。

[0158] 拍摄图 6(a) 和 6(b) 中所示图像而未添加自发荧光,其中拍摄背景自发荧光浓度为 40 nM 的图 6(c) 和 6(d) 中所示图像。

[0159] 具体而言,图 6a) 至 d) 示出拍摄的有和无自发荧光的图像及其横截面分布图。

[0160] 如从图 6(d) 可见,自发荧光背景与图 6(c) 相比有所减少,这改进用于上转换纳米粒子的信号比对背景的对比度。这些图清楚地示范使用下转换荧光团和上转换纳米晶体的对比度差异。值得注意的是,即使未添加人为自发荧光,精制卵磷脂本身仍然自发荧光,并且效果在图 6(a) 中的横截面分布图中可见。

[0161] 使用纳米粒子的最终结果主要受检测器的信噪比限制。这意味着通过增加激励功率有可能增强可获得的图像质量。

[0162] 情形对于 DY-781 染料而言不同。染料很高效并且一般不受信噪比限制。然而它受信号比对背景的对比度限制。这意味着激励功率增加将不导致更好的图像质量。

[0163] 荧光分子断层照相(FMT)

[0164] 在如图 5b 中在所示透射荧光设置中执行对使用非线性荧光团和传统荧光团的 FMT 的仿真。将仿真的组织体建模为半径为 43mm 的半无穷圆柱体(508)。光学性质在 $\lambda = 660 \text{ nm}$ 时为 $\mu' s = 10 \text{ cm}^{-1}$ 和 $\mu_a = 0.4 \text{ cm}^{-1}$ 而 16 个均匀间隔的源检测器点(509)在几何形状的一个平面周围。荧光团如图 5b 中所示一起接近地放置为在整个体模内延伸的棒。

[0165] 正向模型使用由 1785 个节点构成的均匀网状物。为了重构,使用 17×17 个像素的像素基础。有用于选择重构基础的若干策略。两个例子是第二网状物基础和像素基础。然而所有策略以减少问题中的未知数的数量为目标。之所以促使该点是因为解有望平滑并且使用更粗略的基础改进不适定性(ill-posedness)。在该实验中选择如下像素基础,该像素基础是一组规则间隔的像素。该基础适合于无空间先验信息的问题。

[0166] 从正向仿真获得用于重构的输入数据。将源建模为在体模以内一个散射事件距离处放置的以 1W 辐射的各向同性点源。

[0167] 用于重构的过程可以简要地视为执行以下步骤:i) 对于每个激励位置:用正确功率因子计算激励场;ii) 对于每个检测位置:用前述激励场计算发射场、即伴随法;iii) 对于每个激励和检测对,计算在激励场与发射场之间的乘积(伴随)。也就是说,计算 $N \times M$,其中 N 是激励位置的数量并且 M 为发射位置的数量。后者可以被视为灵敏度计算分布图。存储所得内部分布。iv) 例如通过最小化 $\|Ax - y\|$ 求解最小平方问题来找到对检测的内容最佳地进行描述的内部荧光团分布,其中 A 是包含灵敏度分布图的矩阵, x 是荧光团的内部分布,并且 y 是测量数据。

[0168] 对于非线性标记物,可以例如通过求解有关扩散方程或者使用 Monte-Carlo 仿真对光传播(发射和激励)的非线性依赖性建模。这可能是必要的以便将非线性标记物用于断层照相。当已经计算激励场时,它可以用作对发射问题的输入数据。在用于断层照相重构的前述步骤之一可以考虑标记物的幂依赖关系。例如对于如下非线性标记物,这些标记物具有发光(L)对激励光(E)的特有幂依赖关系,激励场的场强度以相同的幂互乘,即如果非线性标记物具有二次幂依赖关系,则计算激励场的二次乘积。使用二次激励场强度作为用于计算发射问题中的发射场的源项。可以导致更窄的灵敏度分布图并且由此增加分辨率。窄灵敏度分布图对应于先前阐述的窄或者小的激励体积。因此重构发光标记物的断层照相图像可以包括根据非线性依赖性计算激励场的乘积,其中发射场的计算基于该乘积。并且

计算乘积可以包括使所述激励场的场强度相乘,以便得到场强度的与非线性关系的幂依赖关系相对应的次方。

[0169] 重构的准确性依赖于当光源相对于发光标记物移动或者相反时对于每个光源位置获得多少信息,诸如检测的发光。除了通过空间变化来获得重构信息之外,发光标记物的多个激励波长和发射波长可以用来获得重构信息而不是通过谱变化。CCD 在该情形中可以检测若干波长的发光用于在成像和断层照相重构两者中使用。在后一情况下,空间和谱变化均可以用来计算前述灵敏度分布图。

[0170] 重构结果

[0171] 图 9 示出在线性荧光团(902)与非线性荧光团(903)之间的断层照相重构的比较。呈现图 9 中的示例作为二次荧光团的例子(该情况选择为二次)。

[0172] 示出基础真值(ground truth)为图 9 中的输入异常(901)。示出两个分离、但是接近的异常为较大圆圈中的不规则点。

[0173] 如从图 9 清楚,在使用线性荧光团(902)的重构中不能区分两个接近放置的异常。

[0174] 然而使用二次荧光团(902)的重构示出在两个接近放置的异常之间的良好分离。这在图 9 中清楚可见。

[0175] 该比较说明使用非线性荧光团提供比用线性荧光团有利的效果,即更高对比度和分辨率。该增强归因于在如以下方程(1)中所见使用二次源项之时的更窄灵敏度。这可以通过考虑用于不同源位置的收集信号来可视化。使用二次荧光团,如果源位置在荧光团本身附近,则信号才会强。因此信号可以比对于线性荧光团的情况提供关于荧光团位置的更多信息。这也可以给予例如分辨使用线性荧光团不可分辨的如图 9 中所示两个接近放置的荧光团的可能性。

[0176] 使用上转换纳米粒子的多束荧光扩散光学断层照相

[0177] 此外,本公开示范一种在荧光扩散光学断层照相中用于利用上转换纳米粒子的独特非线性幂依赖关系以通过包括同时用两个束的激励在光栅扫描设置中进一步增加信息量的方法。发现增加的信息造成更准确的重构。

[0178] 荧光扩散光学断层照相(FDOT)是一种寻求重构混浊材料以内的荧光探针浓度的空间分布的相对新模式。作为成像工具,它在例如对肿瘤、蛋白酶和药物效果成像的生物医学研究中具有良好前景。

[0179] FDOT 具有在数值上颇不适定的问题。在该问题中,用于荧光靶的重构质量由从边界测量获得的荧光信息数量和质量直接确定。仪器噪声和组织自发荧光是测量的主要扰动,这造成不良信号质量并且可能在重构结果中引起严重赝像。为了克服该点,可以例如运用低噪声设备、使用背景减法或者谱离析(unmixing)。然而此类方法不能解决所有问题,因为它们实质上仅以更佳方式利用当前信息而不是为重构添加新约束,即添加对于改进重构质量而言关键的新独立信息。在基于无接触 CCD 的 FDOT 系统中,一种获得更多信息的优选方式是通过增加激励位置的数量。然而,为了保持激励束的强度在合理水平内,对激励束的最小大小存在限制。这意味着对最高激励位置密度的实际上限,因为相异(即未重叠)激励位置是重构所需要的。也有可能运用解剖成像模态(诸如磁共振成像)以提供先验结构信息。然而,这是以系统明显增加复杂度并且减少灵活性为代价的。

[0180] 在本公开中,我们提出一种利用上转换纳米粒子的二次幂依赖关系以通过在 FDOT

中将两个束同时用于激励来获得附加信息的方法。示范用双束激励拍摄的图像(即 D 型图像)对纳米粒子数量密度分布 n 重构的影响。此外进行在线性若丹明 6G 与二次上转换纳米粒子之间的重构结果比较。

[0181] 可以通过两个耦合扩散方程 [Ref. 1] 对激励场和发射场建模。对于二次荧光团, 在第 k 个束的激励之下在固定检测器位置处检测的荧光信号; 可以由正向模型(1)描述:

[0182]

$$\Gamma_k = \sum_{i=1}^N U_f^*(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_i) n(\mathbf{r}_i) [U_e(\mathbf{r}_{sk}, \mathbf{r}_i)]^2 \Delta V_i, \quad (1)$$

[0183] 其中 N 表示体元(voxel)数量,

[0184] $\mathbf{r}_{s,d,i}$ 表示分别用于源、检测器和体元的坐标, 并且;

[0185] ΔV_i 是体元 i 的体积。

[0186] 激励光的正向解由下式代表:

[0187]

$$[U_e(\mathbf{r}_{sk}, \mathbf{r}_i)]^2$$

[0188] 而正向荧光问题的伴随解由下式代表:

[0189] $U_f^*(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_i)$ 。

[0190] 当同时使用两个束来激励介质时, 检测的信号由(2)给定:

[0191]

$$\begin{aligned} \Gamma_{k \& j} &= \sum_{i=1}^N U_f^*(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_i) n(\mathbf{r}_i) [U_e(\mathbf{r}_{sk}, \mathbf{r}_i) + U_e(\mathbf{r}_{sj}, \mathbf{r}_i)]^2 \Delta V_i \\ &= \Gamma_k + \Gamma_j + \\ &\quad 2 \sum_{i=1}^N U_f^*(\mathbf{r}_d, \mathbf{r}_i) n(\mathbf{r}_i) U_e(\mathbf{r}_{sk}, \mathbf{r}_i) U_e(\mathbf{r}_{sj}, \mathbf{r}_i) \Delta V_i, \end{aligned} \quad (2)$$

[0192] 其揭示了交叉项的牵连。在光栅扫描设置(500, 507)中, 如果在两个位置上利用一个激励束扫描依次拍摄两个图像(称为 S 型图像), 并且在之前两个位置之上利用两束激励拍摄第三图像(D 型), 交叉项的牵连意味着通过从现有 S 型图像的任何数学变换不能获得 D 型图像, 这指示其是独立的并且包含附加信息。然而, 对于线性荧光团(例如, 若丹明 6G) D 型图像仅是现有 S 型图像的线性组合, 并且将不添加对于逆问题的更多约束。对于非线性荧光团, 推导出方程(2)可以被一般化以包括更多的同时激励束。

[0193] 通过对其元素由(3)给定的权重矩阵 W 的奇异值分析 [Ref. 1] 来确认利用双束激励的测量在重构中的意义:

[0194]

$$W_{(s,d),i} = U_f^*(r_d, r_i) [U_e(r_s, r_i)]^T \Delta V_i, \quad (3)$$

[0195] 其中：

[0196] 对于二次荧光团而言 $\gamma = 2$ ；并且[0197] 对于线性荧光团而言 $\gamma = 1$ 。[0198] 使用如下 NIRFAST 包来执行计算，该 NIRFAST 包实施有限元方法。根据(4)对 W 分解因式：

