

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4607859号
(P4607859)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 B 10/00 (2006.01)
G 0 1 N 21/64 (2006.01)A 6 1 B 10/00 E
G 0 1 N 21/64 F

請求項の数 27 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2006-503890 (P2006-503890)
 (86) (22) 出願日 平成16年2月17日 (2004.2.17)
 (65) 公表番号 特表2006-520216 (P2006-520216A)
 (43) 公表日 平成18年9月7日 (2006.9.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/005785
 (87) 国際公開番号 W02004/075032
 (87) 国際公開日 平成16年9月2日 (2004.9.2)
 審査請求日 平成19年2月13日 (2007.2.13)
 (31) 優先権主張番号 60/448,349
 (32) 優先日 平成15年2月19日 (2003.2.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/471,706
 (32) 優先日 平成15年5月19日 (2003.5.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503169585
 サイセル・テクノロジーズ、インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国ノースカロライナ州275
 60、モリスヴィル、ゲイトウェイ・セン
 ター・ブルヴァード 3800、スウィ
 ート 308
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光分析物と連動して作動するインビボ蛍光センサ、システム及び関連方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者（ヒトを除く）における治療法のインビボ臨床有効性を決定する方法であって、
 身体内に埋め込まれるのに適合するセンサから、少なくとも1つの励起光信号を、前記
 少なくとも1つのセンサの近位の組織へ放射させるステップと、

前記被験者の対象領域内の蛍光に対応する信号を前記少なくとも1つのセンサからイン
 ビボで検出するステップと、

前記検出された信号を被験者の身体の外部の場所へ中継するステップと、及び

前記投与された蛍光前標識した分析物、自然蛍光分析物及び/又は被験者内にあると蛍
 光を示す分析物に対する前記被験者の局所的蛍光反応を決定するために経時的に信号をモ
 ニタリングするステップと、を含む方法。

【請求項 2】

前記励起光が約20mmまで離れている組織に浸透することができ、そして前記標識が
 約665から約695nmの波長の蛍光反応を生成する約630から約660nmの励起
 波長である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記励起光が約20mmまで離れている組織に浸透することができ、そして前記標識が
 約400から約695nmの蛍光反応波長を生成する約400から約660nmの励起波
 長である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも1つのセンサが約25cmまでの表面下深さで身体内に埋め込まれるのに適合する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記少なくとも1つの励起光信号が出力強度における所定変動を有する複数の信号を含み、そして前記検出された蛍光を使用して光学的プロファイリングデータが生成される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

投与された遺伝子療法の結果として生じるタンパク質の発現を決定するために前記モニタリングするステップが実行される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記モニタリングするステップに基づいて前記蛍光分析物に対する表現型反応を決定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記モニタリングするステップが前記蛍光分析物に対する癌細胞の感受性又は受容性を決定するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

検出された蛍光信号に結び付いたデータを使用して、(a)埋め込まれたセンサの近位で受容された分析物の濃度又は用量を計算するステップと、(b)前記蛍光分析物の薬学的又は薬物動態学的活性を評価するステップと、(c)腫瘍部位へのA b付着を確認するステップと、(d)治療により過度に影響を受けていないことを確認するために非標的部位をモニタリングするステップと、(e)細胞特性の変化をモニタリングするステップと、(f)計算された用量又は濃度データを使用して前記被験者に投与される蛍光分析物の治療量を調整又はカスタマイズするステップと、(g)標的部位でのミセル濃度を確認し、次にその確認に基づいて毒素放出を刺激するステップと、及び(h)遺伝子療法による組み換えから生じたタンパク質の発現をモニタリングするステップと、のうちの少なくとも1つを実施するステップと、をさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項10】

体内に投与された蛍光分析物と関連する被験者における蛍光を検出するための検出システムであって、前記蛍光分析物が蛍光体標識分析物、自然蛍光分析物及び前記被験者の体内に投与されると蛍光を示す分析物のうちの少なくとも1つを含み、前記検出システムが、インビボ作動のために構成された少なくとも1つの蛍光センサであって、前記少なくとも1つのセンサが、少なくとも間欠的に、蛍光分析物の投与後少なくとも約24時間に及び期間にわたって励起光信号を放射し、放射された励起光信号に反応した身体内の局所組織内の蛍光分析物からの蛍光を検出するように構成されているセンサと、及び励起信号の出力を方向付けて前記少なくとも1つのセンサから検出された蛍光に結び付いている蛍光強度信号データを受信するように構成された少なくとも1つのセンサと機能的に結び付いているプロセッサであって、前記プロセッサが少なくとも1つのモニタリング期間にわたって複数の時点に標的局所組織内の蛍光分析物の取り込み及び残留の1つ以上と結び付いた強度を経時的にモニタリングするためのコンピュータプログラムコードを含むプロセッサと、を含む検出システム。

【請求項11】

コンピュータプログラムコードが、前記モニタリングを行い、前記複数の時点に標的局所組織内の蛍光分析物の蛍光強度を連続的に決定し、そして次に前記蛍光分析物に対する薬物動態学的、薬力学的、生体動力学的反応及び/又は対象領域内の組織内の生物活性を決定するためのものである請求項10に記載のシステム。

【請求項12】

前記少なくとも1つのセンサが個別に作動可能であるように構成された複数のセンサであり、そして前記プロセッサが各1つへ個別的にポーリングするように構成されている、請求項10に記載のシステム。

【請求項13】

前記少なくとも1つのセンサを包み込む筋膜層と、約50～100ミクロンの厚さを有する線維芽細胞とのいずれか一方又は両方を通して励起光を生成するように構成されている、請求項10に記載のシステム。

【請求項14】

前記センサが約20mmまで離れている組織へ浸透できる励起光を生成するように構成されている、請求項10に記載のシステム。

【請求項15】

前記センサが約400から約660nmの波長を有する励起光信号を生成するように構成されている、請求項10に記載のシステム。

【請求項16】

前記センサが約400から約695nmの蛍光反応波長を検出するように構成されている、請求項15に記載のシステム。

【請求項17】

前記センサが前記励起光を生成するように構成されているレーザダイオードを含み、該レーザダイオードがパルスレーザダイオードとして前記励起光を生成し、前記パルスレーザダイオードが約10Hzから約1KHzの間の周波数及び約1から約10%の負荷サイクルで作動させられる、請求項10に記載のシステム。

【請求項18】

前記システムが出力における所定の段階的変動を有する複数の信号を生成するように構成されており、そしてそれに反応して生成される前記検出された蛍光を使用して光学的プロファイリングデータが生成される、請求項10に記載のシステム。

【請求項19】

前記センサが身体内に埋め込まれるのに適合し、さらに検出器を含み、そして前記センサ本体が対象波長の蛍光と結び付いた光線が前記センサ本体の内部から前記検出器へ移動するのを選択的に許容するその壁の上に形成された円筒形光学フィルタを含む、請求項10に記載のシステム。

【請求項20】

前記センサが、前記励起光が前記円筒形フィルタを通して前記センサ本体を出ていくのを許容するために前記レーザダイオードと整列した複合フィルタをさらに含む、請求項19に記載のシステム。

【請求項21】

前記センサが、前記励起光が前記円筒形フィルタを通して前記センサ本体を出ていくのを許容するために前記レーザダイオードと整列した光ウィンドウをさらに含む、請求項19に記載のシステム。

【請求項22】

前記センサが、蛍光が進入して約1.15Rから約0.54R（式中、「R」は前記センサ本体の断面の半径である）の幅を有する検出器と係合することを許容するように構成されており、前記円筒形フィルタが前記センサ本体の長さより短い長さにある前記センサ本体の周囲にわたって実質的に連続的に伸びている、請求項21に記載のシステム。

【請求項23】

前記励起源がレーザダイオードを含み、前記検出器が光ダイオードを含み、前記センサ本体がガラス製センサカプセルであり、そして前記センサが内部反射を阻害するために前記検出器及びダイオードを封入しているガラスカプセルへレーザダイオード及び光ダイオードを結合させるために屈折率整合されているエポキシをさらに含む、請求項10に記載のシステム。

【請求項24】

前記センサが第2検出器をさらに含み、前記第1検出器が、蛍光信号がそれを通して移動することを選択的に許容するフィルタと機能的に結び付いており、そして前記第2検出器が励起光信号を検出するように構成されており、そして前記第2検出器からのデータを使用して第1検出器からのデータが正規化される、請求項23に記載のシステム。

【請求項 25】

前記第 1 及び第 2 検出器が前記センサ本体内で、並列整列で保持される、請求項 24 に記載のシステム。

【請求項 26】

前記第 1 及び第 2 検出器が背中合わせ整列で保持される、請求項 24 に記載のシステム。

【請求項 27】

前記励起源が相違する励起波長及び / 又は出力で作動する第 1 及び第 2 ダイオードレーザを含む、請求項 10 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2003 年 2 月 19 日に提出された「In Vivo Fluorescence Sensors, Systems, and Related Methods Operating in Conjunction with Fluorescently Labeled Materials」と題する米国仮特許出願第 60/448,349 号及び 2003 年 5 月 19 日に提出された「In Vivo Fluorescence Sensors, Systems, and Related Methods Operating in Conjunction with Fluorescently Labeled Materials」と題する米国仮特許出願第 60/471,706 号に対する優先権を主張するものであり、上記に挙げた文書の内容全体は参照して本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

細胞及び組織を試験するための蛍光レポータの使用は知られており、この技術に関する一連の研究はますます多く実施されている。しかし、これらの研究の大部分はエックスピボサンプルを取り扱っており、現在利用できる蛍光顕微鏡用ツールを考えると生体組織へのインビボ (in vivo) 適用は困難である。

【0003】

抗癌療法における治療用抗体 (「Ab」) の使用は比較的新しい試みである。米国内で使用するために、現在は数種の化合物 (例、ハーセプチン (HERCEPTIN)、リツキサン (RITUXAN)、ゼパリン (ZEVALIN)) が承認されており、より多くの化合物が開発中である。これらの化合物は難治性疾患の治療に限定されており、現在は第一選択療法としては使用されていない。Ab 療法がこのような扱われる原因は、作用に関する明確な知識が欠如している点にある。Ab 療法が有効となるためには、標的へ選択的に付着できなければならず、さらに臨床作用を発揮又は誘導するために十分な期間にわたり標的へ付着したままとならなければならない。だが現時点では、インビボの標的組織内で臨床作用のそのような測定を行える、実行可能又は容認可能な方法はない。

【0004】

蛍光現象については、明確に試験かつ理解されている。生物学で適用されるように、適当な波長で蛍光を発し、一定の分子量を有し、特定の方法で基質に結合し、光退色に抵抗するなどの化合物を選択することに焦点が置かれている。例えば、多数の市販の蛍光体 (例、ALEXA シリーズ、Molecular Probes 社 (オレゴン州ユージーン)) は 500 ~ 900 ダルトン範囲内であるが、他方緑色蛍光タンパク質はほぼ 30,000 ダルトンである。蛍光体は基質分子と共役させる、又は間接的に活性化もしくは結合させることができる。一部の重要な化合物、例えばドキシソルピシン (DOXORUBICIN) は自然蛍光であるが、蛍光の強度はモニタリング目的には最適ではない可能性がある。様々な波長で種々の蛍光体を試験できる能力は、難解な多角的標識試験を可能にできるという点で望ましい。

10

20

30

40

50

【0005】

内視鏡視下技術を用いて身体内の組織の光学特性をマッピングするために、例えば Potential New Endoscopic Techniques for the Earlier Diagnosis of Pre-Malignancy, Rollins et al., Best Pract Res Clin Gastroenterol, 15(2):227-47(2001)において考察されたように大量の研究が実施されてきた。一般に、研究者らは、良性又は悪性組織の特徴的痕跡を生み出すことを試みて組織吸収及び内因性蛍光スペクトルを評価してきた。例えば、腺腫性結腸ポリープは、Diffuse Reflectance Spectroscopy of Human Adenomatous Colon Polyps in Vivo, G. Zonios et al., Applied Optics 38(31):6628-37(1999)で考察されたように拡散反射分光法によって試験された。食道癌(Light-Induced Autofluorescence Spectroscopy for the Endoscopic Detection of Esophageal Cancer, B. Mayinger, Gastrointest Endosc 54(2):195-201(2001))、結腸ポリープ(Colonic Polyp Differentiation Using Time-Resolved Autofluorescence Spectroscopy, M. Mycek, Gastrointest Endosc 48(4):390-4(1998))、ならびに頭頸部癌(In Vivo Native Cellular Fluorescence and Histological Characteristics of Head and Neck Cancer, S. Schantz, Clin Cancer Res 4(5):1177-82(1998))の特性解析のためには自己蛍光分光法が使用されてきた。特に光力学療法(例、Mayinger, 2001)に関連するように、外因性蛍光体の導入もまた試みられてきた(例、Fluorescence Endoscopy of Gastrointestinal Disease: Basic Principles, Techniques, and Clinical Experience, H. Stepp, Endoscopy 30(4):379-86(1998))。残念なことに、この種の内視鏡視下技術を用いて詳細な動態を追跡することは、おそらく商業的には望ましくないであろう。

【0006】

小動物におけるインビボ光学的イメージングのために数種のアプローチが提案されてきた。Anti Cancer, Inc. (カリフォルニア州サンディエゴ)は、例えば Visualizing Gene Expression by Whole-Body Fluorescence Imaging, M. Yang, Proc Natl Acad Sci 97(22):12278-12282(2001)で考察されたように、緑色蛍光タンパク質(GFP)に共役したプローブの広範なカタログを開発し、ヌードマウスにおける腫瘍のインビボ画像を生成した。しかし、組織による可視光線の強力な減衰及び散乱が生じるために、この技術は皮膚表面から数ミリメートル以内の腫瘍に限定される。Xenogen Inc. (カリフォルニア州アラメダ)は、Visualizing the Kinetics of Tumor-Cell Clearance in Living Animals, T. Sweeney, Proc Natl Acad Sci 96(21):12044-9(1999)に考察されているように、腫瘍細胞への抗腫瘍薬の作用などの、表面下事象をイメージングするための生物発光レポータ(ルシフェラン(LUCIFERAN))及び高感受性外部カメラの使用を提案している。だが同様に、この技術も組織による光信号の減衰によって妨害されるので、したがって表面の近位に腫瘍を有するマウスに限定される。必要とされる長い積分時間は詳細な動態の追跡を危うくする。これらの技術はいずれもヒトへの臨床適用に移せるとは思われない。

【0007】

上記にもかかわらず、依然としてヒトにおいて臨床的に有用な深さで分析物の蛍光を経時的にモニタリングできるシステムに対する必要がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、被験者、特にヒト被験者において臨床的に有用な深さで蛍光分析物の蛍光を評価するために臨床的に適切なツールを提供するために、蛍光分析物、例えば蛍光標識した分析物、自然蛍光分析物及び／又は被験者に導入されると蛍光を示す分析物をインビボでモニタリングする方法、システム、装置及びコンピュータプログラム製品を提供する。特定の実施形態では、これらの深さは約1 cmから約25 cm以上、典型的には約5 ~ 25 cmであってよく、そして特定の実施形態では、表面から約10 ~ 20 cmであってよい。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の実施形態は、標的[局所(localized)]内部領域におけるインビボ蛍光の薬物動態学的(pharmacokinetic)及び／又は力学的測定値を提供するプローブ及びシステム(カテーテル使用装置、光ファイバ、及び／又は完全埋め込み型装置)を提供できる。

【0010】

本発明の実施形態は、反応及び転帰(outcome)を改善するために治療法を個別化及びカスタマイズできる、標的部位で受容した内部用量を評価できる、及び／又はさなければ体内の蛍光分析物もしくは化合物の治療反応もしくは送達をモニタリングできる費用効果的な方法、システム、装置及びコンピュータプログラム製品を提供できる。特定の実施形態では、これらの方法、システム、装置及びコンピュータプログラム製品は、腫瘍又は正常(非標的)組織に治療が及ぼす影響に関するデータを提供できる。

20

【0011】

本発明は、選択された反応又は観察期間にわたって身体の標的領域内の局所組織から放射される、検出された蛍光をインビボ動的モニタリングするための方法、システム、装置及びコンピュータプログラム製品を提供する。一般に記載されているように、モニタリングは、治療タイプ(抗体療法及び薬物療法を含む)を評価又はモニタリングするため、及び／又はデータを入手してインビボで検出された蛍光に関連する代謝パラメータ、生物力学パラメータ、又は予測変数を評価するために一般的代謝評価として実施できる。データは、特に、(a)計画された治療が有効である見込みを(初回又はその後の治療量が実際に被験者へ投与される前及び／又は後に)予測又は評価するため、(b)その被験者にとって適切な臨床反応を提供すると思われる1種以上の薬物を同定するため、(c)腫瘍内動態をモニタリングするため、(d)薬物動態学及び／又は薬力学(pharmacodynamics)について試験するため、(e)薬物もしくは抗体の取り込み及び／又は残留又は腫瘍殺滅もしくは病的状態に変性剤、治療、又は手技が及ぼす影響を試験するため、(f)蛍光体標識分析物(薬物であろうと抗体であろうと、所望の治療について)の取り込み、トラッピング、又は残留を測定するため、(g)治療に対する個人の生体反応を試験するため、(h)特定の治療選択肢を除外するため、(i)代謝活性又は挙動を評価するため、及び(j)遺伝子もしくはタンパク質発現の部位特異性又はレベルについて試験するために使用できる。

30

40

【0012】

あるいは、モニタリングは標的領域における局所組織で受容された用量を定量的に測定するために実施することができる。他の実施形態では、本発明は検出された蛍光を使用して体内の分析物、抗体、代謝産物又はその他の治療薬を含む特定の医薬品、薬物製品及び／又はそれらの誘導体の薬物動態学/薬力学又はインビボ性能を分析することができる。

【0013】

50

有益なことに、特定の実施形態では、本発明は、インビボで入手した蛍光体データを使用して、実質的にリアルタイムで被験者の1つ以上の選択された生物力学的パラメータ又は予測変数を評価できる費用効果的な最小侵襲性の方法、システム、装置及びコンピュータプログラム製品を提供することができる。装置及びシステムの特定の実施形態は、正常及び悪性組織間の反応における差及び/又は個々の腫瘍もしくは腫瘍部位(又は相違する時点での同一腫瘍部位)の生理学及び生物学における差を同定するため、同定された同一物に関する情報を利用して、個別化した治療決定を開発するため、及び/又は治療転帰を予測し、腫瘍反応を改善するために治療を変更するために構成できる。

【0014】

特定の実施形態では、被験者の2つの相違する蛍光体反応プロフィールを生成できる。2つの相違するプロフィールは、時間的に離れた時点での特定の治療及び/又は相違する分析物を用いた特定治療の前及び/又は後に入手できる。

【0015】

その他の実施形態は、その投与に先行する治療量の薬剤に対する被験者の反応を予測するために、典型的には治療量の送達の前及び時間的に近い時点に評価された非治療量の薬物のインビボで検出された取り込み、トラッピング及び/又はその他の所望の反応(選択された時間にわたる)に基づいて個別化された治療プロトコルの向上を可能にする。そのような送達前評価能力は、臨床的に有効ではないと思われる細胞毒性薬の不要な有効ではない投与を減少させて、患者にカスタマイズした化学薬品又は治療薬の選択の向上を可能にする。そこで、本発明の実施形態は、蛍光分析物の取り込み及び/又は残留と結び付いている検出された蛍光を測定することによって、計画された送達又は同一物の投与に時間的に近い時点に、特定療法に対する腫瘍の感受性又は受容性を同定することができる。さらに、これらのデータを使用すると、標的部位での治療分析物における取り込み又は残留又は非残留又は減少に基づいて、その後の療法を投与すべきかどうかを決定することができる。そのようなデータは、確立された基準に基づいた治療の送達よりむしろカスタマイズされた治療計画を可能にできる。

