



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107430074 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201680019537.X

(22)申请日 2016.02.08

(30)优先权数据

14/615,993 2015.02.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/016941 2016.02.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/127158 EN 2016.08.11

(71)申请人 德克萨斯大学系统董事会

地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 袁保红 程冰冰 韦明元

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 张臻贤 屈小春

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

A61B 8/12(2006.01)

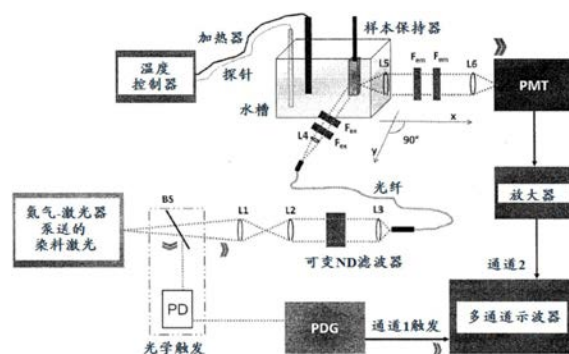
权利要求书5页 说明书50页 附图45页

(54)发明名称

用于高分辨率成像的系统和方法

(57)摘要

在一个方面,本文描述了成像方法。在一些实施方案中,本文所描述的成像方法包括:将超声波可切换荧光团安置在环境中;使所述环境暴露于超声波束,以在所述环境内产生激活区;将所述荧光团安置在所述激活区内,以将所述荧光团从关闭状态切换为开启状态;使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述荧光团;在所述环境内的第一位置处检测光致发光信号,所述光致发光信号包括由所述荧光团发射的超声波荧光信号以及背景信号中的至少一者;使所述光致发光信号与参考信号相关以产生所述第一位置的相关系数;以及使所述光致发光信号乘以所述第一位置的所述相关系数,以产生所述第一位置的经修改的光致发光信号。



1. 一种成像方法,所述成像方法包括:

- (a) 将第一超声波可切换荧光团安置在环境中;
- (b) 使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;
- (c) 将所述第一荧光团安置在所述激活区内以将所述第一荧光团从关闭状态切换为开启状态;
- (d) 使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述第一荧光团;
- (e) 在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第一超声波荧光信号以及第一背景信号中的至少一者;
- (f) 使所述第一光致发光信号与第一参考信号相关以产生所述第一位置的第一相关系数;以及
- (g) 使所述第一光致发光信号乘以所述第一位置的所述相关系数以产生所述第一位置的第一经修改的光致发光信号。

2. 如权利要求1所述的方法,其中使所述环境暴露于所述电磁辐射束还激发存在于所述环境中的至少一种光致发光背景物质。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述第一背景信号包括由所述至少一种光致发光背景物质发射的第一背景光致发光信号。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一参考信号对应于所述第一荧光团的所述第一超声波荧光信号。

5. 如权利要求1所述的方法,其中使所述第一光致发光信号与所述第一参考信号相关包括:将所述第一光致发光信号的时间强度衰减曲线与所述第一参考信号的时间强度衰减曲线进行比较。

6. 如权利要求5所述的方法,其中根据以下等式(1)产生所述第一位置的所述相关系数:

$$\rho_{I,R} = \frac{(\sum I(t)R(t)) - \frac{(\sum I(t))(\sum R(t))}{N}}{\sqrt{\left(\sum I(t)^2 - \frac{(\sum I(t))^2}{N}\right)\left(\sum R(t)^2 - \frac{(\sum R(t))^2}{N}\right)}} \quad (1),$$

其中 $\rho_{I,R}$ 是所述第一位置的所述相关系数, $I(t)$ 是所述第一光致发光信号在所述第一位置处的所述时间强度衰减曲线, $R(t)$ 是所述第一参考信号的所述时间强度衰减曲线,且 N 是 $I(t)$ 和 $R(t)$ 中的时间点的数目。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一位置的所述相关系数是分段后的相关系数。

8. 如权利要求1所述的方法,进一步包括:

(e_n) 在所述环境内的 n 个额外的位置处检测 n 个额外的光致发光信号,所述 n 个额外的光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第 n 个额外的超声波荧光信号以及第 n 个额外的背景信号中的至少一者;

(f_n) 使所述 n 个额外的光致发光信号与所述第一参考信号相关,以产生所述 n 个额外的位置的 n 个额外的相关系数;以及

(g_n) 使所述 n 个额外的光致发光信号乘以所述 n 个额外的相关系数,以产生所述 n 个额外的位置的 n 个额外的经修改的光致发光信号,

其中 n 是介于1与1000之间的整数。

9. 如权利要求8所述的方法,进一步包括:

(h) 将所述第一位置的所述第一经修改的光致发光信号、所述第二位置的所述第二经修改的光致发光信号和所述n个额外的位置的所述n个额外的经修改的光致发光信号进行组合,以产生由所述第一荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

10. 一种成像方法,所述成像方法包括:

(a) 将第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团安置在环境中;

(b) 使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;

(c) 将所述第一荧光团安置在所述激活区内以将所述第一荧光团从关闭状态切换为开启状态,和/或将所述第二荧光团安置在所述激活区内以将所述第二荧光团从关闭状态切换为开启状态;

(d) 使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述第一荧光团和/或所述第二荧光团;

(e) 在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第一超声波荧光信号、由所述第二荧光团发射的第一荧光信号以及第一背景信号中的至少一者;

(f) 使所述第一光致发光信号与第一参考信号相关以产生所述第一位置的第一相关系数;以及

(g) 使所述第一光致发光信号乘以所述第一位置的所述第一相关系数以产生所述第一位置的第一经修改的光致发光信号。

11. 如权利要求10所述的方法,其进一步包括:

(f₂) 使所述第一光致发光信号与第二参考信号相关以产生所述第一位置的第二相关系数;以及

(g₂) 使所述第一光致发光信号乘以所述第一位置的所述第二相关系数以产生所述第一位置的第二经修改的光致发光信号,

其中所述第一参考信号对应于所述第一荧光团的所述第一超声波荧光信号,且

其中所述第二参考信号对应于所述第二荧光团的所述第一超声波荧光信号。

12. 如权利要求11所述的方法,进一步包括:

(e_n) 在所述环境内的n个额外的位置处检测n个额外的光致发光信号,所述n个额外的光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号、由所述第二荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号以及第n个额外的背景信号中的至少一者;

(f_{1n}) 使所述n个额外的光致发光信号与所述第一参考信号相关,以产生所述n个额外的位置的n个额外的第一相关系数;

(g_{1n}) 使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的位置的所述n个额外的第一相关系数,以产生所述n个额外的位置的n个额外的第一经修改的光致发光信号,

(f_{2n}) 使所述n个额外的光致发光信号与所述第二参考信号相关,以产生所述n个额外的位置的n个额外的第二相关系数;

(g_{2n}) 使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的位置的所述n个额外的第二相关系数,以产生所述n个额外的位置的n个额外的第二经修改的光致发光信号,

其中n是介于1与1000之间的整数。

13. 如权利要求12所述的方法,进一步包括:

(h₁) 将所述第一位置的所述第一经修改的光致发光信号与所述n个额外的位置的所述n个额外的第一经修改的光致发光信号进行组合,以产生由所述第一荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图;以及

(h₂) 将所述第一位置的所述第二经修改的光致发光信号与所述n个额外的位置的所述n个额外的第二经修改的光致发光信号进行组合,以产生由所述第二荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

14. 一种成像方法,所述成像方法包括:

(a) 将第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团安置在环境中;

(b) 使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;

(c) 将所述第一荧光团安置在所述激活区内以将所述第一荧光团从关闭状态切换为开启状态,和/或将所述第二荧光团安置在所述激活区内以将所述第二荧光团从关闭状态切换为开启状态;

(d) 使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述第一荧光团和/或所述第二荧光团;

(e) 在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第一超声波荧光信号和由所述第二荧光团发射的第一超声波荧光信号中的至少一者;以及

(f) 将所述第一光致发光信号正交地分解为与所述第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第一基向量和与所述第二荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第二基向量。

15. 如权利要求14所述的方法,其进一步包括:

(g₁) 确定所述第一荧光团在所述第一位置处的所述归一化超声波荧光信号的基向量系数a;以及

(g₂) 确定所述第二荧光团在所述第一位置处的所述归一化超声波荧光信号的基向量系数b。

16. 如权利要求15所述的方法,其进一步包括:

(h₁) 使所述第一荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述系数a,以产生所述第一荧光团在所述第一位置处的分离后的超声波荧光信号;以及

(h₂) 使所述第二荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述系数b,以产生所述第二荧光团在所述第一位置处的分离后的超声波荧光信号。

17. 如权利要求16所述的方法,进一步包括:

(e_n) 在所述环境内的n个额外的位置处检测n个额外的光致发光信号,所述n个额外的光致发光信号包括由所述第一荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号和由所述第二荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号中的至少一者;

(f_n) 将所述n个额外的光致发光信号正交地分解为与所述第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的n个额外的第一基向量和与所述第二荧光团的归一化超声波信号相对应的n个额外的第二基向量;

(g_{1n}) 确定所述第一荧光团在所述n个额外的位置处的所述归一化超声波荧光信号的n

个额外的基向量系数 a_n ;

(g_{2n}) 确定所述第二荧光团在所述 n 个额外的位置处的所述归一化超声波荧光信号的 n 个额外的基向量系数 b_n ;

(h_{1n}) 使所述第一荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述 n 个额外的系数 a_n , 以产生所述第一荧光团在所述 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号; 以及

(h_{2n}) 使所述第二荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述 n 个额外的系数 b_n , 以产生所述第二荧光团在所述 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号,

其中 n 是介于1与1000之间的整数。

18. 如权利要求17所述的方法, 其进一步包括:

(i_1) 将所述第一荧光团在所述第一位置处的所述分离后的超声波荧光信号与所述第一荧光团在所述 n 个额外的位置处的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合, 以产生由所述第一荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图; 以及

(i_2) 将所述第二荧光团在所述第一位置处的所述分离后的超声波荧光信号与所述第二荧光团在所述 n 个额外的位置处的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合, 以产生由所述第二荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

19. 如权利要求16所述的方法, 进一步包括:

(j_1) 使所述第一荧光团的所述分离后的超声波荧光信号与第一参考信号相关, 以产生所述第一位置的所述第一参考信号的第一相关系数;

(k_1) 使所述第一荧光团的所述分离后的超声波荧光信号乘以所述第一参考信号的所述第一相关系数, 以产生所述第一位置的所述第一荧光团的第一经修改的分离后的超声波荧光信号,

(j_2) 使所述第二荧光团的所述分离后的超声波荧光信号与第二参考信号相关, 以产生所述第一位置的所述第二参考信号的第一相关系数; 以及

(k_2) 使所述第二荧光团的所述分离后的超声波荧光信号乘以所述第二参考信号的所述第一相关系数, 以产生所述第一位置的所述第二荧光团的第一经修改的分离后的超声波荧光信号,

其中所述第一参考信号对应于所述第一荧光团的所述第一超声波荧光信号, 且

其中所述第二参考信号对应于所述第二荧光团的所述第一超声波荧光信号。

20. 如权利要求17所述的方法, 其进一步包括:

(j_{1n}) 使所述第一荧光团的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号与第一参考信号相关, 以产生所述 n 个额外的位置的所述第一参考信号的 n 个额外的相关系数;

(k_{1n}) 使所述第一荧光团的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号乘以所述第一参考信号的所述 n 个额外的相关系数, 以产生所述 n 个额外的位置的所述第一荧光团的 n 个额外的经修改的分离后的超声波荧光信号;

(j_{2n}) 使所述第二荧光团的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号与第二参考信号相关, 以产生所述 n 个额外的位置的所述第二参考信号的 n 个额外的相关系数; 以及

(k_{2n}) 使所述第二荧光团的所述 n 个额外的分离后的超声波荧光信号乘以所述第二参考信号的所述 n 个额外的相关系数, 以产生所述 n 个额外的位置的所述第二荧光团的 n 个额外的经修改的分离后的超声波荧光信号,

其中所述第一参考信号对应于所述第一荧光团的所述第一超声波荧光信号,且
其中所述第二参考信号对应于所述第二荧光团的所述第一超声波荧光信号。

用于高分辨率成像的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请按照35U.S.C.§119要求2015年2月6日提交的美国专利申请序号14/615,993的优先权,所述美国专利是2014年1月23日提交的美国专利申请序号14/162,375的接续部分,所述美国专利申请序号14/162,375按照35U.S.C.§119(e)要求2013年1月24日提交的美国临时专利申请序号61/756,065的优先权,所述申请中的每一者以全文引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦赞助的研究的申明

[0004] 本发明是依据以下合同在政府支持下作出:由美国国家卫生研究院通过美国国家生物医学成像和生物工程研究院颁发的合同7R15EB012312-02、由德克萨斯州的癌症预防研究所颁发的合同RP120052,以及由美国国家科学基金会颁发的合同CBET-1253199。政府对本发明具有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于高分辨率成像的系统和方法,且具体来说涉及使用超声波可切换荧光(USF)进行成像。

背景技术

[0006] 在深部生物组织中的荧光成像可以提供关于组织结构、功能和功能障碍的重要信息。然而,一些以前的荧光成像技术由于深部组织中的强光散射而在穿透深度和/或空间分辨率方面受到限制。一些以前的荧光成像技术还在信噪比(SNR)方面受到限制。因此,此类方法在许多组织生物学和/或临床应用中的有效性可能较低。

[0007] 因此,需要用于高分辨率成像、尤其用于深部生物组织成像的改进的系统和方法。

发明内容

[0008] 在一个方面,本文描述成像方法,所述成像方法在一些情况下与其他方法相比之下可以提供一个或多个优势。举例来说,在一些实施方案中,本文所描述的方法可以以超过声学衍射极限的分辨率提供对深部生物组织的成像,并且可以进一步展现提高的成像深度-成像分辨率比(DRR)和/或提高的信噪比(SNR)。另外,本文所描述的方法的荧光团在一些情况下可以展现荧光强度或寿命的大开启/关闭比率,和/或开启状态和关闭状态之间的窄过渡带宽。此外,本文所描述的方法的荧光团还可以展现在开启状态和关闭状态之间的可调谐阈值。另外,在一些情况下,本文所描述的方法可以准许多路复用的超声波荧光成像,包括同时对多个分子目标进行成像,例如,这对于一个或多个生物医学应用可为合意的。

[0009] 在一些实施方案中,本文所描述的方法包括:将超声波可切换荧光团群体安置在生物环境中,所述荧光团具有在关闭状态与开启状态之间的切换阈值;以及使所述生物环境暴露于超声波束以在所述生物环境内产生激活区。所述方法进一步包括:将所述激活区

内的荧光团中的至少一者从关闭状态切换为开启状态;使用一束电磁辐射激发至少一个荧光团;以及检测由至少一个荧光团发射的光。在一些实施方案中,所述激活区具有最大负压力和/或最大温度,且至少一个荧光团的切换阈值是激活区的最大负压力的至少大约50%或激活区的最大温度的至少大约50%。在一些情况下,例如,荧光团具有在关闭状态与开启状态之间的切换温度阈值,且激活区具有大于或等于荧光团的切换温度阈值的最大温度。

[0010] 另外,在一些实施方案中,本文所描述的方法包括使生物环境暴露于来自多个不同方向的多个超声波束,其中超声波束的焦点区域至少部分重叠。此外,在一些此类情况下,荧光团的切换阈值大于由超声波束中的一者的焦点区域单独地提供的最大温度或最大负压压力。

[0011] 另外,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括使生物环境暴露于电磁辐射的脉冲束,之后使生物环境暴露于超声波束,所述脉冲束具有不大于100皮秒(ps)的脉冲持续时间,其中将脉冲持续时间定义为脉冲随时间变化的光学功率的半最大值下的全宽度。

[0012] 另外,在一些情况下,本文所描述的方法包括:(a)将第一超声波可切换荧光团安置在例如生物环境等环境中;(b)使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;(c)将第一荧光团安置在激活区内以将所述第一荧光团从关闭状态切换为开启状态;以及(d)使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述第一荧光团。在一些情况下,使所述环境暴露于所述电磁辐射束还激发存在于所述环境中的至少一种光致发光背景物质。另外,所描述的方法还可以包括(e)在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由第一荧光团发射的第一超声波荧光信号和第一背景信号中的至少一者。在一些情况下,所述第一背景信号包括由至少一种光致发光背景物质发射的第一背景光致发光信号。另外,在一些实施方案中,所述方法进一步包括:(f)使第一光致发光信号与第一参考信号相关以产生第一位置的第一相关系数;以及(g)使第一光致发光信号乘以所述第一位置的相关系数以产生所述第一位置的第一经修改的光致发光信号。在一些情况下,本文所描述的方法的第一参考信号对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号。此外,在一些情况下,使第一光致发光信号与第一参考信号相关包括:将第一光致发光信号的时间强度衰减曲线与第一参考信号的时间强度衰减曲线进行比较。

[0013] 另外,可以将环境内的第一位置处检测和处理光致发光信号的前述步骤(e)-(g)重复任何所要次数,以产生环境内的多个位置的多个经修改的光致发光信号。举例来说,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括(e₂)在环境内的第二位置处检测第二光致发光信号,所述第二光致发光信号包括由第一荧光团发射的第二超声波荧光信号和第二背景信号中的至少一者;(f₂)使第二光致发光信号与第一参考信号相关以产生第二位置的相关系数;以及(g₂)使第二光致发光信号乘以第二位置的相关系数以产生第二位置的第二经修改的光致发光信号。更一般来说,可以在环境内的n个位置处从n个光致发光信号以及从所述n个位置的n个相关系数产生n个经修改的光致发光信号,其中n可以是任何所要的整数,例如在2与1000之间的整数。以此方式,如在下文进一步描述,可以获得由第一荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图或曲线。

[0014] 此外,在一些情况下,本文所描述的方法可以包括同时使用一个以上超声波可切换荧光团。因此,在一些情况下,本文所描述的方法可以准许或提供多路复用的超声波荧光成像,包括使用多个不同的超声波可切换荧光团的多路复用的成像。

[0015] 另外,在实施方案中,本文所描述的多路复用成像方法包括:(a)将第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团安置在环境中;(b)使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;(c)将第一荧光团安置在所述激活区内以将第一荧光团从关闭状态切换为开启状态,和/或将第二荧光团安置在激活区内以将第二荧光团从关闭状态切换为开启状态;(d)使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发第一荧光团和/或第二荧光团;(e)在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由第一荧光团发射的第一超声波荧光信号和由第二荧光团发射的第一超声波荧光信号中的至少一者;以及(f)将第一光致发光信号正交地分解为与第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第一基向量和与第二荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第二基向量。另外,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括:(g₁)确定第一荧光团在第一位置处的归一化超声波荧光信号的基向量系数a;以及(g₂)确定第二荧光团在第一位置处的归一化超声波荧光信号的基向量系数b。本文所描述的方法还可以包括:(h₁)使第一荧光团的归一化超声波荧光信号乘以系数a以产生第一荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号;以及(h₂)使第二荧光团的归一化超声波荧光信号乘以系数b以产生第二荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号。另外,如在下文进一步描述,可以将步骤(e)-(h)的前述过程重复任何所要次数,以产生第一和/或第二荧光团在所述环境内的任何所要数目的额外的位置处的分离后的超声波荧光信号。

[0016] 另外,还有可能通过以下方式产生由第一和第二荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的单独的空间曲线图,所述方式包括:(i₁)将第一荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号与第一荧光团在n个额外的位置处的n个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合,以产生由第一荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图;以及(i₂)将第二荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号与第二荧光团在n个额外的位置处的n个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合,以产生由第二荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。另外,一旦获得环境内的一个或多个位置的第一和第二荧光团的分离后的超声波荧光信号后,就有可能在需要时以上文描述的方式提高这些信号的SNR。

[0017] 在一些实施方案中,在本文所描述的方法中使用的超声波可切换荧光团包括**Förster**共振能量转移(FRET)供体物质和FRET受体物质。在一些此类情况下,通过超声波束的存在来更改荧光团的FRET供体物质与FRET受体物质之间的距离。举例来说,在一些实施方案中,荧光团包括微泡,所述微泡包括附着到所述微泡的表面的一种或多种FRET供体物质和一种或多种FRET受体物质。在其他情况下,在本文所描述的方法中使用的超声波可切换荧光团包括温敏聚合物。另外,在一些情况下,本文所描述的荧光团的温敏聚合物包括一种或多种荧光部分或者与一种或多种荧光物质(例如,一种或多种荧光染料分子)缀合。在其他情况下,本文所描述的荧光团包括分散在温敏聚合物纳米颗粒中和/或附着到温敏聚合物纳米颗粒表面的荧光材料。另外,在一些实施方案中,本文所描述的超声波可切换荧光团展现近红外(NIR)中的荧光发射曲线、至少大约为2的在荧光强度方面的开关比(I_{on}/I_{off})、至少大约为1.5的在荧光寿命方面的开关比(τ_{on}/τ_{off}),和/或不大于大约10℃的开启状态和关闭状态之间的过渡带宽(T_{BW})。

[0018] 另外,在一些实施方案中,本文所描述的方法的生物环境包括深部组织。在一些情

况下,所述生物环境包括肿瘤血管。另外,在一些情况下,本文所描述的方法展现至少大约为100的穿透深度/分辨率比率。

[0019] 在后面的详细描述中更详细地描述了这些和其他实施方案。

附图说明

[0020] 图1说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0021] 图2说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0022] 图3说明适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的温度相依荧光团的荧光强度和荧光寿命的曲线图。

[0023] 图4说明适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的荧光团的组分的结构。

[0024] 图5说明适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的荧光团的荧光切换曲线。

[0025] 图6说明适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的荧光团的荧光数据。

[0026] 图7说明用于测量适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的荧光团的荧光特性的系统。

[0027] 图8A说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图8B说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图8C说明根据本文所描述的一个实施方案的成像方法的步骤。

[0028] 图9A说明通过根据本文所描述的一个实施方案的方法而获得的USF图像。图9B说明对应于图9A的图像的比较性图像。图9C说明通过根据本文所描述的一个实施方案的方法而获得的荧光曲线。图9D说明通过根据本文所描述的一个实施方案的方法而获得的荧光曲线。

[0029] 图10说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0030] 图11说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0031] 图12说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0032] 图13说明适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的荧光团的组分的结构。