[0199]

$$W = U \Sigma V^*, \quad (4)$$

[0200] 其中 U 和 V 是如下酉矩阵，这些酉矩阵包含 W 的左和右奇异矢量；并且 Σ 是如下对角矩阵，该对角矩阵包含 W 的奇异值。图像控件模式跨越 V 的列空间，而检测空间模式跨越 U 的列空间。 W 的奇异值表示实验设置 [Ref. 2] 可以多么有效地检测给定的图像空间模式。

[0201] 图 12 示出 W 的归一化奇异值分布。x 轴示出奇异性索引(1120)并且 y 轴示出归一化奇异值强度(1121)。为了清楚，仅示出每个第二奇异值。叉(1122)和加号(1124)符号代表线性荧光团 ($\gamma = 1$)，前者用于单束激励(1122)而后者用于组合的单束激励和双束激励(1124)。可见，由于双束激励(1124)的附加奇异值的归一化强度已经降至机器精确度，这指示用双束激励的测量可能未缓解 FDOT 的不适定性。换言之，D 型图像可能未提供比现有 S 型图像更多的信息。因此它可能未改进重构的质量。然而对于二次荧光团(由图 12 中的星号(1123)和圆点(1125)符号表示)，附加奇异值(1125)的强度仍然显著。这意味着 D 型图像将对重构的质量有贡献。

[0202] 在如下凝胶体模中进行实验，该凝胶体模在 660 nm 时具有用飞行时间光谱系统 [Ref. 3] 测量的光学性质 $\mu_a = 0.29 \text{ cm}^{-1}$ 和 $\mu'_s = 10.0 \text{ cm}^{-1}$ 。分别由溶液若丹明 6G ($c = 0.1 \mu\text{M}$) 和 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 纳米粒子 ($c = 0.1 \text{ wt}\%$) 填充的两个毛细管用来模拟仿荧光损伤。实验设置和对应运行参数与在先前工作 [Ref. 1] 中使用的实验设置和对应运行参数相似。由于考察的体模的区域有限，所以在本公开中仅使用 9 个激励位置 (3×3 网格)。两个最近邻近位置的间距是 3.5 mm，并且每个激励束具有约 2.6 mm 的直径。在实验期间，单个激励束首先用来扫描 3×3 网格，并且 CCD 相机对于每个扫描位置捕获一个图像。在下一步骤中，位于相同网格的两个最近邻近部位的两个激励束同时用来照射体模，这给出 6 个额外 D 型图像。

[0203] 图 13A-13B 示出重构的上转换纳米粒子的三维表现。子图中的红色圆柱体相同并且表示真实荧光损伤。在图 13(a) 的重构中，仅使用 S 型图像。可见，荧光损伤的形状估计过高。逆问题的不适定性说明该估计过高。当添加 D 型图像时，如图 13B 中所示，明显改进荧光损伤形状的重构。为了强调在两个重构之间的差异，在图 14A-14F 中示出重构的相对荧光团分布的横截面切片。虽然对于两个重构在荧光损伤的中心(由圆圈代表)处相对适当地重构深度，但是重构的荧光损伤对于使用 S 型和 D 型图像的情况而言更受限。该结果确

认 D 型图像确实对逆问题有贡献并且造成用于二次上转换纳米粒子的更好重构。也进行用于线性若丹明 6G 的对应重构,在图 15A-15F 中呈现这些重构的横截面切片。与用于纳米粒子的结果比较,用于若丹明 6G 的重构未受益于添加 D 型图像,这与理论一致。也不不良地重构荧光损伤的真实深度。

[0204] 公开上转换纳米粒子的非线性幂依赖关系的附加独特优势。该优势实现有可能通过使用同时用两个或者更多激励束拍摄的图像来获得用于逆问题的附加信息。我们发现这造成改进的重构。当使用线性荧光团(例如若丹明 6G)时不能发现相同优势。

[0205] 本公开呈现非线性发光成像和断层照相的实施例。在实验中,示出利用上转换纳米晶体的成像在与生物组织相似的散射机制中是可能的。另外,仿真示出有可能适配荧光光学断层照相中所用理论与上转换纳米晶体一起工作。

[0206] 在本公开中使用的上转换纳米晶体粒子由于它们的独特光学性质而与有机荧光团相比具有诸如用于生物标记物的多种应用。

[0207] 上文已经参照具体实施例描述了本发明。然而,除了上述实施例之外的实施例在本发明的范围内同样是可能的。可以在除了上述组合之外的组合中组合本发明的不同特征和步骤。本发明的范围仅受所附专利权利要求的限制。

[0208] 可以对有生命的人体或者动物体在活体内执行该方法。在该情况下,可以用任何方式(诸如通过向血流中注入或者向肿瘤中皮下或者直接注入或者代之以通过局部涂敷、侵肺和其他非入侵方法)向身体中预先引入(preintroduce)标记物。可以与剩余方法分开进行此类预先引入。可以与剩余方法结合、但是在其之前不久进行此类预先引入。

[0209] 替代地或者除此之外,可以对在执行该方法之后牺牲的人体或者动物体执行该方法。

[0210] 替代地或者除此之外,可以对无生命的人体或者动物体或者身体的部分(例如脑部死亡的人体或者动物体)在体外执行该方法。

[0211] 替代地或者除此之外,可以在非医学领域(诸如过滤器或者片剂)执行该方法。

[0212] 出于所有目的将以下参考文献通过整体引用结合于此。

[0213]

[Ref. 1] C. T. Xu, J. Axelsson, and S. Andersson-Engels, Appl. Phys. Lett. 94, 251107 (2009).

[Ref. 2] J. P. Culver, V. Ntziachristos, M. J. Holboke, and A. G. Yodh, Opt. Lett. 26, 701 (2001).

[Ref. 3] E. Alerstam, S. Andersson-Engels, and T. Svensson, J. Biomed. Opt. 13, 041304 (2008).