【0016】

その他の実施形態は、治療サイクル中にデータを収集し、検出された動態学的活性データに基づいて臨床有効性の見込みを決定するためにデータを評価する。

【0017】

本発明の特定の実施形態は、被験者における治療法のインビボ臨床有効性を決定する方法に向けられる。この方法は、(a)身体内の対象領域内の組織内にセンサをポジショニングするステップと、(b)被験者に蛍光分析物を投与するステップと、(c)該被験者の対象領域内の分析物から放射された蛍光に対応する信号を埋め込まれたセンサからインビボで検出するステップと、(d)該信号を被験者の身体の外部の場所へ中継するステップと、及び(e)選択された治療のインビボ臨床有効性及び/又は対象領域内の代謝活性のうちの少なくとも1つを予測又は評価するために投与された蛍光体分析物に対する被験者の反応を決定するために(中継された)信号を経時的にモニタリングするステップと、を含むことができる。

【0018】

蛍光体分析物が蛍光体標識分析物である特定実施形態では、蛍光体標識分析物は、薬剤の臨床試験又は前臨床試験(又はその他の新薬開発試験)において薬物動態学的/薬力学的評価を受けている標識されていない対応する薬物又は抗体の蛍光体標識されたバージョンであってよい。他の実施形態では、標識分析物は細胞毒性抗癌療法のための化学療法薬のアナログであってよい。

【0019】

本発明のその他の実施形態は、全身性及び/又は局所投与された蛍光体分析物から放射されたインビボ蛍光を検出するための検出システムに向けられる。このシステムには、インビボ作動のために構成された少なくとも1つの蛍光体センサが含まれる。このセンサは、身体内の標的局所組織内又はその近位で、励起光(光学的放射線)を生成し、標識分析

10

20

30

40

50

物又はその生化学的構成要素から放射された蛍光を検出するように構成されている。このセンサは、繰り返しして励起し、そして次に少なくとも約 0.25 ~ 2.4 時間、及び典型的には少なくとも約 0.25 ~ 4.8 時間におよぶ期間にわたって少なくとも間欠的に放射された蛍光を検出するように構成されている。本発明の特定の実施形態では、評価期間又はデータ収集期間は数秒間という短期間、又は数週間から 1 カ月間以上という長期間にわたって実施されてよい。

【0020】

評価期間は時間的に近くてよく、そして少なくとも時間的に相互から離れて投与される計画された複数の治療の各々の前であってよい。このシステムには、さらにまた少なくとも 1 つの (各) センサと機能的に結び付けられているプロセッサが含まれる。プロセッサは、センサから検出された蛍光に関連する信号データを受信するように構成されている。プロセッサには、標的局所組織内の蛍光分析物の時間依存性測定プロフィール及び / 又は取り込み及び / 又は残留と結び付いている選択されたインビボパラメータをモニタリングするためのコンピュータプログラムが含まれる。

【0021】

本発明のさらにまた別の実施形態は、計画された抗癌療法レジメンに対する個人の反応を評価するためのコンピュータプログラム製品に向けられ、該コンピュータプログラム製品はコンピュータ読み取り可能記憶媒体を含み、該媒体は該媒体中で具現化されたコンピュータ読み取り可能なプログラムコードを有する。コンピュータ読み取り可能なプログラムコードには、(a) 被験者の身体内の標的部位で局所組織内のインビボで検出された蛍光の第 1 測定値を受信するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードであって、該検出された蛍光は該被験者に投与された蛍光分析物から放射されたインビボ蛍光に対応するプログラムコードと、(b) 第 1 測定後に局所組織内で検出された蛍光分析物から放射されたインビボ蛍光の第 2 測定値を受信するためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコードと、及び (c) 第 1 及び第 2 測定値に基づいて該被験者の局所組織内の蛍光分析物の取り込み及び / 又は残留のうちの少なくとも 1 つと結び付いている選択されたパラメータを評価するための時間依存性測定プロフィールを生成するためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコードと、が含まれる。

【0022】

他の実施形態では、コンピュータプログラムコードは第 3 及び第 4 測定値 (又はそれ以降の測定値) を入手するように構成できる。

【0023】

その他の実施形態は、治療に反応して被験者の身体における標的局所部位内の組織へ送達された遺伝子療法薬の量 (用量) を定量するためのコンピュータプログラム製品及び方法に向けられる。本プログラム製品は、(a) 被験者の身体内の局所標的部位でインビボ検出された蛍光に結び付いたデータを受信するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードと、(b) 局所部位で検出された蛍光の時間依存性測定プロフィールを生成するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードと、及び (c) 時間依存性測定値に基づいて局所部位へ送達された遺伝子療法薬の量を評価するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードと、を含むことができる。

【0024】

特定の実施形態は、被験者における治療のインビボ臨床有効性を決定する方法に向けられる。本方法には、(a) 身体内の対象領域内の組織内に少なくとも 1 つのセンサをポジショニングするステップと、(b) 被験者に蛍光分析物を投与するステップと、(c) 少なくとも 1 つのセンサから少なくとも 1 つのセンサの近位の組織へ少なくとも 1 つの励起光信号を放射するステップと、(d) 該投与するステップに反応して該被験者における対象領域内の蛍光に対応する信号を少なくとも 1 つのセンサからインビボで検出するステップと、(e) 該信号を該被験者の身体の外部の場所へ中継するステップと、及び (f) 該投与された分析物への該被験者の局所的蛍光反応を決定するために該信号を経時的にモニタリングするステップと、が含まれる。

【 0 0 2 5 】

特定実施形態では、励起光は約 2 0 m m まで離れた組織に浸透することができ、そして蛍光体標識は約 6 6 5 ~ 6 9 5 n m の蛍光反応波長を生成する約 6 3 0 ~ 6 6 0 n m の励起波長を有する。本発明の特定の実施形態では、標識は約 4 0 0 から約 6 9 5 n m の蛍光反応波長を生成する約 4 0 0 から約 6 6 0 n m の励起波長を有する。

【 0 0 2 6 】

その他の実施形態は、被験者を評価する方法に向けられる。これらの方法には、(i) 被験者に蛍光分析物を投与するステップと、(i i) 所望のモニタリング期間にわたって埋め込まれたセンサから励起光を繰り返し放射させるステップと、(i i i) 励起光を出力する埋め込まれたセンサを使用して励起光に反応した蛍光強度を検出するステップと、及び(i v) 検出された蛍光強度に結び付いたデータを使用して、(a) 埋め込まれたセンサ部位の近位で受容された蛍光分析物の濃度又は用量を計算するステップと、(b) 該分析物の薬力学的及び/又は薬物動態学的活性を評価するステップと、(c) 腫瘍部位への A b 付着を確認するステップと、(d) 治療により過度に影響を受けていないことを確認するために非標的部位をモニタリングするステップと、(e) 細胞特性の変化をモニタリングするステップと、(f) 計算された用量又は濃度データを使用して該被験者に投与される治療薬の治療量を調整又はカスタマイズするステップと、(g) 標的部位でのミセル濃度を確認し、次にその確認に基づいて毒素放出を刺激するステップと、及び(h) 遺伝子療法による組み換えから生じたタンパク質の発現をモニタリングするステップとのうちの少なくとも 1 つを実施するステップと、が含まれる。

【 0 0 2 7 】

特定実施形態では、局所組織に放射された励起信号の強度は、該センサの近位の該組織の反応についての光学的プロファイリングデータを生成するために所定方法で変化させることができる。

【 0 0 2 8 】

その他の実施形態は、体内に投与された分析物と結び付いている被験者内の蛍光を検出するための検出システムに向けられる。本システムには、(a) インピボ作動のために構成された少なくとも 1 つの蛍光センサであって、該少なくとも 1 つのセンサが、少なくとも間欠的に、蛍光分析物の投与後少なくとも約 2 4 時間に及ぶ期間にわたって励起光信号を放射し、放射された励起光信号に反応して身体内の局所標的組織内の蛍光分析物からの蛍光を検出するように構成されているセンサと、及び(b) 励起信号の出力を指示し、そして該少なくとも 1 つのセンサからの検出された蛍光と結び付いた蛍光強度信号データを受信するように構成された少なくとも 1 つのセンサと機能的に結び付いた 1 つのプロセッサと、が含まれる。プロセッサには、少なくとも 1 つのモニタリング期間にわたり複数の時点に標的局所組織内の分析物の取り込み及び残留の 1 つ以上と結び付いている強度を経時的にモニタリングするためのコンピュータプログラムコードが含まれる。

【 0 0 2 9 】

さらにまた別の実施形態は、埋め込み型蛍光センサに向けられる。センサには、(a) 細長い埋め込み型の実質的に円筒形のセンサ本体と、(b) 細長いセンサ本体の外面上方に形成された円筒形光学フィルタと、(c) 約 1 ~ 2 0 m W の出力を有する所定の対象波長でセンサから励起光を生成するように構成されたセンサ本体内に保持された少なくとも 1 つの励起光源と、及び(d) 所定の対象波長で蛍光を検出するように構成されたセンサ本体内に保持された少なくとも 1 つの検出器と、が含まれる。センサは、対象モニタリング期間に渡って複数のサンプル採取間隔で間欠的に作動するように構成されている。

【 0 0 3 0 】

さらにまた別の実施形態は、蛍光分析物に対する被験者のインピボ反応を評価するためのコンピュータプログラム製品に向けられる。コンピュータプログラム製品には、コンピュータ読み取り可能記憶媒体が含まれ、該媒体は該媒体で具現化されるコンピュータ読み取り可能プログラムコードを有する。コンピュータ読み取り可能なプログラムコードは、(a) 少なくとも約 1 時間の期間を有するモニタリング期間中に複数の回数にわたり、イ

ンビボで約 1 c m から約 2 5 c m、又は約 5 c m から約 2 0 c m の深さで被験者の身体内の局所標的部位で被験者の体内に保持されたセンサからの少なくとも 1 つの励起光信号の放射を指示するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードと、(b) 経時的に該センサから標的部位の近位の組織内のインビボで検出された蛍光強度計数データを連続的に受信するためのコンピュータ読み取り可能プログラムコードであって、該検出された強度データが該励起光への暴露に反応して体内に投与される蛍光分析物を有する組織から生成した蛍光に対応するコンピュータ読み取り可能プログラムコードと、及び(c) 該被験者の局所組織内の標識分析物の信号強度、濃度、取り込み及び残留の少なくとも 1 つと結び付いている選択されたパラメータを評価するための時間依存性測定プロフィールを生成するためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコードと、を含む。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 1 】

以下では、本発明の好ましい実施形態が図示されている添付の図面を参照しながら、本発明についてより詳細に説明する。しかし本発明は、多数の相違する形態で具現化することができ、以下に記載する実施形態に限定されると見なすべきではない。本明細書を通して、類似の番号は類似の要素に関する。図面では、特定の層、構成要素又は機能が明確にするために誇張されている場合があり、他に特別に明記されていない限り破線は任意の機能又は作動を示している。さらに、作動(又はステップ)の順序は、詳細にその他のことが記載されていない限り請求項に提示された順序に限定されない。使用された場合、用語「付着した」、「結合した」、「接触させる」、「結合する」などは、他に特別に明記し

20

【 0 0 3 2 】

当業者には理解されるように、本発明は方法、データ処理システム、又はコンピュータプログラム製品として具現化することができる。したがって、本発明は全体がハードウェアの実施形態、全体がソフトウェアの実施形態又はソフトウェア及びハードウェア態様を結合した実施形態の形態を取ることができる。さらにその上、本発明はコンピュータに使用可能な記憶媒体上にコンピュータプログラム製品の形態を取ることができ、該媒体は媒体中で具現化されるコンピュータに使用可能なプログラムコード手段を有する。ハードディスク、C D - R O M、光学記憶媒体、インターネットもしくはイントラネットを支持する媒体などの伝送媒体、又は磁気記憶装置を含むいずれかの適切なコンピュータ読み取り可能媒体を利用できる。

30

【 0 0 3 3 】

本発明の作動を実施するためのコンピュータプログラムコードは、J a v a (登録商標)、S m a l l t a l k 又は C + + などのオブジェクト指向プログラミング言語で書くことができる。しかし、本発明の作動を実施するためのコンピュータプログラムコードは、さらにまた例えば「C」プログラミング言語などの従来型の手続き型プログラミング言語で書くこともできる。プログラムコードは、完全にユーザのコンピュータ上で、部分的に独立型ソフトウェアパッケージなどのユーザのコンピュータ上で、部分的にユーザのコンピュータ上で、そして部分的に遠隔コンピュータ上又は完全に遠隔コンピュータ上で実行することができる。後者のシナリオでは、遠隔コンピュータはローカルエリアネットワーク(L A N)又は広域ネットワーク(W A N)を通してユーザのコンピュータへ接続することができる、又は(例えば、インターネットサービスプロバイダを使用するインターネットを通して)外部コンピュータへ接続することもできる。

40

【 0 0 3 4 】

以下では、本発明の実施形態による方法、装置(システム)及びコンピュータプログラム製品のフローチャート図解及び/又はブロック図を参照しながら本発明について説明する。フローチャート図解及び/又はブロック図の各ブロック、ならびにフローチャート図解及び/又はブロック図におけるブロックの組み合わせはコンピュータプログラムの命令によって実行できることは理解されるであろう。これらのコンピュータプログラムの命令

50

は、コンピュータのプロセッサもしくは他のプログラム可能なデータ処理装置のプロセッサによって実行される命令がフローチャート及び／又はブロック図の１つ以上のブロックに規定された機能を実行するための手段を作り出すように、汎用コンピュータ、専用コンピュータ、又はその他の機械を製造するための他のプログラム可能なデータ処理装置のプロセッサに用意することができる。

【００３５】

これらのコンピュータプログラムの命令はさらにまた、コンピュータ読み取り可能な記憶装置内に保存された命令がフローチャート及び／又はブロック図の１つ以上のブロックに明記された機能を実行する命令手段を含む製品を製造できるように、又はコンピュータもしくはその他のプログラム可能なデータ処理装置が特定方法で機能するように指示できるコンピュータ読み取り可能記憶装置内に保存することができる。

10

【００３６】

コンピュータプログラム命令はさらにまた、コンピュータ又はその他のプログラム可能な装置上で実行する命令がフローチャート及び／又はブロック図の１つ以上のブロックに規定された機能を実行するためのステップを提供するように、コンピュータ実行工程を作製するためにコンピュータ又はその他のプログラム可能な装置上で実施すべき一連の作動ステップを誘導するためにコンピュータ、プロセッサ（デジタル信号プロセッサなど）、又はその他のプログラム可能なデータ処理装置上にローディングすることもできる。

【００３７】

一般的に言って、特定の実施形態では、本明細書に提案する装置及びシステムを使用すると、データを入手することができる、及び／又は蛍光分析物からの蛍光の発光を測定又はモニタリングすることができる。用語「蛍光分析物」には、蛍光標識した分析物、自然蛍光分析物及び／又は被験者に導入又は体内に投与されると蛍光を示す分析物が含まれる。本明細書で使用する「体内に投与された」は、分析物を摂取する、分析物を局所塗布する、分析物を静脈内投与する、分析物を吸入する、分析物を注射するのいずれかによって、分析物もしくは物質を全身性で、及び／又は局所的に被験者へ導入することを意味する。本発明の実施形態は本明細書では主として蛍光標識した分析物（蛍光体標識分析物）に関して考察されているが、本発明のその他の実施形態はこの構成に限定されない。上記で考察したように、自然蛍光分析物及び／又は被験者に導入（摂取、吸入、静脈内、注射、局所的）されると蛍光を示す分析物もまた本発明の教示から逸脱することなく使用できる。

20

30

【００３８】

用語「蛍光体標識分析物」は「蛍光標識した分析物」と交換可能に使用され、蛍光標識した抗原、核酸もしくはアミノ酸、その他の蛍光標識した内因性もしくは天然型物質、化合物又は適切な分子サイズの分子及び／又はそれらの誘導体、代謝産物、又は構成要素、ならびに例えば医薬品もしくはそれらの誘導体などの蛍光標識した外因性物質及び／又は分子など、ならびにそれらの組み合わせを含むが、それらに限定されない。

【００３９】

用語「自然蛍光分析物」は、これらの分析物が自然蛍光化合物を有するので、上記のように「蛍光体標識」されていない物質及び／又は分子を意味する。自然蛍光分析物には、カンプトテシナナログ（カンプトテシン（CAMPOTHECIN））及び／又はアドリアマイシン（ドキシソルピシン（DOXORUBICIN））を含むことができるが、それらに限定されない。最後に、被験者の体内に投与又は導入されると蛍光を示す分析物は、身体の外では蛍光成分を有していなくてもよいが、インビボでの生化学的活性に反応して蛍光性になる分析物である。これらの分析物のタイプにはカテプシン（CATHEPSIN）B、カテプシンD、MMP-2、カテプシンK、トロンビン（THROMBIN）、カスパーゼ（CASPASE）3などを含むことができるが、それらに限定されない。

40

【００４０】

蛍光分析物から放射された光線は、身体内の１つ以上の標的又は局所領域内の組織から

50

インビボで検出できる。このインビボで検出及びモニタリングされる蛍光は、局所領域、組織、もしくは細胞内の代謝活性、対応する非標識分析物もしくは物質の薬物動態及び／又は薬力学、局所領域もしくは組織内における特定化学療法薬の取り込み及び／又は残留、及び／又は生物学的状態の実質的にリアルタイム及び／又は動態分析、所望の時点での局所領域もしくは組織内の悪性腫瘍及び／又は正常細胞の代謝及び／又は増殖、の１つ以上に関する情報を提供できる。蛍光体標識分析物を使用する本発明の実施形態では、対応する親分析物と同一又は実質的に類似の薬理学的もしくは生化学的活性を有する非標識（すなわち、「親」）分析物の蛍光体標識バージョンを調製することができる。

【 0 0 4 1 】

そのようなシステム及び方法を使用すると、臨床医又は研究者が詳細に考察するために提供できる中間データを提供するために生体由来のデータ又は物理的量を入手及び／又は分析することができる。検出は、対象領域の周囲の複数の部位に、又は身体内の様々な間隔をあけた複数の部位に配置した複数のセンサを使用して実施できる。本発明のシステム、方法、及び作動を実施すると、従来型システムより長時間にわたって、治療薬のインビボのレベル、活性、残留、取り込み、送達など（薬物動態学）に加えて、選択された療法（又は療法の組み合わせ）が標的疾患、障害、又は身体の状態に及ぼす生物学的又は生理学的影響（薬力学）をモニタリングすることができる。

【 0 0 4 2 】

本発明のシステム及び方法の特定の実施形態は、上記のように、標識して被験者に再導入できる、又は外因性物質を含むがそれらに限定されない蛍光標識することができて十分な分子量サイズを有するいずれかの分析物と一緒に使用できる。同様に上述したように、適切に標識した分析物は、核種医薬品及びその誘導体、抗体、抗原、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、核酸、代謝産物及びその誘導体の標識バージョンを含むことができる。標識分析物は、部位特異的もしくは腫瘍もしくは組織特異的な送達標的、分化抗原を有する遺伝子組み換え、合成もしくは天然型物質であってよい、又は特定領域もしくは組織へ送達すると活性化できる、又はさもなければ局所的に「活性化」もしくは標的化できる分析物であってよい。標識分析物は、その存在もしくは発現、すなわち抗原、抗体、ペプチド、タンパク質、酵素、アミノ酸もしくはその他の内因性分析物、又はその他のゲノムもしくは表現型基準もしくは挙動などの、領域もしくは標的部位における疾患もしくは癌と結び付いている標識マーカーに基づいて選択できる。そこで、マーカーもしくは抗原発現の動的量についての活性蛍光モニタリングは、細胞活性についての臨床的に貴重な体内リアルタイム又は動的情報を提供できる。