[0033] 图14说明本文所描述的方法的一些实施方案的成像分辨率相对于荧光团切换阈值的曲线图。

[0034] 图15说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0035] 图16说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0036] 图17说明根据本文所描述的方法的一个实施方案的超声波可切换荧光过程。

[0037] 图18A和图18B各自说明适合于在根据在本文所描述的一些实施方案的超声波可切换荧光团中使用的荧光材料的结构。

[0038] 图19A至图19F各自说明根据本文所描述的一些实施方案的超声波可切换荧光团的发射曲线。

[0039] 图20A和图20B各自说明根据本文所描述的一些实施方案的超声波可切换荧光团

的发射曲线。

[0040] 图21A说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图21B说明对应于图21A的组分的成像方法的步骤。图21C说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图21D说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图21E说明对应于图21C和图21D的组分的成像方法的步骤。图21F说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。图21G说明对应于图21F的组分的成像方法的步骤。

[0041] 图22A说明根据本文所描述的一个实施方案的超声波可切换荧光团的发射曲线。图22B说明与图22A的荧光团相关联的背景信号的发射曲线。图22C和图22D各自说明图22A的荧光团的超声波荧光发射曲线。图22E说明根据本文所描述的一个实施方案的超声波可切换荧光团的发射曲线。图22F说明与图22E的荧光团相关联的背景信号的发射曲线。图22G和图22H各自说明图22E的荧光团的超声波荧光发射曲线。

[0042] 图23A至图23D各自说明根据本文所描述的一些实施方案的超声波可切换荧光团的超声波荧光发射曲线。

[0043] 图24A和图24B各自说明根据本文所描述的一个实施方案的超声波可切换荧光团的超声波荧光发射曲线。图24C说明根据本文所描述的一个实施方案检测到的总光致发光信号。

[0044] 图25说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。

[0045] 图26说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。

[0046] 图27说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。

[0047] 图28说明根据本文所描述的一个实施方案的成像组分以及成像方法的步骤。

具体实施方式

[0048] 通过参考以下详细描述、实例和附图,可以更容易地理解本文所描述的实施方案。然而,本文所描述的元件、设备和方法不限于在详细描述、实例和附图中呈现的特定实施方案。应认识到,这些实施方案仅仅说明本发明的原理。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,众多修改和改写对于本领域技术人员来说将容易显而易见。

[0049] 另外,本文公开的所有范围应理解为涵盖归入其中的任何和所有子范围。举例来说,应将“1.0到10.0”的所陈述范围视为包括开始于最小值为1.0或更多且结束于最大值为10.0或更小的任何和所有子范围,例如,1.0到5.3,或4.7到10.0,或3.6到7.9。

[0050] 还应将本文公开的所有范围视为包括所述范围的端点,除非另有明确规定。举例来说,应一般将“5与10之间”的范围视为包括端点5和10。

[0051] 此外,在结合数量或量使用短语“多达”时,应理解,所述数量是至少可检测的数量或量。举例来说,以“多达”指定数量的数量存在的材料可以存在可检测的数量以及多达和包括所述指定数量。

[0052] 在一个方面,本文描述成像方法。在一些实施方案中,一种成像方法包括:将超声波可切换荧光团群体安置在生物环境中,所述荧光团具有在关闭状态与开启状态之间的切换阈值;以及使所述生物环境暴露于超声波束以在所述生物环境内产生激活区,所述激活区具有最大负压力和最大温度,其中至少一个荧光团的切换阈值是所述激活区的最大负压

力的至少大约50%或所述激活区的最大温度的至少大约50%。所述方法进一步包括:将所述激活区内的荧光团中的至少一者从关闭状态切换为开启状态;使用一束电磁辐射激发至少一个荧光团;以及检测由至少一个荧光团发射的光。在一些实施方案中,所述至少一个荧光团的切换阈值是所述激活区的最大负压力或最大温度的至少大约60%或至少大约70%。在一些情况下,至少一个荧光团的切换阈值是所述激活区的最大负压力或最大温度的大约60%与大约100%之间、大约60%与大约90%之间、大约70%与大约100%之间、大约70%与大约95%之间或大约70%与大约90%之间。如在下文进一步描述,在一些情况下,选择此类切换阈值可以准许通过有效地将激活区的体积减小到用于形成所述激活区的超声波束的焦点区域的大小以下的大小来提高成像分辨率。

[0053] 在其他实施方案中,一种成像方法包括:将超声波可切换荧光团群体安置在生物环境中,所述荧光团具有在关闭状态与开启状态之间的切换阈值;以及使生物环境暴露于来自多个不同方向的多个超声波束,以在所述生物环境内产生激活区,所述超声波束的焦点区域至少部分重叠。在一些情况下,例如,使用两个正交的超声波束。另外,在一些情况下,荧光团的切换阈值大于由超声波束中的一者的焦点区域单独地提供的最大负压力或最大温度。所述方法进一步包括:将所述激活区内的荧光团中的至少一者从关闭状态切换为开启状态;使用一束电磁辐射激发至少一个荧光团;以及检测由至少一个荧光团发射的光。如在下文进一步描述,以本文所描述的方式使用多个超声波束可以准许通过减小激活区的大小来提高成像分辨率。

[0054] 在其他实施方案中,一种成像方法包括:将超声波可切换荧光团群体安置在生物环境中,所述荧光团具有在关闭状态与开启状态之间的切换阈值;以及使生物环境暴露于电磁辐射的脉冲束,所述脉冲束具有基于脉冲束随时间变化的光学功率的FWHM的不大于100ps的脉冲持续时间。所述方法进一步包括:使生物环境暴露于超声波束以在所述生物环境内产生激活区;将激活区内的荧光团中的至少一者从关闭状态切换为开启状态;使用第二束电磁辐射激发至少一个荧光团;以及检测由至少一个荧光团发射的光。另外,在一些情况下,所述脉冲束具有不大于大约50ps或不大于大约10ps的脉冲持续时间。在一些实施方案中,所述脉冲束具有在大约1ps与大约100ps之间、在大约1ps与大约10ps之间、在大约1ps与大约50ps之间、在大约10ps与大约100ps之间或在大约10ps与大约50ps之间的脉冲持续时间。如在下文进一步描述,在一些实施方案中,以本文所描述的方式使生物环境暴露于电磁辐射的脉冲束可以通过准许与来自存在于生物环境中的其他物质的发射相比对荧光团发射的检测的时间分离而提高所述方法的信噪比(SNR)。因此,在一些情况下,所述检测由至少一个荧光团发射的光的步骤是在对应于此类其他物质的荧光寿命的延迟之后执行的。另外,在一些实施方案中,对脉冲束的波长进行选择以与存在于生物环境中的一种或多种物质的吸收曲线基本上重叠。

[0055] 在其他实施方案中,一种成像方法包括:(a)将第一超声波可切换荧光团或第一超声波可切换荧光团群体安置在例如生物环境等环境中;(b)使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;(c)将第一荧光团安置在激活区内以将所述第一荧光团从关闭状态切换为开启状态;以及(d)使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发所述第一荧光团。在一些情况下,使所述环境暴露于所述电磁辐射束还激发存在于所述环境中的至少一种光致发光背景物质。另外,所述方法进一步包括(e)在所述环境内的第一位置处检测第一

光致发光信号,所述第一光致发光信号包括由第一荧光团发射的第一超声波荧光信号和第一背景信号中的至少一者。在一些情况下,所述第一背景信号包括由至少一种光致发光背景物质发射的第一背景光致发光信号。此外,在一些实施方案中,本文所描述的方法还包括(f)使第一光致发光信号与第一参考信号相关以产生第一位置的第一相关系数。在一些情况下,第一参考信号对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号。另外,本文所描述的方法还可以包括(g)使第一光致发光信号乘以第一位置的相关系数,以产生第一位置的第一经修改的光致发光信号。

[0056] 另外,应了解,可以将在环境内的第一位置处检测和处理光致发光信号的前述步骤(e)–(g)重复任何所要次数,以产生环境内的多个位置的多个经修改的光致发光信号。举例来说,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括(e₂) 在环境内的第二位置处检测第二光致发光信号,所述第二光致发光信号包括由第一荧光团发射的第二超声波荧光信号和第二背景信号中的至少一者;(f₂)使第二光致发光信号与第一参考信号相关以产生第二位置的相关系数;以及(g₂)使第二光致发光信号乘以第二位置的相关系数以产生第二位置的经修改的光致发光信号。

[0057] 类似地,可以重复步骤(e)–(g)或(e₂)–(g₂)的相同过程以从环境内的第三位置处的第三光致发光信号以及第三位置的相关系数产生第三经修改的光致发光信号。更一般来说,可以从环境内的n个位置处的n个光致发光信号以及从所述n个位置的n个相关系数产生n个经修改的光致发光信号,其中n可以是任何所要的整数,例如在2与1000之间、在2与500之间、在2与100之间、在2与50之间、在2与30之间或在2与20之间的整数。在一些情况下,n可以大于1000。另外,所述n个位置可以是环境内的所要位置的任何集合,包括在环境内在一个或多个方向上邻接或非邻接的位置。另外,在一些实施方案中,在本文所描述的环境内的位置可以是环境内的体素和/或由x坐标、y坐标和z坐标中的一者或多者识别的位置。在一些情况下,例如,位置是以环境的xy坐标值或有序对(x,y)或xyz坐标值(x,y,z)为中心的体素,例如可以加以识别以用于对环境内的位置进行光栅扫描。以此方式,可以获得由第一荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图或曲线。另外,如在下文进一步描述,此类曲线图可以具有提高的SNR,包括与在不执行上文描述的相关和相乘步骤的情况下产生的另外类似的曲线图相比。

[0058] 因此,在一些实施方案中,本文所描述的成像方法进一步包括(e_n) 在环境内的n个额外的位置处检测n个额外的光致发光信号,所述n个额外的光致发光信号包括由第一荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号和第n个额外的背景信号中的至少一者;(f_n)使所述n个额外的光致发光信号与第一参考信号相关以产生n个额外的位置的n个额外的相关系数;以及(g_n)使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的相关系数以产生n个额外的位置的n个额外的经修改的光致发光信号,其中n是介于1与1000之间的整数。另外,此方法还可以包括(h)将第一位置的第一经修改的光致发光信号、第二位置的第二经修改的光致发光信号和n个额外的位置的n个额外的经修改的光致发光信号进行组合,以产生由第一荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

[0059] 如在下文进一步描述,在一些实施方案中,以本文所描述的方式产生由超声波可切换荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图可以通过减小可能存在的任何背景光致发光(例如,由荧光背景物质发射的背景荧光)的强度来提高所述方法的SNR。应了解,

在本文中用于参考目的的“背景”物质是除了存在于环境中的超声波可切换荧光团之外的物质。更具体来说,背景物质可以是并非所述方法的成像分析物的物质。在一些情况下,背景物质可以包括存在于被成像的生物环境中的生物组织、由所述生物组织组成或者大体上由所述生物组织组成,使得背景信号包括组织自发荧光、由组织自发荧光组成或者大体上由组织自发荧光组成。

[0060] 另外,在一些情况下,本文所描述的方法可以包括同时使用一个以上超声波可切换荧光团。因此,在一些情况下,本文所描述的方法可以准许或提供多路复用的超声波荧光成像,包括使用多个不同的超声波可切换荧光团的多路复用的成像。举例来说,在一些实施方案中,本文所描述的方法包括:(a) 将第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团安置在环境中;(b) 使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;(c) 将第一荧光团安置在所述激活区内以将第一荧光团从关闭状态切换为开启状态,和/或将第二荧光团安置在激活区内以将第二荧光团从关闭状态切换为开启状态;(d) 使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发第一荧光团和/或第二荧光团;(e) 在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号。所述第一光致发光信号可以包括由第一荧光团发射的第一超声波荧光信号、由第二荧光团发射的第一荧光信号和第一背景信号中的至少一者。另外,所述方法可以进一步包括:(f) 使第一光致发光信号与第一参考信号相关以产生第一位置的第一相关系数;以及(g) 使第一光致发光信号乘以所述第一位置的第一相关系数以产生所述第一位置的第一经修改的光致发光信号。

[0061] 另外,在此方法中,可以针对仅使用一个超声波可切换荧光团或使用超声波可切换荧光团群体的实施方案以如本文中所描述的相同方式执行和/或重复所述检测、相关和其他信号处理步骤(e)-(g)。举例来说,在一些情况下,以本文所描述的方式针对一个超声波可切换荧光团确定相关系数。另外,在一些实施方案中,本文所描述的方法进一步包括(e_n) 在环境内的n个额外的位置处检测n个额外的光致发光信号,其中所述n个额外的光致发光信号包括由第一荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号、由第二荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号以及第n个额外的背景信号中的至少一者。此方法还可以包括以下步骤:(f_n) 使所述n个额外的光致发光信号与第一参考信号相关以产生n个额外的位置的第一相关系数;以及(g_n) 使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的第一相关系数以产生n个额外的位置的第一经修改的光致发光信号,其中n是介于1与1000之间的整数。

[0062] 因此,如上文针对使用一个超声波可切换荧光团的实施方案所描述,可以使用本文所描述的方法来产生由存在于环境中的超声波可切换荧光团发射的超声波荧光的空间曲线或曲线图。另外,应了解,可以通过选择参考信号来确定与特定空间曲线图相关联的荧光团。举例来说,在一些情况下,第一参考信号对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号。在这些情况下,本文所描述的方法可以进一步包括(h) 将第一位置的第一经修改的光致发光信号与n个额外的位置的第一经修改的光致发光信号进行组合以产生由第一荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。另外,还有可能产生由第二荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。为了产生此类曲线图,可以将参考信号选择成对应于第二荧光团而不是第一荧光团的第一超声波荧光信号。

[0063] 另外,在本文所描述的一些实施方案中,可以使用多个不同参考信号来关联本文

所描述的光致发光信号,包括以连续方式来关联。举例来说,在一些情况下,本文所描述的方法可以进一步包括:(f_2)使第一光致发光信号与第二参考信号相关以产生第一位置的第二相关系数;以及(g_2)使第一光致发光信号乘以所述第一位置的第二相关系数以产生所述第一位置的第二经修改的光致发光信号。在一些情况下,所述第一参考信号对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号,且第二参考信号对应于第二荧光团的第一超声波荧光信号。

[0064] 不希望受理论束缚,相信可以使用此类不同的参考信号来获得多路复用的成像,这是因为超声波可切换荧光团,包括本文所描述的超声波可切换荧光团具有独特的光致发光发射曲线。此类超声波可切换荧光团可以具有独特的超声波荧光信号。此外,超声波荧光信号可以在波长域中和/或在时域或时间域中是独特的。因此,在本文所描述的一些实施方案中,第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团可以具有不同的超声波荧光发射曲线。举例来说,在一些情况下,曲线的峰发射波长有所不同,使得荧光团发射不同色彩的电磁辐射。在一些情况下,荧光团具有不同的时间强度衰减曲线。更一般来说,在本文所描述的方法的一些实施方案中,第一和第二荧光团的超声波荧光发射曲线在数学上是正交的或者非相关或弱相关。在这些情况下,在使大体上由一个荧光团的超声波荧光发射组成的信号与基于另一荧光团的超声波荧光发射的参考信号相关时,将获得小相关系数。举例来说,在一些情况下,使用与第二荧光团的超声波荧光信号相对应的参考信号来关联第一荧光团的第一超声波荧光信号将产生小相关系数,例如,小于0.3的相关系数,且反之亦然。

[0065] 另外,应了解,可以将在环境内的第一位置处检测和处理光致发光信号的前述步骤(e)-(g)重复任何所要次数,以产生环境内的多个位置的多个经修改的光致发光信号。举例来说,在一些实例中,使用多个超声波可切换荧光团的本文所描述的方法可以进一步包括(e_n)在环境内的n个额外的位置处检测n个额外的光致发光信号,其中所述n个额外的光致发光信号包括由第一荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号、由第二荧光团发射的第n个额外的超声波荧光信号以及第n个额外的背景信号中的至少一者。所述方法还可以包括:(f_{1n})使所述n个额外的光致发光信号与第一参考信号相关以产生所述n个额外的位置的n个额外的第一相关系数;(g_{1n})使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的位置的n个额外的第一相关系数以产生所述n个额外的位置的n个额外的第一经修改的光致发光信号;(f_{2n})使所述n个额外的光致发光信号与第二参考信号相关以产生所述n个额外的位置的n个额外的第二相关系数;以及(g_{2n})使所述n个额外的光致发光信号乘以所述n个额外的位置的n个额外的第二相关系数以产生所述n个额外的位置的n个额外的第二经修改的光致发光信号,其中n是上文描述的整数,例如,在1与1000之间的整数。

[0066] 另外,如上文针对使用单个超声波可切换荧光团所描述,可以使用本文所描述的方法来产生一个以上荧光团的超声波荧光发射的空间曲线图。举例来说,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括(h_1)将第一位置的第一经修改的光致发光信号与n个额外的位置的n个额外的第一经修改的光致发光信号进行组合以产生由第一荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。另外,此方法还可以包括(h_2)将第一位置的第二经修改的光致发光信号与n个额外的位置的n个额外的第二经修改的光致发光信号进行组合以产生由第二荧光团在环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

[0067] 此外,应了解,上文针对两个不同的超声波可切换荧光团所描述的相同过程还可以用于使用多于两个不同的荧光团的多路复用的成像。一般来说,可以使用任何所要数目

的不同超声波可切换荧光团。举例来说,在一些实施方案中,可以使用三个、四个或五个不同的超声波可切换荧光团。另外,在此情况下,本文所描述的方法可以包括分别使用与三个、四个或五个荧光团相对应的三个、四个或五个参考信号来执行三个、四个或五个相关和相乘步骤(例如,在步骤 (f_{1n}) 、 (g_{1n}) 、 (f_{2n}) 和 (g_{2n}) 中描述的步骤)。一般来说,可以使用多达 m 个不同的超声波可切换荧光团,其中 m 可以是5、10、20、50或100。

[0068] 当被成像的环境内的单个位置不含有所述 m 个不同的超声波可切换荧光团中的一者以上时,上文描述的多路复用的USF成像方法可以尤其有用。然而,在一些情况下,甚至在不同的荧光团存在于或可能存在于所述环境内的共同体素中时,也有可能产生由多个不同的超声波可切换荧光团发射的超声波荧光的多个空间曲线图。举例来说,在一些实施方案中,本文所描述的方法包括:(a)将第一超声波可切换荧光团和第二超声波可切换荧光团安置在环境中;(b)使所述环境暴露于超声波束以在所述环境内产生激活区;(c)将第一荧光团安置在所述激活区内以将第一荧光团从关闭状态切换为开启状态,和/或将第二荧光团安置在激活区内以将第二荧光团从关闭状态切换为开启状态;以及(d)使所述环境暴露于一束电磁辐射,进而激发第一荧光团和/或第二荧光团。所述方法可以进一步包括(e)在所述环境内的第一位置处检测第一光致发光信号,其中所述第一光致发光信号包括由第一荧光团发射的第一超声波荧光信号和由第二荧光团发射的第一超声波荧光信号中的至少一者。另外,在一些情况下,本文所描述的方法还包括(f)将第一光致发光信号正交地分解为与第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第一基向量和与第二荧光团的归一化超声波信号相对应的第二基向量。另外,在一些实施方案中,所述方法进一步包括:(g_1)确定第一荧光团在第一位置处的归一化超声波荧光信号的基向量系数 a ;以及(g_2)确定第二荧光团在第一位置处的归一化超声波荧光信号的基向量系数 b 。此外,所述方法还可以包括:(h_1)使第一荧光团的归一化超声波荧光信号乘以系数 a 以产生第一荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号;以及(h_2)使第二荧光团的归一化超声波荧光信号乘以系数 b 以产生第二荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号。在本文中出于参考目的,“分离的”超声波荧光信号可以指已经从由USF成像实验检测到的较为复杂的信号移除的、与所述信号脱离的或者从所述信号消除歧义的超声波荧光信号,所述较为复杂的信号例如为本文所描述的可以包括信号的组合(包括不同的超声波荧光信号的组合)的检测到的光致发光信号。因此,以本文所描述的方式执行方法可以准许来自被成像的环境内的一个以上荧光团的信号有别于彼此,即使所述荧光团存在于所述环境内的相同一般位置内(例如,相同体素内)也可以。

[0069] 另外,可以将步骤(e)–(h)的前述过程重复任何所要次数,以在所述环境内的任何所要数目的额外的位置处产生第一和/或第二荧光团的分离后的超声波荧光信号。因此,在一些情况下,本文所描述的方法进一步包括(e_n)在环境内的 n 个额外的位置处检测 n 个额外的光致发光信号,其中所述 n 个额外的光致发光信号包括由第一荧光团发射的第 n 个额外的超声波荧光信号和由第二荧光团发射的第 n 个额外的超声波荧光信号中的至少一者。此方法还可以包括(f_n)将所述 n 个额外的光致发光信号正交地分解为与第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的 n 个额外的第一基向量,和与第二荧光团的归一化超声波信号相对应的 n 个额外的第二基向量。另外,所述方法可以进一步包括:(g_{1n})确定第一荧光团在所述 n 个额外的位置处的归一化超声波荧光信号的 n 个额外的基向量系数 a_n ;(g_{2n})确定第二荧光

团在所述 n 个额外的位置处的归一化超声波荧光信号的 n 个额外的基向量系数 b_n ; (h_{1n}) 使所述第一荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述 n 个额外的系数 a_n 以产生第一荧光团在所述 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号; 以及 (h_{2n}) 使所述第二荧光团的所述归一化超声波荧光信号乘以所述 n 个额外的系数 b_n 以产生第二荧光团在所述 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号。如上文描述, n 可以是任何所要整数, 例如在1与1000之间的整数。

[0070] 另外, 如上文描述, 还有可能产生由第一和第二荧光团在环境内发射的超声波荧光的单独的空间曲线图。举例来说, 在一些实施方案中, 本文所描述的方法进一步包括: (i_1) 将第一荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号与第一荧光团在 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合, 以产生由第一荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图; 以及 (i_2) 将第二荧光团在第一位置处的分离后的超声波荧光信号与第二荧光团在 n 个额外的位置处的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号进行组合, 以产生由第二荧光团在所述环境内发射的超声波荧光的空间曲线图。