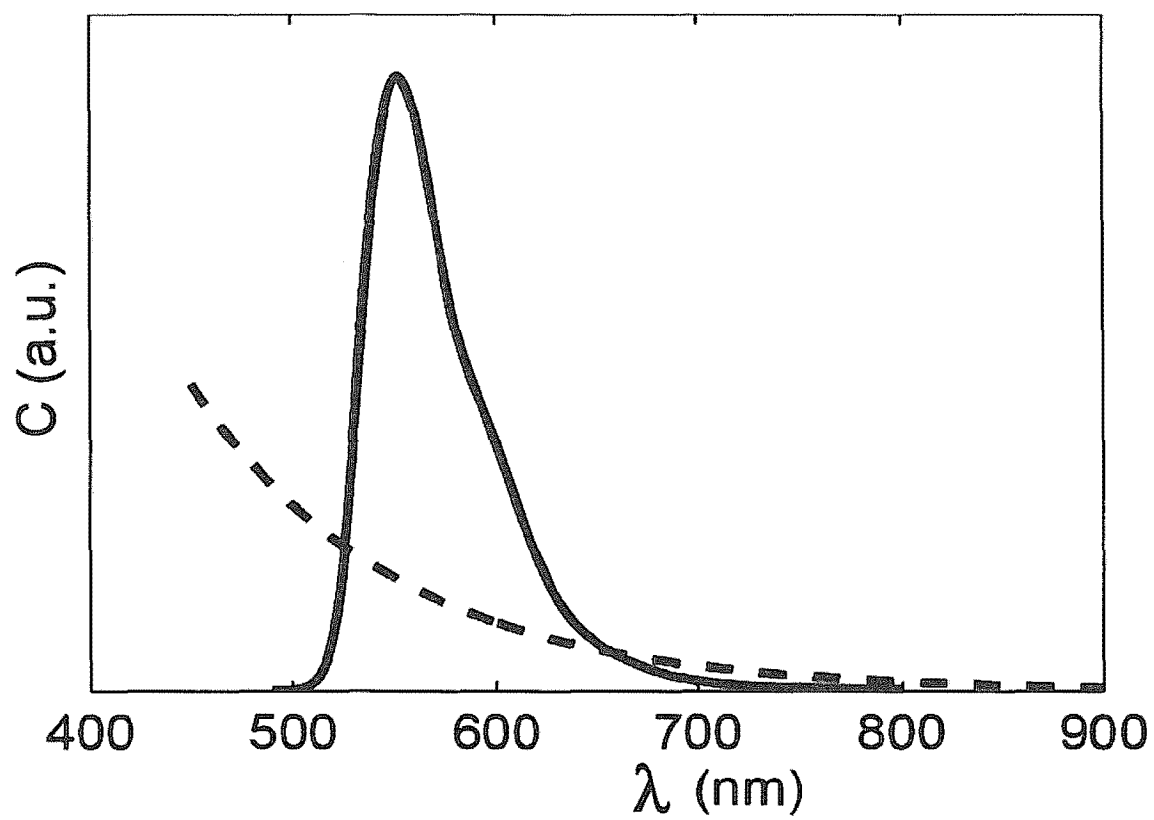


图 1

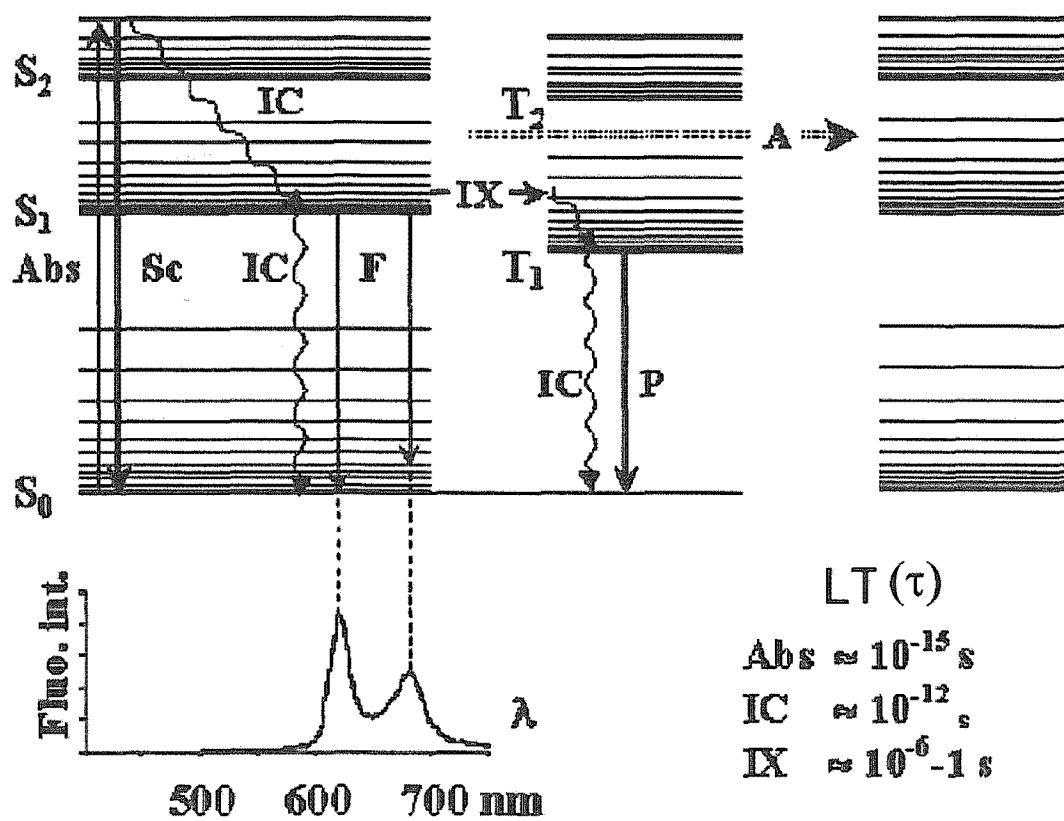


图 1A

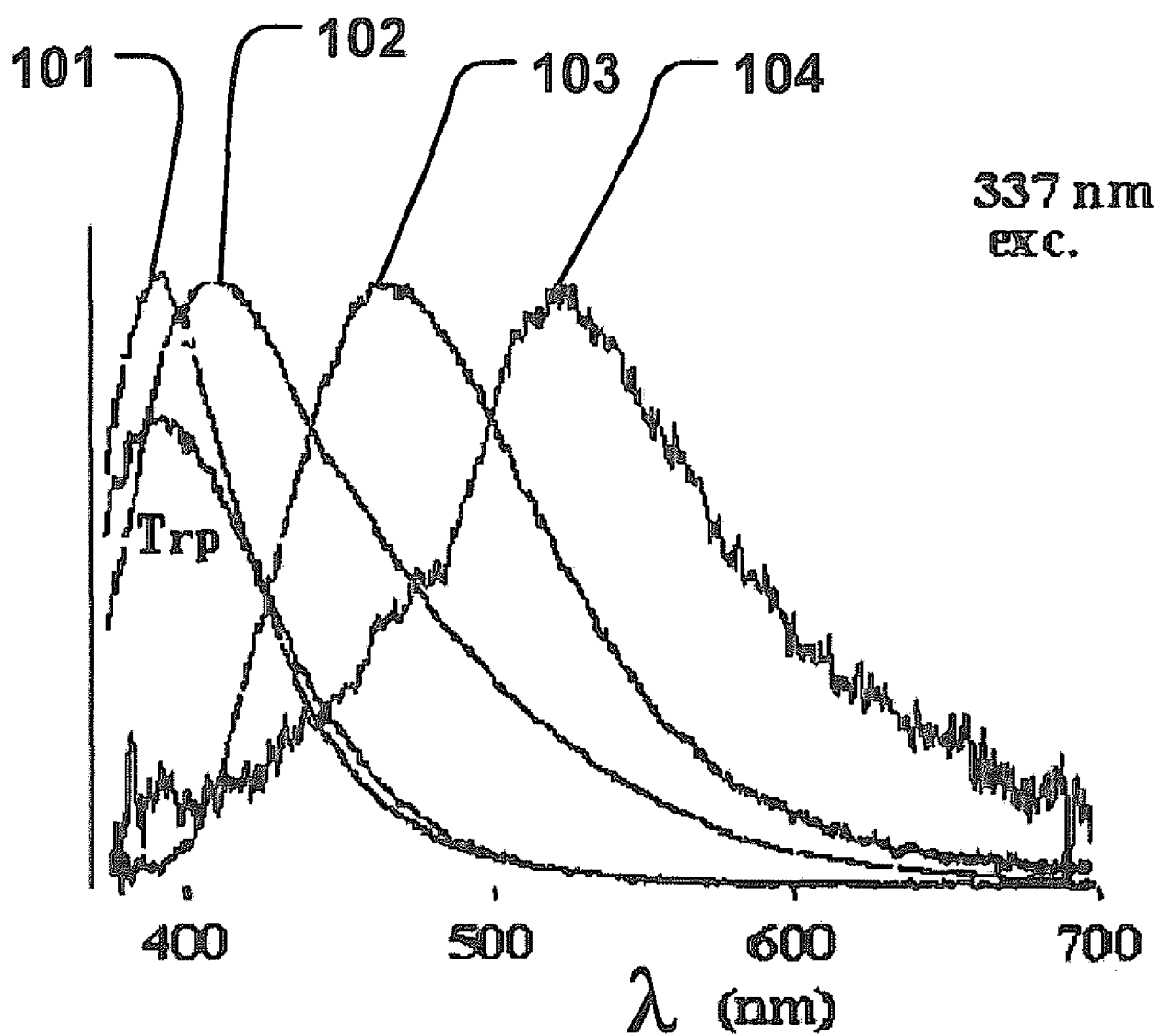


图 1B