【 0 0 4 3 】

特定の実施形態では、被験者は被験者に投与される前に蛍光前標識した分析物を用いて「予備試験」又は評価することができる。用語「前標識（pre-labeled）」は、分析物が被験者の体外で標識され、その後に蛍光体標識分析物又はその構成要素が標的部位及び／又は細胞へ移動するように被験者に投与されることを意味する。本明細書で使用するように、用語「蛍光体標識分析物」には身体内の生化学的構成要素が含まれることに留意されたい。次に体内反応は被験者のインビボ生物系内の前標識分析物を使用して評価できるが、それは前標識分析物が腫瘍もしくは標的治療領域と同一の生体分子及び生理化学的環境に曝露させられ、これが身体内の分析物の挙動（取り込み及び／又は治療有効性など）に影響を及ぼす可能性があるからである。

【 0 0 4 4 】

本発明の特定の実施形態を使用すると、どの表現型が選択された療法に対して反応性である見込みがあるかどうかをスクリーニング又は決定することができる、及び／又は選択された分析物に対する表現型の反応を評価することができる。このデータは、集団の他のセグメントに比較して治療有益性を得られる可能性がある被験者を同定する（薬物スクリーニングなど）ために役立つ薬物スクリーニングに、及び／又は特定患者に合わせて治療法及び薬物選択をカスタマイズするために使用できる。

【 0 0 4 5 】

さらにまた別の実施形態では、標的細胞群又は腫瘍部位上で、経時的に、抗癌療法又は分析物が有する細胞毒性作用に対する細胞増殖抑制作用を評価するための作動を実施できる。さらに、遺伝子療法により治療された第一世代の細胞は細胞集団における変化（特定のタンパク質の産生の減少又は増加など）を引き起こすことがある。本発明の作動は、遺伝子療法が身体内で持続しているかどうかを決定するために該療法が第二、第三又は第四世代以降においても有効なままであるかどうかを決定するために経時的に実施できる。

【0046】

マーカー又は発現に基づく抗原／抗体（標識できる）の評価の例には、癌評価及び／又は治療に使用される評価が含まれる。対象腫瘍関連抗原の例にはCD-20抗原（Bリンパ球上）が含まれ、それに対する治療は一部の乳癌に関連するCD-20抗原及びヒト上皮成長因子（HER2）に対する抗体を有する物質を含む。ハーセプチンは蛍光標識することができ、現在HER2乳癌療法に対して承認されていることに留意されたい。

10

【0047】

本発明の作動を実施するためにはその他の生体材料もまた適切である可能性があることが企図されている。適切である可能性のある生体材料の例には、自家腫瘍細胞を溶解する細胞溶解性Tリンパ球（CTL）（又はCTLクローンもしくは自家CTL）を生成するための腫瘍細胞及び血液由来リンパ球（患者自身からのものであってよい）を含有する混合培養が含まれるが、それらに限定されない（黒色腫、腎臓癌、膀胱癌、頭頸部癌、非小細胞性肺癌などと結び付けて使用できる）。その他の可能性のある対象抗原／抗体には、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-3、カンプトテシンアナログ、上皮成長因子（すなわち血管内皮成長因子（VEGF））及び血管新生因子が含まれる。例えば、UCL Christian de Duve細胞病理研究所のLudwig Institute For Cancer Research、URL: icp.ucl.ac.be/report95/licr95.htmlを参照されたい。

20

【0048】

いずれにせよ、標識分析物は他の物質と結合して、所望の組成物及び／又はボラスを生成するために所望の送達（注射、静脈内、皮下など）に合わせて調製できる。特定の実施形態では、蛍光体分析物は溶液に調製できる。この溶液は、標識構成要素もしくは成分の濃度を希釈するため、又は他の所望の生体適合性物質を提供するために調製できる。

30

【0049】

本発明による用語「被験者」には、動物界に属する被験者が含まれ、好ましくは哺乳動物被験者（例、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、齧歯類、ブタ、及び／又はウサギ）であり、より好ましくはヒト被験者である。

【0050】

用語「組織（tissue）」には身体内のすべての物質、例えば身体内で1つ以上の機能を実施する形態学的に類似の細胞の凝集及び細胞間物質（筋肉、動脈、静脈、管、組織、骨、骨髓などを含むが、それらに限定されない）ならびに血清、間質流体又は間質液が含まれる。液体及び流体の検出は、より典型的には非ファイババージョンのセンサよりむしろファイババージョンの検出プローブ又はセンサプローブを用いて測定することができる。

40

【0051】

特定の実施形態では、分析物は選択された生理的もしくは生物学的状態、損傷、又は疾患を治療するために構成された治療用医薬品もしくは抗体である。蛍光標識は、同一検出物の非標識バージョン及び標識バージョンが身体内で実質的に同一の生化学的活性を有するように、及び／又は標識バージョンが身体内で予定された治療的、生理学的、又は生物学的反応を妨害しないように、実質的に透過性であるように選択もしくは調製できる。そこで、分析物（又は薬物もしくは抗体）の標識バージョンは、該標識バージョンが生物学的に機能するようであってよい、又は対応する非放射標識バージョンと実質的に同一方法で生化学的に処理されるようであってよい。特定の実施形態では、標識は評価のために使

50

用される濃度で生体適合性（非毒性）であり、身体内の分析物及び／又はその成分の自然分解又は反応を妨害しない。

【 0 0 5 2 】

この種類の研究のために開発された戦略が極めて多数あるために、精選文献を列挙するのは困難である。既に開発された蛍光体標識及び／又は試験の例として蛍光キットの製造供給元の目録を例として挙げる（例えば、URL：<http://molecularprobes.com>又はオレゴン州ユージーンに所在するMolecular Probes, Inc.からの製品を参照されたい）。当業者には、一部の蛍光は細胞毒性であるが、多数の蛍光体は相当に高濃度で安全であることが知られている。そこで、治療的又は診断的評価のための蛍光体標識分析物のインビボ投与は実行可能である。様々なタイプの蛍光体標識又は蛍光体分析物の例には、反応性色素及びその他の新規蛍光体（蛍光物質）、酵素標識蛍光（ELF）、高感受性核酸染色、高感受性タンパク質染色、オルガネラ染色、生物学的用途のための蛍光ミクロスフェア、蛍光原性酵素基質、細胞生育性アッセイ、及びイオンインジケータが含まれるが、それらに限定されない。さらに、蛍光体より小さい分子もまた、結合部位が遮断されない限り標識することができる。

10

【 0 0 5 3 】

表1には、蛍光標識又は関連する試験及び装置について記載している発行された米国特許の例を列挙する。表1に列挙した特許各々の内容は、これにより全体として参照して本明細書に組み込まれる。

【 0 0 5 4 】

20

【表 1 A】

特許番号	特許の表題
米国特許第 4,774,339 号	Chemically Reactive Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes
米国特許第 4,945,171 号	Xanthene Dyes Having a Fused [C] Benzo Ring
米国特許第 5,132,432 号	Chemically Reactive Pyrenyloxy Sulfonic Acid Dyes
米国特許第 5,187,288 号	Ethenyl-Substituted Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes and Their Synthesis
米国特許第 5,208,148 号	Lipophilic Fluorescent Glycosidase Substrates
米国特許第 5,227,487 号	Certain Tricyclic and Pentacyclic-Hetero Nitrogen Rhodol Dyes
米国特許第 5,242,805 号	Long Wavelength Lipophilic Fluorogenic Glycosidase Substrates
米国特許第 5,248,782 号	Long Wavelength Heteroaryl-Substituted Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes
米国特許第 5,262,545 号	Fluorescent Chloramphenicol Derivatives for Determination of Chloramphenicol Acetyltransferase Activity
米国特許第 5,274,113 号	Long Wavelength Chemically Reactive Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes and Conjugates
米国特許第 5,314,805 号	Dual-Fluorescence Cell Viability Assay Using Ethidium Homodimer and Calcein AM
米国特許第 5,316,906 号	Enzymatic Analysis Using Substrates That Yield Fluorescent Precipitates
米国特許第 5,321,130 号	Unsymmetrical Cyanine Dyes With Cationic Side Chains
米国特許第 5,326,692 号	Fluorescent Microparticles With Controllable Enhanced Stokes Shift
米国特許第 5,338,854 号	Fluorescent Fatty Acids Derived from Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes
米国特許第 5,362,628 号	Fluorescent Haloalkyl Derivatives of Reporter Molecules Well Retained in Cells
米国特許第 5,364,764 号	Fluorescent Chloramphenicol Derivatives for Determination of Chloramphenicol Acetyltransferase Activity
米国特許第 5,405,975 号	Fluorescent Ion-Selective Diaryldiaza Crown Ether Conjugates
米国特許第 5,410,030 号	Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes Containing Pyridinium Moieties
米国特許第 5,433,896 号	Dibenzopyrrometheneboron Difluoride Dyes
米国特許第 5,436,134 号	Cyclic-Substituted Unsymmetrical Cyanine Dyes
米国特許第 5,437,980 号	Phenanthridium Dye Staining of Nucleic Acids in Living Cells
米国特許第 5,442,045 号	Biological Conjugates of Fluorescent Rhodol Dyes
米国特許第 5,443,986 号	Enzymatic Analysis Using Substrates That Yield Fluorescent Precipitates

10

20

30

【表 1 B】

米国特許第 5,445,946 号	Viability Stains for Yeast and Other Fungi	
米国特許第 5,451,663 号	Long Wavelength Chemically Reactive Dipyrrrometheneboron Difluoride Dyes and Conjugates	
米国特許第 5,453,517 号	Reactive Derivatives of BAPTA Used to Make Ion-Selective Chelators	
米国特許第 5,459,268 号	Xanthylum Dyes That Are Well Retained In Mitochondria	
米国特許第 5,459,276 号	Benzazolylicoumarin-based Ion Indicators For Heavy Metals	
米国特許第 5,501,980 号	Benzazolylicoumarin-based Ion Indicators	
米国特許第 5,514,710 号	Photocleavable Derivatives of Hydroxypyrenesulfonic Acids	10
米国特許第 5,516,864 号	Fluorescent Ion-Selective Diaryldiaza Crown Ether Conjugates	
米国特許第 5,534,416 号	Fluorescent Viability Assay Using Cyclic-Substituted Unsymmetrical Cyanine Dyes	
米国特許第 5,545,535 号	Fluorescent Assay for Bacterial Gram Reaction	
米国特許第 5,573,909 号	Fluorescent Labeling Using Microparticles With Controllable Stokes Shift	
米国特許第 5,576,424 号	Haloalkyl Derivatives of Reporter Molecules Used to Analyze Metabolic Activity in Cells	
米国特許第 5,582,977 号	Dimers of Unsymmetrical Cyanine Dyes	
米国特許第 5,616,502 号	Non-specific Protein Staining Using Merocyanine Dyes	20
米国特許第 5,635,608 号	Alpha-Carboxy Caged Compounds	
米国特許第 5,648,270 号	Methods of Sensing with Fluorescent Conjugates of Metal-Chelating Nitrogen Heterocycles	
米国特許第 5,656,449 号	Neutral Unsymmetrical Cyanine Dyes	
米国特許第 5,658,751 号	Substituted Unsymmetrical Cyanine Dyes with Selected Permeability	
米国特許第 5,686,261 号	Xanthylum Dyes that are Well Retained in Mitochondria	
米国特許第 5,696,157 号	Sulfonated Derivatives of 7-Aminocoumarins	
米国特許第 5,719,031 号	Dye Labeled Polymers as Reagents for Measuring Polymer Degradation	
米国特許第 5,723,218 号	Dipyrrrometheneboron Difluoride Labeled Fluorescent Microparticles	30
米国特許第 5,773,227 号	Bifunctional Chelating Polysaccharides	
米国特許第 5,773,236 号	Polyhaloaryl-Substituted Reporter Molecules	
米国特許第 5,786,219 号	Microspheres with Fluorescent Spherical Zones	
米国特許第 5,798,276 号	Reactive Derivatives of Sulforhodamine 101 with Enhanced Hydrolytic Stability	
米国特許第 5,830,912 号	Derivatives of 6,8-Difluoro-7-hydroxycoumarin	
米国特許第 5,846,737 号	Conjugates of Sulforhodamine Fluorophores with Enhanced Fluorescence	
米国特許第 5,863,753 号	Chemically Reactive Unsymmetrical Cyanine Dyes and their Conjugates	
米国特許第 5,869,689 号	Stains for Acidic Organelles	40
米国特許第 5,872,243 号	Novel Caged Nucleotides	

【表 1 C】

米国特許第 5,888,829 号	Photolabile Caged Ionophores
米国特許第 6,004,536 号	Lipophilic Cyanine Dyes with Enhanced Aqueous Solubility
米国特許第 6,005,113 号	Long Wavelength Dyes for Infrared Tracing
米国特許第 6,013,802 号	Fluorescent Conjugates of Metal-Chelating Nitrogen Heterocycles
米国特許第 6,130,101 号	Sulfonated Xanthene Derivatives
米国特許第 6,162,931 号	Fluorinated Xanthene Derivatives
米国特許第 6,229,055 号	Synthesis of Fluorinated Xanthene Derivatives
米国特許第 6,265,179 号	Detection of Phosphate using Coupled Enzymatic Reactions
米国特許第 6,291,203 号	Cyanine Dyes that Stain Cells and Mitochondria
米国特許第 6,316,267 号	Luminescent Protein Stains and Their Method of Use
米国特許第 6,323,337 号	Quenching Oligonucleotides
米国特許第 6,323,186 号	Phosphate-Bound Polyazaindacene Derivatives of Nucleotides
米国特許第 6,329,205 号	Detection Method using Luminescent Europium-Based Protein Stains
米国特許第 6,399,392 号	Xanthene Dyes and their Application as Luminescence Quenching Compounds

10

20

【 0 0 5 5 】

本出願では、上述した蛍光標識した分析物をインビボで精査するために使用される埋め込み型センサ及びプラットフォーム装置（デバイス）の実施形態について記載する。特定実施形態では、分析物は、例えば抗癌療法のために送達される、及び／又は遺伝子療法もしくはその他の用途に使用される抗体のように、起源が外因性である。上述したように、本発明の方法、センサ、デバイス、システム及びコンピュータプログラム製品を作動させると、標的組織内に受容されて取り込まれた治療用抗体の体内局所用量、局所組織内の療法の動的取り込み及び／又は残留を対象期間に渡ってモニタリングする、及び／又は細胞状態の表示を提供するタンパク質の発現をモニタリングすることができる。

【 0 0 5 6 】

30

埋め込み型センサは、能動的治療法の前、中及び／又は後に癌細胞に結び付いた内部活性（細胞プロセスなど）のモニタとして遠隔計測的に作動させて使用するために、及び／又は遺伝子療法を評価するために構成できる。遠隔計測的に作動される埋め込み型センサユニット及び読み取り装置についての追加の説明は、米国特許第 6,402,689 号及び同時係属の米国特許出願第 10/127,207 号の中に提供されており、それらの内容は全体として参照して本明細書に組み込まれる。

【 0 0 5 7 】

上述したように、本発明によって提供される方法及び装置は、ヒト乳癌異種移植片を有するヌードマウスにおいて標識抗体（ハーセプチン）の進行をインビボで動的に追跡する能力を証明している。測定は光ファイバを使用する装置を用いて実施した。治療用癌抗体は、一般に投与後に身体内で 2～4 日間の時間的経過を有する。

40

【 0 0 5 8 】

本発明の実施形態は、同一タイプの測定を実施できる完全埋め込み型センサを提供する。これらの方法及び装置は、特定の治療法が及ぼす影響をモニタリングするために薬物動態学的「PK」プロファイルを生成できるので、したがって臨床作用に関して臨床医に貴重な情報を提供する。特定の実施形態では、治療法は、それらの薬物動態学的特性を変化させずに蛍光体を用いて標識できるように、その物質又は抗体を形成する生体分子が相当に大きなサイズであるために選択された細胞毒性物質又は抗体である可能性がある。

【 0 0 5 9 】

詳細には、細胞膜表面上で発現する抗原を描出する蛍光タグを利用でき、その密度は時

50

間的に変化する可能性がある。例えば、一般的に言って、ハーセプチンは膜貫通タンパク質に付着することによって機能するが、その密度は一般的に時間的に固定されると推定されている。膜上又は細胞内でのそのような抗原の発現は、腫瘍制御において重要性を有する重大な事象（転移が始まる可能性、細胞周期の状態など）をシグナリングできる。大多数の抗癌療法の末期をシグナリングするプログラムされた細胞死であるアポトーシスの開始を示すであろう蛍光体標識もまた利用できる。手短には、本発明の実施形態を使用すると、治療用抗体の体内局所用量及び／又は細胞状態の表示を提供するタンパク質の発現をモニタリングすることができる。

【0060】

類似のモニタリング技術は、遺伝子療法の適用において価値を有する。臨床的遺伝子療法における1つの問題は、代々の細胞内に変化の作用を永続化させることにおける困難である。ヒト患者では、遺伝子療法の失敗又は減退は、反復バイオプシー又は臨床症状における再発の開始によってしか明確にならない可能性がある。長期的ベースでインビボ遺伝子発現をモニタリングする能力は重要なツールであり、それにより治療を前進させることができる。「長期的」ベースとは、少なくとも2～4週間の期間を意味する。典型的には、埋め込み型センサは4～6週間、6～12週間、又は治療期間（3～6カ月間以上）にわたり埋め込まれるように構成される。本明細書に記載した装置は、この努力において有益な可能性がある。

【0061】

本発明による一部の実施形態は、2つの主要な適用領域である薬物動態学的及び薬力学的蛍光モニタリングにおいて使用できる。第一に、標識分子は、例えば腫瘍内及び腫瘍の周囲などの特定部位で定量的及び動的にアッセイされる。薬力学的蛍光とは、レポータとして使用される蛍光体の活性化（細胞膜上での特定のタンパク質発現の結果としての活性化）を意味する。薬物動態学的蛍光は、一般には所定の治療実体の用量及び特異性を取り扱う。薬力学的蛍光は、一般にはその療法が細胞プロセスに及ぼす作用を取り扱う。インビボプローブを作製することについての長所は、現在では両方のタイプの動力学の短期的及び長期的測定が可能になることにある。

【0062】

抗体（Ab）を使用する療法は、現在臨床市場に参入しつつある。ハーセプチン（HERCEPTIN）（トラスツズマブ（trastuzumab）、Genetech社）及びリツキサン（RITUXAN）（リツキシマブ（rituximab）、IDEC社）のような製品は、単独で、そして他の療法との併用で極めて有望な前途を証明しつつある。例えば、非ホジキンリンパ腫では、リツキサンはさらにまた別の新規のAbを使用する放射免疫療法である、標的B細胞を照射するために強力な線エミッタであるY-90を有するゼバリン（Zevalin）（イブリツモマブ・チウキセタン（ibrutinomab tiuxetan）、IDEC社）と併用して投与されている。これらの製品すべてに共通する問題は適正な用量である。ハーセプチンの場合は、候補患者は最初にHER2/neu（又はc-erbB2）遺伝子の発現レベルについて試験される。大まかに言って、女性の25%はこの療法の使用を正当化するために十分に高い発現レベルを有する。ゼバリンは現在、Y-90変種を含む最終用量を設定する前に生体内分布及びクリアランスを観察するために「微量」モードでIn-111と一緒に投与されている。特定患者のための適正用量の決定は、明確には定義されていない努力であることが多い。