[0071] 另外, 一旦获得环境内的一个或多个位置的第一和第二荧光团的分离后的超声波荧光信号, 就有可能在需要时以上文描述的方式提高这些信号的SNR。举例来说, 在一些情况下, 本文所描述的方法进一步包括 (j_1) 使第一荧光团的分离后的超声波荧光信号与第一参考信号相关, 以产生第一位置的第一参考信号的第一相关系数; (k_1) 使第一荧光团的分离后的超声波荧光信号乘以第一参考信号的第一相关系数, 以产生第一位置的第一荧光团的第一经修改的分离后的超声波荧光信号; (j_2) 使第二荧光团的分离后的超声波荧光信号与第二参考信号相关, 以产生第一位置的第二参考信号的第一相关系数; 以及 (k_2) 使第二荧光团的分离后的超声波荧光信号乘以第二参考信号的第一相关系数, 以产生第一位置的第二荧光团的第一经修改的分离后的超声波荧光信号。此外, 在这些实施方案中, 第一参考信号可以对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号, 且第二参考信号可以对应于第二荧光团的第一超声波荧光信号。

[0072] 应进一步了解, 可以针对被成像的环境内的任何所要数目的位置执行对分离后的超声波荧光信号的所述相关和修改。举例来说, 在一些实施方案中, 本文所描述的方法可以包括: (j_{1n}) 使第一荧光团的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号与第一参考信号相关, 以产生 n 个额外的位置的第一参考信号的 n 个额外的相关系数; (k_{1n}) 使第一荧光团的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号乘以第一参考信号的 n 个额外的相关系数, 以产生所述 n 个额外的位置的第一荧光团的 n 个额外的经修改的分离后的超声波荧光信号; (j_{2n}) 使第二荧光团的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号与第二参考信号相关, 以产生所述 n 个额外的位置的第二参考信号的 n 个额外的相关系数; 以及 (k_{2n}) 使第二荧光团的 n 个额外的分离后的超声波荧光信号乘以第二参考信号的 n 个额外的相关系数, 以产生所述 n 个额外的位置的第二荧光团的 n 个额外的经修改的分离后的超声波荧光信号, 其中第一参考信号对应于第一荧光团的第一超声波荧光信号, 且第二参考信号对应于第二荧光团的第一超声波荧光信号。

[0073] 另外, 在需要时, 可以使用多个位置的此类修改的分离后的超声波荧光信号来产生由荧光团在所述环境中发射的超声波荧光的空间曲线图, 如上文在步骤 (i_1) 或 (i_2) 中所描述。另外, 应了解, “经修改的” 超声波荧光信号可以指已经通过一个或多个信号处理步骤 (例如, 本文所描述的一个或多个相乘步骤) 修改的超声波荧光信号。

[0074] 此外,应了解,上文针对两个不同的超声波可切换荧光团所描述的相同过程还可以用于使用多于两个不同的荧光团的多路复用的成像。一般来说,可以使用任何所要数目的不同超声波可切换荧光团。举例来说,在一些实施方案中,可以使用三个、四个或五个不同的超声波可切换荧光团。另外,在此情况下,本文所描述的方法可以包括分别使用与三个、四个或五个荧光团相对应的三个、四个或五个参考信号来执行三个、四个或五个相关和相乘步骤(例如,在步骤 (f_{1n}) 、 (g_{1n}) 、 (f_{2n}) 和 (g_{2n}) 中描述的步骤)。一般来说,可以使用多达 m 个不同的超声波可切换荧光团,其中 m 可以是5、10、20、50或100。然而,如本文进一步描述,对于单个体素内的此类多路复用的成像,应了解, m 个不同的超声波可切换荧光团的 m 个超声波荧光发射曲线优选在数学上正交、非相关或弱相关。

[0075] 现在转向方法的特定步骤,本文所描述的成像方法包括将超声波可切换荧光团或超声波可切换荧光团群体安置在环境中。可以使用不与本发明的目的不一致的任何环境。在一些实施方案中,所述环境是生物环境。本文所描述的方法的环境还可以是非生物环境。在一些情况下,例如,生物环境是体内环境,例如组织、器官、血管或活生物体的其他部分。在一些实施方案中,生物环境包括肿瘤或肿瘤血管。在其他情况下,生物环境包括体外环境,例如组织培养物。本文所描述的方法的生物环境还可以包括生物假体材料或仿组织假体材料或者被所述生物假体材料或仿组织假体材料取代,所述材料例如为琼脂、硅胶、聚乙烯醇(PVA)凝胶、聚丙烯酰胺(PAA)凝胶或油在明胶中的分散液。还可以使用其他假体材料。

[0076] 另外,在一些实施方案中,生物环境包括深部组织。在本文中出于参考目的,“深部”组织包括位于有机体、组织培养物或与生物环境相关联的其他更大结构的外表面(例如,在假体材料的情况下,假体材料的外表面)下方至少大约1cm的组织(或在假体材料的情况下,假体材料的内部区)。在一些实施方案中,例如,深部组织位于外表面下方大约1cm与大约10cm之间,或大约1cm与大约5cm之间。在一些情况下,深部组织位于外表面下方多于10cm。此外,在一些实施方案中,外表面包括有机体的皮肤表面。

[0077] 另外,可以使用不与本发明的目的不一致的任何超声波可切换荧光团或不同超声波可切换荧光团的组合。在本文中出于参考目的,“超声波可切换”荧光团包括可操作以响应于暴露于超声波束而在开启状态与关闭状态之间切换的荧光团。超声波束可以直接或间接负责荧光团的切换响应。举例来说,在一些情况下,超声波束直接与荧光团相互作用,从而导致荧光团的荧光状态之间的切换。在其他情况下,超声波束与荧光团的直接环境或微环境直接相互作用,并且改变荧光团的微环境的至少一个性质。在此类情况下,荧光团可以响应于由超声波束引发的环境变化而在开启和关闭荧光状态之间切换。因此,荧光团可以响应于暴露于超声波束而间接可切换。

[0078] 在本文中出于参考目的,荧光团的“开启”状态包括(1)与荧光强度相对较低的荧光团的“关闭”状态相比荧光团的荧光强度相对较高的状态;或(2)与荧光寿命相对较短的荧光团的“关闭”状态相比荧光团的荧光寿命相对较长的状态。此外,在两种情况下,在依据例如温度或负压力等关键切换参数而绘制时,开启状态和关闭状态基本上界定荧光强度或寿命曲线中的阶跃函数。在开启状态中比在关闭状态中具有更长的寿命的荧光团可以特别适合于在使用对从荧光团发射的光子的时间门控或时间延迟检测的本文所描述的方法中使用,例如时间门控检测,其中检测器仅对在激活之后的相对较长的延迟之后接收的那些光子进行计数,以作为USF信号的部分。在一些情况下,荧光团的开启状态展现荧光团的理

论最大荧光强度的至少大约70%、至少大约80%或至少大约90%，且荧光团的关闭状态展现荧光团的理论最大荧光强度的不超过约50%、不超过约30%、不超过约10%，或不超过5%。

[0079] 开启状态相对于关闭状态的存在的物理原因可以有所变化。举例来说，在一些情况下，荧光团的荧光强度或荧光寿命会由于荧光团响应于环境条件的变化而引起的构象或化学变化而变化，例如一些温敏聚合物、pH值敏感化学物质或压敏材料所展现。在一些情况下，荧光团的荧光强度或荧光寿命响应于内部荧光淬灭而变化，其中此类淬灭可以由超声波的存在而直接或间接引发。

[0080] 举例来说，在一些实施方案中，本文所描述的荧光团包括FRET供体物质和FRET受体物质，且FRET供体物质与FRET受体物质之间的距离因为超声波束的存在而变化。FRET供体物质可以是第一荧光物质或其他发色团，且FRET受体物质可以是第二荧光物质或其他发色团。在此类情况下，如本领域技术人员所理解，供体物质与受体物质之间的FRET能量转移可以导致供体物质的荧光的淬灭。因此，可以将受体物质视为荧光团的荧光淬灭物质。可以在本文所描述的基于FRET的荧光团中使用不与本发明的目的不一致的任何供体-受体对。举例来说，在一些情况下，供体物质包括Alexa Fluor 546且受体物质包括Alexa Fluor 647。受体物质和供体物质的其他组合也是可能的。

[0081] 在一些实施方案中，本文所描述的荧光团包括微泡，所述微泡包括附着到微泡的外表面的一种或多种FRET供体物质和一种或多种FRET受体物质，其中所述微泡可操作以在大小上响应于超声波束的存在而变化。大小的变化可以增加或减小FRET供体物质与FRET受体物质之间的距离，因此降低或提高FRET能量转移效率。因此，微泡的荧光淬灭和整体荧光强度可以基于微泡的大小而变化。

[0082] 本文所描述微泡可以具有任何大小且由不与本发明的目的不一致的任何化学物质形成。在一些情况下，微泡具有在大约1 μ m与大约10 μ m之间或在大约1 μ m与大约5 μ m之间的直径。还可以使用其他大小的微泡。另外，在一些实施方案中，本文所描述微泡包括被由聚合材料（例如，有机聚合材料）形成的壳体包围的气体芯。在其他情况下，壳体是由脂类物质形成。在一些实施方案中，微泡包括由白蛋白、半乳糖、脂类和六氟化硫中的一者或多者形成的壳体。另外，本文所描述微泡的气体芯可以包括空气、氮气和例如八氟丙烷等全氟烃中的一者或多者。另外，在一些情况下，本文所描述微泡是由市售微泡形成，例如SonoVue™、Optison™、Imagent™、Definity™或Targestar™微泡。本文所描述的FRET供体和/或受体物质可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式附着到此类微泡的表面。在一些情况下，例如，供体和/或受体物质使用碳化二亚胺、马来酰亚胺或生物素-链霉亲和素偶合方案中的一者或多者附着到市售微泡的外表面。

[0083] 另外，在一些实施方案中，本文所描述的荧光团包括温敏聚合物。在本文中出于参考目的，“温敏”聚合物包括具有以温度相依方式变化的物理或化学性质的聚合物，其中所述变化是间断变化或二元变化。举例来说，在一些情况下，温敏聚合物的物理构象或极性以温度相依方式变化，且温敏聚合物在阈值温度以下展现第一构象，且在阈值温度以上展现第二基本上不同的构象。在一些实施方案中，例如，温敏聚合物在阈值温度以下展现扩展的圈或链构象，且在阈值温度以上展现致密或球状构象。在一些此类情况下，可以将阈值温度称作聚合物的“低临界溶解温度”（LCST）。

[0084] 可以使用不与本发明的目的不一致的任何温敏聚合物。在一些实施方案中,温敏聚合物包括聚(N-异丙基丙烯酰胺),或N-异丙基丙烯酰胺与丙烯酰胺、N-叔丁基丙烯酰胺、丙烯酸和烯丙基胺中的一者或多者的共聚物。在其他情况下,温敏聚合物包括聚(N-乙基己内酰胺)(PVCL),或例如Pluronic聚合物等泊洛沙姆。还可以使用其他温敏聚合物。

[0085] 另外,在一些情况下,本文所描述的荧光团的温敏聚合物包括一种或多种荧光部分,或者与一种或多种荧光物质(例如,一种或多种荧光染料分子)缀合。温敏聚合物可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式与荧光物质缀合。举例来说,在一些情况下,温敏聚合物通过一个或多个共价键(例如,一个或多个酯键或一个或多个酰胺键)而与荧光物质偶合。

[0086] 图1示意性地说明根据本文所描述的一个实施方案使用温敏荧光团的超声波切换的荧光过程。如图1中说明,温敏聚合物与荧光物质缀合以提供荧光团。所述荧光团具有上文描述的链构象和球状构象,且所述构象是温度相依的。此外,从一个构象转变为另一构象导致荧光物质的荧光强度或寿命的变化。如本文进一步描述,在聚合物呈链构象时,与球状构象相比,荧光强度或寿命的变化可能是由于荧光物质的微环境的差异。举例来说,在一些情况下,荧光团经历的聚合物环境的极性和/或粘度视聚合物是呈链构象还是球状构象而变化。

[0087] 此外,在一些实施方案中,本文所描述的荧光团包括分散在温敏聚合物纳米颗粒中和/或附着到温敏聚合物纳米颗粒的表面的荧光材料。另外,荧光材料的荧光性质可以取决于聚合物纳米颗粒的构象、极性或其他物理或化学性质的变化。另外,性质变化可以是温度相依的变化。以此方式,温敏聚合物纳米颗粒的温度的变化可以导致荧光材料的荧光强度和/或寿命的变化,包括在荧光材料的开启状态与荧光材料的关闭状态之间的变化。

[0088] 举例来说,在一些实施方案中,温敏聚合物纳米颗粒可以展现温度相依极性,且分散在纳米颗粒中的荧光材料可以展现极性相依荧光强度和/或寿命。因此,纳米颗粒的温度的变化可以导致荧光团的荧光强度和/或寿命的变化。

[0089] 在另一示例性实施方案中,温敏聚合物纳米颗粒可以在阈值温度以下具有亲水内部,且在阈值温度以上具有疏水内部。因此,此类纳米颗粒可以在分散在极性或非极性溶剂中时展现温度相依大小。举例来说,当在阈值温度以下分散在水或另一极性溶剂中时,纳米颗粒可以由于水在纳米颗粒的亲水内部中的存在而展现较大大小。类似地,在阈值温度以上,纳米颗粒可以由于从纳米颗粒的现在的疏水内部排斥水而展现较小大小。以此方式,分散在纳米颗粒中的荧光材料可以具有温度相依浓度,这可以导致整个荧光团的温度相依荧光性质。在图2中示意性地说明此过程。

[0090] 在另一示例性实施方案中,通过将例如荧光染料等荧光材料并入聚合纳米颗粒或胶束的内部内以使得所述聚合纳米颗粒或胶束充当荧光材料的纳米胶囊而形成超声波可切换荧光团。另外,可以由温敏聚合物(例如,上文描述的温敏聚合物)形成聚合纳米颗粒。适合于形成本文所描述的纳米胶囊的聚合物的非限制性实例包括PluronicF127、Pluronic F98、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)以及PNIPAM与丙烯酰胺(AAm)或N-叔丁基丙烯酰胺(TBAAm)的共聚物。另外,在一些情况下,可以通过使上文描述的温敏聚合物与聚乙二醇(PEG)共聚和/或通过使PEG作为侧基缀合到温敏聚合物来形成纳米颗粒或纳米胶囊。在一些情况下,此类荧光团可以具有至少部分通过包括PEG来控制的切换阈值,如在下文进一步

描述。

[0091] 例如本文所描述的温敏聚合物纳米颗粒或聚合物纳米胶囊等聚合物纳米颗粒可以具有不与本发明的目的不一致的任何大小或形状。在一些实施方案中,例如,温敏聚合物纳米颗粒基本上呈球形,且具有在大约10nm与大约300nm之间、在大约50nm与大约250nm之间、在大约50nm与大约200nm之间或在大约70nm与大约150nm之间的直径。在一些情况下,聚合物纳米胶囊基本上呈球形,且具有小于大约100nm或小于大约50nm的直径。在一些情况下,聚合物纳米胶囊具有在大约20nm与大约90nm之间、在大约20nm与大约80nm之间、在大约20nm与大约70nm之间的大小。其他大小和形状也是可能的。

[0092] 此外,不与本发明的目的不一致的任何荧光材料可以分散在温敏聚合物纳米颗粒或其他聚合物纳米颗粒中和/或附着到温敏聚合物纳米颗粒或其他聚合物纳米颗粒,以形成本文所描述的荧光团。在一些实施方案中,如本文中所描述,荧光材料展现极性敏感荧光强度和/或寿命。在其他情况下,荧光材料展现温度相依、粘度相依、pH值相依和/或离子强度相依的荧光强度和/或寿命。

[0093] 适合于在本文所描述的一些实施方案中使用的荧光材料的非限制性实例包括有机染料,例如N,N-二甲基-4-苯并呋喃磺胺(DBD);4-(2-氨基乙氨基)-7-(N,N-二甲基氨基磺酰基)苯并呋喃(DBD-ED);吲哚菁绿(ICG);Dylight-700,例如Dylite-700-2B;IR-820;碘化3,3'-二乙基硫杂三羧花青(DTTCI);LS-277;LS-288;cypate;罗丹明染料,例如罗丹明6G或罗丹明B;或香豆素。在一些情况下,荧光材料包括氮杂二吡咯甲川。另外,在一些情况下,荧光材料包括无机物质,例如半导体纳米晶体或量子点,包括例如ZnS或CdSe等II-VI半导体纳米晶体,或例如InP或InAs等III-V半导体纳米晶体。在其他情况下,荧光材料包括镧系物质。适合于在本文所描述的超声波可切换荧光团中使用的荧光材料的额外的非限制性实例包括在以下文献中描述的荧光材料:Amin等,“Syntheses,Electrochemistry,and Photodynamics of Ferrocene-Azadipyrromethane Donor-Acceptor Dyads and Triads,”J.Phys.Chem.A 2011,115,9810-9819;Bandi等,“A Broad-Band Capturing and Emitting Molecular Triad:Synthesis and Photochemistry,”Chem.Comm.,2013,49,2867-2869;Jokic等,“Highly Photostable Near-Infrared Fluorescent pH Indicators and Sensors Based on BF₂-Chelated Tetraarylazadipyrromethane Dyes,”Anal.Chem.2012,84,6723-6730;Jiang等,“A Selective Fluorescent Turn-On NIR Probe for Cysteine,”Org.Biomol.Chem.,2012,10,1966-1968;以及Kucukoz等,“Synthesis,Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Aza-boron-dipyrromethane Compounds Containing Methoxy and Hydroxy Groups and Two-Photon Absorption Cross-Section,”Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 247 (2012),24-29;以上文献全部以引用的方式并入本文。还可以使用其他荧光材料。

[0094] 本文所描述的超声波可切换荧光团可以具有不与本发明的目的不一致的任何荧光发射曲线。举例来说,在一些实施方案中,荧光团展现发射曲线,所述发射曲线包括可见光或者以电磁波谱的可见区为中心,例如在450nm与750nm之间。在一些情况下,荧光团展现发射曲线,所述发射曲线包括红外(IR)光或者以电磁波谱的IR区为中心。举例来说,在一些情况下,本文所描述的荧光团展现发射曲线,所述发射曲线以近IR(NIR,750nm-1.4μm)、短

波长IR (SWIR, 1.4 μm –3 μm)、中间波长IR (MWIR, 3 μm –8 μm) 或长波长IR (LWIR, 8 μm –15 μm) 为中心。另外, 在一些实施方案中, 本文所描述的荧光团具有发射曲线, 所述发射曲线与水 and/或生物组织具有吸收最小值的波长重叠, 例如在大约700nm与大约800nm之间或者在大约1.25与大约1.35 μm 之间的波长。另外, 在一些情况下, 本文所描述的超声波可切换荧光团群体包括具有不同发射曲线的荧光团。举例来说, 在一些情况下, 所述群体的第一荧光团可以在NIR中发射, 并且所述群体的第二荧光团可以在电磁波谱的可见区中发射。另外, 在一些情况下, 第一荧光团和第二荧光团可以具有不同的时间强度衰减曲线, 如下文进一步描述。在一些实施方案中, 第一荧光团和第二荧光团的超声波荧光发射曲线在数学上正交或非相关。以此方式, 可以实现多路复用的成像。

[0095] 此外, 在一些情况下, 本文所描述的荧光团展现至少大约1ns、至少大约3ns或至少大约10ns的荧光寿命。在一些实施方案中, 本文所描述的荧光团展现在大约1ns与大约15ns之间、在大约1ns与大约10ns之间、在大约1ns与大约4ns之间、在大约3ns与大约7ns之间、在大约3ns与大约5ns之间或者在大约10ns与大约15ns之间的荧光寿命。

[0096] 另外, 在一些实施方案中, 本文所描述的超声波可切换荧光团展现与荧光团的开启状态和关闭状态相关的一个或多个合意的特征。举例来说, 在一些情况下, 荧光团展现在荧光强度方面的高开关比 ($I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$)、在荧光寿命方面的高开关比 ($\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$)、在开启状态与关闭状态之间的急剧过渡带宽 (T_{BW}), 和/或可调整的切换阈值 (S_{th}), 例如可调整的切换阈值温度 (T_{th}) 或可调整的切换阈值压力 (P_{th})。可以参考图3进一步描述这些度量。

[0097] 图3说明温度相依荧光团的荧光强度和荧光寿命随温度而变的曲线图。然而, 应了解, 对于展现压力相依荧光或取决于本文所描述的一些其他变量的荧光的荧光团, 可以通过类似的方式应用相同原理和命名。在这种情况下, 可以通过压力轴或对应于与荧光切换相关的另一变量的轴来取代图3的温度轴, 而不需要另外基本上更改图3的外观。参考图3, T_{th} 是指切换阈值温度。 $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ 是指在阈值温度以上的温度范围内的荧光团的平均荧光强度与在阈值温度以下的温度范围内的荧光团的平均荧光强度的比率。类似地, $\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$ 是指在阈值温度以上的温度范围内的荧光团的平均荧光寿命与在阈值温度以下的温度范围内的荧光团的平均荧光寿命的比率。在一些实施方案中, 在温度范围内取得具有量值的平均值, 所述平均值是切换阈值的量值的大约5%到大约100%, 但位于过渡带宽 T_{BW} 之外。 T_{BW} 是指温度值范围 (或类似地, 压力或其他变量值), 荧光团在所述范围内以阶跃函数的方式从开启状态切换为关闭状态。换句话说, T_{BW} 是指开启状态和关闭状态之间的台阶的宽度。 T_{BW} 越小, 荧光团的荧光强度曲线越像在开启状态与关闭状态之间具有不连续性的实际阶跃函数。在图3中, 将 I_{on} 值取作大约33 $^{\circ}\text{C}$ 到大约48 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围 (大约16 $^{\circ}\text{C}$ 的范围, 或26 $^{\circ}\text{C}$ 的 T_{th} 值的大约62%) 内的平均强度, 且将 I_{off} 值取作大约23 $^{\circ}\text{C}$ 到大约25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围 (大约3 $^{\circ}\text{C}$ 的范围, 或26 $^{\circ}\text{C}$ 的 T_{th} 值的大约12%) 内的平均强度。一般来说, 用于确定开启状态和关闭状态中的平均荧光强度的温度值范围可以基于用于特定成像应用的所关注的温度值范围。本文所描述的超声波可切换荧光团可以展现在下文在表1中提供的 $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ 、 $\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$ 、 T_{BW} 和 T_{th} 值中的任一者。

[0098] 表1.