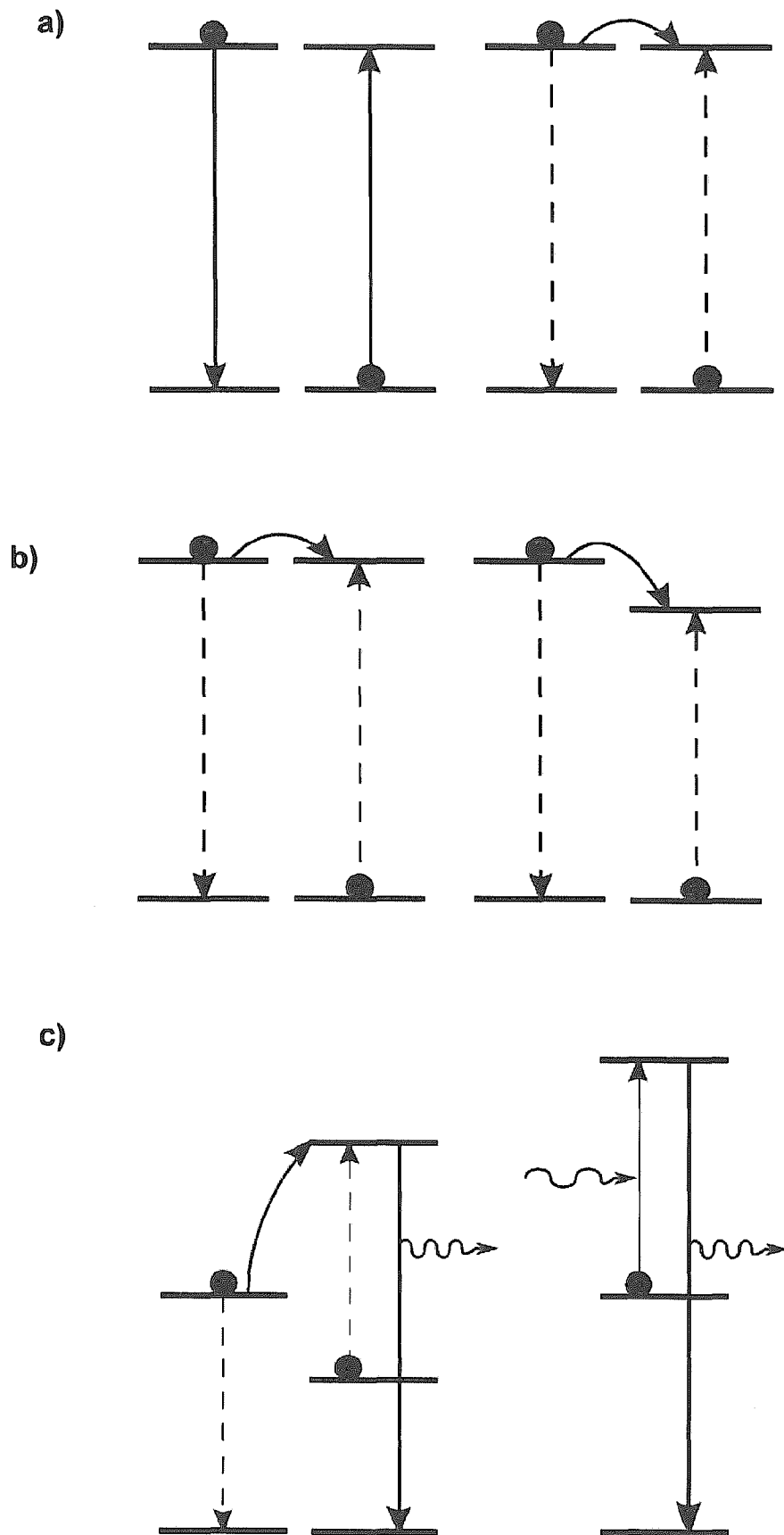


图 2

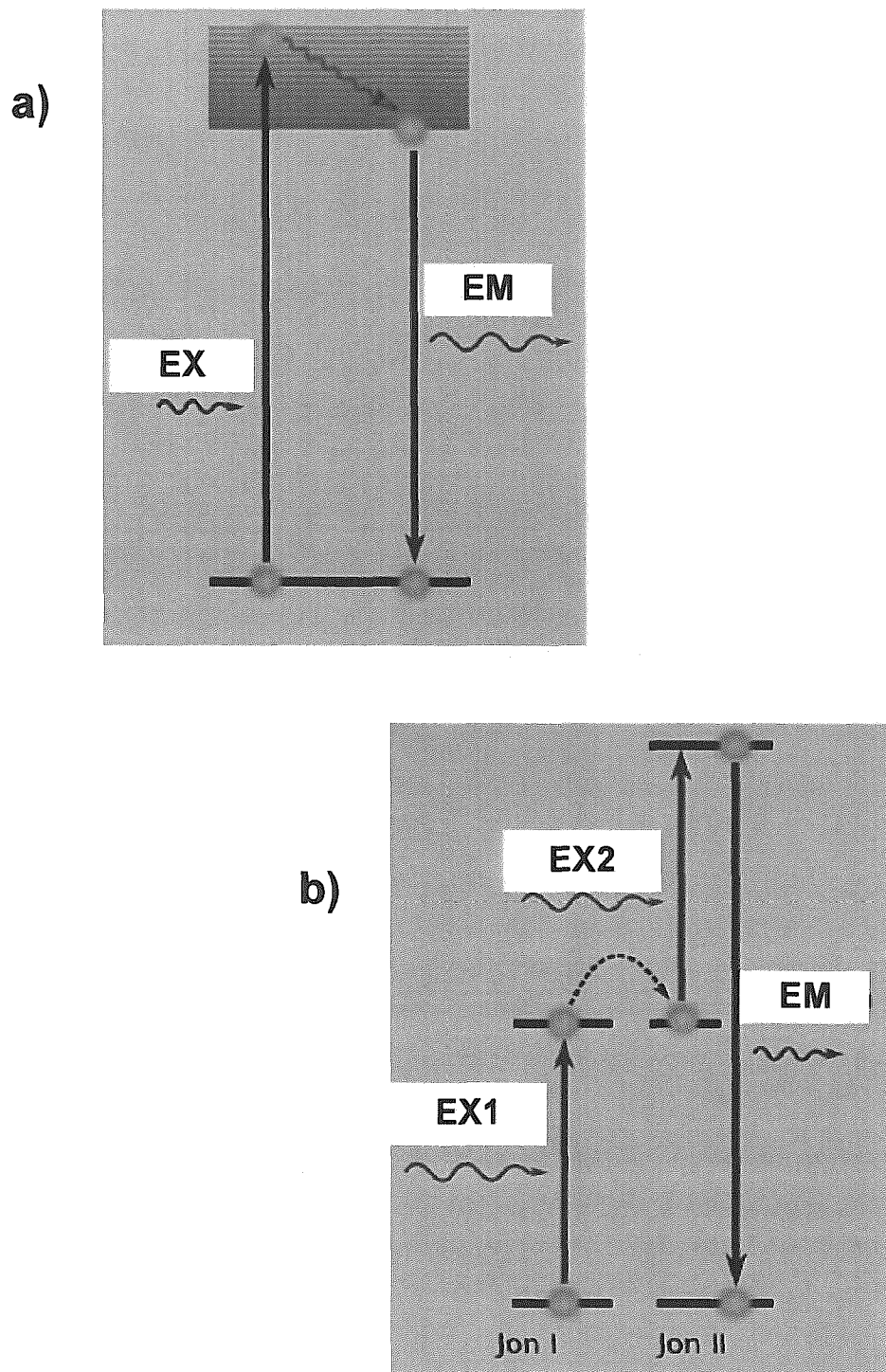


图 3

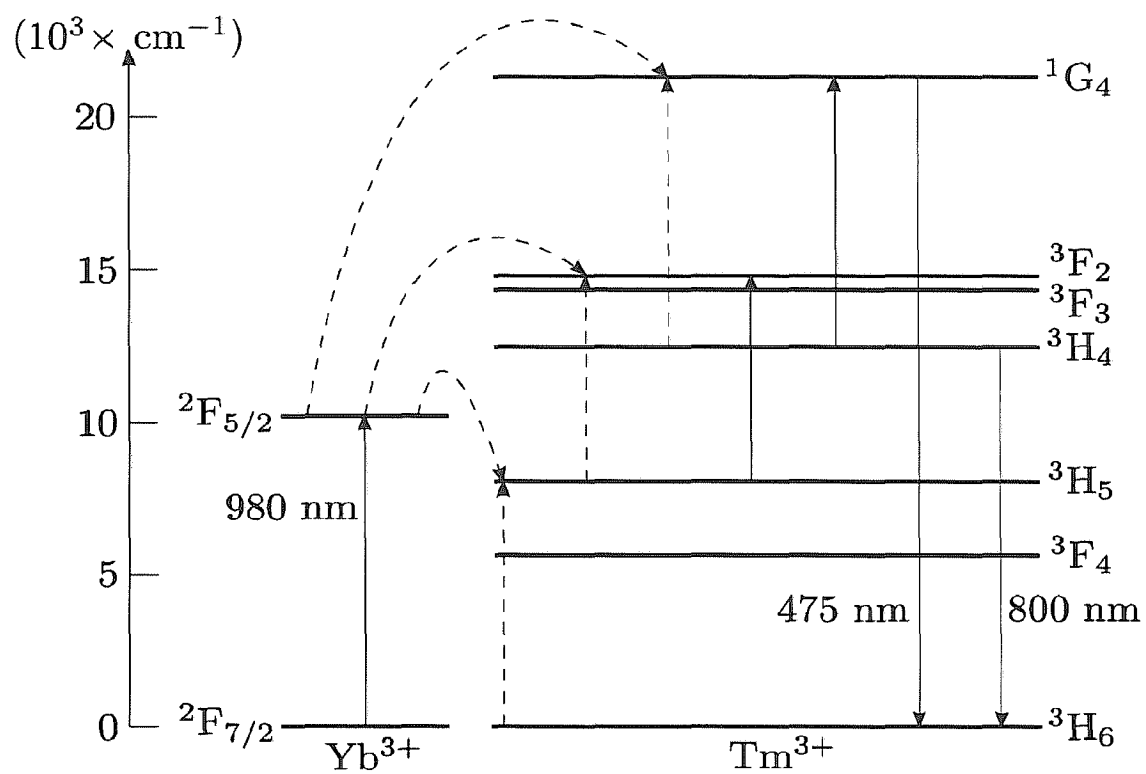


图 4A

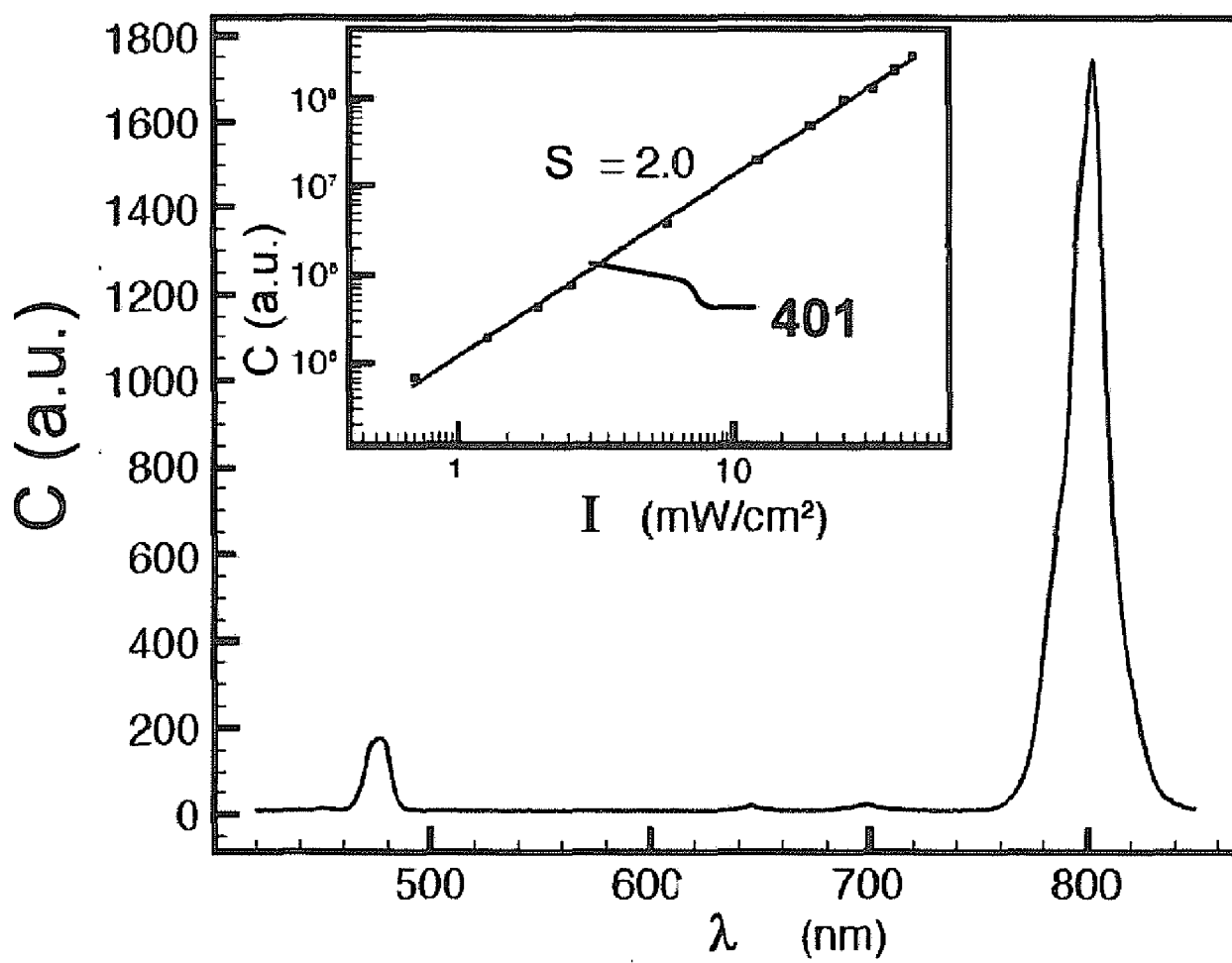