【0063】

特に抗体を用いた場合は、蛍光標識又はタグは、大きな分子量が関係するために魅力的なマーカーである。すなわち、Abに共役させると、治療薬の薬物動態を阻害しない、及び／又は無用な影響を及ぼさない蛍光体を同定することが可能である。実際に、そのような試験は治療用製品の通常の開発の一部としてしばしば実施されている。この方法で治療薬を標識することによって、次に作用部位で濃度を評価し、さらにインサイチュー蛍光モニタがあれば結合及び放射の動態を試験することができる。本発明は、被験者の身体内の相当に広範囲の臨床的に重要な深さで検知するために適合するインサイチュー蛍光モニタ

10

20

30

40

50

を提供する。

【 0 0 6 4 】

上述した定量及び動態は、インビボプローブにとっての標的である。それらは用量を取り扱う。治療用化合物が失敗した場合、次の重要な問題はその理由である。おそらく、標的細胞は処方された用量を受容したのに、耐性になったのであろう。これは薬力学的失敗と呼ぶことができよう。この状況では、細胞事象である遺伝子又はタンパク質発現、アポトーシスの開始などへ反応する蛍光活性化を使用するのが魅力的であろう。

【 0 0 6 5 】

本発明の一部の実施形態では、情報は個々の細胞から収集できるが、特に適切であるのはサイズが約数ミリメートル以上の大きさにある組織の領域、集団、容積及び／又は領域をモニタリングすることであろう。

10

【 0 0 6 6 】

蛍光体標識を用いて調製できる化学療法薬用の医薬製品の例には、アルキル化剤、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、抗生物質、ホルモン拮抗薬もしくはアンドロゲン、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、エストロゲン／ナイトロジェン混合物、エストロゲン、ゴナドトロピン放出ホルモン、免疫調節薬、及びその他の適切な治療薬などの抗腫瘍薬が含まれる。詳細には列挙していないその他の製品もまた、本発明の実施形態により企図されたように使用できる。表 2 には、本発明の実施形態によって、蛍光体標識のために適切な、又は抗癌療法などの蛍光体プローブを使用して作用についてモニタリングできる蛍光体標識製品の例を列挙した。

20

【 0 0 6 7 】

【表 2 A】

物質名	製造業者名	
A. <u>アルキル化剤</u>		
1. ミレラン(Myleran)	Glaxo Smith Kline (Glaxo)	
2. パラプラチン(Paraplatin)、プラチノール(platinol)	Bristol Myers Squibb (BMS)	
3. テモダール(Temodar)	Schering	
B. <u>ナイトロジェンマスタード</u>		
1. アルケラン(Alkeran)	Glaxo	10
2. サイトキサン(Cytoxan)	BMS	
3. イフェックス(Ifex)	BMS	
4. ロイデラン(Leuderan)	Glaxo	
C. <u>ニトロソ尿素</u>		
1. BCNU	BMS	
2. CCNU	BMS	
3. グリアデルウエハー(Gliadel wafer)	Aventis	
D. <u>抗生物質</u>		
1. アドリアマイシン(Adriamycin)	Pharmacia & Upjohn	20
2. ブレノキサン(Blenoxane)	BMS	
3. イダマイシン(Idamycin)	Pharmacia & Upjohn	
4. ミトラシン(Mithracin)	Bayer	
5. ムタマイシン(Mutamycin)	BMS	
6. ノバントロン(Novantrone)	Immunex	
7. ルーベックス(Rubex)	BMX	
8. フルダラ(Fludara)	Berlex	
9. FUDR	Roche	
10. チオグアニン(Thioguanine)	Glaxo	
11. ゼローダ(Xeloda)	Roche	
E. <u>ホルモン拮抗薬</u>		
1. ニランドロン(Nilandron)	Aventis	30
2. テスラック(Teslac)	BMS	
F. <u>抗アンドロゲン</u>		
1. カソデックス(Casodex)	AstraZenaca	
2. ユーレキシシ(Eulexin)	Shering	

【表 2 B】

G. <u>抗エストロゲン</u>		
1. アリメデックス(Arimedex)	AstraZenaca	
2. アロマシン(Aromasin)	Pharmacia	
3. フェマラ(Femara)	Novartis	
4. ノルバデックス(Nolvadex)	AstraZenaca	
H. <u>エストロゲン/ナイトロジェン混合物</u>		
1. エムサイト(Emcyt)	Pharmacia	10
I. <u>エストロゲン</u>		
1. エステニル(Estinyl)	Schering	
J. <u>ゴナドトロピン放出ホルモン</u>		
1. ルプロン(Lupron)	TAP	
2. ゴラデックス(Zoladex)	AstraZenaca	
K. <u>プロゲステロン</u>		
1. メゲース(Megace)	BMS	
L. <u>免疫調節薬</u>		
1. エルガミソール(Ergamisol)	Jansen	20
M. <u>抗体療法</u>		
1. ハーセプチン(Herceptin)	Genetech	
2. リツキサン(Rituxan)	Genetech, IDEC	
3. ゼバリン(Zevalin)	IDEC	
4. アバスチン(Avastin)	Genetech	
5. ABX-EFG	Abgenix	
6. ベキサール(Bexxar)	Corixa	
7. キャンパス(Campath)	Millenium and ILEX Partners, LP	
8. エルビタックス(Erbitux)	Bristol Myers Squibb	
9. マイロターグ(Myoltarg)	Wyeth Ayerst	30
10. オンタク(Ontak)	Seragen, Inc.	
11. 血管内皮成長因子(VEGF)	開発中	
N. <u>非抗体療法</u>		
1. グリベック(Gleevec/Glivec)	Novartis	
2. ハイカムチン(Hycamtin)	Glaxo Smithkline	
3. タキソール(Taxol)	Bristol Myers Squibb	
O. <u>自然蛍光分析物</u>		
1. カンプトテシン(Camptothecin)アナログ	開発中	
2. アドリアマイシン(Adriamycin)	Pharmacia & Upjohn Co.	40

【表 2 C】

P. その他

1. カムプトサル(Camptosar)
2. DTIC
3. エトポフォス(Etopophos)
4. ジェムザール(Gemzar)
5. ハイドレア(Hydrea)
6. イントロン A(Intron A)
7. リソドレン(Lysodren)
8. ナベルビン(Navelbine)
9. オンコビン(Oncovin)
10. プロロイキン(Proleukin)
11. ロフェロン A(Roferon A)
12. タクソン(Taxon)
13. タキソテール(Taxotere)
14. ベルバン(Velban)
15. ベプシド(VePesid)

Pharmacia
Bayer
BMS
Lilly
BMS
Scherling
BMS
Glaxo
Lilly
Chiron
Roche
BMS
Aventis
Lilly
BMS

10

【 0 0 6 8 】

20

表 3 には、本発明の一部の実施形態による蛍光センサを用いてアッセイできる代表的分析物又は化合物が含まれている。表 3 に列挙した分析物の一部は表 2 にも含まれているが、しかし表 3 はこれらの分析物に関するより詳細を含有する。

【 0 0 6 9 】

【表 3】

薬物商標名	薬物名	製造業者名	用途
蛍光標識できる抗体			
ABX-EGF	上皮成長因子(EGF)受容体阻害剤	Abgenix (開発中)	様々な癌において過剰発現する EGF 受容体を標的とする
アバスタチン(Avastin)	ベバシツマブ(Bevacizumab)	Genentech	血管新生阻害剤
ベキサール(Bexxar)	トシツモマブ(Tositumomab)	Corixa	CD20 陽性濾胞性非ホジキンリンパ腫
キャンパス(CamPATH)	アレムツズマブ(Alemtuzumab)	Millenium and ILEX Partners, LP	抗 CD52 抗体; B 細胞慢性リンパ球性白血病
エルビタックス(Erbix)	セツキシマブ(Cetuximab)	Bristol Myers Squibb (開発中)	標的化抗癌療法
ハーセプチン(Herceptin)	トラスツズマブ(Trastuzumab)	Genentech	HER2 陽性転移性乳癌
マイロターゲット(Mylotarg)	ゲムツズマブ・オゾガマイシン(Gemtuzumab ozogamicin)	Wyeth Ayerst	CD33 陽性急性骨髄性白血病
オンタク(Ontak)	デニロイキン(Denileukin)	Seragen, Inc.	再発性皮膚 T 細胞リンパ腫における CD25 陽性 IL-2 受容体
リツキサン(Rituxan)	リツキシマブ(Rituximab)	Genentech, IDEC	難治性、軽症または濾胞性 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫
血管内皮成長因子(VEGF)阻害剤	VEGF 阻害剤アナログ	様々な研究者により開発中	VEGF を阻害する
ゼバリン(Zevalin)	イブリツモマブ・チウキセタン(Ibritumomab tiuxetan)	IDEC	軽症、濾胞性または形質転換 B 細胞性非ホジキンリンパ腫
蛍光標識できる非抗体分析物			
グリベック(Gleevec/Glivec)	メシル酸イマチニブ(Imatinib mesylate)	Novartis	慢性骨髄性白血病
ハイカムチン(Hycamtin)	塩酸トプテカン(カンプトテシンアナログ)	Glaxo Smith Kline	トポイソメラーゼ I を阻害する
タキソール(Taxol)	パクリタキセル(Paclitaxel)	Bristol-Myers Squibb	リンパ節転移陽性乳癌
自然蛍光分析物			
アドリマイシン(Adriamycin)	ドキシソルビシン(Doxorubicin)	Pharmacia & Upjohn Co.	抗生物質、抗腫瘍薬
カンプトテシン(Camptothecin)アナログ	カンプトテシンアナログ	様々な研究者により開発中	トポイソメラーゼ I を阻害する

【0070】

特定の実施形態では、1つ以上の時間依存性、及び/又は可変性励起強度依存性プロフィールを生成する、分析する、及び/又はモニタリングすることができる。図13A~13Eは、選択されたパラメータもしくは予測変数から生成でき、時間依存性プロフィールを生成する、分析する、又はモニタリングすることができる反応プロフィールの例である。図13Aは、蛍光強度のプロフィールを入手でき、次にその強度が閾値レベルを超えたままの時間を決定できることを例示している。特定の実施形態では、モニタリングされた反応時間又は期間を個別化できる。すなわち、反応時間は検出される蛍光の測定値が基底閾値をどのくらい長く超えたままののかに基づくことができる(閾値はX軸に隣接する波線によって表される)。他の実施形態では、反応もしくはモニタリング期間は正規化及び/又は規定することができる(1~3時間、24~48時間以上にわたり発生する所望の間隔など)。

【0071】

本明細書で考察する反応又はモニタリング期間は例示する目的でのみ提供されており、

本発明の実施形態がこれらの実施例に限定されないことは理解されるであろう。例えば、反応又はモニタリング期間は、本発明の範囲から逸脱することなく約数秒間から数週間又は数カ月間に及び範囲内であってよい。

【0072】

図13A、13B、13C及び13Eに示したように、蛍光強度はある期間(t)にわたって検出できる。強度レベルが特定値を超えている時間は、局所組織が標識分析物を取り込む、捕捉する、蓄積する、及び/又は保持することのできる時間(t_{trap})であると定義できる。特定値は閾値(蛍光体標識分析物の送達前にインビトロ又はインビボで入手された数値など)として示されているが、この数値は相違する所望の相対値又は絶対値であると定義することもできる。いずれにせよ、検出された強度は反応周期における特定時点にピークを有する可能性がある(t_{peak})。さらに、強度は反応周期の一部分中に増加する(t_{inc})及びその後の期間中に減少する(t_{dec})場合がある。上昇もしくは低下速度又はピークもしくは下方閾値に達する時間もまた、モニタリングされた数値に基づいて計算できる。さらに、加速もしくは減速速度又は減衰速度もまた(モニタリング期間中の平均又は特定時点のいずれかで)確定できる。

【0073】

パラメータもしくは適切な予測変数の1つ又は組み合わせは、臨床転帰、用量、又は体内の性能に及ぼす影響を決定するために相関させる、又は統計的に評価することができる。そこで、選択されたパラメータは被験者における局所組織の所望の性能、反応又は状態(又は他の実施形態では、標的治療部位へ実際に送達された標識物質の送達及び/又は量の定量)を予測することができる。

【0074】

例えば、標識Abを以前より、又は匹敵する被験者より、又は臨床試験データで確定されたより(絶対的又は相対的に)長い時間にわたって被験者が一定レベルを超えて標識Abを保持できるように相当に長いリガンド結合時間を有する場合は、この能力は陽性予測因子を表す可能性がある。同様に、濃度減衰速度が遅い、又はピーク(もしくは飽和までの時間)が反応周期の後期に到達する場合は、これもまた陽性予測因子を表す、あるいは好ましい治療反応が示されていることを表している可能性がある。その他の例には、代表的時間後のより遅い取り込み及び/又はピーク値からのより小さな減少が含まれる。例えば、信号が代表的時間後(被験者への標識分析物の投与の開始から約1~24又は48時間後など)にピークもしくは最大蛍光体強度活性からの規定率より小さな下落を示した場合は、これは好都合の予測因子を表す可能性がある。

【0075】

図13Bは、曲線下面積を使用すると標的部位で受容された標識分析物の用量を計算できることを例示している。強度反応プロフィールは、インビボ送達される用量を規定する先験的データと相関させることができる。先験的データは、サンプルのインビトロ評価に基づくことができる。その他の用量相関又は計算手段もまた使用できる。図13Cは、信号をモニタリングし、次に(第1)導関数を数学的に入手してそれに関連する時間にわたり濃度の変化率を表せることを例示している。例として、図示した実施形態では、図13Cの線形は、振幅値について考慮に入れない単位を使用しない方法であるにも関わらず、図13Aのプロフィールの導関数に対応している。活性は、経時的に強度計数(C)と対応している(上述したようにパルス化励起間隔で入手した)。その他のパラメータ及び定量又は評価処理法は、特定用途及び所望の情報に依存して使用できる。

【0076】

図13Eは、このシステムはその各々が連続的に間隔を開けたモニタリング期間に対応する複数の様々なデータセットを入手できることを例示している。図示したように、3種の時間的に離れた反応期間がモニタリングされる。第3反応期間は、強化された、又は好都合の治療法が同定された場合に発生するように、検出された蛍光強度の上昇を有するように示されている。これらのモニタリング方法は、各治療の前に、好都合の治療ウィンドウが指示されるまで数回にわたり、又は分析物の投与時に実施できる。モニタリングは、

標的領域が薬物取り込みにより受容性になるように影響を及ぼす、又は誘導するためのステップが取られた後にも実施できる。

【 0 0 7 7 】

検出された信号の相対値もしくは絶対値を使用するとその部位での蛍光の強度を評価できる、又は量を定量できる（バックグラウンド情報を消去するためにベースライン時表示を得るために標識分析物を導入する前の測定値を入手することによって、又は2回の測定値の比率を使用することによってなど）ことに留意されたい。

【 0 0 7 8 】

図13Dは相違する励起信号を使用して標的領域から入手できる相違する反応プロフィールに対応する2つのグラフを例示している。上のグラフは、第1励起信号が、相違する強度（電力）レベルで第2励起信号を使用して入手した対応する第2のグラフに比較して相違する反応プロフィールを生成する第1強度（電力）での出力である可能性を例示している。相違する励起信号は、図示したように経時的に蛍光体強度の変動を作り出すことがある。例えば、システム及び/又は1つ以上のセンサは、各々が制御された（相違する）出力強度の変動で（第1信号は5 mW及び第2信号は15 mWで）、複数の相違する励起信号を連続的に出力するように構成できる。相違する放射された励起光信号に対する反応は、腫瘍又はその他の標的部位などの標的領域の周囲の光学的プロファイリングデータを生成できるように検出できる。さらに、あるいはまた、相違する励起波長を使用することもできる。そこで、相違する選択された強度、電力及び/又は波長での複数の相違する励起信号を生成し、センサによって反応波長及び/又は強度を検出し、外部読み取り装置又はプロセッサへ中継することができる。制御された変動は、段階的（増分的、減分的、又はその組み合わせ）変動であってよい。相違する励起信号は、同一励起源又はセンサ本体内に保持された相違する励起源によって生成することができる。

【 0 0 7 9 】

特定実施形態では、被験者は癌性腫瘍に対する治療を受けている場合がある。ある量の蛍光分析物、例えば蛍光体標識分析物（単独で、又は他の成分もしくは物質と組み合わせ）を被験者に投与できる。その物質もしくは分析物の量もしくは濃度は、それが治療自体を送達する前に治療の臨床的有効性を評価又は予測するために治療量に先行して送達される、治療量ではなく治療前の試験用量として機能するような量であってよい。標識分析物又は物質は、全身性、局所的、あるいはその両方のいずれかで送達できる。

【 0 0 8 0 】

特定の実施形態では、少量の試験用もしくは治療量以下の用量の例えば化学療法薬、医薬品もしくはA bの蛍光体アナログなどの標識物質もしくは分析物を（その癌を治療するためにいずれの非標識バージョンの医薬品を使用できるかについて）治療セッションの時点の近く（及び/又は前）に被験者へ投与することができる。本明細書で使用する「少量の」用量とは、治療量より少ない用量を意味する。検出された蛍光は、治療の成功の可能性についての動態的もしくは予測的情報を提供し、臨床医が計画された治療を進行させる、治療を遅延させる、1つ以上の治療を排除する、又は治療のために相違する医薬品を選択する可能性を与える。特定の実施形態では、標識用量は約0.1% - 60%の間の量にサイズ設定することができ、対応する治療量の約1 ~ 10%であってよい。この用量は、体重によってサイズ設定することができる（小児は小さな範囲部分内の用量を受容でき、大きな成人は典型的範囲以上の用量を受容できる）。

【 0 0 8 1 】

図13Fは、本発明の実施形態によって実施できる作動のブロック図である（作動は、コンピュータプログラムが指示できる、又は実施できる）。これらの作動は、組織内の蛍光の取り込み及び/又は残留に結び付いている時間依存性測定プロフィールから入手される少なくとも1つの予測変数を入手して使用する。用語「予測変数」とは、体内用量又は体内作用もしくは反応を計算するために使用できる重要な体内活性もしくは反応の予測因子である蛍光強度と結び付いた規定のパラメータを意味する。予測変数は、複数の計算動態因子であってよい。動態因子を使用すると、生体動力学的反応（被験者の生物学的又は

生理学的機能における変化を意味することができる)が本発明の実施形態により治療決定を行うために好都合であるかどうかを決定することができる。図示したように、蛍光の取り込み及び/又は残留に結び付いている少なくとも1つの予測変数(複数の予測動態因子であってよい)が決定される(ブロック300)。予測変数は、図13A-Eに関して上述したように反応プロフィールと結び付いた予測変数を含むことができる。本方法は次に、被験者の代謝活性(ブロック305)及び/又は被験者の生体動力学的反応が好都合であるかどうか(ブロック310)を評価する。好都合であれば、特定の実施形態では、次に所望の治療を被験者に送達できる(ブロック320)。好都合でなければ、次に好都合な治療反応を得るための機会を増加させることを試みるために治療を遅延又は延期又は変更することができる(ブロック330)。本方法は、さらにまた利用できる両方のタイプを考察し、腫瘍タイプ、予測因子に基づく一定の動態もしくは活性、又はその他の患者情報(例えば、年齢、治療回数(それが第1回もしくは第2回もしくは第3回の治療であるかどうかなど))などに基づいて臨床的に満足できる転帰を達成できる可能性の高い治療タイプを選択することができる。あるいは、又は追加して、代謝評価(ブロック305)を使用すると薬物動態学的データを試験もしくは評価する(ブロック306)及び/又は計画もしくは送達された療法の有効性を評価する(ブロック307)ことができる。1つ以上の予測変数を使用すると、受容された用量を測定する(ブロック321)ことができる。