[0099]

$I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$	$\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$	$T_{\text{BW}}(^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{th}}(^{\circ}\text{C})$
--------------------------------	--------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

>2	≥ 2	<15	>25
>3	≥ 3	<10	>30
>5	≥ 5	≤ 5	>37
>8	2-10	1-15	≥ 40
2-10	2-7	1-10	20-45
3-10	2-5	3-12	25-35
3-9	3-7	3-10	37-45
5-9	3-5	3-5	38-45

[0100] 在一些实施方案中,本文所描述的成像方法还包括将例如生物环境等环境暴露于电磁辐射的脉冲束,包括在使生物环境暴露于超声波束之前进行。电磁辐射的脉冲束可以具有皮秒脉冲持续时间,例如,不大于100ps的脉冲持续时间,其中将所述脉冲持续时间界定为脉冲束随时间变化的光学功率的FWHM。脉冲束可以具有不与本发明的目的不一致的任何波长和功率。在一些情况下,例如,将脉冲束的波长选择为与存在于生物环境中的一种或多种物质的吸收曲线基本上重叠,如上文进一步描述。在一些实施方案中,脉冲束具有可见波长或NIR波长。还可以使用其他脉冲束。

[0101] 本文所描述的成像方法还包括将例如生物环境等环境暴露于一个或多个超声波束以在环境内产生激活区。超声波束可以具有不与本发明的目的不一致的任何超声波频率。在一些实施方案中,超声波束包括具有大于大约20kHz或大于大约2MHz的频率的振荡声音压力波。在一些情况下,本文所描述的超声波束具有多达大约5GHz或多达大约3GHz的频率。在一些实施方案中,超声波束具有在大约20kHz与大约5GHz之间、在大约50kHz与大约1GHz之间、在大约500kHz与大约4GHz之间、在大约1MHz与大约5GHz之间、在大约2MHz与大约20MHz之间、在大约2MHz与大约10MHz之间、在大约5MHz与大约200MHz之间、在大约5MHz与大约15MHz之间、在大约200MHz与大约1GHz之间、在大约500MHz与大约5GHz之间或在大约1GHz与大约5GHz之间的频率。

[0102] 另外,超声波束可以具有不与本发明的目的不一致的任何功率。在一些实施方案中,例如,超声波束具有在大约0.1W/cm²与大约10W/cm²之间、在大约0.1W/cm²与大约5W/cm²之间、在大约0.5W/cm²与大约5W/cm²之间、在大约1W/cm²与大约10W/cm²之间或在大约1W/cm²与大约5W/cm²之间的功率。在其他情况下,超声波束具有在大约100W/cm²与大约5000W/cm²之间或在大约100W/cm²与大约3000W/cm²之间的功率。在一些情况下,使用具有高功率(例如,本文所描述的功率)的超声波束可以导致在激活区内产生非线性效果。另外,在一些实施方案中,可以通过此方式减小激活区的有效大小,从而导致提高的成像分辨率。

[0103] 可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式使环境暴露于超声波束。举例来说,在一些实施方案中,生物环境仅在有限的持续时间内暴露于本文所描述的超声波束。在一些情况下,例如,在小于大约1秒或小于大约500ms内向环境提供超声波束。在一些实施方案中,在小于大约300ms、小于大约100ms、小于大约50ms或小于大约10ms内向环境提供超声波束。在一些情况下,在大约1ms到大约1秒、大约1ms到大约500ms、大约1ms到大约300ms、大约1ms到大约100ms、大约1ms到大约50ms、大约1ms到大约10ms、大约10ms到大约300ms、大约10ms到大约100ms、大约10ms到大约50ms或大约50ms到大约100ms内向环境提供超声波束。在一些实施方案中,使用生物环境到超声波束的短暴露时间可以准许对荧光信号的时间门

控,使得所要的USF信号可以在时间上与一个或多个非所要或非分析物荧光信号(例如,组织自发荧光信号或来自随机开启的荧光团的信号)分开。

[0104] 另外,超声波束可以是连续波束或脉冲或调制束。在一些实施方案中,使用调制或脉冲超声波束可以通过准许对USF信号的频率门控检测来进一步提高本文所描述的方法的SNR。举例来说,在一些情况下,脉冲或调制超声波束提供具有特定频率或调制的超声暴露。因此,对应的USF信号还可以展现相同特定频率或调制。因此,在一些此类情况下,使用锁定放大器来增加检测器对特定频率或调制的灵敏度,因此增加方法的整体灵敏度和SNR。

[0105] 在本文所描述的方法的一些实施方案中,使用单个超声换能器(例如,高强度聚焦超声(HIFU)换能器)将单个超声波束引导向环境。在其他情况下,使用多个超声换能器将多个超声波束引导向环境。另外,在一些情况下,以第一角度和/或从第一方向将第一超声波束引导向环境,且以不同于第一角度和/或方向的第二角度和/或从第二方向将第二超声波束引导向环境。在一些实施方案中,例如,所述第一和第二方向是正交或基本上正交的方向,例如相隔80度到100度的方向。在其他情况下,所述方向相隔小于80度或多于100度。此外,在需要时,还可以从额外的方向或以额外的角度将额外的超声波束引导向环境。在此类情况下,束的焦点区域可能会彼此重叠或相交,以在所述束的交叉点处形成激活区。以此方式,激活区可以具有比用于产生激活区的单个超声波束的焦点区域或横截面小的体积或横截面,进而提高成像分辨率。在一些情况下,例如,激活区具有小于大约2mm、小于1.5mm或小于大约1mm的横向尺寸和/或轴向尺寸。在一些实施方案中,激活区具有小于大约700 μ m或小于大约500 μ m的横向尺寸和/或轴向尺寸。在一些实施方案中,激活区具有大约300 μ m到大约2mm、大约400 μ m到大约1.5mm、大约400 μ m到大约1mm、大约400 μ m到大约700 μ m或大约400 μ m到大约500 μ m的横向尺寸和/或轴向尺寸。在一些情况下,横向和轴向尺寸具有本文所述的大小,包括在大约1mm以下或在大约700 μ m以下的大小。另外,在一些实施方案中,激活区的横向和轴向尺寸是不同的,进而提供相对各向异性的激活区。替代地,在其他情况下,横向和轴向尺寸是基本上相同的,进而提供相对“方”或各向同性的激活区。

[0106] 在本文中出于参考目的,“激活区”包括其中本文所描述的超声波可切换荧光团可以从关闭状态切换为开启状态的环境的区。举例来说,在一些情况下,激活区包括与环境的其他部分相比之下的负压力区。类似地,在其他情况下,激活区包括高温区。如本文进一步描述,可以基于安置在生物环境中的荧光团的切换阈值来选择本文所描述的激活区的温度、压力或其他特性。举例来说,在一些情况下,一个或多个超声波束被配置成形成具有大于大约30 $^{\circ}$ C、大于大约35 $^{\circ}$ C或在大约30 $^{\circ}$ C与大约50 $^{\circ}$ C之间的平均温度或最大温度的激活区。在其他实施方案中,激活区具有在大约10kPa与大约150kPa之间或在大约80kPa与大约120kPa之间的平均负压力或最大负压力。另外,如本文进一步描述,可以通过用于形成激活区的一个或多个超声波束的数目和/或功率来确定激活区的大小、形状和/或其他性质。在一些情况下,例如,通过单个超声波束的焦点区域来界定激活区的大小和形状。在其他情况下,通过多个超声波束的焦点区域的重叠来界定激活区。

[0107] 本文所描述的荧光团可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式安置在激活区内。在一些情况下,荧光团通过从环境的邻近区域漫射到激活区中而进入或安置在环境的激活区内。在其他情况下,在环境内的其中已知有可能发现或可以发现荧光团或荧光团群体的特定位置内产生激活区。举例来说,在一些实施方案中,跨环境或在环境内对本文所

描述的超声波束进行光栅扫描,进而以连续方式在环境内的不同位置产生多个激活区。

[0108] 本文所描述的成像方法还包括使环境暴露于一束电磁辐射和/或使用一束电磁辐射激发处于开启状态的至少一个荧光团。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式使用一束电磁辐射来激发荧光团。在一些实施方案中,例如,使用例如二极管激光器等激光激发源来激发荧光团。在其他情况下,使用一个或多个发光二极管(LED)或宽带激发源来激发荧光团。另外,本文所描述的激发源可以提供不与本发明的目的不一致的任何波长的光。在一些实施方案中,使用包括可见光、NIR光或IR光的一束电磁辐射来激发本文所描述的荧光团。在其他情况下,所述电磁辐射束包括紫外(UV)光。

[0109] 本文所描述的方法还包括检测在环境内或环境内的特定位置内发射的光致发光信号或其他光。在一些实施方案中,例如,一种方法包括检测由至少一个超声波可切换荧光团发射的光。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来检测由荧光团发射的光。在一些实施方案中,例如,检测由处于开启状态的至少一个荧光团发射的光包括:以时间门控或频率门控的方式检测光,包括本文所描述的时间门控方式或频率门控方式。在一些情况下,在比处于关闭状态的荧光团的荧光寿命或者比存在于生物环境中的另一物质的荧光寿命更长的时间延迟之后来检测由处于开启状态的至少一个荧光团发射的光。举例来说,在一些实施方案中,在比存在于生物环境中的非荧光团物质的自发荧光寿命(例如,可以达大约4ns或达大约5ns的组织的自发荧光寿命)更长的时间延迟之后,检测由处于开启状态的至少一个荧光团发射的光。另外,可以使用不与本发明的目的不一致的任何检测器。在一些实施方案中,例如,可以使用一个或多个光电倍增管(PMT)检测器。其他配置也是可能的。

[0110] 类似地,可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来执行在环境内的一个或多个位置处检测光致发光信号。在一些情况下,例如,通过对环境进行光栅扫描来检测环境内的多个位置处的多个光致发光信号。此类光栅扫描可以包括对跨环境或环境内的一个或多个超声波束进行光栅扫描,使得超声波束在所述环境内的不同位置处循序地产生一系列激活区。在一些情况下,还有可能从环境内的位置之间移动或扫描本文所描述的检测器。以此方式移动或扫描检测器可以增加所述方法的检测区域。在其他情况下,使用例如电荷耦合装置(CCD)图像传感器或相机等二维检测器来同时检测多个位置处的光致发光信号。

[0111] 在一些实施方案中,本文所描述的成像方法还包括使一个或多个检测到的光致发光信号与一个或多个参考信号相关,以产生被成像的环境内的一个或多个位置的一个或多个相关系数。此类方法还可以包括使一个或多个检测到的光致发光信号乘以一个或多个位置的一个或多个相关系数,以产生所述一个或多个位置的一个或多个经修改的光致发光信号。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来执行前述相关和相乘步骤。另外,本文所描述的方法的“参考”信号可以是与安置在被成像的环境中的荧光团具有相同发冷光或荧光发射曲线的信号。因此,“参考”信号可以用作标准信号,相对于所述标准信号来比较检测到的信号,如本文进一步描述。另外,应了解,可以在与当从被成像的环境检测一个或多个光致发光信号时使用的实验条件相同或基本上类似的实验条件下产生或测量此参考信号。例如,可以使以下实验条件保持恒定或基本上恒定(在实验误差内)以便产生或测量参考信号并且检测一个或多个光致发光信号:使所述环境暴露于超声波束的方式(例如,所使用的超声波束的数目、功率和定向);使所述环境暴露于一束电磁辐射的方式(例如,所使用的辐射源的功率、波长和类型(脉冲或连续波));检测光致发光信号的方式(例如,所使用的

检测器的类型和放置) ;以及环境的性质 (例如,成像深度和所使用的组织的类型)。

[0112] 在本文所描述的一些实施方案中,使光致发光信号与参考信号相关包括:将光致发光信号的时间强度衰减曲线与参考信号的时间强度衰减曲线进行比较。在一些情况下,此类比较可以产生用作检测到的光致发光信号有多紧密地对应于参考信号的度量的相关系数。不希望受理论束缚,相信当将光致发光信号和参考信号的时间强度衰减曲线进行比较时,时域中的超声波可切换荧光团的独特的光谱签名可以准许产生尤其有用的相关系数,如在下文进一步描述。在一些实施方案中,根据以下等式 (1) 产生环境内的位置的相关系数:

$$[0113] \quad \rho_{I,R} = \frac{(\sum I(t)R(t)) - \frac{(\sum I(t))(\sum R(t))}{N}}{\sqrt{(\sum I(t)^2 - \frac{(\sum I(t))^2}{N})(\sum R(t)^2 - \frac{(\sum R(t))^2}{N})}} \quad (1),$$

[0114] 其中 $\rho_{I,R}$ 是第一位置的相关系数, $I(t)$ 是第一位置处的第一光致发光信号的时间强度衰减曲线, $R(t)$ 是第一参考信号的时间强度衰减曲线, 且 N 是 $I(t)$ 和 $R(t)$ 中的时间点的数目。

[0115] 另外, 在一些情况下, 以本文所描述的方式产生的相关系数是分段后的相关系数。在本文中出于参考目的, “分段” 的相关系数是基于所有可能的相关系数值的分段而被指定值的相关系数。举例来说, 在一些情况下, 可以首先根据上文等式 (1) 来确定相关系数的值。通过使用等式 (1), 所有相关系数可以在理论上具有 -1 与 +1 之间的值。然而, 对于本文所描述的相关步骤, 负值在物理上可能没有意义。因此, 如果等式 (1) 提供相关系数的负值, 那么可以使用分段过程迫使负相关系数具有值零。可以还对相关系数的其他值进行 “更改” 或分段以提供提高的 SNR。因此, 在一些情况下, 如分段过程中的下一步骤, 可以使用特定相关系数的 “实际” 值来将所述特定相关系数放置在系数值的多个 “段” 中的一者中。另外, 为了执行本文所描述的相乘步骤, 例如以上步骤 (g) 或 (g_n), 可以将同一段中的所有相关系数视为具有同一值, 例如由用于将相关系数分段的分段表提供的值。在下文在表 2 中提供适合于在本文所描述的一些实施方案中使用的分段表的一个非限制性实例。然而, 应了解, 还可以使用其他分段表。

[0116] 表 2.

[0117]

相关系数的值 (x)	相关强度	将用于相乘步骤的值
$x < 0$	反相关	0
$x = 0$	零相关	0
$0 < x < 0.3$	弱相关	0
$0.3 \leq x < 0.9$	中度相关	x^3
$0.9 < x$	强相关	x

[0118] 另外, 应进一步理解, 可以使用不与本发明的目的不一致的任何计算机或软件算法或其他硬件和/或软件来执行本文所描述的相关和/或相乘步骤。在一些情况下, 例如, 使用一种或多种 MATLAB 算法。

[0119] 在一些实施方案中, 本文所描述的方法还包括将环境内的多个位置的多个经修改的光致发光信号进行组合, 以产生由所述环境内的荧光团发射的超声波荧光的空间曲线

图。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来组合经修改的光致发光信号。在一些情况下,例如,将经修改的光致发光信号进行组合以提供作为沿着一个或多个轴的距离的函数的荧光强度的曲线图。例如,在图22中说明了作为一个维度上的距离的函数的荧光强度的曲线图。在其他实施方案中,将经修改的光致发光信号进行组合以提供作为环境内的两个维度或三个维度的函数的荧光强度的曲线图。还可以通过其他方式来组合经修改的光致发光信号。

[0120] 此外,如上文描述,根据本文所描述的方法而产生的空间曲线图可以具有提高的SNR,包括与在不执行本文所描述的相关和相乘步骤的情况下产生的另外类似的曲线图相比。举例来说,在一些情况下,由本文所描述的环境内的荧光团发射的超声波荧光的空间曲线图可以具有比当不以本文所描述的方式执行相关步骤时由所述环境(或类似的环境)内的荧光团发射的超声波荧光的空间曲线图的SNR大以下各者的SNR:至少大约50%、至少大约70%、至少大约100%、至少大约150%、至少大约200%、至少大约250%、至少大约300%、至少大约400%、至少大约500%、至少大约600%、至少大约700%、至少大约800%、至少大约900%或至少大约1000%。应了解,通过使两个相关SNR值的差除以较低的SNR值且随后乘以100来确定前述百分比。在一些情况下,使用本文所描述的方法而获得的SNR比通过不包括本文所描述的相关步骤的另外类似的方法而获得的SNR大大约20%-300%、大约15%-250%、大约15%-200%、大约15%-100%、大约50%-300%、大约50%-250%、大约50%-200%、大约50%-150%、大约50%-100%、大约70%-300%、大约70%-250%、大约100%-300%、大约100%-250%、大约100%-200%、大约150%-300%、大约150%-250%、大约200%-300%或大约200%-250%。另外,在一些实施方案中,由在本文所描述的环境内的荧光团发射的超声波荧光的空间曲线图可以具有至少大约80、至少大约100、至少大约150、至少大约200、至少大约250、至少大约300、至少大约350或至少大约400的SNR。在一些情况下,以本文所描述的方式产生的空间曲线图的SNR在大约80与大约400之间、在大约100与大约350之间、在大约150与大约350之间、在大约200与大约350之间、在大约250与大约350之间、在大约300与大约400之间或在大约300与大约350之间。在下文在实施例10中说明和进一步描述以本文所描述的方式提供的空间曲线图的非限制性实例。

[0121] 应进一步注意,可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来确定本文所描述的空间曲线图的SNR。在一些情况下,如下确定空间曲线图的SNR。首先,使用归一化USF图像的发射曲线来确定所述曲线的峰强度和FWHM。随后将峰波长指定为信号范围的中心,所述信号范围具有是FWHM的值的三倍的带宽。接下来,将在此信号范围之外的所有数据视为背景。随后计算所述背景的标准偏差且视为发射曲线的噪声。随后可以通过使峰强度除以所述噪声来计算曲线的SNR。此外,在需要时,可以确定和平均多个测量值的SNR。随后可以将平均SNR取作USF图像的SNR。

[0122] 另外,在一些情况下,本文所描述的方法包括:将一个或多个光致发光信号正交地分解为与第一荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第一基向量,和与第二荧光团的归一化超声波信号相对应的第二基向量。此类方法还可以包括确定环境内的多个位置处的多个荧光团的归一化超声波荧光信号的基向量系数。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式分解光致发光信号。举例来说,在一些情况下,使用计算机或软件算法或其他硬件(例如,MATLAB曲线拟合算法)将光致发光信号分解为基向量。类似地,一旦将光致发光信号

分解为基向量,可以使用任何合适的计算机或软件算法(例如,MATLAB算法)来确定基向量的系数,如在下文进一步描述。另外,可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来执行使荧光团的归一化超声波荧光信号乘以适当的系数以产生环境内的特定位置处的荧光团的分离后的超声波荧光信号。举例来说,在一些情况下,可以使用例如MATLAB算法等算法。

[0123] 在一些情况下,本文所描述的方法还包括将多个位置处的一个或多个荧光团的分离后的超声波荧光信号进行组合,以产生由环境内的一个或多个荧光团发射的超声波荧光的空间曲线图。可以通过不与本发明的目的不一致的任何方式来组合分离后的超声波荧光信号。在一些情况下,例如,将分离的信号进行组合以提供作为沿着一个或多个轴的距离的函数的荧光强度的曲线图。在其他实施方案中,将分离的信号进行组合以提供作为环境内的两个维度或三个维度的函数的荧光强度的曲线图。以本文所描述的方式组合分离后的超声波荧光信号因此可以提供多个荧光团在环境内的一个、两个或三个维度上的多路复用的成像。

[0124] 如上文描述,在一些实施方案中,本文所描述的成像方法可以展现提高的穿透深度/分辨率比率(DRR)。在本文中出于参考目的,将成像方法的“穿透深度”界定为被成像的对象的表面下方的深度,在所述深度处,所述对象内部的超声波束的强度下降到其在表面处的初始值的 $1/e$ (大约37%)。在本文中出于参考目的,方法的“分辨率”是微观分辨率(即,可以区分单独对象的大小),使所述微观分辨率等于给定维度上的激活区的FWHM。在一些实施方案中,本文所描述的方法展现至少大约100的DRR。在其他情况下,本文所描述的方法展现至少大约200、至少大约300或至少大约400的DRR。在一些实施方案中,本文所描述的方法展现多达大约500的DRR。在一些情况下,本文所描述的方法展现在大约100与大约500之间、在大约100与大约400之间、在大约100与大约300之间或在大约200与大约500之间的DRR。此外,在一些实施方案中,本文所描述的方法的穿透深度可以多达100mm、多达50mm或多达30mm。在一些情况下,所述穿透深度是在大约10mm与大约100mm之间、在大约10mm与大约60mm之间、在大约10mm与大约50mm之间、在大约20mm与大约90mm之间或在大约20mm与大约50mm之间。另外,在一些实施方案中,本文所描述的方法的分辨率小于大约 $100\mu\text{m}$ 、小于大约 $70\mu\text{m}$ 、小于大约 $50\mu\text{m}$ 或小于大约 $30\mu\text{m}$ 。在一些情况下,所述分辨率在大约 $10\mu\text{m}$ 与大约 $100\mu\text{m}$ 之间、大约 $10\mu\text{m}$ 与大约 $70\mu\text{m}$ 之间、大约 $10\mu\text{m}$ 与大约 $50\mu\text{m}$ 之间、大约 $10\mu\text{m}$ 与大约 $30\mu\text{m}$ 之间、大约 $20\mu\text{m}$ 与大约 $100\mu\text{m}$ 之间、大约 $20\mu\text{m}$ 与大约 $80\mu\text{m}$ 之间、大约 $20\mu\text{m}$ 与大约 $50\mu\text{m}$ 之间或大约 $30\mu\text{m}$ 与大约 $70\mu\text{m}$ 之间。

[0125] 应了解,本文所描述的成像方法可以包括不与本发明的目的不一致的本文所描述的步骤的任何组合,并且使用本文所描述的设备 and 材料的任何组合。举例来说,在一些情况下,本文所描述的方法包括:将包括温敏聚合物的一个或多个荧光团安置在深部生物组织中;使用两个正交HIFU换能器形成激活区;以及以时间门控的方式检测来自荧光团的发射,进而提供大于大约200的DRR。另外,在一些情况下,此方法进一步包括在产生环境内的多个位置的多个相关系数之后,和/或在正交地分解一个或多个光致发光信号且随后产生多个荧光团的分离后的超声波荧光信号之后,产生荧光团的超声波荧光发射的空间曲线图。其他组合和配置也是可能的。