图 4B

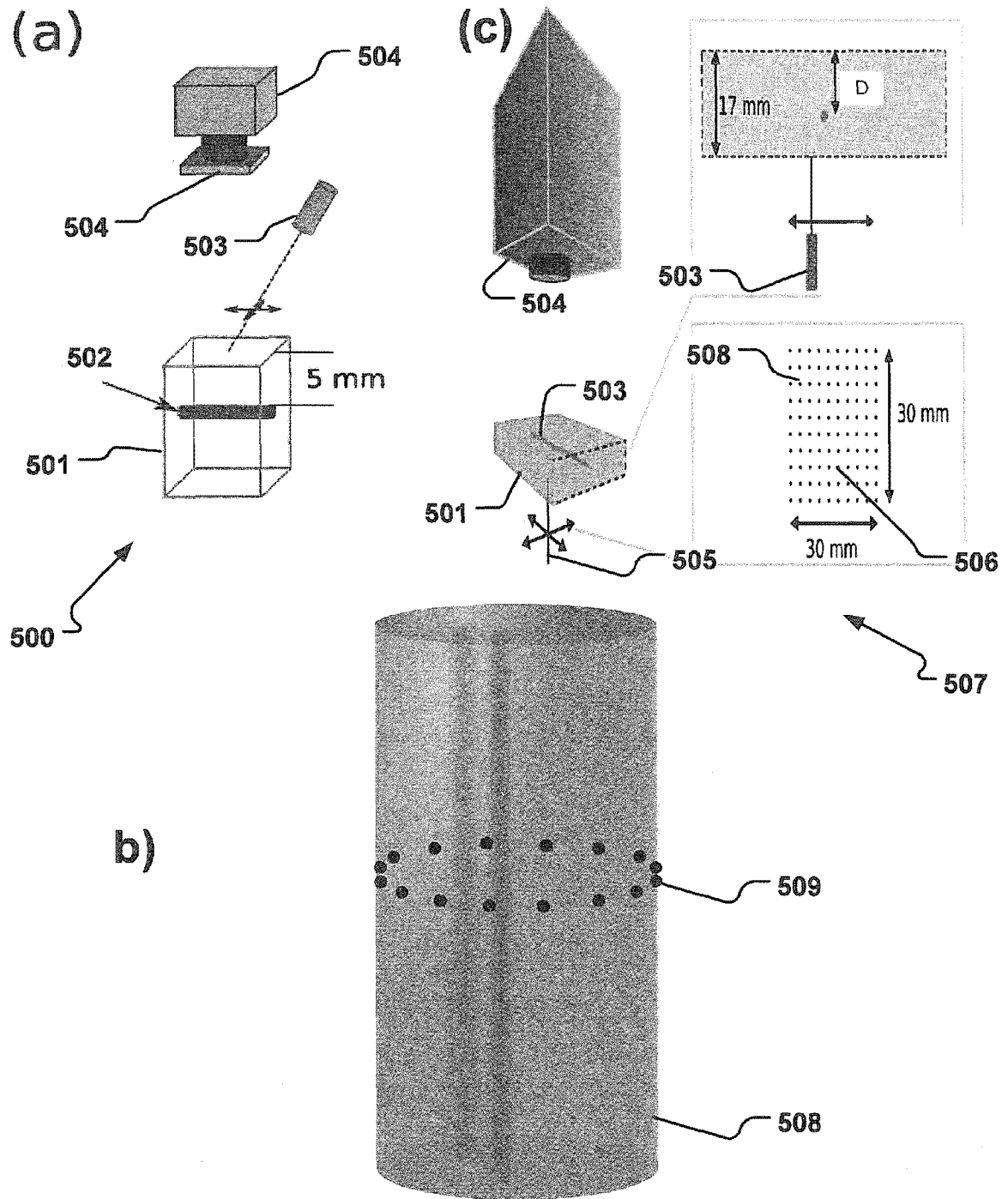


图 5

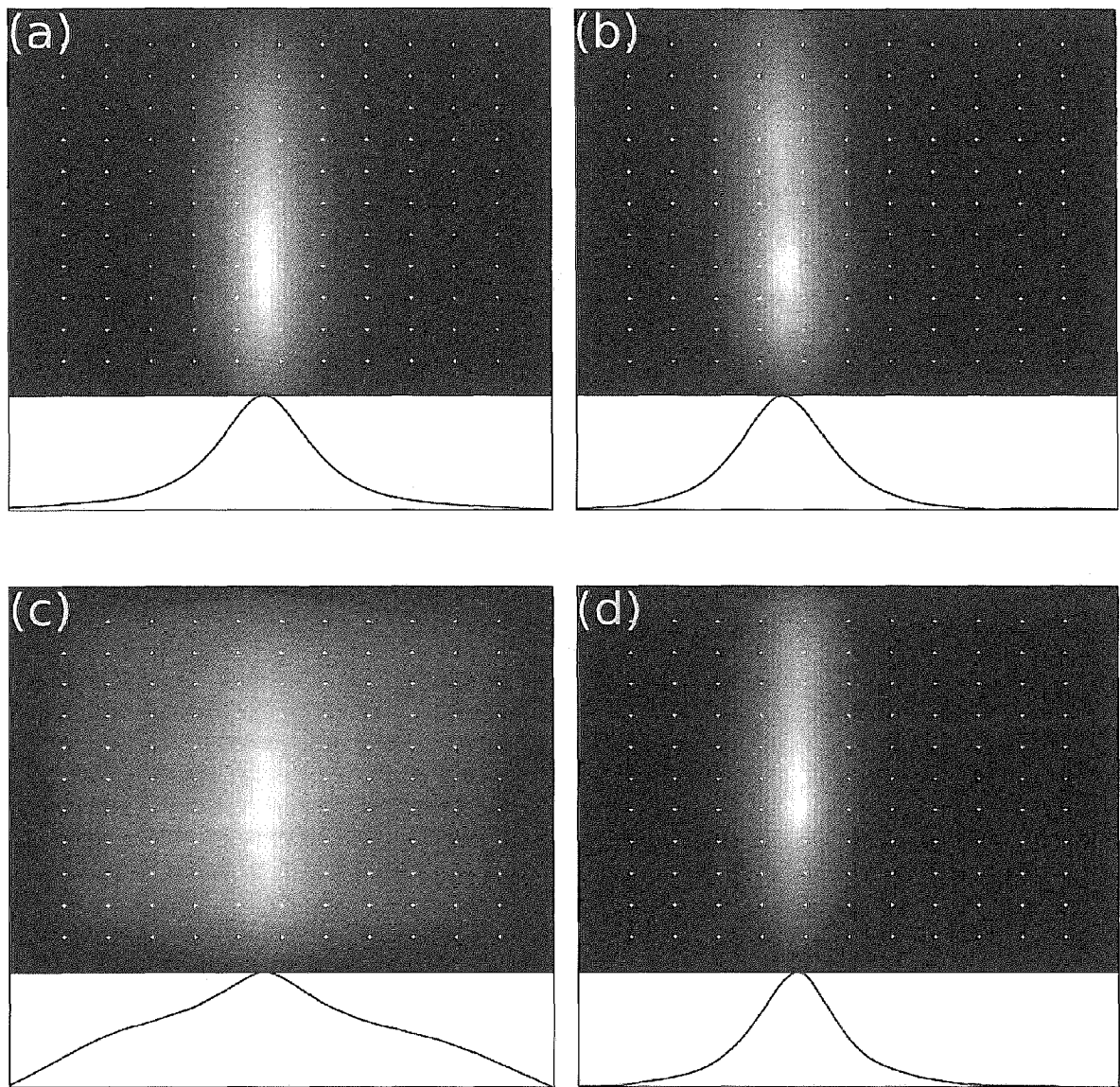


图 6

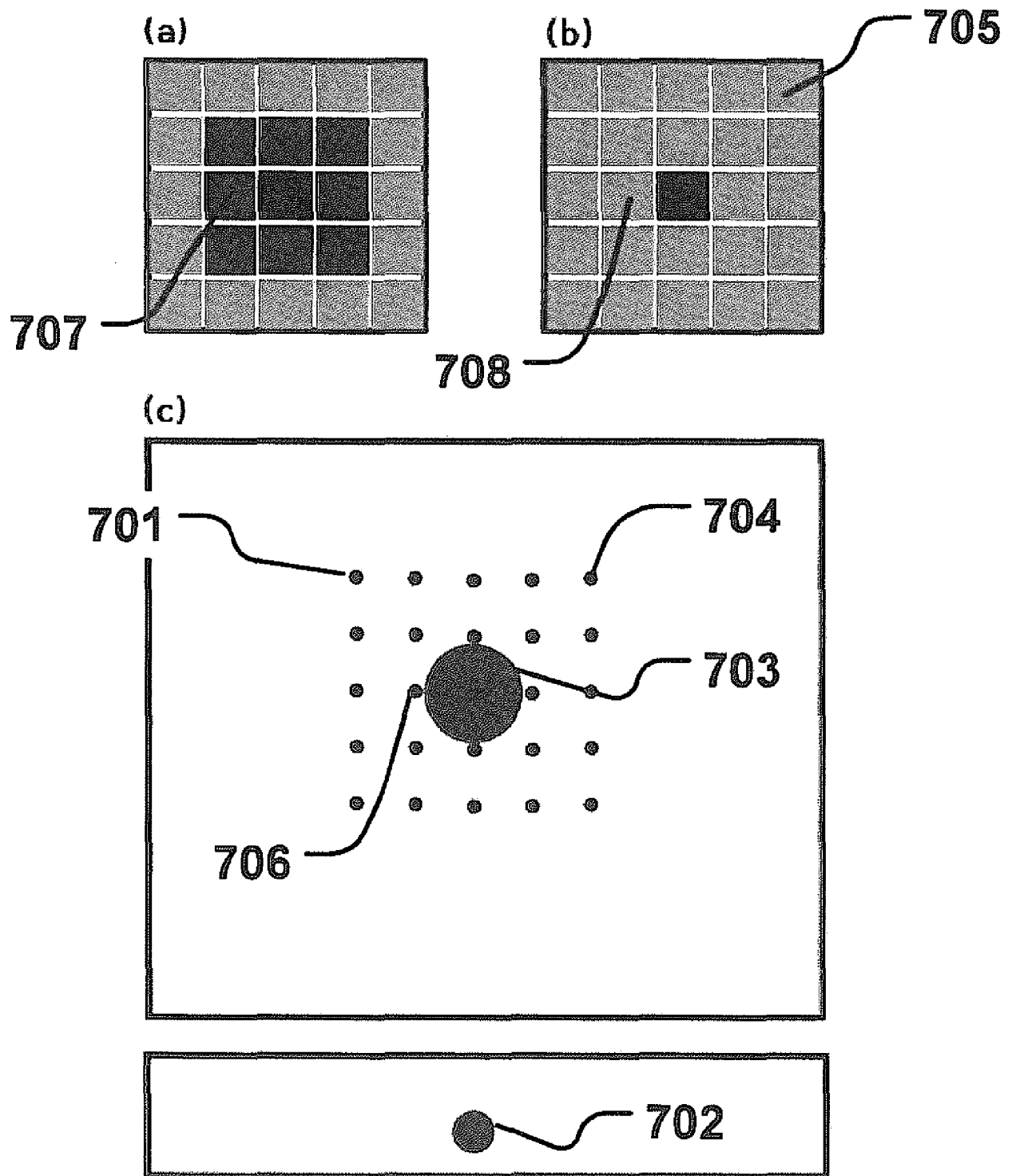


图 7