10

【0082】

図14は、本発明の実施形態によって実施できる作動の図である。図示したように、蛍光体標識分析物を被験者に送達できる(ブロック400)。励起光は、埋め込まれたセンサから所望のモニタリング期間にわたって放射させる(ブロック405)ことができる。励起光に反応した蛍光強度は、励起光を出力する埋め込まれたセンサを使用して検出する(ブロック408)ことができる。検出された蛍光強度からのデータを使用すると、次に、(a)埋め込まれたセンサ部位の近位で受容された分析物の濃度又は用量を計算するステップと、(b)該標識分析物の薬力学的又は薬物動態学的活性を評価するステップと、(c)腫瘍部位へのAb付着を確認するステップと、(d)治療により過度に影響を受けていないことを確認するために非標的部位をモニタリングするステップと、(e)細胞特性の変化をモニタリングするステップと、(f)計算された用量又は濃度データを使用して該被験者に投与される分析物の治療量を調整又はカスタマイズするステップと、(g)標的部位でのミセル濃度を確認し、次にその確認に基づいて毒素放出を刺激するステップと、及び(h)遺伝子療法による組み換えから生じたタンパク質の発現をモニタリングするステップと、のうちの少なくとも1つを実施できる(ブロック425)。

20

30

【0083】

特定の実施形態では、埋め込まれたセンサ内に配置されたレーザダイオードをパルスングさせて励起光を発生させることができる(ブロック407)。レーザダイオードは、励起光を発生させる(ブロック412)ために約1~10%の負荷サイクルで作動させることができる。励起光の反復放射及び関連する検出ステップは、少なくとも約1時間にわたって、そして典型的には24~48時間のモニタリング期間にわたって間隔をあけて実施することができる(ブロック414)。

40

【0084】

特定の実施形態では、励起信号の強度は、該センサの近位の該組織の反応についての光学的プロファイリングデータを生成するために所定方法で変化させることができる(ブロック406)。特定実施形態では、センサは腫瘍内又はその近位に埋め込まれる(ブロック409)。センサは、患者の皮下で、例えば約25cmまで、約5~25cm、及び典型的には約10~20cmであってよいいずれかの適切な深さに埋め込むために適合している(ブロック411)。本明細書で提供する深さは例示する目的でのみ提供されており、本発明の実施形態がこの構成に限定されないことは理解されるであろう。例えば、センサは本発明の範囲から逸脱せずに約1cmから約25cmまでの深さに埋め込むことができる。

50

【 0 0 8 5 】

上記で考察したように、センサは最小侵襲性のカテーテルを使用する（自然の身体内腔に挿入される）プローブとして構成することもできる。他の実施形態では、センサプローブは対象部位に先端部分を配置して埋め込まれるように構成される侵襲性光ファイバプローブを使用できる。プローブチップは、円刃刀を用いて小切開部を作製し、ゲージの大きなニードルを標的部位に挿入することによって埋め込むことができる。光ファイバプローブは約250ミクロンから1mmのサイズ範囲の1本以上のファイバを使用できる。これらの実施形態では、光源及び多チャンネルアナライザを外部（身体の外側）に配置できる。センサは、特にCT（コンピュータ断層撮影法）、超音波誘導、磁気共鳴イメージング（MRI）及び/又はX線を使用する場合は、対象部位から約1mm以下の範囲内に（又は誘導装置の分解能に合わせて）配置できる。腫瘍の周囲にセンサプローブのチップを配置して、腫瘍周辺の数ミリメートル以内からのデータを観察することも可能である。

10

【 0 0 8 6 】

光ファイバプローブを含む本発明の実施形態について本明細書では少なくともインビボに埋め込まれるチップを有すると考察しているが、本発明の実施形態がこの構成に限定されないことは理解されるであろう。例えば、光ファイバプローブは本発明の一部の実施形態によるとエックスビボ又はインビトロで使用できる。

【 0 0 8 7 】

本発明による一部の実施形態では、図1Aを参照すると、完全埋め込み型の遠隔走査型センサ10を使用してインビボで蛍光を励起かつ検出することができる。励起源はレーザーダイオードであってよく、検出には光ダイオードを使用できる。選択的帯域フィルタを作り出すためには、これらの装置の外壁面に薄膜誘電層（Chroma：バーモント州ブラトルバロ）を適用することができる。光ダイオードを使用すると、信号対雑音比を増加させるために放射スペクトル中の実質的にすべての波長を統合することができる。これらの構成要素及びそれらの対応する回路は米国特許第6,402,689号に記載されている放射線センサに類似する超小型生体適合性の細長カプセル10c内に配置できる。この生体適合性カプセル10cは、約2～3mmの直径及び約20mm未満の長さを有している。

20

【 0 0 8 8 】

センサ10は、対象領域内に外科的に埋め込み、遠隔作動することができる。放射線センサのガラスカプセル（特定の実施形態の蛍光センサのために企図された対応するサイズ及び形状を有する）について試験が実施されており、その試験ではラット12匹にパリレン（Parylene）Cがコーティングされた、又はコーティングされていないいずれかのガラスカプセルが埋め込まれた。90～122日後、10～100ミクロンの繊維状被包化が全動物において観察された。インプラントに起因する炎症性反応は明白にならず、埋め込み部位からの重大な移動も発生しなかった。さらに、ヒトを対象とする試験でも埋め込み型センサ10の重大な移動は証明されなかった。

30

【 0 0 8 9 】

図1Bに例示したように、本発明の一部の実施形態によるセンサ10は患者の体内でセンサを固定するため、及び/又は体内での回転又は移動を阻害するために回転防止機構15を含むことができる。例えば、回転防止装置の実施例は2003年1月18日に出願された同一出願人による「Implantable Sensor Housing, Sensor Unit and Methods for Forming and Using the Same」と題する米国特許出願第10/353,857号の中で考察されており、その開示は全体として参照して本明細書に組み込まれる。したがって、回転防止機構15の詳細については、本明細書ではこれ以上考察しない。

40

【 0 0 9 0 】

作動時には、選択された1つ以上の波長が身体内の1つ以上のセンサ10の近位に位置する組織、膜、又は細胞を照射するために第1強度レベルで発信される。引き続いて、蛍光放射された光線はセンサカプセル10eの内側に保持された検出器によって検出される

50

。蛍光放射された光線は、励起光より長い波長及び少ないエネルギーを有するであろう。

【0091】

複数のセンサ10が使用されるシステムについては、外部読み取り装置又はプロセッサは、同定及び個別インテロゲーションを可能にする1つ以上の固有のRF同定データビットを有する各センサを用いて同一周波数で各センサを連続的にポーリングするように構成することができる。複数のセンサは、腫瘍内もしくは腫瘍に隣接して、又は正常もしくは非標的組織もしくは器官の近位に配置することができる。そのような配置は、甲状腺、心臓などの高感受性及び/又は非標的部位の近位、又は腫瘍もしくは標的治療領域の近位で受容された用量の外部モニタリングを可能にするように選択できる。

【0092】

図1Aに示した埋め込み型センサユニット10には、外部読み取り装置30との無線連絡を可能にするように構成された電子機器10e及びアンテナもしくはコイル10aが含まれる。センサユニット10は、さらにまた放射線を検知するように構成することもできるので、したがって吸収された放射線量に比例する閾値電圧「第5」変動を用いて作動するRADFETを含むこともできる。特定の実施形態では、少なくとも1つ、及び典型的には複数の埋め込まれたセンサユニット10は蛍光、放射線量及び温度をモニタリングするように構成できる。そこで、センサ10は、RADFET、光検出器及び光源、ならびにデジタル式温度センサを含むことができる。温度データ及び放射線量データを使用すると、ハイパーサーミア/放射線併用療法を投与するのに役立たせることができる。

【0093】

センサユニット10には、誘導的に結合させた内部コイル10aを経由して誘導的に出力供給できる。センサユニット10は、ガラスカプセル、又は実質的に不浸透性である医療用に適切な材料などの密閉された被包化ハウジング内に保持できる。センサユニット10の電子機器10eは、セラミック基板上に取り付けることのできるデータ収集及び読み取り装置/センサユニットの通信を制御するマイクロ(又はナノ)プロセッサ制御装置を含むことができる。電子機器10eはデータ収集のために用意された半導体チップへのルーティングを備える特注チップデザインを含むことができる。センサユニット10は、双方向性アンテナを含むことができる。センサユニット10は、約1mV以下(又は以上)の分解能の第5回測定を提供でき、16ビットCRCエラーチェック能力を備えて作動できる12~16ビットデータ収集を使用するデジタル通信コンポーネント(デジタル信号プロセッサなど)を備えるように構成できる。電子機器10eは、クラスVIのUSPエポキシ樹脂で作製し、カプセル10cの内側に密閉することができる。カプセルの外面又は本体は、蛍光励起及び反応光線がセンサ壁を通して伝送できるように構成されたパリレンC物質又はその他の生体適合性コーティング剤でコーティングすることができる。センサユニットは、EO(エチレンオキサイドガス)滅菌して、上述したように長期的インビオ埋め込みのために適合するように適応させることができる。センサ本体又はその部分は、CTスキャン及びポर्टフィルムなどにおいて視覚的対比のために放射線透過性であってよい。代表的なセンサユニットのハウジングの構成についての追加の説明は、同時係属の米国特許出願第10/353,857号に見いだすことができる。

【0094】

特定実施形態では、システム10は選択された埋め込まれたセンサユニット75を個別的に選択的に(連続的に)ポーリングする、アドレスする、及び/又はインテロゲートするように構成することができる。センサユニット75は、同一周波数で読み取り装置を用いて作動させる、又は通信するように構成することができる。どのセンサユニット10が有効通信モードにあるのかを制御及び/又は同定するために、シングルビット又はマルチビット識別子を生成してデータ流内で使用できる。

【0095】

特定の実施形態では、蛍光センサ又はプローブ10は、光線がセンサ10を被包化する可能性がある筋膜層に浸透するように、局所組織を通して励起光を投影するように構成されるであろう。これまでに実施された試験は、レーザダイオードが組織減衰に起因して強

10

20

30

40

50

度の一部を犠牲にして組織に約 20 mm 浸透する光線を発生させることができる。ヌードマウスを対象とする試験もまた、カテーテルを使用する蛍光体センサ又は励起光源を使用すると、さらにまた数十ミリメートルの深さへ浸透する励起光を発生させることができることを証明している。そこで、センサ 10 の長期的埋め込みに関連する生物付着が信号強度に関してこの装置の作動を阻害するはずはないが、それはレーザー光が吸収されたタンパク質及び脂質の層に浸透し、筋肉、血液、血清などを通して十分に伝送されるからである。図 2 は、多チャンネルアナライザの様々な積分時間 (10 ms、1,000 ms、及び 300 ms) を使用してイヌの血液及び血清を通る様々な波長でのレーザーの透過率 (強度計数) を示している。

【0096】

作動時には、蛍光モニタリングシステムは、設定又は規定積分時間周期にわたって 1 波長当たりの計数を合計することによって相対蛍光を定量することができる。各時間周期後に、図 2 に示したような、強度対波長の新しいスペクトルが作製される。作動時には、強度はより多くの蛍光体 (蛍光発光) が検出用ダイオード及び / 又は光ファイバ要素の正面を通過するにつれて増加する。スペクトル自体の最大値又は積算値は、腫瘍対正常組織において比較できる。

【0097】

特定の実施形態では、評価中に、蛍光分析物が投与される前後にいずれかの対象組織内でベースライン時信号を入手できる。蛍光体標識分析物を使用する本発明の実施形態では、抗体などの標識分析物は、取り込みの薬物動態学及び薬力学を蛍光体及び抗体が身体の全体に分布するにつれてリアルタイムでモニタリング及び記録できるように投与される。これまでの実験は、適切な抗体については腫瘍内への優先的取り込みが行われること、そして蛍光体単独では抗体へ共役した蛍光体と同一の分布パターンを有していないことが証明されている。キャリブレーションではインビトロアッセイ及び血漿もしくはその他の選択された生体材料の数値とのインビボ比較のどちらも考慮に入れることができる。

【0098】

C-14 標識は、グルコース (180 ダルトン) などの極めて小さな分子量を有する化合物の場合でさえ、有機化合物の動態を試験するための有用なツールである。その内容がこれにより全体として参照して本明細書に組み込まれる同一出願人による米国特許出願第 10/127,207 号を参照されたい。しかし、蛍光マーカーは、他の状況において、例えば Ab 標識又は遺伝子発現において利点を有する。放射性標識及び蛍光標識センサは、広範囲のインビボ試験のために強力なタンデムセンサを提供する。光ファイバ蛍光プローブ 10' (図 3) のカテーテル使用バージョンについての最初の実験は完了している。カテーテル使用のプローブ 10' は図 3 に示されており、コンピュータインターフェース 50、インビボの生体内留置のために校正されているチップ 10t を備える光ファイバプローブ 10f、ダイオード照射源、及び Ocean Optics (フロリダ州ダニーディン) から入手できるような光学多チャンネルアナライザ 100 を有する。以下で詳細に考察するように、このプローブの分解能を決定するための試験が実施された。これらの測定は ALEXA FLUOR 594 (Molecular Probes 社: オレゴン州ユージーン) を用いて実施された。3% の乳汁を含むゼラチン中でプローブを用いての校正ラン (散乱光に対して) は、治療用化合物を用いたアッセイのために適切である以上の、ng/ml 範囲内の高感受性を証明した。

【0099】

上述したように、特定の実施形態では、色素などの蛍光標識を励起かつ読み出すために完全埋め込み型レーザーダイオード / 光ダイオードの対を構成できる。埋め込み型蛍光体センサは、臨床的に容認可能な表面深さ及び / 又は長期的ベースで情報を提供できる。しかし図 3 に示したような光ファイバを使用するプローブは頑丈で便宜的であり、さらにより表在性の腫瘍に対する臨床的用途のために、又はエックスビボもしくはインビトロ分析のために魅力的な場合がある。光発光ダイオード (LED)、レーザーダイオード、及び光ダイオードが多数の用途のために開発されている。レーザーダイオードを使用するセンサは、

10

20

30

40

50

LEDを使用するセンサと同様に構成できるが、ただし前者では光帯域を相当に狭くして光出力を増加させる積算光キャビティが作り出される（ファブリ・ペロー型キャビティ（Fabry Perot cavity）として知られる）点が相違する。特定の実施形態では、埋め込み型バージョンに使用されるレーザダイオードの表面は、適切な蛍光の励起波長に実質的に適応する光帯域を作り出すために誘電フィルタでコーティングすることができる。垂直入射角度に対して約30度越える角度で出てくる光線はバンドからは遠すぎる可能性があるため、物理的コリメータを使用して角分散を制限することができる。光ダイオードは、同一方法で濾波及び視準することができる（フィルタは、594又は647nm、又は使用された蛍光体に依存して選択される他の波長の発光スペクトルが通過させられるように置かれる）。

10

【0100】

電力を節約するために、特定の実施形態では、レーザダイオードをパルスモードで作動させることができる。蛍光の基本現象は、1,000兆分の1秒から10億分の1秒の時間尺度で発生する。ミリワット範囲内の出力を有する光源からの励起光を使用して所望の深さへ標的組織内の蛍光体標識分析物を励起するためには、ミリ秒範囲内のパルス持続時間が適正であると考えられる。負荷サイクルは、テレメトリによってインプラントへ送られる総出力が合理的レベルとなり、同時にレーザダイオードがミリワット範囲内の光出力を供給できるように選択できる。

【0101】

光ファイバプローブ及び多チャンネルアナライザによって作り出される図6～8に示した発光スペクトルとは相違して、光ダイオードはその光帯域フィルタを通して許容される光を積算できる。これは周波数変化情報が重要ではない特定の用途には望ましいことがある。作動時には、特定の実施形態では、一部の蛍光はpH又は酸素張力に伴う周波数変化を示すことがある。これらは腫瘍学においては重要なパラメータである可能性があるため、スペクトル変化を決定するために、重複しない帯域フィルタを備える2つの光ダイオードがレシオメトリック法で使用される修飾されたセンサ構成を構築できよう。特定の実施形態では、埋め込まれたセンサ10は図1に示した管の本体内に1対のレーザダイオード/光ダイオードを並列で使用できる。一部の実施形態では、管のサイズは、例えば直径が約2.0～2.2mmであるように、いっそう小さくてもよい。

20

【0102】

適切なセンサの一部の実施形態はダイオードと管壁との間に空気界面を備えている。さらにまた別の実施形態では、カプセルの内部はカプセルのガラス壁の屈折率に適応する化合物で充填することができる。後者のバージョンは、ダイオードと管の外側のサンプルとの間の半円筒形レンズから形成することができる（空気バージョンと同様に一部のレンズ効果があるだろうが、余り顕著ではない可能性がある）。照射パターンはインピトロで記録することができ、照射野の相対的利点を評価できる。

30

【0103】

図9A及び9Bは、センサ10のカプセル本体10cの内側に並列して整列させた2つの検出器75₁、75₂、及びレーザダイオード60励起源を使用する1つの埋め込み型蛍光体センサ10の構成の断面図を示している。図示したように、レーザダイオード60は光60_Lを伝送する。励起光60_Lは、2つの相違する光散乱角である約10°の₁及び約40°の₂を有する可能性がある。内因性分散は、視野の第1決定因子である。レンズ作用を使用すると、光円錐をある程度調整することができる（図9Aに示した実施形態は集束を想定していない）。センサ10は、有効視野を測定及び増加又は最適化するように構成することができる。結合の動態を追跡する相対スペクトルを記録できる。一部の場合は、蛍光を注射する前にベースライン時読み取り値を入手できる。インピボでの濃度に対して光ダイオード検出器75の出力を正確に正規化するためには、標的組織の減衰を考慮に入れることができる。蛍光データを正規化するための1つの方法は、濾波されていない光ダイオードを用いたベースライン時吸収読み取り値を入手し、その信号を知られている組織試験値と比較することである。この読み取りは、図9A及び9Bに示した帯域フィ

40

50

ルタ 80 を使用せずに第 2 光ダイオードを追加することによって実行できる。この構成は（以下で詳細に説明するように）円筒形フィルタを必要としない。

【0104】

特定の実施形態では、9A 及び 9B に示したように、第 1 検出器 75₁ は、第 2 検出器 75₂ が濾波されて蛍光体発光光線を検出する間にセンサ内に再進入するレーザ光を検出できるように、フィルタなしで（図ではフィルタ 80 を含むように示したが）構成することができる。第 1 検出器 75₁ によって検出された光線はモニタリングすることができ、その強度はレーザ信号の減衰について、及び / 又はレーザ光が組織に浸透する能力についての情報を提供できる。例えば、高密度もしくは非透過性組織については、検出されるレーザ光は、レーザ光が実質的に自由に放射してセンサから離れた近位組織内の深さまで移動する場合より高強度となるであろう。この濾波されていないデータを使用すると、検出器 75₂ から検出された蛍光体信号データを調整又は正規化することができる。レーザ光が透過する場合は、より少ない蛍光体光線が予想される。それ以上の蛍光プローブの校正は、インピトロで入手され、知られている蛍光体の濃度の信号強度をインピボで観察された強度と比較することによって実施できる。