[0126] 在以下非限制性实施例中进一步说明本文所描述的一些实施方案。

[0127] 实施例1

[0128] 超声波可切换荧光团

[0129] 综述

[0130] 通过将环境敏感NIR染料、吲哚菁绿 (ICG) 囊封到温敏聚合物纳米颗粒 (NP) 中来制备适合于在根据本文所描述的一些实施方案的成像方法中使用的一系列超声波可切换荧光团或造影剂。NP可以安置在例如于本文所描述的生物环境等含水环境中。当环境的温度在阈值温度 (其可以被称为NP的LCST) 以下时, 所述NP是亲水的并且吸收大量水, 结果是所述NP具有相对大的平均直径。不希望受理论束缚, 相信ICG分子在富含水的微环境下发弱荧光, 因为水提供极性和非粘性的微环境, 且进而增加了所激发的ICG分子的非辐射衰减率。当温度增加到阈值温度以上时, NP变得疏水, 导致从NP排出水以及平均NP直径的对应减小。此外, 不希望受理论束缚, 相信分散在NP内的ICG分子因此暴露于与富含水的微环境相比具有相对低的极性和高粘度的富含聚合物的微环境。相信此类低极性、高粘度微环境可以抑制所激发的ICG分子的非辐射衰减率, 从而导致ICG的荧光强度的增加。已观测到, 从关闭状态到开启状态的此荧光切换行为是可逆和可重复的。具体来说, 可以使用高强度聚焦超声 (HIFU) 换能器通过将换能器的焦点区域中的温度更改为高于和低于NP的LCST而在开启状态和关闭状态之间可逆地和反复地切换荧光团。

[0131] NP是由聚 (N-异丙基丙烯酰胺) (PNIPAM) 或其与丙烯酰胺 (AAm) 或N-叔丁基丙烯酰胺 (TBA_m) 的共聚物形成的。图4说明此类聚合物和ICG的结构。具体来说, 合成四种类型的聚合物NP, 包括 (1) ICG囊封型P (NIPAM-TBA_m 185:15) NP, (2) ICG囊封型PNIPAM NP, (3) ICG囊封型P (NIPAM-AAm 90:10) NP, 以及 (4) ICG囊封型P (NIPAM-AAm 86:14) NP。前述公式中的比率是指用于形成NP的NIPAM单体与TBA_m或AAm单体之间的摩尔比率。可以基于与PNIPAM共聚的AAm和/或TBA_m的数量来更改这些温敏聚合物NP的LCST。举例来说, 使用亲水单体 (例如AAm) 导致具有更高LCST的聚合物。相比而言, 使用疏水单体 (例如TBA_m) 会减小LCST。另外, 应注意, TBA_m比NIPAM更疏水, 而AAm比NIPAM更亲水。

[0132] 材料

[0133] N-异丙基丙烯酰胺 (NIPAM)、丙烯酰胺 (AAm)、过硫酸铵 (APS)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (BIS)、N-叔丁基丙烯酰胺 (TBA_m)、抗坏血酸钠和ICG是从Sigma-Aldrich (圣路易斯市, 密苏里州, 美国) 购得。所有化学物品按原样使用, 而不需要进一步提纯。

[0134] 合成

[0135] 如下制备含有PNIPAM的ICG NP。使用类似的方案来制备其他NP, 不同之处在于添加适当量的TBA_m和/或AAm单体。另外, 还有可能使用丙烯酸 (AAc) 和烯丙基胺 (AH) 来部分地或完全地取代TBA_m和/或AAm, 以形成NIPAM的其他共聚物, 例如P (NIPAM-AAc)、P (TBA_m-NIPAM-AAc) 或P (NIPAM-AH)。

[0136] 简言之, 为了制备PNIPAM NP, 使NIPAM (单体, 0.6822g)、BIS (交联剂, 0.0131g) 和 SDS (表面活性剂, 0.0219g) 溶解于250mL Schlenk管中的50mL去离子水中, 随后使用氮气吹扫10分钟。随后将ICG (荧光团, 0.0034g)、APS (引发剂, 0.039g) 和TEMED (促进剂, 51μL) 添加到所述管中。随后将所述管置于惰性氮气气氛下并持续向Schlenk线施加真空随后使用氮气回填的三个循环。随后在室温下将烧瓶的内含物搅拌4个小时。通过使烧瓶内含物暴露于空气而停止反应。使用10kDa分子量截止膜相对于去离子水将所述产物透析3天, 以移除额

外的表面活性剂和未反应的材料。使用傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) (Thermo Nicolet 6700, 西棕榈滩市, 佛罗里达州, 美国) 在 $4,000\text{cm}^{-1}$ 到 600cm^{-1} 下确认最终产物的组成。

[0137] 通过动态光散射 (DLS) 和透射电子显微镜 (TEM) 来测量 NP 的直径。TEM 还用于确定 NP 的形态。对于 DLS 测量, 使用 2.8 mL 的去离子水稀释 200 μL 的产物, 且随后在室温 (25°C) 下使用 Nanotracs 150 (Microtrac 公司, Niskisno, 圣地亚哥市, 加利福尼亚州, 美国) 进行分析。对于 TEM 测量, 通过将产物 NP 的水分散体 (处于大约 1mg/mL) 液滴涂布到碳包覆的铜网上 (FF200-Cu-50, Electron Microscopy Sciences, 哈特菲尔德市, 宾夕法尼亚州, 美国), 随后使用 0.2% 的乙酸双氧铀染色, 来制备样本。使用 JEOL 1200EX TEM (JEOL, Peabody, 马萨诸塞州, 美国) 执行 TEM 实验。基于动态光散射 (DLS) 和透射电子显微镜 (TEM), NP 具有在 70 nm 与 150 nm 之间的大小。具体来说, 当通过 DLS 测量时, (1) 含有 ICG 的 PNIPAM NP 具有 $150 \pm 25\text{nm}$ 的平均大小; (2) 含有 ICG 的 P (NIPAM-TBA 185:15) NP 具有 $76 \pm 4\text{nm}$ 的平均大小; (3) 含有 ICG 的 P (NIPAM-AA 86:14) NP 具有 $75 \pm 25\text{nm}$ 的平均大小; 以及 (4) 含有 ICG 的 P (NIPAM-AA 90:10) NP 具有 $76 \pm 2\text{nm}$ 的平均大小。通过 DLS 测得的大小略微大于通过 TEM 测得的大小, 这是因为水溶液中的 NP 周围的表面活性剂 (SDS) 和水化层的存在。举例来说, 以上样本 (1) 的 NP 的平均大小当通过 TEM 测量时是大约 110 nm。所述 NP 是几乎球形。

[0138] 在图 5 中示出聚合物 NP 的荧光切换曲线。将荧光强度绘制为样本温度的函数。在 28°C 、 31°C 、 37°C 和 41°C 的切换阈值温度 (LCST 或 T_{th}) 下, 可以针对所有四个 NP 清楚地看到醒目的切换特征。此外, 在单个样本中多次观测到切换。举例来说, 图 6 说明在于低温 (25°C , 测量点 1、3、5、7、9 和 11) 和高温 (44°C , 测量点 2、4、6、8、10 和 12) 之间循环的 12 个不同时间点 (测量点 1-12 在 x 轴上) 处的含有 ICG 的 P (NIPAM-AA 90:10) NP 的荧光数据。另外, 样本 (1)、(2)、(3) 和 (4) 的 $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ 比率分别达到 3.3、2.9、9.1 和 9.1。这些值比一些其他造影剂至少高 1.6 到 5.1 倍。

[0139] 在图 7 中示意性地说明用于测量本文所描述的荧光团的荧光特性的系统。一般来说, 荧光团的发射脉冲平均为 100 次, 且平均峰值用于表示荧光强度。如图 7 中说明, “ F_{ex} ”是指激发滤波器; “ F_{em} ”是指发射滤波器; “L”是指透镜; “PMT”是指光电倍增管; “BS”是指分束器; “PD”是指光电二极管; “PDG”是指脉冲延迟产生器; 以及 “ND 滤波器”是指中性密度滤波器。

[0140] 实施例 2

[0141] 使用温敏聚合物纳米颗粒的成像方法

[0142] 综述

[0143] 如下执行根据本文所描述的一些实施方案的成像方法。首先使用实施例 1 的含有 ICG 的 PNIPAM NP (LCST = 31°C) 的水溶液填充小硅胶管 (平均直径为 0.69 mm; Instech 实验室, BSILT031, 宾夕法尼亚州, 美国)。随后将所述管嵌入一块猪肌肉组织中以模拟血管, 以作为 USF 成像的目标。图 8A 示意性地说明用于成像的组织样本、管、激发光源、荧光收集光纤和 HIFU 换能器的配置。猪组织具有大约 8 mm 的厚度 (在图 8A 的 z 方向上) 和大约 20 mm 的宽度 (在 x 方向上)。沿着 y 方向将管插入到所述组织中。从管中心到组织的顶表面的距离是大约 4 mm。使用具有大约 3 mm 的直径的纤维束 (Edmund Optics NT39-366, 新泽西州, 美国) 将来自激光器的激发光递送到组织的底部, 以通过暴露于 HIFU 束来激发切换为开启状态的荧光团。将第二纤维束 (Edmund Optics NT42-345) 放置在组织顶部上以收集 USF 光子。将 2.5 MHz

HIFU换能器(H-108,Sonic Concepts,华盛顿州,美国;有效直径:60mm;焦距:50mm)定位在组织底部处且聚焦于管区。为了将声能高效地传输到组织中,使HIFU换能器、组织样本的底表面和用于递送激发光的纤维束淹没于水中。为了在两个维度上对管成像,在x-y平面中扫描或平移HIFU换能器。

[0144] USF成像系统

[0145] 在图8B中示意性地说明USF成像系统的设置。所述系统包括四个主要子系统:(1)光学子系统,(2)超声子系统,(3)温度测量子系统,以及(4)电子控制子系统。光学子系统包括用于递送激发光或电磁辐射束并且收集发射光的组分。使用808nm二极管激光器(MDL-III-808R)产生激发光,且经由上文描述的纤维束将所述激发光递送到样本组织的底部。将带通滤波器F1(FF01-785/62-25,Semrock,纽约;中心波长:785nm;带宽:62nm)用作激发滤波器,以清理位于发射滤波器的通带中的二极管激光的任何不合意的边带分量。激光以连续波(CW)模式操作;然而,使用通过脉冲延迟产生器(PDG,P400,海兰市,加利福尼亚州)触发的快速机械快门(UNIBITZ LS3T2,纽约州)来控制样本照射时间和持续时间。快门具有0.5ms的响应时间。替代地,还有可能使用脉冲激光而不是CW激光。将经由上文描述的第二纤维束收集的发射光子递送到发射滤波器且随后由光电倍增管(PMT)接收。四个发射滤波器的组合准许对激发光子的最大排斥和使荧光发射光子通过,具体来说,两个长波通干扰滤波器(F2和F5;BLP01-830R-25,Semrock,纽约州,美国;边缘波长:846nm)和两个长波通吸收性玻璃滤波器(F3和F4;FSR-RG830,Newport,Irvine,加利福尼亚州,美国,长波通截止型830nm)如图8B中说明而定位。使用两个NIR消色差双合透镜(AC-254-035-B,Thorlabs,新泽西州,美国)来校准荧光光子,以便通过干扰滤波器对激发光子进行最佳排斥,并且将经过滤的光子聚焦到冷却型和低噪声PMT(由高电压源C8137-02驱动驱动的H7422P-20,滨松市,日本)上。进一步通过低噪声电流前置放大器(SR570,Stanford Research Systems,加利福尼亚州,美国)放大所述信号,并且通过多通道示波器(DP04102B-L,Tektronix,俄勒冈州,美国)获取所述信号。

[0146] 超声子系统包括上文描述的HIFU换能器、各种驱动组分、阻抗匹配网络(NWM)、射频(RF)功率放大器和函数发生器(FG)。具体来说,通过FG(33220A,Agilent,加利福尼亚州,美国)产生具有2.5MHz的中心频率的门控正弦波信号,且通过RF功率放大器(325LA,E&I,纽约州,美国)进一步放大所述信号。将经放大的信号输入到NWM中以驱动HIFU换能器。HIFU换能器聚焦于硅胶样本管上。将HIFU换能器安装在二维平移平台上以用于初始HIFU定位和后续扫描。在初始定位中,将HIFU换能器移动到其中来自热电偶的温度信号达到其最大值(指示热电偶接点位于HIFU焦点上)的位置。将此位置视为图像的中心。通过环绕中心的HIFU换能器对矩形区域(4.0mm x1.02mm)进行光栅扫描。通过PDG控制整个超声子系统,包括HIFU脉冲的射击、激发光脉冲的射击以及示波器的数据采集。在图8C中绘制这些过程的时间序列。在此实施例中,超声暴露时间是300ms,这由来自PDG的门控脉冲的宽度确定。

[0147] 为了使激光脉冲、荧光信号和数据采集适当地同步,采用以下策略。通过将激光束耦合到20m的光纤(FT200EMT,Thorlabs公司,纽敦市,新泽西州,美国)中而使激光脉冲延迟大约100ns。当通过激光器发射激发光脉冲时,少量激光能量被分束器分裂并递送到快速光电二极管(PD)以产生电子脉冲。此脉冲用于触发PDG。PDG的输出用于触发示波器以进行数据采集。通过控制PDG的输出延迟时间来调整触发时间。因此,示波器的数据采集与荧光信

号良好地同步和匹配。来自激光脉冲的100ns延迟大到足以考虑到触发信号的总电子延迟。

[0148] 通过微米大小的热电偶经由放大器和第二示波器来测量HIFU焦点处的温度。具体来说,将具有75 μ m的小接点大小的热电偶(Chc0003, Omega Engineering, 康涅狄格州, 美国)安置在硅胶管中以测量HIFU引发的温度变化。所述接点固定于扫描区域的中心。通过包括高精度运算放大器OPA2277的放大器电路放大来自热电偶的输出电压信号,且通过示波器(Infiniium 54830D MS0, Agilent, 加利福尼亚州, 美国)获取所述信号。通过沿着x方向扫描HIFU换能器,而获取温度曲线。发现热电偶信号与温度线性地成比例,所述温度先前在测试之前在组织样本外部经过校准。发现HIFU焦点处的所测得的峰温度是大约45 $^{\circ}$ C。

[0149] 在超声暴露周期期间, HIFU焦点处的组织温度连续地增加。在暴露之后,所述温度由于热扩散而减小。激发光恰好在超声暴露结束之前的最后2ms内照射组织,且通过打开快门来起始照射。同时,通过由来自PDG的脉冲触发的示波器来获取荧光信号。使用二维平移平台来扫描或平移HIFU换能器。

[0150] 高分辨率USF图像

[0151] 上文描述的HIFU换能器用于对上文描述的组织样本中样本管进行超声成像。使用脉冲发生器/接收器(5073PR, Olympus NDT, 美国)来用于激发换能器并且接收反射的声学回声。NWM还用于换能器与脉冲发生器/接收器之间的阻抗匹配。反射的声信号被脉冲发生器/接收器放大且被介接到计算机的数字化仪(NI USB 5133)获取。此类所接收的信号在超声成像领域中通常被称为A线,且表示沿着深度(z)方向的组织声阻抗分布。在x-y平面中的每个位置处获取一个A线。通过在x-y平面中扫描HIFU换能器,获取一组三维(x、y和z)数据。计算每个A线的包络以用于在不同深度处形成C模式图像。为了与USF图像进行比较,通过固定在管位置处的深度z来提取x-y平面中的一组二维数据(C模式图像中的一者)。以此方式形成图9B的图像。

[0152] 图9A说明x-y平面上的管的USF图像。两条垂直虚线指示管的内部边缘的位置。计算在每个y位置处沿着x方向的USF图像曲线的FWHM和八分之一最大值处的全宽(FWEM)。不同y位置处的平均FWHM和FWEM分别是 0.48 ± 0.13 mm和 0.68 ± 0.19 mm。虽然FWHM(0.48mm)比管的内径窄,但FWEM(0.69mm)非常接近管的内径(0.69mm)。因为可以将内径视为描述管的总大小的参数,所以可以将FWEM而不是FWHM视为描述USF图像的总大小的参数。

[0153] 为了将USF图像与纯超声波图像进行比较,经由常用的脉冲-回波方法使用同一HIFU换能器在x-y平面上扫描同一样本。在每个x-y位置处,对来自管的顶部内边界的反射的超声回波进行记录,并且用于产生超声波图像。在图9B中示出结果。其平均的FWHM和FWEM分别是 0.76 ± 0.01 mm和 1.12 ± 0.02 mm。这两个值大于USF图像的值。另外,如果假定肌肉中的超声速度在1,542m/s与1,626m/s之间,那么所采用的HIFU换能器(频率=2.5MHz且f数=0.83)的理论衍射极限横向焦点大小(等效于FWHM)在0.512mm与0.54mm之间,这也大于管的USF曲线的平均FWHM。因此,本文所描述的成像方法可以实现超过声学衍射极限分辨率。

[0154] 图9C和图9D说明沿着图9A中标记的水平虚线的USF产生的荧光、漫射的荧光、超声的强度曲线以及温度的比较。具体来说,图9C说明在y=0处沿着x轴的USF信号和漫射的荧光信号的曲线。图9D说明在y=0处沿着x轴的USF、超声和温度信号的曲线。USF和超声波图像都基于双三次法而经过归一化和内插。漫射的荧光信号的FWHM是3.9mm,这显著大于对应的USF图像的曲线的FWHM(0.48mm)和管的内径(0.69mm)。因此,本文所描述的方法可以提供

与漫射荧光方法(例如,荧光漫射光学断层摄影(FDOT))相比之下的提高的分辨率。还应注意,在图9D中,温度曲线具有0.66mm的FWHM,且超声曲线具有0.76mm的FWHM,这与0.54mm的USF信号曲线FWHM形成对比。为了获取漫射荧光的曲线,如图9C中说明,在保持所有其他组分固定的同时沿着x方向扫描样本。虽然HIFU保持关闭且温度保持在室温下(<LCST),但当激光开启时USF造影剂仍然发射一些荧光,因为USF造影剂甚至在关闭状态也不是100%的关闭。为了避免由于激发光的发射滤波器泄漏而使结果失真,通过使用水填充管进行背景扫描,且从结果减去此背景数据,所述结果是从含有荧光团的管获取得来。

[0155] 实施例3

[0156] 超声波可切换荧光团

[0157] 综述

[0158] 如下制备适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的一系列超声波可切换荧光团。所述荧光团包括多个FRET供体物质和多个FRET受体物质,其(1)偶合到线性温敏聚合物结构,(2)分散在温敏聚合物NP内,例如上文在实施例1中描述的NP,(3)偶合到温敏聚合物NP的表面,或(4)部分地分散在温敏聚合物NP内且部分地偶合到所述表面。在图10至图12中分别示意性地说明结构(1)、(3)和(4)。另外,在表2和表3中提供各种荧光团的一些性质。表3基于线性温敏聚合物结构来描述荧光团的性质。表4基于温敏聚合物纳米颗粒来描述荧光团的性质。在表3和表4中使用的命名对应于在下文在此实施例中进一步描述的命名。另外,以在以上实施例1和实施例2中描述的方式来获得在表3和表4中报告的所测得的值。

[0159] 结构(1)

[0160] 一般来说,首先合成温敏线性聚合物,且随后通过在聚合物和荧光物质上的适当部分(例如,羟基、羧基和/或胺部分)之间形成共价化学键而将荧光物质接枝到聚合物上。在一些情况下,例如,使用碳化二亚胺偶合方案。还可以通过其他方式执行缀合。一般来说,供体物质在可见区中具有短激发/发射波长,而受体物质具有红色/NIR发射(长波长)。使用短波长激发光(对于供体来说)来激发系统,使得几乎不激发或完全不激发受体至荧光状态。当温敏聚合物呈现上文描述的球状构象时,供体和/或受体之间的距离减小,从而导致从供体到受体的FRET。因此,可以观测到受体的发射(以长波长)。

[0161] 为了形成具有一般结构(1)的一系列荧光团,使用以下材料。异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、N-叔丁基丙烯酰胺(TBAm)、丙烯酰胺(AAm)、丙烯酸(AAc)、烯丙基胺(AH)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS),和7-(2-氨基乙氨基)-N,N-二甲基-4-苯并呋喃磺(DBD-ED)是从Sigma-Aldrich(圣路易斯市,密苏里州,美国)购得。SeTau 425单N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、Square 660单NHS、Seta 700单NHS、Seta 633单NHS和Square 660单NH₂是从SETA BioMedicals(乌尔班纳市,伊利诺伊州,美国)购得,且分别表示为ST425、Sq660、St700、Sq633和Sq660a。所有化学物品按原样使用,而不需要进一步提纯。

[0162] 具有一般结构(1)的荧光团的温敏聚合物组分包括至少三个功能部分:(a)主要温敏单元(例如NIPAM);(b)LCST控制单元(例如TBAm或AAm);以及(c)用于偶合到荧光物质的官能化单元(例如AAc或AH)。通过自由基聚合来合成线性聚合物。在250mL的Schlenk管中执

行所有反应。三个主要步骤如下。首先,执行吹扫程序,其中使用氮气对反应混合物吹扫10分钟。当添加引发剂(例如,APS)或促进剂(例如,TEMED)时,吹扫氧气达施加真空(1m)和使用氮气回填(5s)的三个循环。接下来,通过在室温下在氮气下将反应混合物搅拌4h来执行聚合反应。最后,通过使用适当的分子量截留(MWCO)膜透析三天以移除未反应的单体、引发剂和其他小分子来净化聚合物产物。

[0163] 使用P(NIPAM-AAc 200:1)作为一个实例,一般程序如下。以200:1的摩尔比率将1.3644g NIPAM(单体)和4 μ L AAc(单体)的样本溶解于Schlenk管中的50mL去离子(DI)水中。在吹扫程序期间,将0.067g APS(引发剂)和51 μ L TEMED(促进剂)添加到所述管中。在反应之后,使用3.5K MWCO膜透析样本。所得的溶液经过收集和冷冻干燥以用于随后与含有胺的荧光物质缀合。为了与含有NHS的荧光物质缀合,使用以上相同方案(不同之处在于使用AH而不是AAc)合成胺官能化的聚合物P(NIPAM-AH)。更一般来说,使用前述程序来合成以下温敏聚合物:P(NIPAM-TBAc-AAc 85:15:1)、P(NIPAM-TBAc-AAc 185:15:1)、P(NIPAM-TBAc-AAc 585:15:1)和P(NIPAM-AAc 200:32:1)。