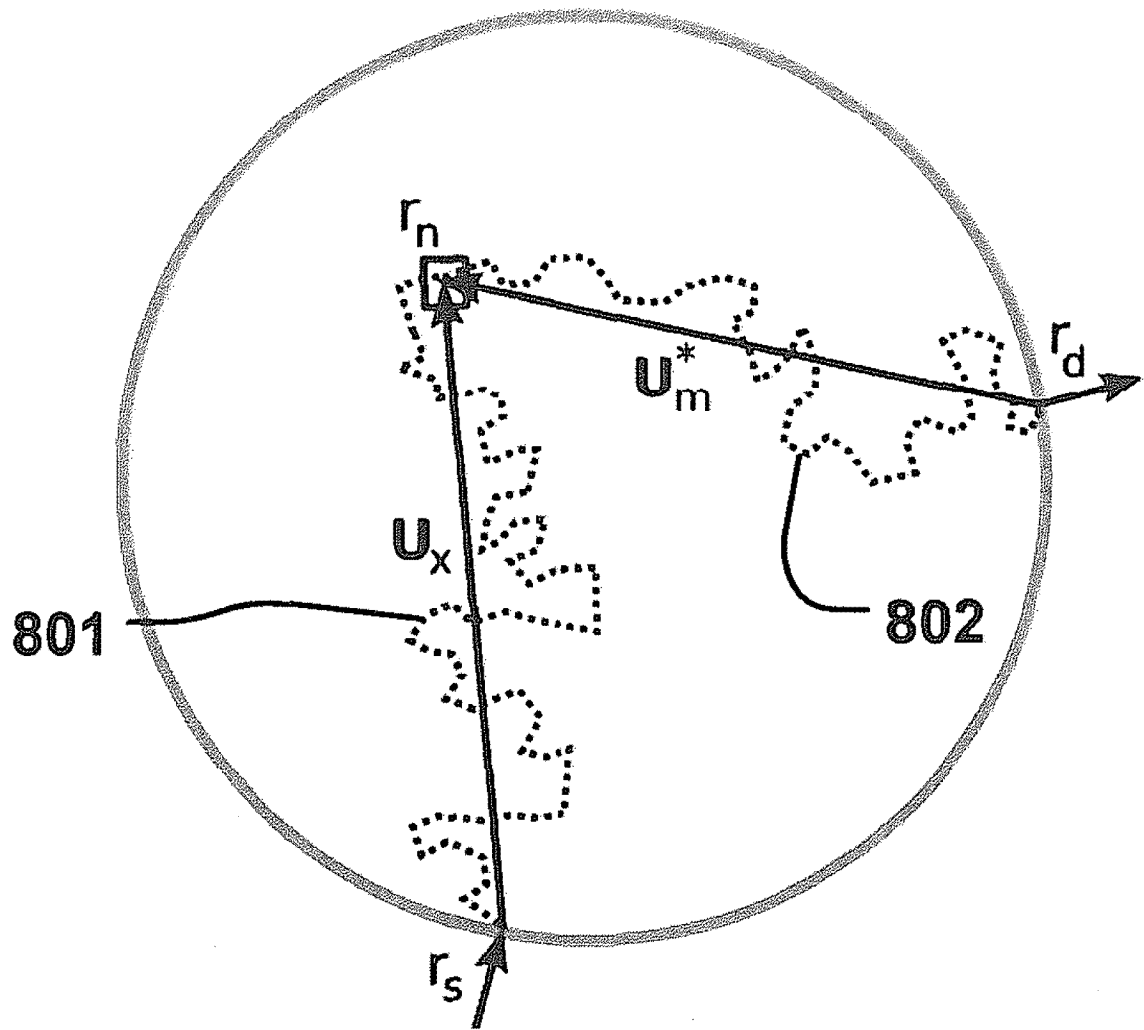


图 8

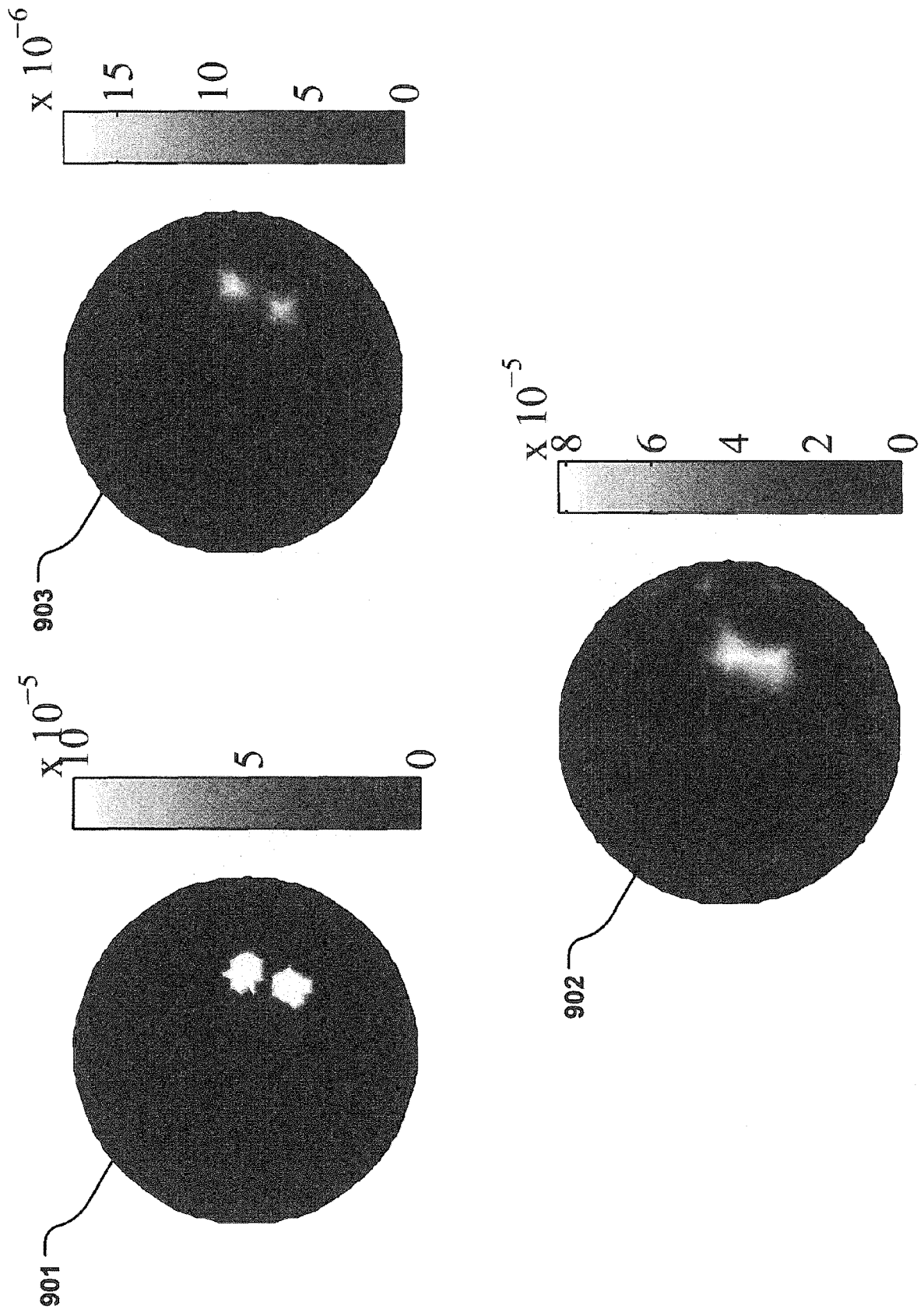


图 9

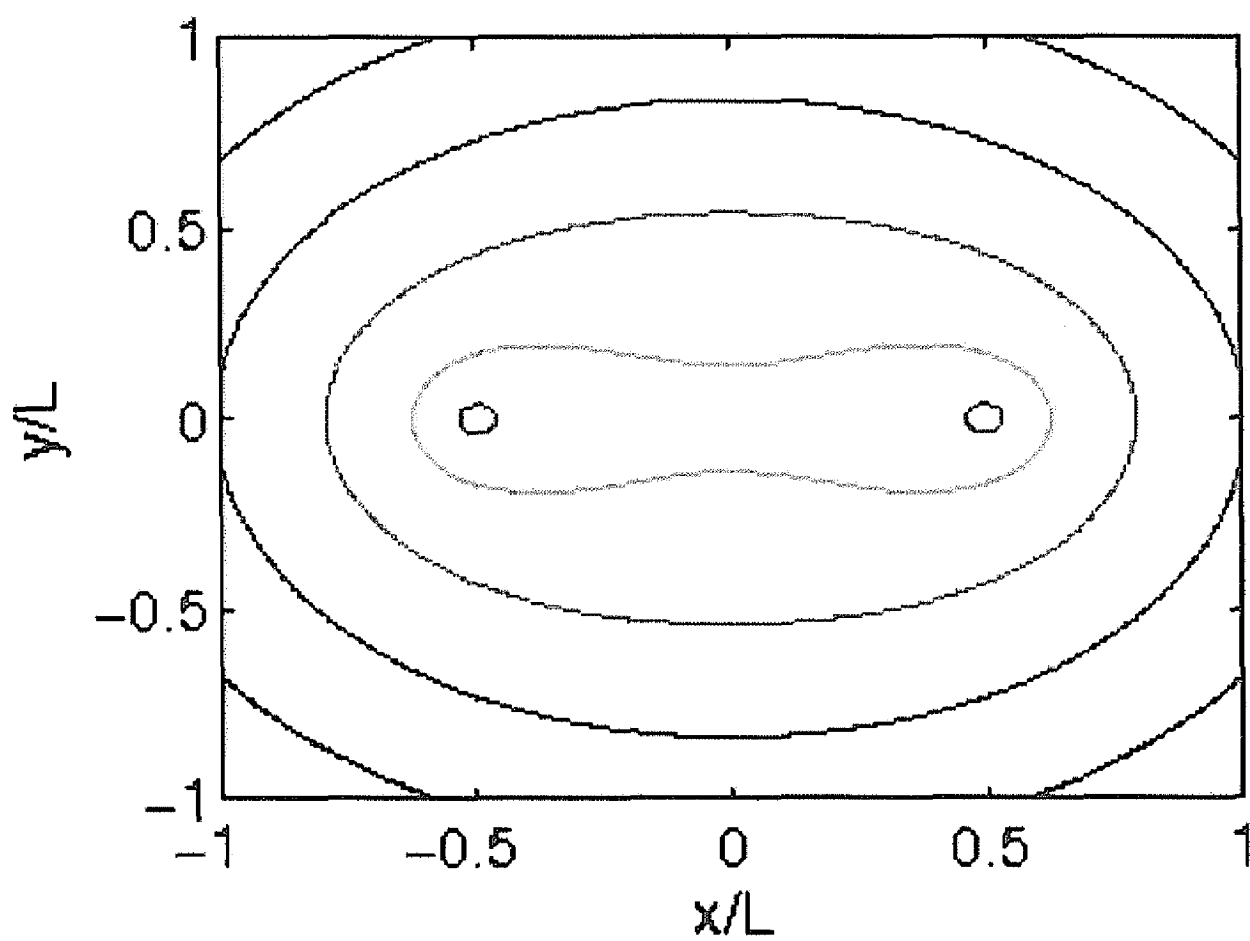


图 10A

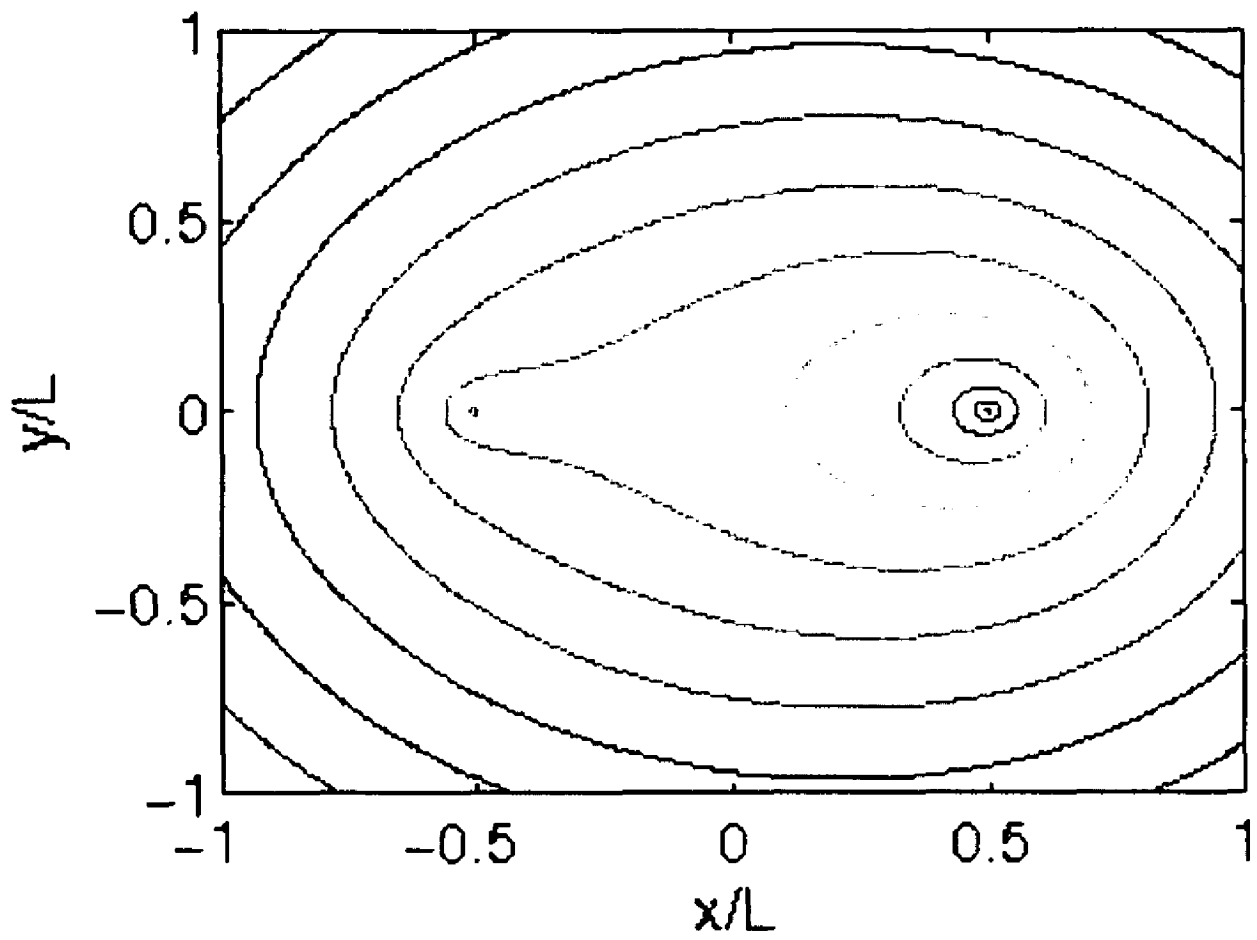