10

【0105】

本明細書に記載したセンサは、インピボに留置された電流測定センサを用いると発生する生物付着問題を比較的に免れるように構成できる。上述した埋め込み型放射線線量計についての試験は、ガラスカプセルは、典型的には数週間又は数カ月間にわたり長期的に埋め込まれた場合でさえほんのわずかな異物反応しか引き起こさず、約 50 ~ 100 μm の厚さまで線維芽細胞による被包化をもたらすことを証明している。励起光及び放射蛍光は容易にこの層を通過できる。本発明の蛍光体センサ 10、10' は、数ミリメートル（典型的には約 20 mm まで）離れた組織の表面下位置での活性を精査することができ、さらに薄い筋膜層も通過できる。

20

【0106】

本発明による一部の実施形態では、外部起源からの蛍光体を使用できる。そのような場合には、蛍光体信号を使用すると組織内の標識分析物の量を提供できる、又は一部の細胞プロセスもしくは自然プロセスに起因する蛍光信号の活性化又は消光をモニタリングすることができる。このシグナリング能力の価値は、抗原発現の変化、アポトーシス状況などの事象を同定できる点にある。本発明による一部の実施形態は、さらにまたセンサ本体上に保持された蛍光体標識抗体を放出するためのマトリックスを含むことができるが、しかしセンサはそのようなマトリックスを含まずに構成することができ、そして外部から投与される標識抗体などの蛍光体標識分析物の存在に基づいて励起光を投影してそれに反応した照射された蛍光を検出するように構成することもできる。

30

【0107】

本発明による一部の実施形態では、定量情報を使用すると治療中に投与される治療薬の量を滴定することができる。Ab 療法については、初回の投与が腫瘍標的にどのように効果的に到達したかに基づいて用量を調整できる。これらの技術を使用すると、さらに蛍光も含有できるミセルから毒素を放出させることもできる。そこで、例えば上記の埋め込み型装置 10 を使用すると、標的での適正なミセル濃度を決定することができる。これらのデータを使用すると、毒素の放出を指示する、又は刺激することができる。

40

【0108】

本発明による一部の実施形態では、標識分析物又は化合物の濃度は、埋め込み型センサを使用する時間の関数として定量できる。本発明による一部の実施形態では、屈折率整合エポキシを使用するとレーザダイオードと光ダイオードをガラス（又はその他の生体適合性及び光学的に適切な物質）に結合させ、内部反射が防止されるようにセンサの電子機器を封じ込めることができる。本発明による一部の実施形態では、放射光の強度は、腫瘍についての光学的プロファイリング情報を生成するために、段階的、増分的又は減分的方法で変動させることができる。上述したように、レーザダイオード 60 はパルスングできる。パルス励起を使用すると、例えば蛍光をクエンチして回復について観察できる。他の実

50

施形態では、パルシングを実施すると、経時的に信号を維持するために蛍光のクエンチを回避することができる。本発明による一部の実施形態では、蛍光体濃度の高密度（時間的に）サンプリングを長いサイクル時間（時間）にわたって発生させることができる。このアプローチには、埋め込まれたセンサの確認及び／又はファイバプローブを使用する技術を使用できる。

【0109】

特定実施形態では、ある範囲の励起（レーザダイオード）波長は、647nmで励起され約665～695nmで蛍光光線を放射するALEXA FLUOR 647などの蛍光体に対して約630～660nm（ナノメータ）であってよい。光出力は1～20mW範囲内であってよい。負荷サイクルは、レーザがその蛍光体を漂白するかどうか依存して変動するであろう。一部の組織では、10mWでは2パルスで信号を破壊できる。そこで、1～10%範囲内の負荷サイクルが予測される。同様に、より高出力範囲では、レーザは100%でランするとバーンアウトするであろう。最後に、センサが身体内の相当深部に埋め込まれると、100%でセンサ電子機器を作動させるために十分に結合するには出力が不十分になる可能性がある。特定の実施形態では、作動周波数は10～1kHzの範囲内であろう。

【0110】

本明細書で考察する特定波長は例示する目的でのみ提供されており、本発明の実施形態がこれらの実施例に限定されないことは理解されるであろう。例えば、上記で考察した波長範囲は本発明の範囲から逸脱せずに約400から約900nmであってよい。

【0111】

つまり別の言い方をすると、特定の実施形態では、レーザダイオード60は1秒当たり10～1,000回の周波数でパルシングされる。周期の半分で「オン」される場合は、オン時間は可能性のある時間量の約1～10%に減らすことができる。例えば、レーザは1秒当たり10回発射させる10Hzでパルシングすることができ、10%負荷サイクルでは、1ショット当たり約0.01秒間オンされるであろう。

【0112】

特定の実施形態では、検出器75は、信号（数）が濃度に依存して総計約1～20秒間にわたり積算されるように作動させることができる。測定は、例えば約24～48時間などの所望のモニタリング間隔にわたり数分間毎に繰り返すことができる。

【0113】

本発明による一部の実施形態では、円筒形吸収フィルタ80cには、作動中は例えば図11A-11Cに示したような光検出器75で増加した入射蛍光信号を収集できるようにセンサカプセル10cの壁の少なくとも約180度を被覆するフィルタを用意することができる。図示したように、フィルタ80cは概して円筒形であり、所望の長さについてセンサ10cのハウジング本体の周囲（360度）にわたって連続してよい。あるいはまた、フィルタ80cは、特に1つの検出器75しか使用されない場合は、周囲の一部分（検出器の上方の180度など）だけを被覆する半円筒形フィルタ（図11B）として形成することもできる。そこで、本明細書で使用する用語「円筒形」フィルタには概して半円筒形フィルタの形状も含まれる。

【0114】

誘電フィルタは角度依存性である。従来型では、入射光が垂直入射の約15～30度以内でない限り、フィルタは適正に作動することができない。そこで、角度の制限は、順にセンサ装置の光収集力を制限する可能性がある。図11Aに示したように、部分的に円筒形のフィルタ80cは所望の長さにわたってカプセルの壁の少なくとも約180度を被覆又は重なるように構成されており、有効入射蛍光体領域「 R_A 」を定義することができ、これはセンサ本体10cの一部分の上方に約180度の視野を可能にする。フィルタ80cは、センサ壁10wの内面又は外面上に形成することができる。特定の実施形態では、壁10wの吸光度を修飾する波長遮断剤を壁の上方にコーティング又は形成することができる。コーティングは、円筒形壁10wの外面上に沈着させられる誘電性反射防止層の積

10

20

30

40

50

み重ねによって提供できる。その他のコーティング又は光学的調整を使用して所望のフィルタ範囲を提供することもできる。

【0115】

本装置によって励起光を投影又は発光できるように、光ウィンドウ60w（円筒形フィルタ80c内のスペース又は開口部）をセンサ壁上に形成できる。図11B及び12はさらにまた、フィルタ80cを通してセンサ本体をレーザ光が通過できるように壁10wの選択された領域 R_L の上方での複合フィルタの使用を例示している。

【0116】

特定の実施形態では、ウィンドウ60wは、蛍光体（長い）波長で光線が進入できる（そして、そこで投影される場合はセンサの本体から励起光が出て行くのを防止する）ように構成されている部分的円筒形フィルタ80cの残りの部分とは対照的に、第1波長で発光する第2領域「 R_L 」と結び付いている。この二重物質層の構成は複合フィルタであると説明することができ、蛍光体センサの感受性を増加させながら蛍光体に基づく照射発光ではなく発光された励起光の検出に起因する偽示度の可能性を減少させるはずである。光ウィンドウ60wは、（フィルタ帯域を調整する第2コーティング又は層を備える）選択的複合フィルタとして形成できる。そこで、この実施形態では、アパーチャボックスは必要とされず、蛍光体信号は広範囲にわたり光検出器内に入力できる。

【0117】

図11Cは、円筒形フィルタ80cからレーザ光が出て行くのを可能にする別の技術を例示している。この実施形態では、レーザ光源は、光線が臨界角より大きい角度で円筒形壁にぶつかることによってセンサから出て行けるようにセンサ内に配置されている。そこで、レーザ光源とセンサの壁との整列は、光線が臨界角より大きい角度で円筒形センサ壁上に衝突するために、レーザ光線が円筒形フィルタ80cを通過するのを可能にする。

【0118】

検出器75は、フィルタ80cを規定する壁10wが検出器75から適切な間隔で離れているように、センサのハウジング又は本体の幅又は直径より実質的に小さい（典型的には約30%未満）ように構成かつサイズ設定することができる。図示したように、検出器75はセンサ本体10cの実質的に中央に配置できる。この構成及び間隔は、プローブ（励起）ビームが漏れてセンサ内に戻り、検出器で検出される蛍光信号を不純にする場合に結び付く漏れを阻害するように選択できる。そこで、フィルタ特性（帯域、サイズ、間隔、長さ、角被覆範囲など）は、作動中にはプローブ光が検出から遮断され、長い波長の放射された蛍光（光線）が通過するように選択できる。

【0119】

例えば、図11Cに図示した光線75_Lを見ると、中央の光線は90度の角度でフィルタ壁にぶつかる。同一ポイントからの他の光線は、検出器75の辺縁に到達できる。検出器75は、図11Aに示したようにセンサ本体の中央で実質的に真ん中に保持できる。検出器75は、センサ本体10cの横断幅（直径）「 W_2 」より短い関連幅「 W_1 」を有する可能性がある。

【0120】

センサ本体、及びフィルタ80cは検出器75に対して、それらの非垂直光線が円筒壁に対して作り出す角度が過度に大きくなく、それにしたがって（フィルタを規定する）検出器及びセンサ本体の幅が選択されるように構成できる。所望の角度は、フィルタに基づいて変動させることができる。適切な構成を表現する1つの方法は、

$$W_1 < 2R / \tan(90 - T) \quad \text{方程式(1)}$$

（式中、 W_1 = 断面図における検出器の幅、 R = 円筒形センサ本体の半径、 T = フィルタの最大受光角）である。

【0121】

そこで、「 T 」はそれを越えると他の（所望ではない）光線がフィルタを通過できる垂直入射から外れた角度である。 T は正確なパラメータではないが、それは漏れが発生し始めてその後は悪化するためである。本明細書で使用するように、 T は漏れが急速に、まず

ます実際に高速で悪化する角度を表している。Tの典型的な作用範囲は約15～30度である。そこで、30度については、 $W_1 < 1.15R$ 、そして15度については $W_1 < 0.54R$ である。

【0122】

特定の実施形態では、円筒形本体10cの軸に沿った検出器75の長さ「 L_d 」(図11B)は、

$$R / \tan(90 - T)$$

方程式(2)

(式中、Rはセンサ本体の半径であり、Tはフィルタの臨界角である)より小さいように構成できる。そこで、上記のように、特定の実施形態では、Tは約15～30度の範囲に及んでよい。そこで、検出器の長さ L_d は、15度については $< 0.27R$ 、又は30度

10

【0123】

フィルタ80cは円筒形でハウジングの全半径方向周囲を実質的に被覆していてもよいが、典型的にはセンサ本体の全周囲のアキシアル長さ「L」の一部を被覆している可能性がある。

【0124】

図11Bではセンサ本体10cの長さに沿って実質的に中央に位置するように示されているが、フィルタ80c及びその下にある検出器75はセンサ本体10cの1つの端部により近位に配置することができる(図示していない)。

20

【0125】

特定の実施形態では、2つの背中合わせの検出器75を備える2つの励起光源は、規定長さにわたって円筒形本体の周囲の約300度、典型的には約360度を被覆するように構成されているフィルタ80cを備えるセンサ本体10c内に配置できる(図示していない)。

【0126】

作動時には、部分円筒形フィルタ80eは、垂直入射角度に近い角度でフィルタ80cを通過するように蛍光体光線を光ダイオード又は検出器75に到達させるように作動できる。光検出器75の下方には、内部反射を減少させるために円筒形本体10eの周囲の相

30

【0127】

フィルタ80cを適所に置くと、アパーチャ75a(図10に示されている)はもはや検出器75の上方には必要とされない。しかし、図12を参照すると、(a)小さなアパーチャ又はシフティングフィルタを使用すると、レーザ光の出口をフィルタ80cが遮断するのを防止できるようにアウターフィルタ80Cがレーザ波長から見えなくすることができる。(b)の場合には、レーザ光自体の波長は変化させられず(小さなシフティングフィルタがアウターフィルタの濾波作用を低下させる)、したがって光線がカプセルから放射されると、偽信号を作り出すであろうカプセル内に反射し戻す可能性は小さく

40

【0128】

図10は、光ウィンドウ60w及びフィルタ80'の構成の第2の実施形態を示している。この実施形態では、第2フィルタはレーザ60の上方に配置されて間隔をあけており、シフタ60sとして機能する。シフタ60sは円筒形フィルタ80cと内壁の界面で接しており、励起光をセンサから外へ向かわせる。

【0129】

あるいは、レーザ光60_Lは、図11Cに示したように励起レーザ光をセンサから投影するように方向付けるために急角度(典型的には約75～105度)で円筒形壁10wへぶつかるように方向付けることができる。この構成は、円筒形フィルタ80cの壁にシフ

50

タ区間を接触させるよりも容易に実行することができる。

【0130】

本発明による一部の実施形態では、腫瘍部位又は非特異的非腫瘍部位でのA b付着をモニタリングできる。正常組織もまた、それが攻撃されていないことを確認するためにモニタリングできる。本発明による一部の実施形態では、遺伝子療法組み換えの結果として生じたタンパク質の発現をモニタリングできる。本発明による一部の実施形態では、例えば体外から導入された蛍光体又は上述した方法などのマトリックス放射法を使用して、アポトーシス又は壊死の開始などの細胞特性における変化をモニタリングできる。本発明による一部の実施形態では、埋め込み型デバイスは身体内の広範囲の深さにわたってポジショニングできる。

10

【0131】

以下では、上述した内容を、非限定的実施例を参照しながら説明する。

【実施例】

【0132】

本明細書に記載した蛍光センサシステムは、抗体を使用する治療の薬物動態学及び薬理学を個別ベースで評価することを可能にする、蛍光標識した分析物のインビボでのリアルタイムの短期的及び／又は長期的な測定を提供する。最初の実験は、プローブのカテーテル使用バージョンを用いて完了され、成功が得られた。プローブはレーザダイオード照射源及び光学的多チャンネルアナライザを使用する。レーザダイオード(650nm)光源は効果的に組織内へ数ミリメートル浸透する。抗体はAlexa 647蛍光体(Molecular Probes社、オレゴン州ユージーン)を用いて標識した。インビトロ試験では、この波長が血液、組織、及び血清中への良好な光透過率を提供することが確認された。コロイド状ゼラチン混合物中の蛍光体を用いた校正試験は、 $< 10 \text{ ng/ml}$ 範囲内の感受性を証明した。

20

【0133】

2種の癌細胞系：ラージ・バーキット(Raji Burkitt's)ヒトリンパ腫及びBT474ヒト乳癌細胞系を使用して実験を実施した。標的抗原は、各々CD20及びHER2/neu(c-erbB2)であった。ハーセプチン(Genentech社)及び市販で入手できる抗CD20(Lab Vision社)を蛍光タグ付けし、適切な細胞系に塗布し、適切な波長に設定した共焦点顕微鏡下でイメージングした。ラージ(Raji)細胞及びBT474細胞はどちらも明確に染色し、標識系のプロービングは標的抗原に到達することに有効であった。蛍光プローブの分子量(800ダルトン未満)は抗体に比較して小さいので、それらの結合能力に影響を及ぼさない。

30

【0134】

インビボ実験を実施して、プローブが蛍光共役した抗体及び対象部位でのそれらの取り込みをモニタリングする能力を評価した。これら2種の腫瘍細胞系は、ヌードマウスへ異所性で移植した。BT474モデルでは、 $3 \sim 5 \text{ mg/kg}$ (動物の体重)(臨床用量は $\sim 4 \text{ mg/kg}$ である)の用量で尾静脈内へAlexa 647標識ハーセプチンをボラス注射した。肩甲部腫瘍部位に埋め込んだファイバプローブは、注射数時間以内に腫瘍内の蛍光体の中等度の取り込みを証明した(Alexa 647ヒドラジド単独の注射は注射後数分間以内にピーク取り込みを示した)。17時間後に、体外プロービングは正常組織の測定値はベースライン時示度よりわずかに高いが、両方の腫瘍部位は有意に高いことを証明し、これはタグ付き抗体が腫瘍組織内の標的抗原に付着していたことを示していた。CD20系についても同様の結果が得られた。

40

【0135】

他の陽性及び陰性コントロールは、上記の実験結果が妥当であることを確証した。これらをまとめると、蛍光プローブは臨床的に重要な濃度でインビボの抗体取り込みを測定して両方の有効性(すなわち、取り込み力学)を評価するための強度の可能性を証明しており、広範囲の研究及び診断試験にとっての基盤を提供する。本装置は、この種のアッセイが表面プロービングに限定されないように、身体内の実質的にあらゆる場所への配置を可

50

能にできるように構成できることが企図されている。

【0136】

2種のヒト癌細胞系：ラージ・バーキットヒトリンパ腫及びBT474ヒト乳腺癌（どちらもWake Forest大学から入手した）を使用してインビトロ実験を実施した。この実験の標的抗原は、ラージ細胞系に対してはCD20、そしてBT474細胞に対してはHER2/neu(c-erbB2)であった。HER2/neuに対する一次抗体は、マウスモノクローナル抗体抗c-erbB2(LabVission社：カリフォルニア州フリーモント)及びGenentech社(カリフォルニア州サンフランシスコ)から市販で入手できる抗乳癌薬であるBT474細胞に対するハーセプチンを含んでいた。ハーセプチンならびにリツキサン(Genentech社及びIDEC社、カリフォルニア州サンディエゴ)はFDA(米国食品医薬品局)によって初めて承認された2種の免疫療法薬であった。ハーセプチンは乳癌を標的とするが、他方リツキサンはCD20陽性B細胞性非ホジキンリンパ腫を標的とする。リツキサンは今回の実験実施時に使用するためには入手できなかったため、ラージ細胞系と一緒に、市販で入手できるマウスモノクローナル抗体である抗CD20(LabVission, Inc.)を使用した。一部の場合には、一次抗体は蛍光体を用いて標識したが、大部分の細胞顕微鏡試験のためには信号を増幅させるために二次標識抗体を使用した。使用した二次抗体は、一次抗体とは相違する波長を有する適切な蛍光体を用いて標識したMolecular Probes社(オレゴン州ユージーン)からのヤギ抗マウスIgG(H+L)であった。

10

【0137】

図4及び5は、これらの分析により得られた画像のタイプを示している。これらの試験は、この標識系が標的に到達することに有効であることを証明している。インビボ蛍光体は個別細胞に対して感受性、又は他の実施形態では離散性腫瘍における細胞の集団又は群に対して感受性である可能性がある。図5に関して、BT474細胞は細胞表面、膜局在パターンで明確な染色を証明した。この染色は市販のマウス抗c-erbB2抗体を用いた2種の一般的固定法後に存在したが、それ自体が相違する色の蛍光体を用いて個別に標識された種特異的二次抗体によりイメージングした場合だけであった。固定細胞は、抗c-erbB2(一次抗体)へ共役したALEXA FLUOR 647、及びヤギ抗マウスIgG H+L(二次抗体、Molecular Probes, Inc.)へ共役したALEXA FLUOR 594を用いて標識した。