[0164] 在合成所述聚合物之后,使用羧基与伯胺部分之间的化学反应来执行聚合物与荧光物质之间的结合。在一些情况下,所述荧光物质包括NHS,其与温敏聚合物的伯胺(例如,存在于P(NIPAM-AH)中的胺)反应。在其他情况下,所述荧光物质包括在存在EDC的情况下与聚合物(例如,P(NIPAM-AAc))的羧基缀合的伯胺。在7mL棕色玻璃管中执行所述缀合反应,以保护光敏染料或荧光物质。缀合的一般程序如下所述。对于含有胺的染料(例如DBD-ED或Sq660a),将5mg聚合物、25mg EDC以及0.3mg DBD-ED或/和5 μ L Sq660a(1mg/100 μ L二甲基亚砜(DMSO)的储备溶液)溶解在管中的5mL去离子水中。随后搅拌管并且在室温下反应过夜。在完成所述反应之后,使用如上文描述的适当的MWCO透析膜来净化缀合物。对于含有NHS的染料(例如ST425、St633、Sq660和St700),将5mg聚合物和10 μ L染料(储备溶液:1mg/100 μ L DMSO)溶解在5mL磷酸盐缓冲盐水(PBS,8mM磷酸钠、2mM磷酸钾,0.14M NaCl,10mM KCl,pH 8.3-8.6)中。随后搅拌溶液并且在室温下反应过夜。接下来,将1mL的20mM Tris缓冲液(pH 7.8)添加到所述溶液,以使染料的未反应的NHS部分淬灭两小时。最后,通过透析来净化样本。

[0165] 应注意,在一些情况下,将DBD-ED、St633、Sq660和St700用作极性敏感荧光团。在其他情况下,将DBD-ED或ST425用作供体物质且将Sq660(a)用作受体。

[0166] 结构(2)

[0167] 如上文在实施例1中描述来制备具有结构(2)的荧光团。

[0168] 结构(3)

[0169] 通过首先如上文在实施例1中所描述来制备温敏NP,而制备具有结构(3)的荧光团,不同之处在于不需要包括荧光物质。接下来,荧光物质以与上文针对线性温敏聚合物描述的方式相对应的方式附接到NP的表面,不同之处在于使用5mL聚合物NP溶液而不是5mg线性聚合物。作为一个实例,通过经由由AAc单体提供的羧基部分将两种含有胺的染料(DBD-ED和Sq660a)共价键合到聚合物NP(P(NIPAM-AAc 200:1)NP)的表面,来制备具有结构(3)的荧光团P(NIPAM-AAc 200:1)NP-DBD-ED-Sq660a。

[0170] 结构(4)

[0171] 通过首先如上文在实施例1中所描述来制备温敏NP且随后如上文针对结构(3)所

描述将荧光物质缀合到NP的表面,来制备具有结构(4)的荧光团。作为一个实例,将具有结构(4)的荧光团DBD-ED囊封在P(NIPAM-AH 86:14)NP内部,且经由NHS部分(来自染料)和胺部分(来自AH单体)的缀合将Sq660附着到所述NPS的表面。使用一般命名DBD-ED@P(NIPAM-AH 86:14)NP-Sq660来表示此类荧光团,其中在符号“@”之前的物质被囊封在所识别的聚合物NP中,且在连字符“-”之后的物质缀合到NP的表面。

[0172] 表3

	荧光团	$\lambda_{\text{ex}} \& \lambda_{\text{em}}$ (nm)	$I_{\text{On}}/I_{\text{Off}}$	$\tau_{\text{On}}/\tau_{\text{Off}} \& \tau_{\text{On}}$ (ns)	T_{th} (°C)	T_{BW} (°C)
DBD (供体)	PNIPAM (链), 共聚合	470 & 580	4.2	3.5 & 14	31	1
	P(NIPAM-AAc 100:1), 后标记	470 & 560lp	1.4	4.7 & 4.8	35	8
	P(NIPAM-AAc 200:1), 后标记	470 & 560lp	1.6	3.1 & 5.2	36	5
	P(NIPAM-AAc 600:1), 后标记	470 & 560lp	1.6	1.9 & 2.5	32	5
	P(NIPAM- TBAm-AAc 185:15:1), 后标记	470 & 560lp	1.8	5.4 & 10	26	4
	P(NIPAM-AAm- AAc 200:32:1), 后标记	470 & 560lp	1.1	2 & 2.2	42	9
红色染料 (受体)	P(NIPAM-AH 200:1), 后标记, St633	609 & 650/60	4.2	1.1 & 0.9	32	5
	P(NIPAM-AH 200:1), 后标记, Sq660	609 & 711/25	1.6	2.2 & 2.1	35	3
	P(NIPAM-AH 200:1), 后标记, St700	609 & 711/25	0.6	0.7 & 1.1	33	8
FRET	P(NIPAM-AAc 200:1)-DBD-ED, -Sq660a, 后标记	470 & 711/25	3.8	3.4 & 5.3	34	3
	P(NIPAM- TBAm-AAc 185:15:1), -DBD- ED, -Sq660a, 后标记	470 & 711/25	3	1.7 & 5.3	26	3

[0174] 表4

[0175]

	荧光团	$\lambda_{\text{ex}} \& \lambda_{\text{em}}$ (nm)	$I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$	$\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}} \& \tau_{\text{on}}$ (ns)	T_{th} (°C)	T_{BW} (°C)
DBD (供体)	@PNIPAM NP, 经囊封	470 & 560lp	4	3.3 & 6	35	5
	@P(NIPAM- AAm 86:14) NP, 经囊封	470 & 560lp	3.5	2.2 & 3.8	42	9
	@P(NIPAM- TBAa 185:15) NP, 经囊封	470 & 560lp	3.7	3.6 & 7.2	31	5
	@P(NIPAM- AH 86:14) NP, 经囊封	470 & 560lp	3	2.6 & 5.3	33	8
红色染料 (受体)	@PNIPAM NP, 经囊封, St700	630 & 711/25	0.7	0.7 & 1.2	36	9
	@PNIPAM NP, 经囊封, Sq660	609 & 711/25	3.3	1.3 & 2.9	35	5
FRET	DBD-ED@ P(NIPAM-AH 86:14) NP- Sq660	470 & 711/25	6.9	1.4 & 3.42	35	7
	P(NIPAM-AAc 200:1) NP- DBD-ED- Sq660a	470 & 711/25	5.3	3.3 & 6	35	5
	P(NIPAM- TBAa-AAc 185:15:1) NP- DBD-ED- Sq660a	470 & 711/25	6.5	2.7 & 5.2	33	9
	P(NIPAM-AAc 200:1) NP- ST425-Sq660a	456 & 711/25	7	1.5 & 3.65	36	4

[0176] 实施例4

[0177] 超声波可切换荧光团

[0178] 综述

[0179] 如下制备适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的一系列超声波可切换荧光团。所述荧光团包括温敏聚合物和在电磁波谱的红色/NIR部分中具有发射峰的荧光材料。具体来说,使用ADPDI羧基肉桂酸染料(ADPDICA)。在图13中说明ADPDICA的结构。一些荧光团具有来自上文实施例3的一般结构(1);其他荧光团具有来自实施例3的一般结构(2);以及其他荧光团具有来自实施例3的一般结构(3)。

[0180] 材料

[0181] N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、丙烯酰胺(AAm)、过硫酸铵(APS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、丙烯酸(AAc)、N-

叔丁基丙烯酰胺 (TBAm) 以及抗坏血酸和钠是从Sigma-Aldrich (圣路易斯市, 密苏里州, 美国) 购得。所有化学物品按原样使用, 而不需要进一步提纯。

[0182] 合成

[0183] 根据氮杂二吡咯甲川合成程序来制备ADPDICA, 所述程序描述于以下文献中: Bandi等, “Excitation-Wavelength-Dependent, Ultrafast Photoinduced Electron Transfer in Bisferrocene/BF₂-Chelated-Azadipyrrromethene/Fullerene Tetrads,” Chem. Eur. J. 2013, 19, 7221-7230, 以及Bandi等, “Self-Assembled via Metal-Ligand Coordination AzaBODIPY-Zinc Phthalocyanine and AzaBODIPY-Zinc Naphthalocyanine Conjugates: Synthesis, Structure, and Photoinduced Electron Transfer,” J. Phys. Chem. C 2013, 117, 5638-5649。简言之, 首先通过使对应的4-羟基苯甲醛、苯乙酮和氢氧化钾反应来制备3-(4-羟基苯基)-1-苯基丙-2-烯-1-酮。此物质随后与硝基甲烷和二乙胺在无水乙醇中反应以获得3-(4-羟基苯基)-4-硝基-1-苯基丁-1-酮。接下来, 通过在乙醇中与乙酸铵反应来合成4-{2-[3-(4-羟基苯基)-5-苯基-1H-吡咯亚氨基]-5-苯基-2H-吡咯-3-基}苯酚。随后, 通过在水CH₂Cl₂中使用二异丙基乙基胺和三氟化硼乙醚处理所述产物而由此产物形成BF₂-螯合4-{2-[3-(4-羟基苯基)-5-苯基-1H-吡咯-2基亚氨基]-5-苯基-2H-吡咯-3-基}苯酚。BF₂螯合的物质随后在存在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺 (EDCI) 的情况下与适当的苯甲酸反应, 随后进行色谱纯化。

[0184] 根据以上在实施例3中针对结构(1)描述的方案来制备具有一般结构(1)的荧光团, 不同之处在于将ADPDICA用作荧光物质。另外, 通过使用3.5kDa MWC0膜透析3天来执行纯化。温敏聚合物包括P(NIPAM-AH 200:1)、P(NIPAM-TBAm-AH 185:15:1)和P(NIPAM-AAm-AH 172:28:1)。因此, 形成具有一般结构(1)的以下荧光团: (a) P(NIPAM-AH 200:1)-ADPDICA, (b) P(NIPAM-TBAm-AH 185:15:1)-ADPDICA, 和 (c) P(NIPAM-AAm-AH 172:28:1)-ADPDICA。通过在ADPDICA的羧基与由聚合物的AH重复单元提供的胺基之间形成酰胺键来进行ADPDICA与温敏聚合物的缀合。

[0185] 根据以上在实施例3中针对结构(2)描述的方案来制备具有一般结构(2)的荧光团。具体来说, 所述方案对应于DBD-Sq660FRET系统的方案。以此方式形成的一个示例性荧光团是ADPDICA@P(NIPAM-AH 200:1)NP, 其中ADPDICA被囊封在NP内部。

[0186] 根据以上在实施例3中针对结构(3)描述的方案来制备具有一般结构(3)的荧光团。具体来说, 所述方案对应于DBD-Sq660FRET系统的方案。以此方式形成的一个示例性荧光团是P(NIPAM-AH 200:1)NP-ADPDICA, 其中ADPDICA附接到所述NP的表面。与结构(1)一样, 通过在ADPDICA的羧基与由聚合物的AH重复单元提供的胺基之间形成酰胺键来进行ADPDICA与温敏聚合物的缀合。

[0187] 荧光成像

[0188] 在两个不同的激发波长(λ_{ex} = 609nm或655nm)下且使用711nm/25nm带通发射滤波器来评估上文描述的荧光团的温度相依荧光性质。通过将荧光团安置在温度受到控制的水浴中来控制所述荧光团的温度。在表5和表6中提供结果。表5提供 λ_{ex} = 609nm的数据。表6提供 λ_{ex} = 655nm的数据。表5和表6中被标记为“ λ_{ex} ”的数据是指所使用的发射滤波器, 其中“lp”是指长通滤波器。

[0189] 表5

[0190]	荧光团	$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}} (\text{nm})$	$I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$	$T_{\text{th}} (^\circ\text{C})$	$T_{\text{BW}} (^\circ\text{C})$
	P(NIPAM-AH 200:1)-ADPDICA	609, 711/25	75.45	33	7
	P(NIPAM-TBAH-AH 185:15:1)-ADPDICA	609, 711/25	93.59	30	7
	P(NIPAM-AAH-AH 172:28:1)-ADPDICA	609, 711/25	188.94	42	7
	ADPDICA@P(NIPAM-AH 200:1) NP	609, 711/25	2.14	35	2
	P(NIPAM-AH 200:1)-NP-ADPDICA	609, 711/25	20.12	34	6

[0191] 表6

[0192]	荧光团	$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}} (\text{nm})$	$I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$	$T_{\text{th}} (^\circ\text{C})$	$T_{\text{BW}} (^\circ\text{C})$
	P(NIPAM-AH 200:1)-ADPDICA	655, 711/25	319.95	33	7
	P(NIPAM-TBAH-AH 185:15:1)-ADPDICA	655, 711/25	417.2	30	7
	P(NIPAM-AAH-AH 172:28:1)-ADPDICA	655, 711/25	274.46	42	7
	ADPDICA@P(NIPAM-AH 200:1) NP	655, 711/25	1.79	35	2
	P(NIPAM-AH 200:1)-NP-ADPDICA	655, 711/25	43.38	34	6

[0193] 实施例5

[0194] 使用微泡的成像方法

[0195] 如下执行根据本文所描述的一些实施方案的成像方法。首先,制备包括微泡的一系列荧光团。在一种情况下,所述荧光团包括Targestar-B微泡,所述Targestar-B微泡具有附着到所述微泡的外表面的多种FRET受体物质(或“荧光团”物质,简称为“F”)和多种FRET供体物质(或“淬灭剂”物质,简称为“Q”)。具体来说,经由生物素-链霉亲和素偶合在微泡表面上标记Alexa Fluor (AF) 546 (供体或F) 和AF 647 (受体或Q)。

[0196] 为了成像,在15MHz下调制激发光(532nm)的强度。个别F-Q微泡缓慢流过超声和光学透明的微管。使用中心频率为2.25MHz的具有三个循环的超声波猝发来使F-Q微泡膨胀。起初,来自AF 546的荧光信号由于从AF 546到AF 647的FRET能量转移而较弱。然而,由于微泡在由超声波猝发形成的负压力循环期间膨胀,所以可以通过超声波方式来开启来自AF 546的荧光发射($I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ 比率为大约5且 $\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$ 比率为大约5)。来自受体(AF 647)的发射显示互补行为。

[0197] 已发现,可以使用两个衍射极限超声波束来形成良好限定的超声负压力场以用于基于F-Q微泡的USF成像。通过两个聚焦的5MHz换能器来提供超声波束。每个束的聚焦的负压力区的横向大小的FWHM是大约450 μm 。主要通过换能器的衍射和数值孔径(NA)来确定此大小。焦点的轴向大小为大约380 μm 。主要确定换能器和超声波脉冲长度和频率来确定此大小(假定轴向分辨率是脉冲宽度乘以超声速度的至少一半)。当两个超声波脉冲垂直地传播且在共同焦点区域处彼此交叉时,通过对两个个别垂直场求和来获得干扰的压力场。以此方式,形成小负压力区,其中所述小区具有比用于形成所述区的任一束的焦点区域小的大

小。由两个束形成的主负压区 (MNPR) 的 FWHM 在横向方向上是大约 $165\mu\text{m}$, 这分别比个别超声波脉冲的横向和轴向分辨率窄大约 2.7 倍和 2.3 倍。在干扰场的轴向方向上发现类似的结果。

[0198] 当 MNPR 在空间上受到限时, 其还由于超声波脉冲的传播而在时间上受到限制。限定的 MNPR 的寿命是大约 $0.08\mu\text{s}$ – $24\mu\text{s}$ 。此时间周期长到足以准许使用 ps 光脉冲来照射周围组织以激发处于开启状态的荧光团。其还比激发光脉冲的宽度长得多, 其在深部组织中由于组织中的光散射而加宽为 1ns – 3ns 。因此, 在需要时, 可以在单个时间窗口中提供多个光脉冲。通过仅在此时间窗口内对组织进行光学照射 (即, 在时间上限定激发), 有可能避免由被个别超声波脉冲在形成 MNPR 之前和之后意外开启的荧光团产生的背景荧光噪声。因此, 仅当光学脉冲和超声波脉冲在空间上和时间上重叠时可以检测到 USF 荧光信号。

[0199] 另外, 已发现, 在一些实施方案中, 可以通过适当地选择压力阈值来使本文所描述的微泡振荡而进一步提高本文所描述的成像方法的空间分辨率。举例来说, 假定 100kPa 的负压压力阈值和每个个别超声波脉冲中低于此阈值的负峰值压力, 将在两个超声波脉冲重叠并形成 MNPR 时才开启荧光团。当使用上文描述的两个超声波脉冲来形成 MNPR 时, 干扰场的最大负压压力由于相长干扰而加倍 (200kPa)。仅其中压力高于 100kPa 的区内的 F-Q 微泡可以被开启。此区的总大小是大约 $165\mu\text{m}$, 且其 FWHM (空间分辨率) 是大约 $83\mu\text{m}$ 。然而, 可以通过进一步调整切换阈值 (例如, 100kPa) 与由每个个别超声波束提供的峰值负压压力之间的关系来获得甚至更小的激活区大小和甚至高分辨率的功率。当负压压力切换阈值增加 (变得更负) 时, 其中可以开启 F-Q 微泡的区的大小会减小, 且因此提高了空间分辨率。图 14 说明其中开启 F-Q 微泡的激活区的 FWHM 与所述微泡的阈值之间的关系, 其中将切换阈值表示为个别超声波束的最大负压力的百分比。当所述阈值高于最大负压力的大约 70% 时, 在 5MHz 和 10MHz 超声波频率下快速地提高了分辨率。举例来说, 当所述阈值是最大负压力的 90% 时, 空间分辨率在 10MHz 和 5MHz 超声波频率下分别可以达到 $14\mu\text{m}$ 和 $35\mu\text{m}$, 这与纯超声波横向和轴向分辨率 ($450\mu\text{m}$ 和 $380\mu\text{m}$) 相比得到了显著提高。

[0200] 一般来说, 空间分辨率的提高可能会伴有信噪比 (SNR) 的降低。此降低可能是由于激活区的更小的体积。在荧光团的给定浓度下, 可能在生物环境的更小体积中发现更少的荧光团。因此, 处于开启状态的更少的荧光团可以被激发, 且可以预期更弱的 USF 信号。当仅单个 F-Q 微泡位于图像体素 (例如, $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ 体素) 中时, 发生极端非零情况。通常, 可以基于与 $249\mu\text{M}$ 的体积浓度等效的微泡的体积 (使用泡的体积来计算所述浓度) 而使用 5×10^4 分子/平方微米来标记 $2\mu\text{m}$ 直径的微泡。如果将体积取作 $30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$ 体素, 那么此标记量等效于 36nM 的体积浓度。这些浓度远高于用于组织成像的大多数光学技术的检测极限 (fM–nM)。因此, 使用高度敏感的光学检测系统 (例如, 时间门控和/或光子计数系统) 可以基本上补偿由于小的激活区体积而引起的 SNR 中的任何损耗, 且有可能检测组织中的单个 F-Q 微泡。

[0201] 实施例 6

[0202] 超声波可切换荧光团

[0203] 适合于在根据本文所描述的一些实施方案的方法中使用的额外的超声波可切换荧光团包括以下各者。

[0204] F-Q-HJ 微泡

[0205] 为了在微泡的表面上的供体-受体对之间实施FRET,可以经由霍利迪接合(HJ)在微泡上标记供体和受体。图15示意性地说明此类微泡。两个交叉线表示HJ的两个臂,其由呈四通接点的形式的四个DNA双螺旋线组成。两个方块指示在两个臂的两端处标记的一对供体和受体物质(经由链霉亲和素-生物素偶合,或通过HJ的核酸与附接到供体和受体的NHS酯之间的反应)。水平定向的线指示HJ的其他两端附接在上面的微泡的壳体(经由生物素-链霉亲和素偶合或另一偶合方案)。当泡膨胀(受到挤压)时,距离 R_s 增加(减小)。这导致供体和受体(R_{DA})之间的距离的增加(减小),其中放大率为 (l_1/l_2) 并且伴随着供体的开启(关闭)。可以控制两个臂之间的初始角度(θ)。由于微泡的相对大的表面积,可以在单个微泡上标记众多F-Q-HJ而没有显著干扰。此设计可以使USF过渡带变窄,并且提高超声切换效率和SNR。

[0206] F-Q-发夹-NP微泡

[0207] 另一标记策略是在DNA发夹复合体上附接供体-受体对(参看图16和图17)。发夹复合体的一端经由生物素-链霉亲和素偶合而附接到微泡表面,且另一端经由地高辛-抗地高辛偶合而附接到小得多的金纳米颗粒(Au-NP,直径为数十nm)。F-Q(或D-A)标记的DNA发夹复合体由三个主要组分组成:(1)发夹分子(图16中的虚线区),(2)附接到供体和地高辛的寡核苷酸,和(3)附接到受体和生物素的寡核苷酸。不希望受理论束缚,可以如下描述开启供体的原理。超声压力波可以通过拉伸发夹分子来使微泡壁加速,且因此使Au纳米颗粒加速。加速的Au-NP向发夹分子施加相反的力。当此力足够大时,可以打开发夹环,进而增加供体-受体距离并且开启供体。可以使用大约18皮牛(pN)的力来打开发夹并且发动供体发射。当所述力减小到小于大约6pN时,发夹闭合且供体关闭。据估计,施加到直径为2 μ m的微泡且附接到直径为20nm的Au-NP的具有150kPa压力波的超声波脉冲可以产生大约20pN的力来拉伸发夹分子。因此,有可能靠超声开启荧光。

[0208] F-Q发夹微泡

[0209] 还有可能使用上文描述的DNA发夹分子取代以上F-Q-HJ微泡的霍利迪接点。其两端可以退火为两个互补的寡核苷酸。使用供体(例如AF 610)和生物素来标记一个寡核苷酸。类似地,另一寡核苷酸附接到受体(例如AF 647)和生物素。生物素末端可以附接到链霉亲和素标记的微泡。当DNA分子的长度短于其持续长度(通常大约50nm)时,DNA分子表现得像弹性杆一样。因此,两个臂自然拉伸并且附接到微泡表面。当暴露于超声波束在负压压力循环期间使微泡膨胀时,在发夹臂的两端上施加力,所述力可以打开发夹并且开启如上文描述的供体。