图 10B

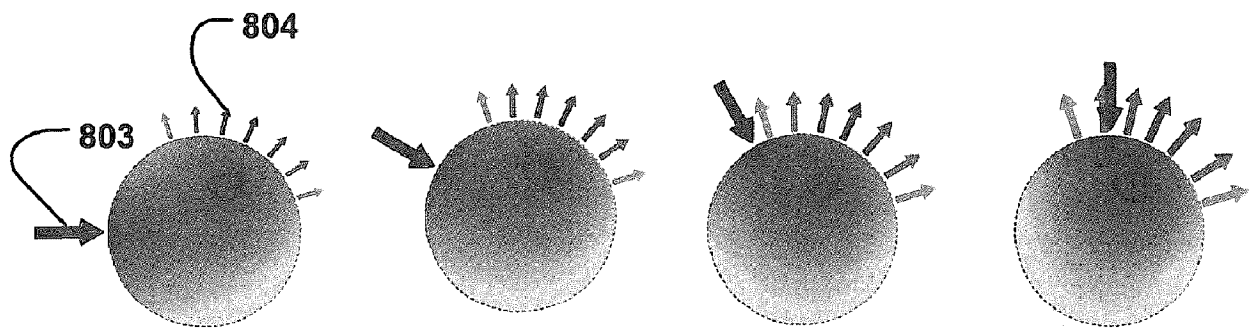


图 11

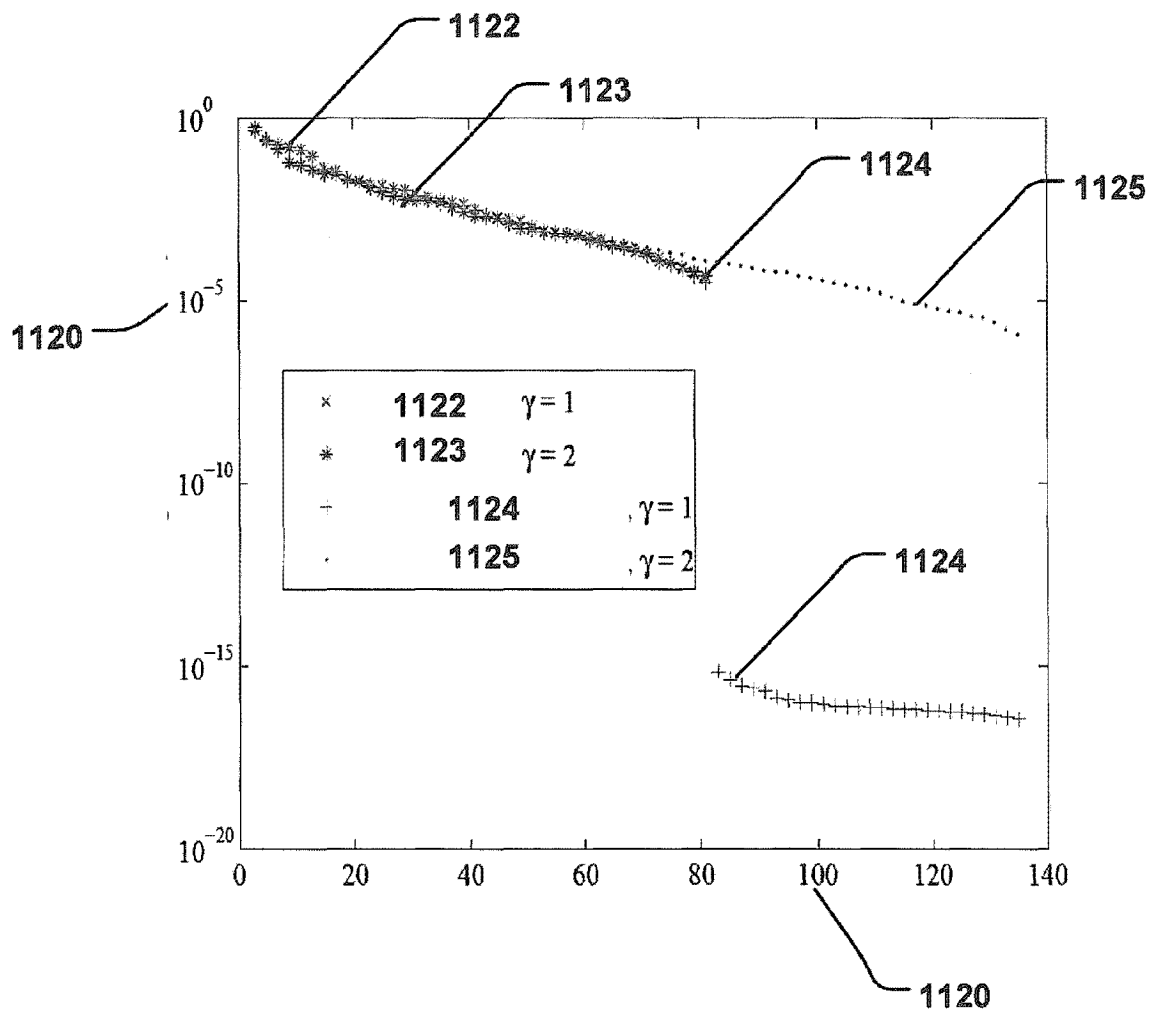


图 12

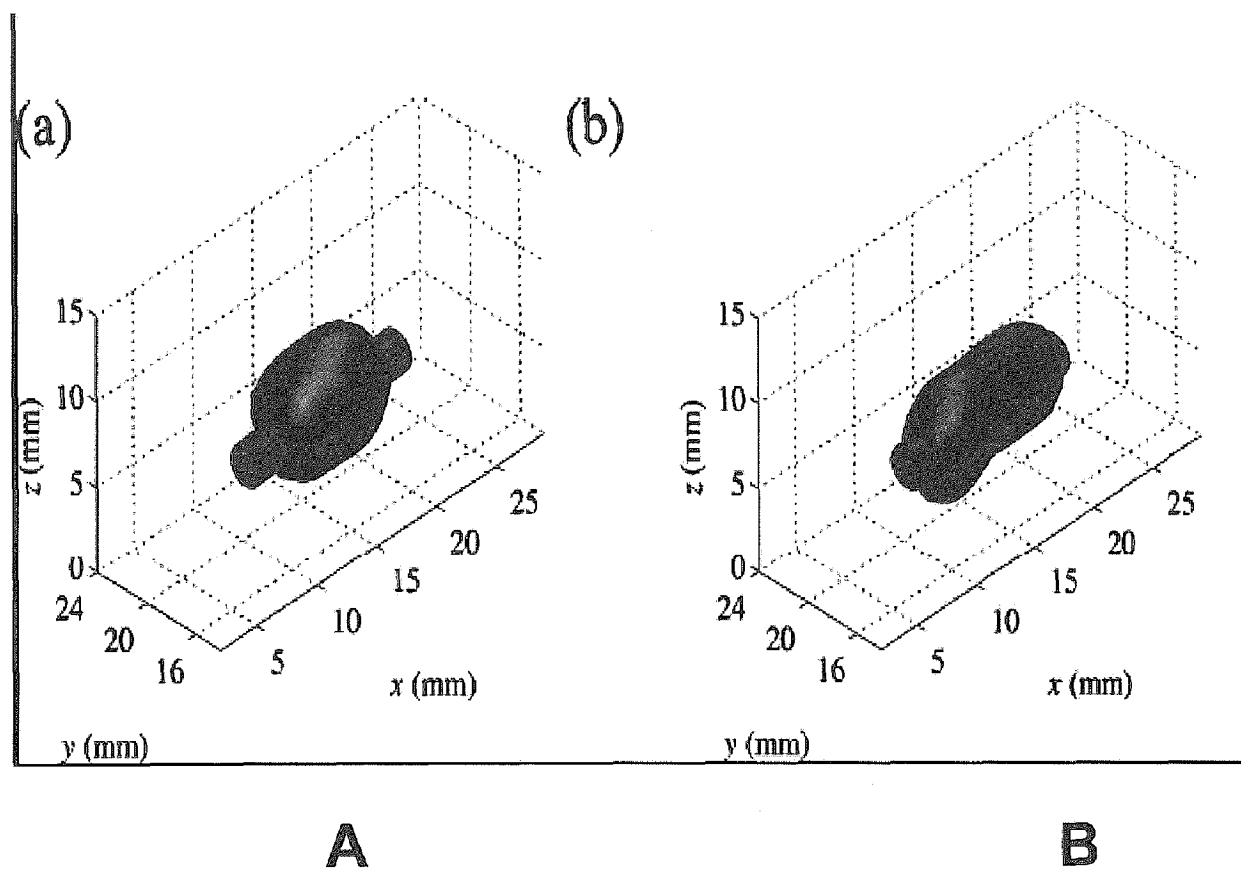