20

30

【0138】

標識の強度は、一次抗体濃度における10倍の増加が一次抗体自体の蛍光コンジュゲートをイメージングすることによって、ならびに二次抗体によって間接的に視認できたので、一次抗体の濃度の関数である可能性がある。細胞標識実験では、一次抗体及び二次抗体を用いたこの二重標識のプロトコールは、現在の標識を検出する方法が限られていることを前提にして二次抗体が信号を増幅させるので、極めて一般的である。この標識は、間違った一次抗体の存在下、あるいは一次抗体が存在しない場合は極めて弱くしか存在せず、共焦点顕微鏡によって明らかにされたように血漿膜への強力な「リング状」局在を証明しなかったため、特異的であると判断された。一部のc-erbB2抗原は全細胞上に存在し、BT474細胞上で過剰発現したので、これらの結果は予測された。

40

【0139】

未結合蛍光体のクリアランスを試験するために、蛍光プローブのカテーテル使用バージョンをFisher 344系ラットの皮下に埋め込んだ。ラットには時点0に尾静脈を経由して10 µg/gのALEXA FLUOR 594を注射し、埋め込み部位でのその取り込みを約45分間にわたってモニタリングした(図6を参照)。蛍光体の取り込みは注射の約30秒後にピークに達し、その後徐々に減少した。埋め込み部位では相当に高い強度がまだ45分後に検出されたので、他の身体領域を蛍光体の分布を決定するために外部から調査した。プローブからの光線は組織を通過して浸透した。約300 msの短い積分時間、強固な信号、及びスペクトル信号が統合されなかったという事実は、この蛍光体の用量(約10 µg/g)が不必要に高かったことを示している。目的は、このプロー

50

ブを用いて動態の検出を行う単純な例を作り出すことであった。

【 0 1 4 0 】

また別のインビボ実験もまた、蛍光体プローブが蛍光共役した抗体及び対象部位でのそれらの取り込みを追跡する能力について前途有望な結果を証明している。ヌードマウスに B T 4 7 4 及びラージ・パーキットリンパ腫細胞のヒト腫瘍異種移植片を埋植した。触知可能な腫瘍が存在するようになるまで腫瘍を増殖させた。マウスにケタミン / キシラジンをを用いて麻酔をし、尾静脈を経由して B T 4 7 4 腫瘍に対してはハーセプチン (F D A が免疫療法薬として承認した 2 剤中の 1 つ、 G e n e n t e c h 社) 及びラージ腫瘍に対しては市販で入手できる抗 C D 2 0 (L a b V i s i o n 社) を静脈内注射した。陽性及び陰性コントロールもまた確立した。インビボ実験は表 4 に示した。

10

【 0 1 4 1 】

【表 4】

実験	結果の要約
Fisher 344 系ラットの尾静脈を経由して ALEXA FLUOR 594 ヒドラジドを IV 注射した。プローブは正常健康組織の皮下に配置した。	蛍光強度信号のピークは 30 秒内に到達し、徐々に減少した。プローブを抜去した 45 分後にはまだ相当に高かった。耳、尾静脈、および排出された尿中での体外診査は蛍光が存在することを証明した。
肩甲部および側腹部 BT474 腫瘍を有するヌードマウスにおいて尾静脈を経由して ALEXA FLUOR 647 標識ハーセプチンを IV を注射した。プローブは肩甲部腫瘍の皮下に配置した。	注射数時間後に腫瘍内への中程度の取り込み。注射前示度に比較して正常組織中ではわずかな増加。17 時間後、正常組織はわずかに高かったが、両方の腫瘍組織は有意に高く、抗体が腫瘍に付着したいることを示していた。17 時間後にプローブを使用して体外で測定を実施した。
肩甲部および側腹部 BT474 腫瘍を有するヌードマウスにおいて尾静脈を経由して ALEXA FLUOR 647 標識ハーセプチンを IV を注射した。プローブは肩甲部腫瘍の皮下に配置した。	ハーセプチンを用いて上記と同一の結果。
腫瘍を有していないヌードマウスにおいて尾静脈を経由して ALEXA 647 標識ハーセプチンを IV 注射した。プローブは肩甲部組織の皮下に配置した。	ピーク取り込みは数分間以内に発生した。信号強度は、以前に正常組織のハーセプチン実験において所見された強度と同等であった。体外診査は、身体全体にほぼ同等に分布することを証明したが、乳腺組織においてわずかに高かった可能性がある。
ヌードマウスのラージ腫瘍における ALEXA FLUOR 647 標識抗 CD20。プローブは大きな腫瘍(~1000 mg)の皮下に配置した。	注射後 2 時間以内に、腫瘍信号は上昇し続けた。17 時間後、体外診査は腫瘍内の蛍光取り込みが正常組織中より有意に高いことを証明した。
ヌードマウスの BT474 腫瘍における ALEXA FLUOR 647 標識抗 CD20。プローブは腫瘍の皮下に配置した。	腫瘍は正常組織中に比較してわずかに優先的取り込みを有したが、ハーセプチン実験の場合ほど有意ではなかった。腫瘍にはいくらかの CD20 抗原が存在すると思われる。反復実験。
ヌードマウスの正常組織中への ALEXA FLUOR 647 ヒドラジド。プローブは正常組織の皮下に配置した。	蛍光は 10 分以内に観察され、ピーク強度は、抗体に共役結合した蛍光よりはるかに速く、30 分以内に発生した。肩甲部、側腹部、頭蓋底、腎臓、および尾静脈を診査した。すべてがほぼ同量の信号強度を有していた。
右側腹部にヒト脳腫瘍細胞を埋植したヌードマウスに自然蛍光 BACPTDP(405 nm で励起する)を注射した。目に見える、または触知できる腫瘍の徴候はなかった。信号は、エックスビボに配置したファイバプローブから入手した。500 nm の発光フィルタを使用した。	信号は注射直後に尾静脈で観察され、さらに注射後最初の 2 分間以内に耳でも観察された。最初の 2 分間以後は有意な信号は生じなかった。耳における信号波動は、おそらくファイバのポジショニングのためであった。最大の信号は、腫瘍細胞が埋植された右側腹部で所見された。腫瘍増殖の徴候は見られなかったため、結果を検証するために実験を反復する必要はなかった。他のいずれの場所でも重大な信号は発生しなかった。剖検により、ほぼすべての蛍光は身体内のいずれにおいても信号が欠如していたことに、そして腫瘍の徴候が明白ではなかった事実一致して胆嚢に蓄積していた。

20

30

40

【 0 1 4 2 】

50

図7及び8は、BT474腫瘍における標識ハーセプチン及びラージリンパ腫瘍における抗CD20の取り込みを示している。臨床的に適切な用量レベルのAbが投与されたことに留意されたい。腫瘍中の信号は正常組織内より、又は腫瘍自体への注射前に入手したベースライン時信号より有意に高かった。ピーク取り込みは注射後数時間まで到達しなかったが、これは抗体取り込みが蛍光体自体の取り込みより緩徐であることを確認している。さらに図6から明らかなように、蛍光体単独を試験するとそのピーク強度は半時間未満で到達したが、これはタグ付き抗体を使用した実験については、蛍光体が抗体から有意に分離しないことを示している。これらの実験結果は、本発明のインビボ蛍光プローブが臨床的に有用なデータを提供できることを示している。

【0143】

詳細な評価を実施するとHer2/neuの発現レベルが相違する3種の乳癌細胞系において蛍光標識したハーセプチンの腫瘍組織中薬物動態学(PK)を決定できることが予想されている。ヒト腫瘍はヌードマウスの側腹部及び肩甲部領域内に異所性及び正所性に埋植することができようが、それは微小環境及び抗体挙動がこれら2つの部位間で相違する可能性があるためである。ヒト腫瘍細胞系は数カ所の研究所から入手できる。MCF7及びBT474ヒト乳癌は、それに薬物のハーセプチン又はいずれかの抗HER2/neu(もしくは抗c-erbB2)抗体が結合するHER2/neu、又はc-erbB2を過剰発現する。使用した腫瘍細胞系は次のとおりであった：

(1) BT474 - 超臨床レベルのHER2/neuを過剰発現する。

(2) MCF7 - HER2/neuを発現しない。

(3) MCF7 TamR - Duke大学でDr. Dewhirst, Blackwell及びDr. McDonnellによって開発された。これは、臨床的に重要なレベルでHER2/neuを過剰発現する。

【0144】

雌性マウスの側腹部又は乳房脂肪パッドのいずれかに腫瘍細胞を移植し、腫瘍を直径8~9mmへ増殖させた。MCF7細胞系が移植される動物には、腫瘍移植の数日前にエストロゲン(MCF7及びMCF7-Her2)ならびにタモキシフェンペレット剤(MCF7 TamRのみ)が埋め込まれる。腫瘍が分析サイズに到達すると、蛍光標識したハーセプチンをボーラス又は注入、IVのいずれかとして投与し、48時間にわたり1~2時間毎に腫瘍中で非侵襲的に蛍光強度を測定し、さらに6回の時点で6~12時間毎に測定を実施することができよう。実験の終了時には、腫瘍を切除し、後に行う切片作製及び蛍光強度イメージングのために急速冷凍することができる。取り込み及び結合の動態は、最大結合(飽和)が達成されるまでモニタリングできる。データが入手される時点又は実験の実施期間は最初の数回の実験結果によって調整できる。比較的スペクトルサンプルは、側副正常組織(例、筋肉)内で同一時点に非侵襲的に収集し、腫瘍対筋肉比を計算する。サンプリングは、腫瘍に到達する抗体の統合量の良好な推定値(AUC)を入手するために十分頻回に実施する。各実験は、ハーセプチン群対非特異的コントロール抗体群及び側腹部群対正所性増殖群の各5匹のマウスからなる4群を含むことができる。そこで、各細胞系に対して20匹のマウスを使用でき、この計画は3種の細胞系(MCF7、BT474、MCF7 TamR)に対して行えるので、計60匹のマウスを使用することになる。

【0145】

(a) ハーセプチンについてのAUCはHer2陰性細胞系についてよりHer2過剰発現細胞系についての方が大きくなるであろう。(b) ハーセプチンについてのAUCはHer2(+)細胞系中では非特異的MOAbより大きいであろうが、MCF7細胞系では非特異的MOAbと同等であろう。(c) Her2(+)細胞系内では、AUCはBT474に対してが最大、MCF7 Her2に対してが中間、そしてMCF7 TamRに対してが最低であろう。(d) ハーセプチンの取り込みは、異所性部位に比較して腫瘍が正所性部位で増殖した場合に大きくなるであろう、と予想されている。

【0146】

動態分析を使用すると、血漿中PKデータを入手するために最適なサンプリング時間を

10

20

30

40

50

確立することができる。

【0147】

眼中で実施した蛍光強度測定値は直接血漿測定値の代理として使用できる。そして腫瘍組織中抗体レベルは冷凍切片から直接決定できる。2種のHer2(+)細胞系の1つを使用できる。実験は1カ所の腫瘍部位 - 最も有望には正所性部位で実施できる。この実験は1群当たり動物5匹×6回の時点×1種の腫瘍細胞系×2種の抗体=60匹のマウスを必要とするであろう。規定した時点に、腫瘍を有するハーセプチン又はコントロール抗体を摂取した動物は眼内で実施された蛍光強度の測定を受け、腫瘍及び正常組織部位の蛍光測定が完了され、そして蛍光強度の直接測定のために眼窩後穿刺により血漿が入手される。次に動物は腫瘍組織切除及び急速冷凍のために解剖される。腫瘍は低温切片作製して蛍光強度について分析できる。血漿薬物動態、時間の関数としての眼中の相対蛍光強度、及び蛍光標識した抗体の相対組織中濃度分布を確立できる。(a)眼中で実施された測定値の薬物動態及び直接血漿測定値の薬物動態は、ピーク値に対して正規化すると類似であろう。(b)冷凍切片の蛍光強度は、ピーク値に対して正規化すると、光ファイバ法を用いて入手した蛍光強度と類似であろう。(c)コントロール抗体より特異的抗体を用いた抗体取り込みの方が、不均質性が低いであろう、と予想されている。

10

【0148】

ここで図15を参照しながら、本発明の実施形態によるデータプロセッシングシステム1505のブロック図について考察しよう。図15に例示したように、データプロセッシングシステム1505は、本発明の実施形態による計算モジュール1550を含む。プロセッサ1510はアドレス/データバス1548を経由して記憶装置1514と連絡している。プロセッサ1510はいずれかの市販で入手できるプロセッサであってよい、又は特注マイクロプロセッサであってよい。記憶装置1514は、データプロセッシングシステム1505の機能を実行するために使用されるソフトウェア及びデータを含有する全階層の記憶装置を代表している。記憶装置1514は、次のタイプの装置：キャッシュ、ROM、PROM、EPROM、EEPROM、フラッシュメモリ、SRAM、及びDRAMを含むことができるが、それらに限定されない。

20

【0149】

図15に示したように、記憶装置1514はデータプロセッシングシステム1505に使用される数種のカテゴリーのソフトウェア及びデータを含有することができる：オペレーティングシステム1552、アプリケーションプログラム1554、入出力(I/O)デバイスドライバ1558、計算モジュール1550、及びデータ1556。計算モジュール1550は、投与された蛍光分析物に対する被験者のインビボ反応を評価するコンピュータプログラムコードを含む。特定の実施形態では、蛍光分析物には、蛍光前標識した分析物、自然蛍光分析物及び/又は被験者の体内に投与されると蛍光を示す分析物が含まれる。

30

【0150】

データ1556には、1つ以上の埋め込まれたセンサから入手できる検出された蛍光に結び付いている蛍光強度信号データ1562を含むことができる。プロセッサ1510は、例えばインビボ作動のために構成された蛍光センサのような、1つ以上の発光装置1520と連絡することができる。

40

【0151】

当業者であれば理解できるように、オペレーティングシステム1552は、International Business Machines Corporation(ニューヨーク州アーモンク)製のOS/2、AIXもしくはOS/390、Microsoft Corporation(ワシントン州レッドモンド)製のWindows(登録商標) CE、Windows(登録商標) NT、Windows(登録商標) 95、Windows(登録商標) 98、Windows(登録商標) 2000、Windows(登録商標) XPもしくはWindows(登録商標) XT、Palm, Inc.製のPalm OS、Apple Computer製のMac OS、UNIX(登録商標)、Free BSD、Linux、専売オペレーティングシステム又は例えば

50

埋込式データプロセッシングシステムのための専用オペレーティングシステムなどの、データプロセッシングシステムとともに使用するために適合するあらゆるオペレーティングシステムであってよい。

【0152】

I/Oデバイスドライバ1558には、典型的には1つ以上のI/Oデータポート、データ記憶装置1556及び特定記憶装置1514の構成要素及び/又は発光装置1520などのデバイスと連絡するためにアプリケーションプログラム1554によってオペレーティングシステム1552を通してアクセスされるソフトウェアルーチンが含まれる。アプリケーションプログラム1554は、データプロセッシングシステム1505の様々な機能を実行するプログラムの代表であり、好ましくは本発明の実施形態による作動をサポートする少なくとも1つのアプリケーションを含む。最後に、データ1556は、アプリケーションプログラム1554、オペレーティングシステム1552、I/Oデバイスドライバ1558及び記憶装置1514内に存在する他のソフトウェアプログラムによって使用される静的及び動的データを表している。

10

【0153】

本発明を例えば図15に示したアプリケーションプログラムである計算モジュール1550を参照しながら例示してきたが、当業者には理解されるように、本発明の教示から利益を得ながら他の構成もまた利用することができる。例えば、モジュール1550はさらにまた、オペレーティングシステム1552、I/Oデバイスドライバ1558、又はデータプロセッシングシステム1505内の論理的区域内に組み込むこともできる。そこで、本発明は図15の構成に限定されると見なされてはならず、この図は本明細書に記載した作動を実施できるあらゆる構成を含むことが企図されている。

20

【0154】

I/Oデータポートを使用するとデータプロセッシングシステム1505とシステム1520又はその他のコンピュータシステム又はネットワーク(例、インターネット)との間で、あるいはプロセッサによって制御される他のデバイスへ情報を伝達することができる。これらの構成要素は、多数の従来型データプロセッシングシステムに使用される構成要素などの従来型構成要素であってよく、本明細書に記載したように作動するように本発明によって構成することができる。

【0155】

本発明を特定区域のプログラム、機能、及び記憶装置を参照しながら例示してきたが、本発明はそのような論理的区域に限定されると見なされてはならない。そこで、本発明は図15の構成に限定されると見なされてはならず、本明細書に記載した作動を実施できるあらゆる構成を含むことが企図されている。

30

【0156】

上記は本発明の例示であり、それを限定すると見なされるべきではない。本発明の少数の代表的実施形態について記載していたが、当業者であれば本発明の新規の教示及び長所から著しく逸脱せずに代表的実施形態において多数の変形が可能であることを容易に理解するであろう。したがって、そのような変形はすべて特許請求の範囲に規定された本発明の範囲内に含まれることが意図されている。特許請求の範囲では、手段に機能を加えた条項は列挙された機能を実行すると本明細書に記載した構造、ならびに構造的同等物だけではなく同等構造にも及ぶことが企図されている。このため、上記は本発明の例示であり、本明細書に開示した特定実施形態に限定されると見なされてはならない、そして開示した実施形態ならびにその他の実施形態に対する変形は添付の特許請求の範囲内に含まれることが企図されていると理解すべきである。本発明は、添付の特許請求の範囲によって規定され、特許請求の範囲の同等物は本明細書に含まれる。

40

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1A】本発明の実施形態による埋め込み型センサのスクリーンの拡大プリントアウトである。

50

【図 1 B】本発明の実施形態による回転防止機能を有する埋め込み型センサの図である。

【図 2】多チャンネル受信器の積分時間を使用してイヌの血液及び血清を通る光線の伝送についての強度対波長のグラフである。

【図 3】本発明の実施形態による光ファイバ蛍光プローブシステムの構成要素のスクリーンのプリントアウトである。

【図 4】抗 CD 20 へ共役した ALEXA FLUOR 647 を用いて標識したラージ (Raji) ヒトリンパ腫細胞 (ペレット形) の顕微鏡写真のデジタル画像である。

【図 5】固定して抗 CERBB2 (Lab Vision, Inc.) を用いて標識された BT474 細胞の共焦点顕微鏡画像である。図 5 A は波長 647 nm のレーザ光線を用いて撮影されており、一次抗体標識化を例示している。図 5 B は波長 568 nm で撮影され、二次抗体標識化を例示している。

10

【図 6】ラット尾静脈内への投与時点 ($t = 0$) から時間的に相違する 3 回の時点に測定した Fisher 344 系ラットにおける ALEXA FLUOR 594 hydrazide (Molecular Probes, Inc., オレゴン州ユージーン) の強度対波長のグラフである。

【図 7】ヒト BT474 肩甲部及び側腹部腫瘍を有するヌードマウスにおける取り込み及び残留を例示している、標識ハーセプチンの注射後の様々な注射後時間における強度 (計数対波長) のグラフである。

【図 8】ラージ・バーキットヒトリンパ腫瘍を有するヌードマウスにおける取り込み及び残留を例示している、標識抗 CD 20 の注射後に採取された複数時点を含む、様々な時点における強度 (計数対波長) のグラフである。