[0210] F-Q-DNA-NP微泡

[0211] 还有可能经由荧光标记的双股(ds)DNA分子使微泡与相对小的纳米颗粒(数十nm)附接。ds-DNA经由生物素-链霉亲和素蛋白偶合而附接到微泡表面。ds-DNA的另一端经由硫醇键结合而附接到金纳米颗粒(Au NP)。通常,ds-DNA是弯曲的,且由于ds-DNA和AuNP之间的静电吸引、疏水相互作用和离子-偶极分散相互作用而被平坦地吸附到AuNP的表面。由于Au NP与DNA分子之间的吸引,Au NP靠近在ds-DNA的一端上标记的荧光物质。AuNP的表面可以在相对长的距离(大约3nm-20nm)内淬灭荧光物质。当施加超声压力波以挤压微泡时,加速的微泡壁将通过拉伸ds-DNA分子来使Au NP加速。当微泡壁的加速度充分大(通过超声压力强度控制)时,由DNA与Au NP之间的静电吸引和其他相互作用产生力,Au NP无法经受

相同的加速度(由于AuNP的质量),从而导致荧光物质与Au NP表面分离且移除淬灭效应。

[0212] QD-温敏聚合物-受体荧光团

[0213] 另一基于FRET的荧光团使用半导体量子点(例如,CdSe量子点)作为供体且使用小分子染料作为受体。量子点使用由温敏聚合物形成的一个或多个连杆而附接到一种或多种受体染料。举例来说,发红光的量子点(Qdot®655,Invitrogen公司)被选为供体,且NIR染料(Alexa Fluor 750,Invitrogen公司)被选择为受体。多个受体(AF 750)经由温敏聚合物使用上文描述的偶合方案而附接在单个供体(Qdot®655)上。QD供体具有非常长的寿命(大约30ns)且受体AF 750具有非常短的寿命(大约0.7ns)。当 $T < LCST$ 时,温敏聚合物展现延长的线圈或链构象,这相对长。因此,供体与受体之间的距离一般比FRET淬灭范围($> 40nm$)更长。当HIFU换能器以上文描述的方式将温敏聚合物加热到其LCST以上时,所述聚合物转变为球状构象,进而减小供体-受体距离($< 20nm$)。因此,发生FRET能量转移。因此,供体(Qdot®655)的激发能量的部分转移到受体(AF 750),所述受体在NIR波长下发射光子。这些FRET相关的光子可以具有接近供体寿命和受体寿命中的较长者的寿命,所述寿命在此情况下是大约30ns。因此,可以容易使用本文所描述的时间门控检测技术以高SNR来检测所发射的NIR光子。可以使用长波通光学滤波器来消除对QD发射的检测。

[0214] 实施例7

[0215] 超声波可切换荧光团

[0216] 综述

[0217] 如下制备适合于在本文所描述的方法的一些实施方案中使用的一系列超声波可切换荧光团。将酞菁锌(ZnPC)衍生物囊封到Pluronic F-98胶束或P(NIPAM-TBA)纳米颗粒(NP)中,以作为根据本文所描述的一些实施方案的成像方法的造影剂。

[0218] 材料

[0219] 酞菁锌(ZnPC)、2,9,16,23-四叔丁基-29H,31H-酞菁锌(ZnPCTTB)、1,4,8,11,15,18,22,25-八丁氧基-29H,31H-酞菁锌(ZnPCOB)、1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-十六氟-29H,31H-酞菁锌(ZnPCHF)、2,3,9,10,16,17,23,24-八(辛氧基)-29H,31H-酞菁锌(ZnPCOO)以及2,11,20,29-四叔丁基-2,3-萘酞菁锌(ZnTTBNPC)是从Sigma-Aldrich(圣路易斯市,密苏里州,美国)购得。在图18A和图18B中示出这些ZnPC衍生物的化学结构。还使用四丁基碘化铵(TBAI)(Sigma-Aldrich)、Pluronic F-98(BASF,Florham Park,新泽西州,美国)、NIPAM、TBA、BIS、4,4'-偶氮二(4-氰戊酸)(ACA)和SDS。

[0220] ZnPC囊封型Pluronic F-98胶束的合成

[0221] 在超声波处理下通过添加四丁基碘化铵而将ZnPC溶解于氯仿中持续30分钟。同时,Pluronic F-98以50mg/mL的浓度溶解于去离子(DI)水(pH 8.5)中。将ZnPC氯仿溶液在剧烈搅拌(500rpm)下逐滴地添加到Pluronic F-98水溶液中。进一步以40W的超声探针(Qsonica)将所得的乳液分散4分钟(在每运行1分钟之后有30秒的脉冲)。氯仿在通风柜中蒸发过夜。获得澄清溶液,随后使用0.45 μm 膜进行过滤。

[0222] ZnPC囊封型P(NIPAM-TBA)NP的合成

[0223] 在250mLSchlenk管中,用50mL的DI水(pH 10.5)溶解1.3644g NIPAM、0.1247g TBA、0.0131g BIS、0.070g ACA和0.0219g SDS的混合物,随后用氮气吹扫10分钟。将ZnPC

DMSO溶液 (2mL) 添加到管, 随后将所述管放置在真空下, 且随后使用氮气吹扫。将泵送/吹扫程序重复三次, 以便在管内部提供氮气气氛。在70℃下执行反应过夜。随后通过松开阀门以使所述环境暴露于空气来停止所述反应。使用10kDa分子量截止膜相对于DI水将所述样本透析3天, 以移除多余的表面活性剂和未反应的材料。

[0224] ZnPC囊封型Pluronic F-98胶束的荧光响应

[0225] 在 $\lambda_{\text{ex}}=609\text{nm}$ 的激发波长下且使用711nm/25nm带通发射滤波器 (除了具有更长的发射峰值波长的ZnTTBPC之外, 对其使用765nm/62nm的带通滤波器) 来评估上文描述的荧光团的温度相依荧光性质。在表7和图19A至图19F中提供结果。

[0226] 表7

荧光团	$\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}} (\text{nm})$	$I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$	$\tau_{\text{on}}/\tau_{\text{off}}$	$T_{\text{th}} (^\circ\text{C})$	$T_{\text{BW}} (^\circ\text{C})$
ZnPC	609, 711/25	313.94	1.54	20.3	11.9
ZnPC(TTB)	609, 711/25	1450.50	1.87	16.3	11.2
ZnPC(OB)*	609, 711/25	1.32*	<1*	*	*
ZnPC(HF)	609, 711/25	2.71	4.24	28.1	10.2
ZnPC(OO)	609, 711/25	35.80	2.02	23.1	11.6
ZnNPC(TTB)	609, 785/62	13.01	1.79	258	9.4

[0228] *不稳定。

[0229] ZnPC囊封型P (NIPAM-TBAI) NP的荧光响应

[0230] 在图20A和图20B中示出ZnPC囊封型P (NIPAM-TBAI) NP的荧光强度。对于含有ZnPC和P (NIPAM-TBAI) 的NP, $I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$ 比率是大约1.8。囊封在NP内部的处于关闭状态的染料 (A) 的荧光寿命 ($T < \text{LCST}$) 是大约3ns (图20A)

[0231] 实施例8

[0232] 超声波可切换荧光团

[0233] 综述

[0234] 如下制备根据本文所描述的一些实施方案的一系列超声波可切换荧光团。具体来说, 使用两种NIR染料来制备荧光团: 胞苷-氟硼荧衍生物和酞菁锌 (ZnPC) 衍生物。使用Pluronic F-127、Pluronic F-98的温敏聚合物以及它们与PEG的共聚物来合成具有不同开启阈值的染料的纳米胶囊。纳米胶囊的直径在大约20nm与大约70nm之间, 这是基于透射电子显微镜 (TEM) 的测量。通过以上两种染料, 使用ADPDICA和ZnPC (TTB) 形成荧光团。在表8中概括这些荧光团的切换性质。

[0235] 材料

[0236] 根据Bandi等中描述的与以上实施例4一致的技术来合成ADPDICA。在图13中提供ADPDICA的化学结构。ZnPC (TTB) 是从Sigma-Aldrich (圣路易斯市, 密苏里州, 美国) 购得。在图18A中提供ZnPC (TTB) 的化学结构。Pluronic F-127和F-98是从BASF (弗洛勒姆帕克市, 新泽西州, 美国) 购得。甲氧基PEG羧酸产物 ($\text{MW}=20,000\text{g/mol}$ 、 $30,000\text{g/mol}$ 和 $40,000\text{g/mol}$) 是从Nanocs公司 (纽约, 纽约州, 美国) 购得。所有化学物品直接使用, 而不需要进一步提纯。还使用TBAI。

[0237] 合成

[0238] Pluronic F-127或F-98 (取决于所要的制备) 溶解于DI水中 (pH 8)。染料/TBAI (摩

尔比率=1/6) 溶解于氯仿中,且保持超声波处理30分钟。染料/TBAI氯仿溶液在溶液被搅拌的同时逐滴地添加到Pluronic水溶液中。进一步使用在20W下操作的超声发生器(Qsonica, LLC., 纽敦市, 康涅狄格州, 美国) 将所述溶液分散4分钟,且所得的溶液在通风柜下方保持搅拌,直到氯仿完全蒸发为止。通过1.2 μ m膜 (Fisher Scientific, 匹兹堡市, 宾夕法尼亚州, 美国) 和Amicon Ultra离心式过滤器 (10,000分子量截留, Millipore, 比乐利卡市, 马萨诸塞州, 美国) 来过滤所得的澄清溶液。

[0239] 荧光团的特征

[0240] 根据上文在实施例1和实施例2中描述的系统来测量荧光团的光学切换性质。在表8中提供结果。

[0241] 表8

[0242]	荧光团+	胶束	$\lambda_{ex}, \lambda_{em}$ (nm)	I_{on}/I_{off}	T_{th} (°C)	T_{BW} (°C)
	ADPDICA	F-127	655, 711/25	230.4	18.5	7.6
		F-98	655, 711/25	268.6	30.5	4.9
		F-98-PEG20K	655, 711/25	272.1	35.5	14.7
		F-98-PEG30K	655, 711/25	203.8	40.7	15.0
		F-98-PEG40K	655, 711/25	214.8	35.6	15.1
	ZnPC(TTB)	F-127	655, 711/25	209	18.5	7.6

[0243] 实施例9

[0244] USF成像系统

[0245] 提供适合于在本文所描述的成像方法的一些实施方案中使用的USF成像系统。具体来说,已经测试了以下三个USF成像系统:(1) 连续波(CW) 模式系统,(2) 频域(FD) 模式系统,和(3) 时域(TD) 模式系统。在图21A至图21G中示出这些系统的系统配置和时间序列。

[0246] 在CW模式系统下,被成像的环境(例如生物组织)在短时间周期内(毫秒级)连续地暴露于HIFU。在HIFU暴露之前或期间激活或接通激发激光,从而产生USF信号。随后计算每个位置处的USF信号的荧光强度(参看图21A和图21B)。

[0247] 在FD模式系统下,在短暂周期内使用预定频率来调制HIFU暴露。另外,USF信号具有与已调制的HIFU频率相同的频率。通过使用锁定放大器,可以以非常高的灵敏度检测到已调制的USF信号(图21C至图21E)。另外,还可以将激光照射调制到相对高频率,例如从kHz调制到MHz,同时超声波信号以CW模式操作(图21C至图21E)。因此,可以使用锁定放大器来检测由超声导致的荧光信号变化。另外,使用锁定放大器可以准许系统对USF信号的高灵敏度。

[0248] 在TD模式系统下,HIFU暴露在短时间周期内(毫秒级)是连续的,且激光照射皮秒脉冲,以恰好在HIFU加热已经结束之后激发USF造影剂。因此,所发射的USF信号由于开启的荧光团的长荧光寿命而变为具有数十纳秒级的宽度的脉冲(图21F和图21G)。相比而言,背景噪声由于荧光背景物质的短荧光寿命而衰减得快得多。因此,通过寿命门控检测技术,可以通过获取信号的仅尾部而使USF信号在时间上与背景噪声分开。因此,经由特定其他方法/系统来显著增加灵敏度和信噪比。

[0249] 另外,应注意,为了避免加热周期中的显著热扩散,HIFU暴露时间可能受限于毫

秒,这是比热扩散时间常数短得多的持续时间。

[0250] 实施例10

[0251] 提供提高的SNR的成像方法

[0252] 如下执行根据本文所描述的一些实施方案的成像方法。首先,根据以上实施例7制备一系列超声波可切换荧光团。所述荧光团包括(1)包括囊封在由Pluronic F127聚合物形成的纳米胶囊或胶束中的ADPDICA的荧光团,和(2)包括囊封在PNIPAM纳米颗粒中的ICG的荧光团。以与在以上实施例7和实施例8中所描述的方式类似的方式来制备这些荧光团。两个不同荧光团的峰值发射波长分别是大约710nm和810nm。另外,这些荧光团的USF信号的动态行为彼此不同,且还不同于噪声,如图22中说明。具体来说,图22A示出含有ADPDICA的荧光团的USF信号的时间衰减曲线。图22B示出使用含有ADPDICA的荧光团的成像实验的背景或噪声信号的时间衰减曲线。类似地,图22E示出含有ICG的荧光团的USF信号的时间衰减曲线。图22F示出使用含有ICG的荧光团的成像实验的背景或噪声信号的时间衰减曲线。不希望受理论束缚,相信两个荧光团的不同时间衰减曲线是由于以下各者中的一者或多者(1)荧光染料的不同环境灵敏度;(2)荧光团的不同结构(例如,胶束相对于纳米颗粒);以及(3)用于形成荧光团的不同温敏聚合物。不同超声波可切换荧光团的不同发射曲线可以准许多路复用的USF成像。

[0253] 具体来说,应注意,在图22A和图22E中示出的荧光团的发射曲线在给定实验条件(例如,上文描述的条件)下具有唯一和一致的形状。应进一步注意,一旦仪器和实验条件是固定的,给定荧光团的USF动态曲线的形状不会变且独立于信号强度。每个信号的强度在固定时间点增加到峰值,且随后衰减或强度减小。相比而言,背景信号(图22B和图22F)不规则地波动,且不展现与其他噪声信号的任何相关。更重要的是,背景信号不展现与超声波荧光信号展现的时间衰减曲线相同的时间衰减曲线。因此,背景信号在数学上不与超声波荧光信号有很强的相关。不希望受理论束缚,相信不同的时间衰减曲线允许将任何USF信号选择为参考信号,以用于执行对在环境内的特定位置处检测到的总光致发光信号的相关分析。当执行相关时,可以计算相关系数(CrC)。已经发现,当执行此类分析时,USF相关的信号具有大CrC,而背景信号具有小CrC,因此,通过适当地选择CrC阈值,可以使用CrC将USF信号与背景噪声区分开来,如上文进一步描述。

[0254] 在一色USF成像中,使用上文描述的荧光团的水溶液填充小硅胶管(内径:0.31mm;外径:0.64mm),且将所述硅胶管嵌入到一块猪肌肉组织中。此结构既定模拟作为USF成像实验的目标的血管。所述组织的厚度是大约12mm。从管中心到组织的顶表面的距离是大约6mm。使用聚焦超声波束在外部和局部将所述管内的荧光团从关闭状态切换为开启状态,如上文进一步描述。通过冷却型和低噪声PMT收集所发射的荧光光子。在使用超声波束对样本进行光栅扫描之后,以上文描述的方式产生USF图像。具体来说,对于样本内的多个位置中的每一者,执行相关分析将总检测到的光致发光信号与参考信号进行比较。在此情况下,从USF图像中选择典型的USF信号来用作参考信号。根据以上等式(1)计算相关系数。因为背景信号不遵循参考信号的独特动态图案,如图22中所示,所以背景信号的相关系数为零、接近零或非常小(例如 <0.3)。以此方式,可以通过使包括背景信号的检测到的信号与和环境内的相关位置的背景信号相关联的相关系数相乘来显著抑制噪声。

[0255] 以此方式,显著地增加USF图像的SNR。在图22和图23中示出在相关处理之前和之

后的USF图像。具体来说,图22C/图23C以及图22D/图23D分别说明在相关/相乘过程之前和之后的基于ADPDICA的荧光团的空间荧光发射曲线。将那两个曲线的SNR分别计算为88和300。类似地,在图22G/图23A以及图22H/图23B中分别说明在相关分析之前和之后的基于ICG的荧光团的空间荧光发射曲线。对于基于ICG的荧光团,SNR在相关之前和之后分别是31和345。

[0256] 实施例11

[0257] 多路复用成像的方法

[0258] 如下执行根据本文所描述的一个实施方案的多路复用成像的方法。首先,如上文在实施例10中所描述来制备含有ADPDICA和含有ICG的超声波可切换荧光团。接下来,使用与上文在实施例2中描述的成像系统类似的成像系统将前述荧光团成像。激发光源是具有671nm的激发波长的二极管激光器(MLL-FN-671)。将一个673/11带通滤波器(中心波长:673nm;带宽:11nm)应用为激发滤波器,且将三个长通滤波器(边缘波长:715nm)和两个长波通吸收滤波器(边缘波长:690nm)用作发射滤波器。

[0259] 对于二色USF成像,将小管(内径:0.31mm;外径:0.64mm)嵌入到分散的硅胶假体中。分散材料是TiO₂。所述假体的厚度是大约12mm。所述管填充有350μL的基于ADPDICA的荧光团的水溶液和250μL的基于ICG的荧光团的水溶液的混合物。两种溶液每溶液体积含有相同重量的荧光团。使用聚焦超声波束在外部和在局部开启和关闭所述管内的荧光团。通过冷却型和低噪声PMT收集所发射的光子。在使用超声波束进行光栅扫描之后,以上文描述的方式获得USF图像。

[0260] 具体来说,将检测到的光致发光信号正交分解为与基于ADPDICA的荧光团的归一化超声波荧光信号相对应的第一基向量,和与基于ICG的荧光团的归一化超声波信号相对应的第二基向量。因此,对于环境内的特定位置,可以根据等式(2)表示总检测到的光致发光信号:

$$[0261] \quad \overrightarrow{\text{混合物}} = a \times \overrightarrow{\text{ADPDICA}} + b \times \overrightarrow{\text{ICG}} \quad (2),$$

[0262] 其中“混合物”表示总光致发光信号(表示为向量),“ADPDICA”表示与基于ADPDICA的荧光团相对应的基向量,“ICG”表示与基于ICG的荧光团相对应的基向量,且a和b是基向量的系数。图24说明一个特定位置的与等式(2)相对应的信号。具体来说,图24A说明基于ADPDICA的荧光团的分量信号,图24B说明基于ICG的荧光团的分量信号,且图24C说明总检测到的光致发光信号。在MATLAB中使用曲线拟合算法,在样本内的一个位置的95%置信度内,将基向量系数a确定为3.9,且将基向量系数b确定为2.6。a与b的比率(3.9/2.6=1.5)接近混合物的组成(350/250=1.4)。

[0263] 实施例12

[0264] 使用多个超声换能器的成像方法

[0265] 如下执行根据本文所描述的一个实施方案的使用多个超声换能器的成像方法。除了使用多个超声换能器之外,以下方法还包括使用USF成像和超声(US)成像的组合的双模态成像。

[0266] 使用在图25中说明的USF成像系统来执行所述方法。在图25中说明的框图中,MT是用于发送0.1Hz的频率的主触发(T-1)的脉冲延迟产生器。FG-1是用于分别门控(单个循环,

具有0.5毫秒延迟的脉冲信号)和多触发(1KHz,300个循环,脉冲信号)双HIFU换能器模块(双9MHz-HIFU)和超声换能器(UST)模块的函数发生器。FG-2是用于使用9MHz正弦信号通过功率放大器(RFA-1和RFA-2)分别驱动双HIFU(HIFU-1和HIFU-2)中的每一者的函数发生器。脉冲T/R是用于驱动UST的脉冲传输器和接收器。FG-3是在1KHz频率下调制激发激光源(激光器)的函数发生器。W是用于沉浸双HIFU-UST模块且部分地沉浸样本(S)的水槽。ST是内径(ID)为0.31mm且外径(OD)为0.64mm的硅胶管。3D-TS是三维(3D)平移平台。TS-MCU是3D平移平台机动控制单元。CT-1是用于将激发激光源聚焦到光纤束(OB-1)中的准直管。CT-2是用于从样本(S)内导引来自光纤束(OB-2)的收集的荧光信号的优化的准直管。PMT是用于检测光学荧光信号的光电倍增管。前置放大器是用于对来自PMT的检测到的光学信号进行滤波的前置放大器。LIA是用于检测来自检测到的光学信号的1KHz频率信号的锁定放大器。NI-DAQ是用于记录光学信号的National Instrument数据采集模块。数字化仪是用于记录超声波信号的National Instrument数据采集模块。CB-1是用于传递超声波信号数据的通信总线。CB-2是用于控制TS-MCU的串行通信总线。CB-3是用于传递光学信号数据的通信总线。T-2是具有1KHz频率的脉冲信号且用作LIA的参考信号。T-3是用于触发3D-TS的运动的单循环数字脉冲信号。

[0267] 更一般来说,可以将在图25中所描绘的系统划分为四个模块。所述模块包括:(1)源模块,(2)样本模型模块,(3)检测模块,和(4)平移模块。在下文更详细地描述这些模块中的每一者。

[0268] 源模块

[0269] 可以将源模块进一步划分为三个子模块:(1)超声模块,(2)双高强度聚焦超声模块,和(3)激发激光器模块。在下文进一步描述这些子模块中的每一者。

[0270] 超声模块

[0271] 超声模块用于在扫描期间获取每个位置处的A线,其中扫描可以沿着任何所要的线、平面或3D平面,且使用平移模块来调节。为了实现超声的高分辨率成像,采用10MHz(10MHz,V315,Olympus,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)频率聚焦超声换能器(UST)。此处,出于设计简单起见,选择单元件超声换能器。然而,在需要时,可以通过超声换能器阵列来取代所述单元件超声换能器,其中可以进行电子聚焦以用于多深度扇形成像并且实现更精细的分辨率。UST的焦距是大约34mm(大约1.34英寸)且直径是19mm(大约0.75英寸)。采用脉冲回波方法来用于超声成像且因此由脉冲产生器/接收器(5077RP,Olympus NDT,沃尔瑟姆市马萨诸塞州,美国)驱动,所述脉冲产生器/接收器是由2通道函数发生器(FG-1,AFG 3252,Tektronix,德克萨斯州,美国)的第一通道触发。采用通过在每个扫描位置处来自FG-1的通道1的每个猝发中的多个脉冲循环而实现的多个触发以通过求平均来减少噪声(在此实施例的数据处理部分论述进一步的细节)。