图 13A 和图 13B

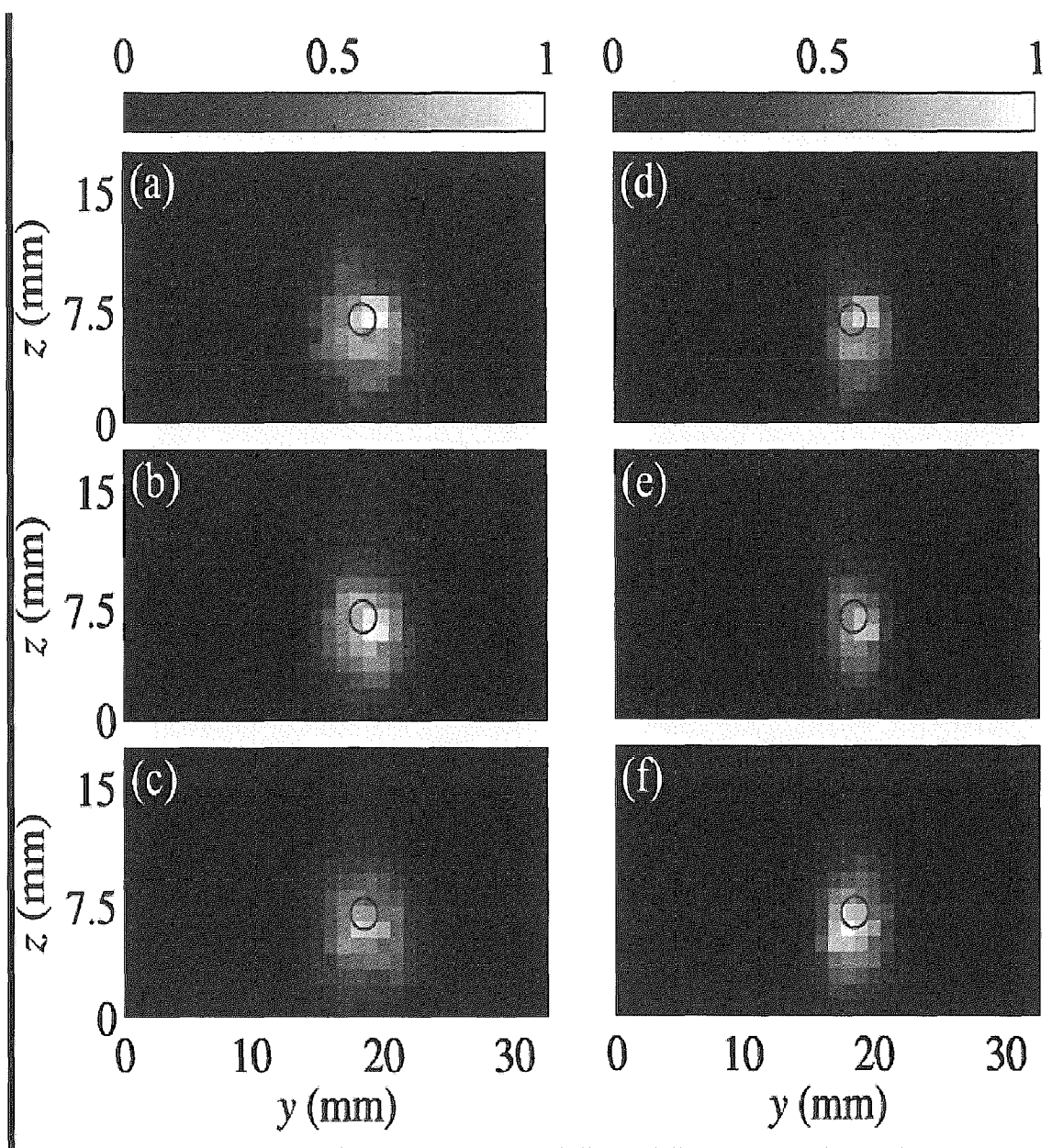


图 14A-14F

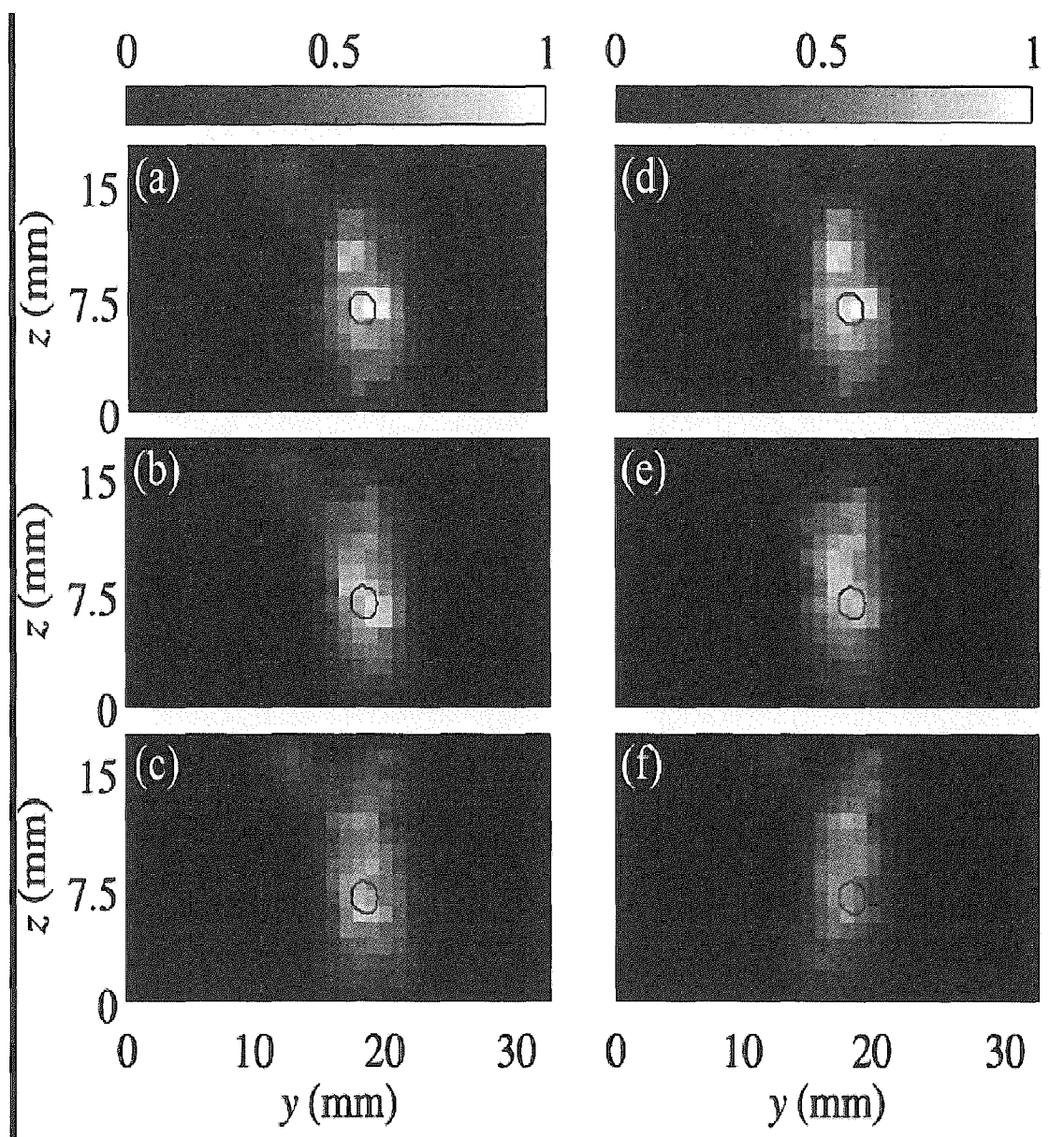


图 15A-15F

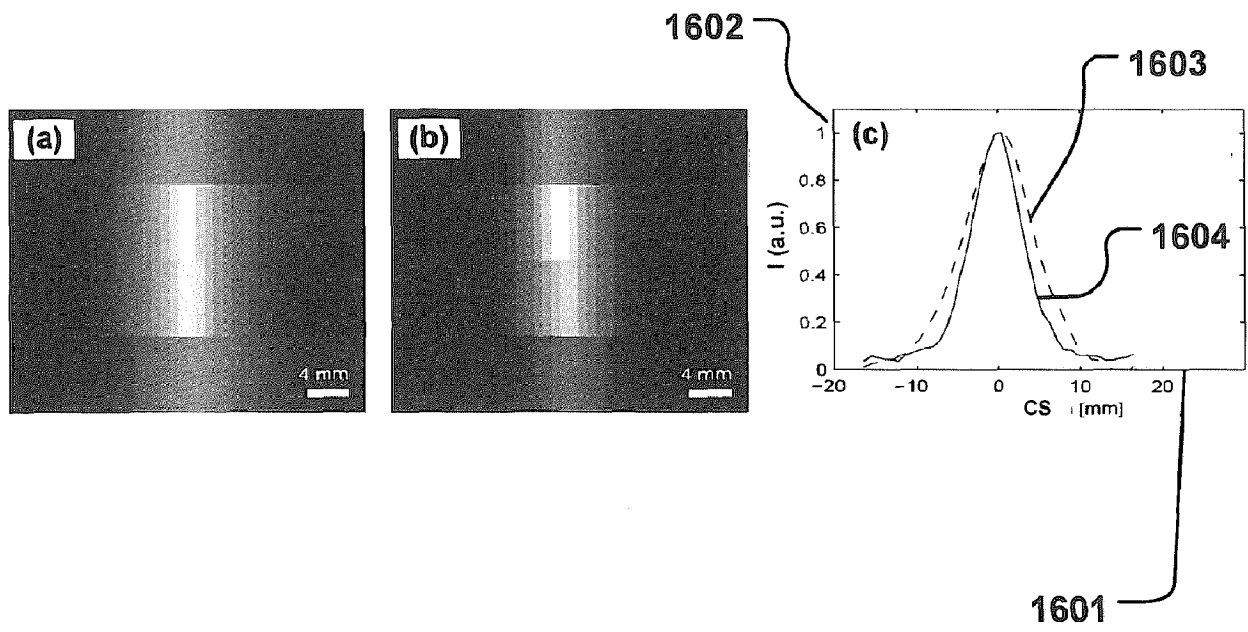


图 16