20

【図 9 A】本発明の実施形態によるダイオード使用埋め込み型センサの側面図である。

【図 9 B】図 9 A に示した装置の切取り端面図である。

【図 10】本発明の実施形態によるセンサの蛍光励起及び検出の構成を示している略図である。

【図 11 A】本発明の実施形態による部分円筒形フィルタを有するセンサの断面 (端面) の略図である。

【図 11 B】本発明の実施形態によるレーザ出力を選択的に可能にする光ウィンドウを形成する半円筒形フィルタ及び複合フィルタを例示している、図 11 A に示したセンサの透視図である。

30

【図 11 C】本発明の実施形態による臨界角より大きい角度で円筒形センサ壁上に衝突することによってレーザ光線を放射するレーザの配置を使用する、図 11 A に示したセンサの略図である。

【図 12】本発明の実施形態による複合フィルタを備えるセンサの検出器及び励起の構成のまた別の実施形態の略図である。

【図 13 A - 13 E】本発明の実施形態による経時的な強度の時間依存性測定プロフィールのグラフである。

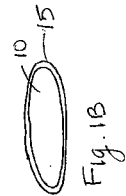
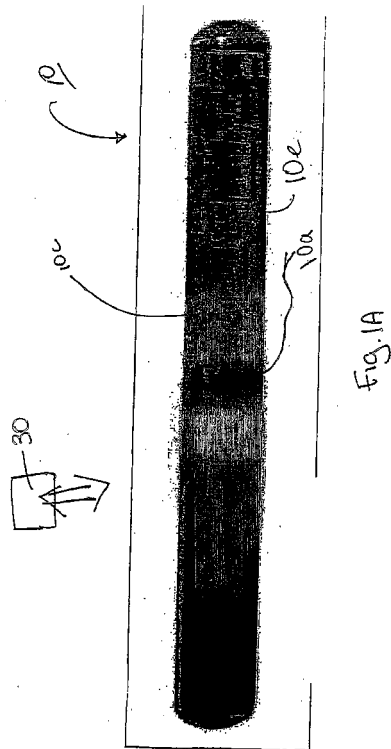
【図 13 F】本発明の実施形態によって実施できる作動のブロック図である。

【図 14】本発明の実施形態によって実施できる作動のブロック図である。

【図 15】本発明の一部の実施形態によるデータプロセッシングシステム及び / 又はコンピュータモジュールのブロック図である。

40

【図 1】



【図 2】

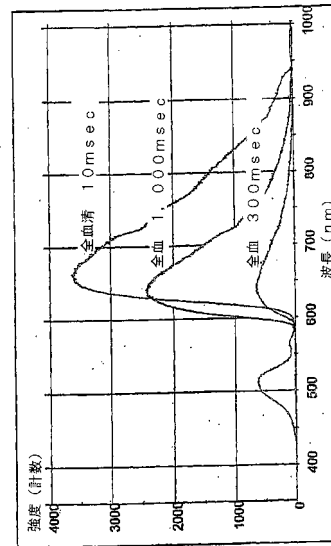


図2. イスの血液および血清を流す光線の伝送についての強度対波長。明記した時間は多チャンネルアナライザの積分時間である。

【図 3】

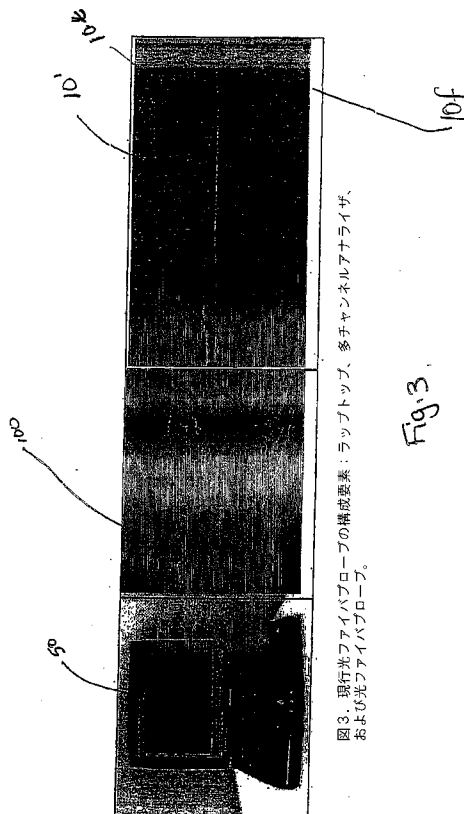


図3. 環行光ファイバプロブの構成要素：ラップトップ、多チャンネルアナライザ、および光ファイバプロブ。

【図 4】

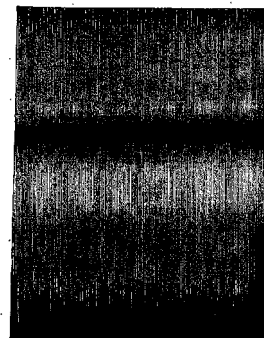


図4. 抗CD20に共役したAlexa Fluor 647を用いて標識したラージヒトリンパ腫細胞（ペレット形）の顕微鏡写真。酸処理で細胞の凝集が見られる。この画像は、励起用フィルタ647/10およびエミッタ700/75を使用し、100mWクリプトン/アルゴンレーザの647nm線を介して作製し、Yokagawaブランドの回転式Nipkowディスクを通してHamamatsu Orca ER 12ビットカメラを用いて記録した。

【図5】

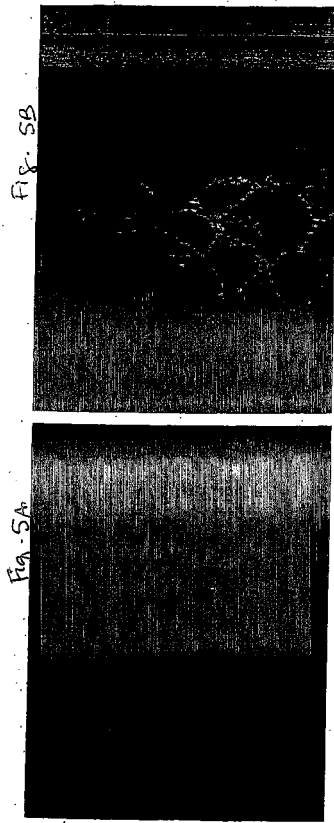


図5A、および5B、固定して抗-acebB2 (LabVision, Inc.) を用いて標識したBT474細胞の共焦点顕微鏡画像。これらの画像は100mWクリプトン/アルゴンレーザの568nmもしくは647nm線を用いて撮影し、Yokagawaブランド回転式Nipkowディスクを通してHamamatsu Orca ER-12ビットカメラを用いて記録した。左の画像は647nmを用いて撮影したので、したがって一次抗体標識化を示している。右の画像は568nmで撮影したので、したがって二次抗体標識化を示している。

【図6】

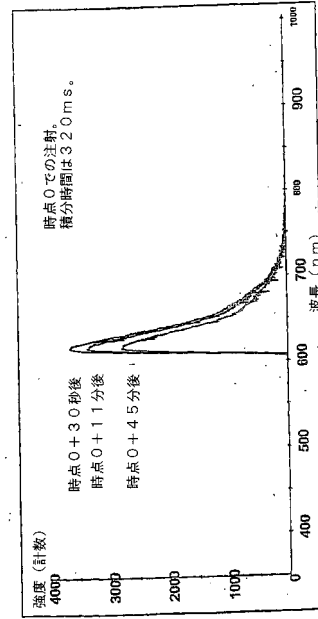


図6. Alexa Fluor 647ヒドロジド (Molecular Probes) (分子量750) についての強度対波長。時点0にラット乳腺細胞内に蛍光体が投与された後のクリアランス曲線。Fisher 342をラットの皮下に光ファイバプローブを留置した。3つの相違する時点：30秒後（最高強度）、11分後、45分後での信号のプロット（積分時間320ms）。

Fig. 6

【図7】

Fig. 7

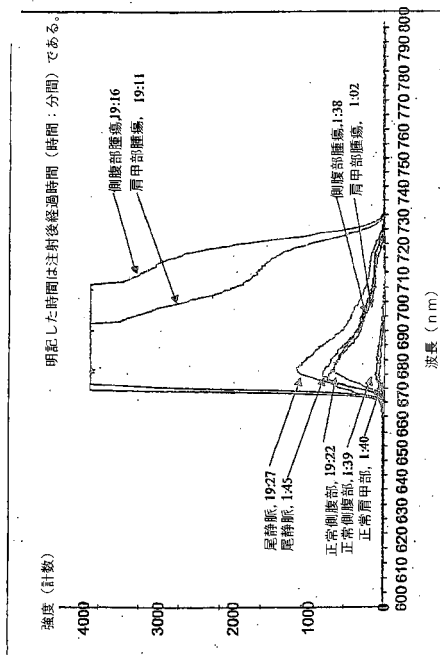


図7. ヒトBT474肩甲部および側腹部腫瘍を有するヌードマウスにおけるAlexa標識ハーセプチンの取り込み。

【図8】

Fig. 8

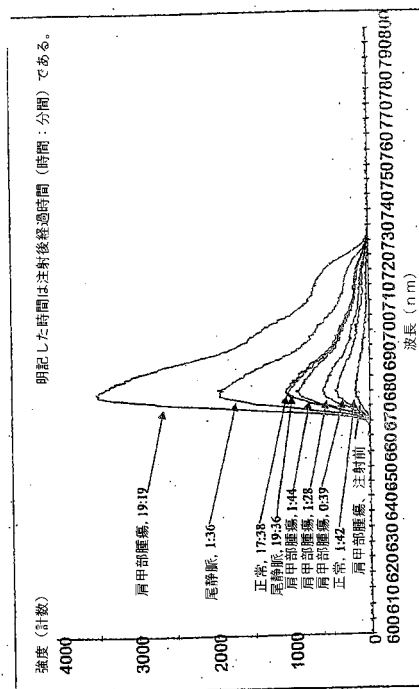


図8. ラージ・バーキットヒトトリリンパ腫細胞が埋植されたヌードマウスにおけるAlexa標識抗CD20。

【図 9】

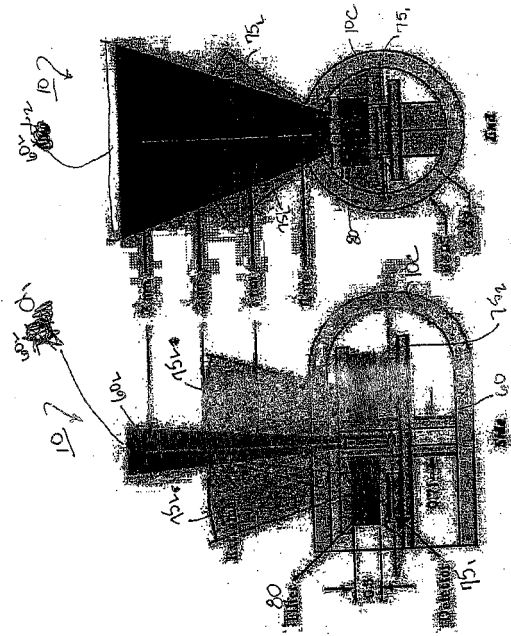
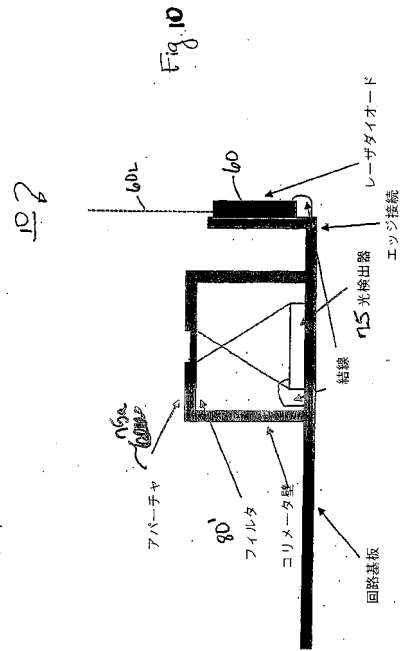
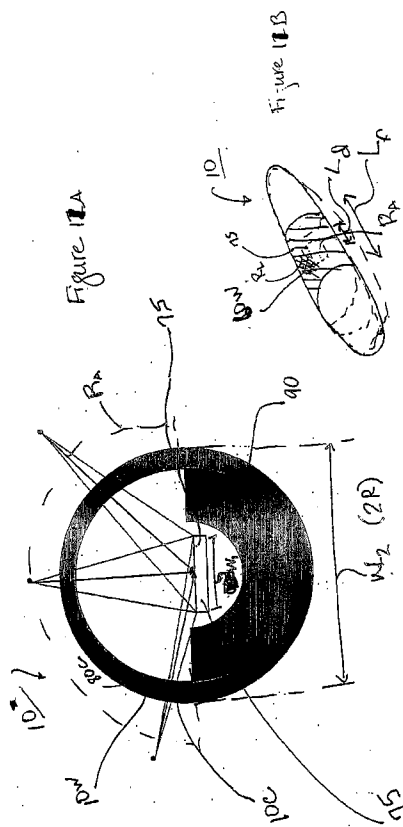


図9Aおよび9B: ガラスサブセル内のダイオード使用センサの側面図および端面図 (寸法の単位はmm)。

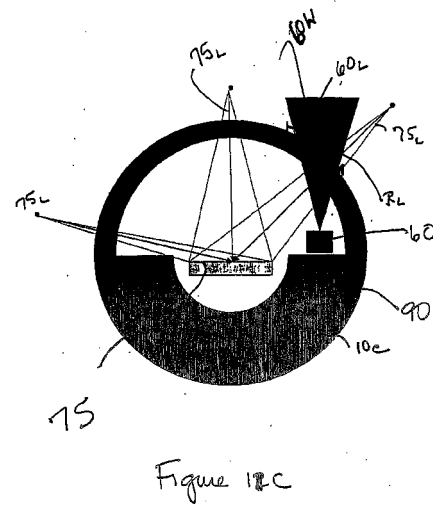
【図 10】



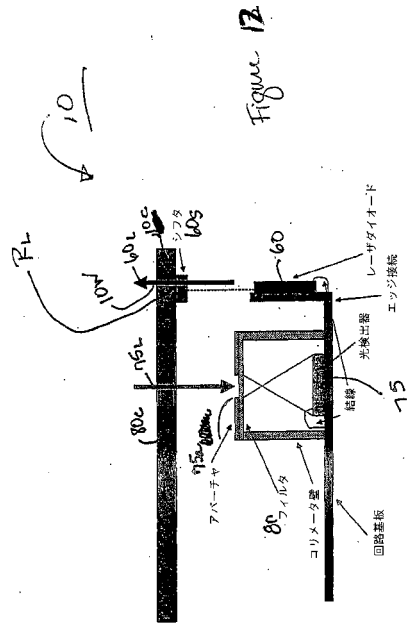
【図 11 A . B】



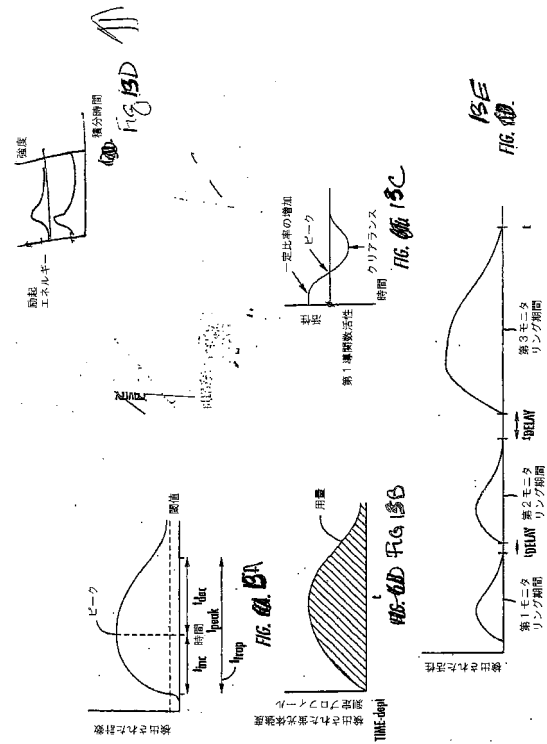
【図 11 C】



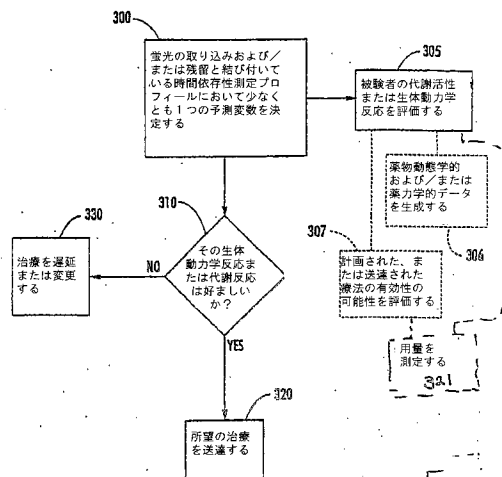
【図 12】



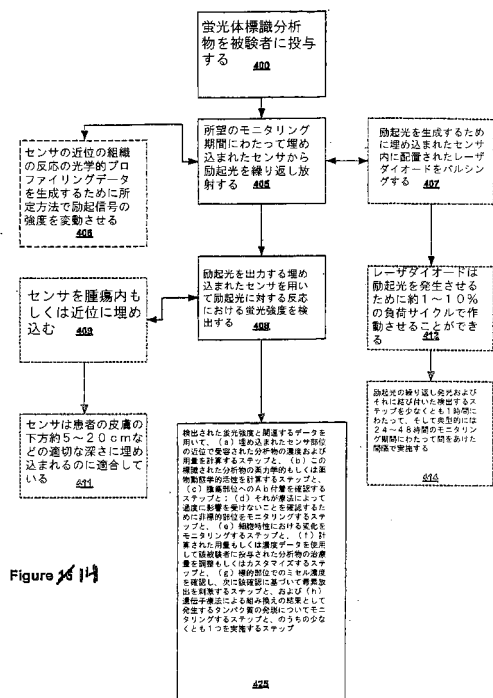
【図 13 A - E】



【図 13 F】



【図 14】



【図 15】

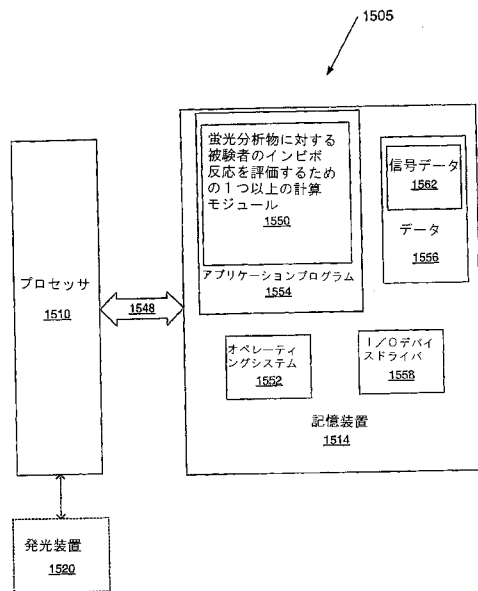


Figure 15

フロントページの続き

- (72)発明者 ブラック, ロバート・ディー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 1 7 , チャペル・ヒル, ヴィレッジ・クロッシング 3
0 1
- (72)発明者 ボリック, ナターシャ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州 2 7 5 2 2 , クリッドムーア, フォレスト・レイン 6 0 5

審査官 宮川 哲伸

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 2 / 3 9 1 1 2 (W O , A 1)
特表 2 0 0 4 - 5 2 3 2 5 7 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 0 6 4 1 0 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A61B 10/00
G01N 21/64