[0272] 双高强度聚焦超声模块

[0273] 对于双高强度聚焦超声模块,将2通道函数发生器(FG-1)的第二通道用作第二函数发生器(FG-2)的门控触发,所述第二函数发生器驱动自定义的双高强度聚焦超声(双HIFU)换能器(HIFU,SU-109,Sonic Concepts Ltd,巴索市,华盛顿州,美国)。双HIFU换能器被设计成使得两个9MHz频率HIFU换能器(直径=23mm,且焦距=35mm)被安装成与其基座成大约45度,彼此成90度、彼此相向且相隔大约5cm。双HIFU之间的间隔区域被设计成具有完

全中空圆形间隙。此间隙具有31.75mm的直径且被定制成具有足够的空间来布置直径为2cm的超声换能器,进而在任一侧上具有大约0.5cm的移动自由度。在双HIFU的初步测试期间,已观察到HIFU的性能规格略有变化。因此,为了在它们的相应HIFU焦点处实现大约相同的峰值压力,在不同电压下驱动所述两个HIFU。使用来自2通道函数发生器(FG-2,Agilent 33500B,芝加哥市,伊利诺伊州,美国)的具有相应振幅(电压峰值-峰值, V_{pp})的正弦信号来驱动双HIFU。所述2通道中的每一者连接到它们的专用的功率放大器以个别地在双HIFU设置中驱动它们的相应的9MHz HIFU换能器。因此,放大的驱动功率在它们的相应焦点处产生更高的峰值压力。以此方式,双HIFU-UST单元经过分组且被布置成面向上(垂直于光学台),其中UST布置在自定义设计的双HIFU的中间,从而面向所要的样本或组织。将经过分组的单元安装到3维平移平台系统(3D-TS,VXM电机驱动的X-Slide组合件,Velmex,纽约州,美国)上,以用于使用自定义编程的MATLAB GUI进行所要的线、平面或3维扫描。来自FG-1的第二通道的门控信号的持续时间控制HIFU暴露的持续时间,所述持续时间与来自FG-2的所要的驱动电压组合会提供用于控制被研究的样本或组织内的超声引发的温度变化的间接方法。

[0274] 脉冲延迟产生器用作0.1Hz频率下的主触发器,所述主触发器会触发函数发生器(FG-1)和数据采集卡(NI-DAQ卡,PCIE-6363,National Instruments,达拉斯市,德克萨斯州,美国),进而控制双HIFU和UST操作以及扫描和采集时序。针对函数发生器FG-1的第二通道设定与其第一通道的即时触发相比的0.5秒延迟,以提供完成超声成像的足够时间。这确保9MHz HIFU信号不会被10MHz UST拾取,因为它们的频率彼此接近。

[0275] 激发激光器模块

[0276] 激发激光器模块是第三子模块。其包括连续波激光以作为荧光团激发源。所述激发源用于通过光纤束(OB-1&OB-2,型号#39366,Edmund optics,巴林顿市,新泽西州,美国)来照射被研究的所要样本或组织。这通过使用808nm(MGL-II-808-2W,Dragon lasers,JL,中国)或671nm(MLL-FN-671-500mW,Optoengine LLC,米德瓦尔市,犹他州,美国)来实现,其取决于用于研究的染料/造影溶液。在808nm激光源的情况下,此激光的束曲线是矩形。对其采用以下简单布置:让平凸NIR透镜(L1&L2,型号#AC254-035-B,Thorlabs,纽敦市,新泽西州,美国)将矩形束聚焦到光纤束(OB-1,型号#39366)的一端上。对于另一激光(671nm CW激光),不需要透镜,因为束曲线横截面与光纤束的开放端相当。在两个布置中,将滤波器置于激光器头部的前方以限制激发波长范围,其中分别采用785/62nm(FF01-785/62-25,Semrock,罗切斯特市,纽约州,美国)和671/11nm(FF01-673/11-25,Semrock,罗切斯特市,纽约州,美国)。光纤束的另一端布置成使得退出的激光照射水下的组织的同一侧,其中超声单元如图25中所描绘进行聚焦。将光纤束布置在与样本相距可接受距离处并且与光学台成大约45度以及退出的发散的激光照射会确保对多于被研究的样本/组织的所要区的均匀照射。使用函数发生器(FG-3,33220A,Agilent,芝加哥市,伊利诺伊州,美国)以1KHz频率驱动激光器,这是因为为此研究选择了频率相依荧光成像。FG-3函数发生器的触发输出用作锁定放大器的参考输入,使得仅可以观测和记录1KHz的光学信号,进而增加系统对所要光学信号的灵敏度。

[0277] 样本模块

[0278] 样本模块是由样本或组织制备以及染料/造影剂制备组成。在图26中说明相对于双HIFU-US模块的样本制备,所述图说明实验框图的微型版本,强调了超声和样本模块设

置。输入-1:双HIFU换能器(9MHz HIFU,双:HIFU-1和HIFU-2)的驱动信号;输入-2:超声换能器(UST)的驱动信号;UST:10MHz超声换能器;ST:嵌入样本(S)中的硅胶管,其中1、2和3分别表示管1、管2和管3;3D-TS:三维平移平台;W:用于沉浸所述双HIFU-UST模块的水槽。

[0279] 被研究的猪组织样本含有三根硅胶管(60-011-01, Hellix Medical, 卡宾特里拉市, 加利福尼亚州, 美国), 其沿着深度在与组织样本的大面的任一侧相距大约5mm-6mm处嵌入。任何两根硅胶管之间的横向距离在组织内是相隔2mm左右。双HIFU聚焦于管2, 且相对于此位置完成扫描。在扫描之前, 测量并记录管2相对于US焦点和双HIFU焦点的位置。需要在双模态MATLAB处理的重叠操作中考虑US焦点与双HIFU焦点之间的管2的2D位置的此失配。管1含有纯ADP染料溶液, 管2是由ICG:ADP(3:2)比率溶液组成, 且管3是由ICG染料溶液组成。所有溶液是使用它们的相应注射器以非常慢的注射速率冲洗, 其中流动速率是大约每小时0.1英寸。

[0280] USF造影剂材料和合成

[0281] 材料:N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)、N-叔丁基丙烯酰胺(TBAI)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、四丁基碘化铵(TBAI)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和ICG是从Sigma-Aldrich(圣路易斯市, 密苏里州, 美国)购得。Pluronic F98是从BASF(弗洛勒姆帕克市, 新泽西州, 美国)获得。所有化学物品按原样使用。

[0282] USF造影剂的合成

[0283] (1) ICG NP。如上文描述来合成ICG囊封型PNIPAM NP。(2) ADP(OH)₂(底部)纳米胶囊。如先前描述来制备这些纳米胶囊。简言之, Pluronic F98以50mg/mL的浓度溶解于去离子水中。染料/TBAI(摩尔比率=1:6)溶解于氯仿中和保持超声波处理30分钟。随后在搅拌下将染料溶液滴到Pluronic水溶液中, 且随后使用超声发生器分散4分钟。氯仿蒸发掉以将染料囊封到Pluronic纳米胶囊的疏水核心中。使用Amicon Ultra离心式过滤器(10000分子量截留, Millipore, 比乐利卡市, 马萨诸塞州, 美国)来移除自由染料。

[0284] 检测模块

[0285] 将检测模块划分为三个子模块:(1)准直管滤波器设定模块,(2)光学传感器模块, 和(3)后光学传感器硬件模块。

[0286] (1)在图27中说明准直管(CT-2)的框图。在图27中,L1:近红外(NIR)平凸透镜以使来自OB-2(光纤束)的光学荧光信号通过;LP1&LP2:长波通光学滤波器715LP和830LP, 分别用于ADP和ICG溶液;RG1&RG2:吸收滤波器RG680和RG808, 分别用于ADP和ICG;IR-1:用于控制准直光学信号到PMT的通过或拒斥的光圈;IR-2:固定开放光圈, 其充当PMT前方的销孔。已经惊喜地发现, 可以使用自定义构建的滤镜布置来实现意外良好的结果, 所述滤镜布置被布置成使光学泄漏信号最小化并且使较长光学波长(比激发波长更长)检测效率最大化。出于方便起见, 此滤镜布置被称为准直管(CT)布置。光学纤维束在暴露于空气的猪组织的侧面上垂直地紧密接近地布置。这确保通过光纤束的开放端收集大多数荧光信号以及主要是泄漏的背景光学信号, 这是因为其接受角度是大约60度。这个光纤束的光纤束(OB-1)的另一端(被称为准直管的样本侧)固定于NIR平凸透镜(L1)的焦点处, 使得使来自光纤束的分散的光学信号并行或准直。另一平凸透镜(L2)布置成与在相反的方向上面向的准直管的样本端相距大约40cm, 使得将并行光学束聚焦到冷却型PMT(H7422-20, 布里奇沃特市, 新泽

西州,美国)的开放传感器端上。准直管的此端被称为准直管的PMT侧。此处,准直管具有三个区段:样本端滤波器组、中间滤波器组和快门。样本端滤波器是长通滤波器(LP1)。对于ADP染料,使用715nm长波通(FF01-715/LP-25, Semrock, 罗切斯特市, 纽约州, 美国), 且对于ICG染料, 使用830nm长波通(BLP01-830R-25, Semrock, 罗切斯特市, 纽约州, 美国)。将LP1恰好安装在样本端透镜(L1)之后。中间滤波器组布置在准直管的中心, 并且由三个滤波器组成, 其中一个长通滤波器(LP2, 与LP1相同)布置在两个吸收滤波器(RG1和RG2)之间。将零孔径光圈(SM1D12SZ, Thorlabs, 纽敦市, 新泽西州, 美国)用作快门, 并且放置在L1透镜与L2透镜之间的大约三分之二距离处(从样本端测量)。通过调整/改变光圈孔径, 可以完全允许或阻碍光学信号。所有三个区段与样本侧透镜(L1)和PMT侧透镜(L2)通过管镜进行连接, 使得完全拒斥外来的和不相关的光学信号。因此, 从准直管的PMT侧出现的光学信号是来自造影剂的经过滤的荧光信号, 其中激发激光源和非所要的外围光学信号有最小泄漏。如上所述, 已经惊喜地发现, 可以使用自定义构建的滤镜布置(例如, 上文描述的布置)来实现意外良好的结果。具体来说, 已经发现使用具有本文所描述的结构准直管来检测光致发光信号可以提供提高的SNR。具体来说, 使用具有第一或近端准直透镜(L1)、第二或远端准直透镜(L2)和安置在所述第一和第二准直透镜之间的一个或多个滤波器的准直管可为有利的, 其中第一准直透镜与滤波器和/或与第二准直透镜相隔大于10cm或大于20cm的距离, 例如25cm-50cm、25cm-40cm或30cm-40cm的距离。

[0287] (2) 冷却型光电倍增管用作具有内部高电压电力供应的光学传感器。此光学传感器的所要特征在于, 其光谱响应在减小的热噪声变化下在300nm到890nm的范围内, 并且具有高信号-噪声(SNR)比率, 甚至对于极低的光学信号也如此。光圈在平凸透镜(L2)的焦距处置于冷却型PMT传感器的前方, 并且被锁定到1mm(大约20%)直径开口, 所述开口充当用于拒斥非必需的光学信号的销孔布置。

[0288] (3) 后光学传感器硬件模块是由低噪声电流前置放大器(PreAmp, SR570, Stanford Research, 森尼维耳市, 加利福尼亚州, 美国)和锁定放大器(LIA, SR830, Stanford Research, 森尼维耳市, 加利福尼亚州, 美国)组成。电流前置放大器将来自冷却型PMT的电流输出转换为电压输出, 同时应用硬件滤波(其中截留大约6dB或12dB)和用户界定(所要)的灵敏度。将灵敏度设定为50nA/V以准许1KHz频率的光学信号无障碍地通过, 因为激发源是在1KHz下调制的。可以设定10KHz的低通(具有12dB)或3Hz-10KHz(具有6dB)的带通以滤除任何非必需的光学信号。将前置放大器的经过滤的光学信号输出供应给锁定放大器以作为输入(待处理), 且从来自函数发生器(FG-3)的同步输出获得/供应参考信号, 所述函数发生器用于以1KHz频率调制激发激光。锁定放大器的输出是由仅具有优选/所要的1KHz频率(因为1KHz是作为参考信号给予LIA)的那个光学信号相对于时间的振幅和相位数据/信息组成。通过LIA输出的两个参数设定(时间常数和灵敏度)来确定LIA输出。将时间常数设定为300毫秒(对于 $f=1\text{KHz}$, 大于 $1/2\pi f \cdot 0.159$ 毫秒)从而确保LIA相对于时间的较慢的累积响应。灵敏度在20mV到500mV之间变化, 这取决于作为染料溶液对被研究的组织/样本内的局部温度变化的荧光响应的导数的信号强度。

[0289] 平移模块

[0290] 三个Velmex线性平移机动平台被布置成具有对设计系统的3D扫描能力(3D-TS)。3D-TS连接到计算机且使用自定义构建GUIMATLAB接口来控制。GUI经编程以控制3D-TS模块

的各个方面,例如步长大小、加速度、扫描速度、扫描平面、扫描平面内的扫描位置的数目等。扫描计划包括沿着所有方向(x、y和z方向)的1D、2D和3D平面扫描能力。将双HIFU-UST模块安装到此3D-TS模块上以执行对组织样本内的目标的扫描。当执行扫描时,样本平台的所有其他组分是相对固定的。

[0291] 实验

[0292] 依据激发激光波长和它们的相应滤波器组将实验划分为两组扫描,以最小化或排斥泄漏波长,所述泄漏波长与和目标(硅胶管)一起使用的染料溶液相依。管被编号为1到3。管1含有ADP且管3含有ICG染料溶液。管2含有处于3:2比率的ICG和ADP的混合物。HIFU-US模块应布置成垂直于考虑中的样本。由于US换能器相对于双HIFU模块的物理限制调整,US的焦点和USF交叉焦斑沿着深度和侧部相隔大约1.5mm乘0.2mm。将双HIFU-US模块调整为使得双HIFU的交叉焦斑聚焦于作为样本的中心的管2。

[0293] 实验操作时序

[0294] 使用脉冲延迟产生器(DG645,Stanford Research,森尼维耳市,加利福尼亚州,美国)的主触发器(MT)用于触发函数发生器(FG-1)和数据采集卡(NI-DAQ)。主触发器起始函数发生器FG-1的两个通道以发送出它们的相应门控脉冲串。将FG-1的通道1设定为每个触发具有8-16个脉冲的1KHz脉冲串。1KHz脉冲串的每个脉冲充当对脉冲产生器/接收器(pulsar,5077PR,Olympus,沃尔瑟姆市,马萨诸塞州,美国)的外部触发,以实施用于超声采集的脉冲-回波方法。因为超声波脉冲-回波的采集速度和数据传递一起占了大约数十毫秒,所以1KHz脉冲频率(在脉冲之间大约1毫秒)足以采集和记录超声A线数据。使用由pulsar触发的数字化仪(NI-USB 5133,National Instruments,达拉斯市,德克萨斯州,美国)记录通过pulsar接收的超声波信号(A线),且每个触发的多个脉冲记录单个扫描位置处的多条A线。处理对这些A线求平均,进而减少噪声,且作为矩阵文件存储在计算机中用于每个扫描位置的所要位置。另一方面,FG-1函数发生器的通道2用于对函数发生器FG-2进行门控,所述函数发生器用于驱动双HIFU。使用500毫秒的延迟设定通道2,以为完成US采集给予足够时间。通过使用FG-1来控制通道2脉冲宽度的持续时间和每个触发的脉冲数目,结合使用FG-2函数发生器的所使用的所界定的驱动电压,双HIFU可以在所要的驱动功率下‘开启’和‘关闭’。因此,实现了对调节组织或样本内的温度的间接控制。

[0295] 主触发器还触发NI-DAQ以开始其采集并且不引入延迟,进而从主触发器一开始便采集光学信号(USF信号)。对于此研究,NI-DAQ卡的两个通道经编程以记录PMT-前置放大器输出信号以及关于来自主触发器的触发的LIA输出,其分别为已调制的荧光信号输出和1KHz频率灵敏度振幅信号输出。如果使用300毫秒时间常数设定LIA,那么光学信号采集的典型持续时间是大约4秒到6秒。一旦使用MATLAB记录采集并且存储到矩阵变量中,便产生软件脉冲触发。通过输出NI-DAQ端口发送出此脉冲触发以触发Velmex 3D平移平台移动到下一个位置。应注意确保组合的DAQ采集持续时间(大约4秒到6秒)和平移到下一个扫描位置的持续时间(小于2秒)一起不超过主触发器之间的持续时间。因此,对于此研究,将主触发器设定为0.1Hz频率(大约10秒)。用于光学USF信号的NI-DAQ以及用于超声波信号的数字化仪的数据传递显著较快,主触发器之间的持续时间确定任何两个扫描位置之间的持续时间,进而确定系统扫描和采集的总持续时间。

[0296] 数据处理

[0297] USF图像处理

[0298] 使用频域荧光成像技术进行超声波可切换荧光成像,其中使用所要的(1KHz正弦)波形调制激发激光源,且检测到的荧光也将使用激发源调制频率进行调制。以此方式,仅1KHz荧光信号是所要处理的所要信号,且可以拒斥所有其他光学信号。使用冷却型PMT记录检测到的荧光信号且提供给LIA以增加荧光信号的灵敏度和特异性。因此,检测到的荧光具有两个输出信号:PMT和LIA的输出。所述两个输出都是由NI-DAQ采集模块的两个通道记录。

[0299] 组织样本内的目标是内径(ID)为0.36mm且外径(OD)为0.61mm的硅胶管。使用注射器泵使染料溶液以每小时0.01英寸的慢流动速率循环以避免停滞。

[0300] LIA输出-最大振幅相对于初始基准线振幅

[0301] 如源部分中所提及,LIA模块具有确定LIA的灵敏度和特异性的两个主要参数设定:(1)时间常数,和(2)灵敏度。针对1KHz已调制光学信号将时间常数设定为300毫秒。此给予LIA对相对于时间的变化的1KHz振幅信号较慢的累积响应,从而导致较高的信号-背景比率。而且在Ni-DAQ数据采集模块的开始与产生USF信号的双HIFU模块的开始之间存在0.5秒的延迟。因此,大约0.5秒的初始数据采集不具有USF信号,其因此可以用作基准线或背景信号。将USF数据记录大约4秒-6秒,其取决于双HIFU驱动(‘开启’)的持续时间(大约250毫秒),这间接控制在考虑中的样本或组织内引发的温度的持续时间。应注意,持续时间和用来驱动双HIFU的振幅(对应于递送到双HIFU的功率)的组合确定组织内的温度增加。还应考虑到,相对于双HIFU的持续时间是活动或‘开启’,温度增加是平缓的,且一旦双HIFU不活动或切换为‘关闭’,温度增加会逐渐地减小。HIFU引发的荧光信号的增加和减小的速率是不同的,且在后一种情况下更慢。温度的此速率和量增加,且进而荧光响应还取决于组织的固有的物理和热特性以及双HIFU的机械和电气规格。

[0302] 从函数发生器(FG-3)的作为1KHz脉冲信号的同步信号提供用于LIA的参考信号。将灵敏度设定为20mv或200mv,其取决于用于研究的造影成像染料溶液(分别为ICG和ADP)。LIA输出振幅信号的最大值与头0.5秒基线的差被视为USF信号变化,所述USF信号变化直接对应于引发的峰值温度变化。因此,记录与扫描位置处的峰值温度相对应的绝对荧光信号强度,且针对其他扫描位置重复所述过程。因此,产生2D图像,所述2D图像的灰度强度值对应于USF信号相对于考虑中的组织或样本内的物理位置的峰值温度。

[0303] 如下给出具有其对应输入和参考信号的LIA的典型的相敏检测输出:

$$[0304] \quad V_{psd} = \frac{1}{2} V_{sig} V_L \cos(\theta_{sig} - \theta_{ref})$$

[0305] 所述信号是 $V_{sig} \sin(\omega_r t + \theta_{sig})$,其中 V_{sig} 是信号振幅, ω_r 是信号频率,且 θ_{sig} 是信号的相位,而参考信号是 $V_L \sin(\omega_r t + \theta_{ref})$,其中 V_L 是参考振幅, ω_r 是参考信号频率且 θ_{ref} 是参考信号的相位。

[0306] 特征提取

[0307] 一旦产生2D USF图像,便观察到信号-背景噪声比率相对低。为了增加USF图像的SNR,采用自定义特征提取算法。将特征提取算法分类为两个部分:相关矩阵的产生以及使用幂函数的灰度映射。随后使经过处理的相关矩阵乘以原始2D USF图像以提高所要的特征,且因此增加被称为经过处理的USF图像的USF图像的SNR。

[0308] 相关矩阵的产生

[0309] 将嵌入组织样本中的管中的ICG或ADP染料的荧光信号的典型动态响应取作参考信号。将通用MATLAB相关函数应用于与USF图像中的扫描点中的每一者相对应的信号中的每一者,以取得在-1与1之间的相关值,其中负对应于与参考信号的相反的关系,0对应于不相关,且正对应于与参考信号的高度相关。通过以下互相关公式来支配相关函数:

$$[0310] \quad R(X,Y) = \frac{\sum X(t)Y(t) \frac{\sum X(t)Y(t)}{N}}{\sqrt{\left(\sum X(t)^2 \frac{\sum X(t)^2}{N}\right) \left(\sum Y(t)^2 \frac{\sum Y(t)^2}{N}\right)}}$$

[0311] 其中R(X,Y)是X(t)和Y(t)的互相关系数,X(t)是输入信号,Y(t)是参考信号,且N是信号样本大小。

[0312] 灰度映射

[0313] 一旦产生原始USF 2D图像的相关矩阵或相关图像,便对2D相关图像实施特征提取算法。通过以下功率公式支配特征提取算法:

$$[0314] \quad P_{out}(i,j) = u * (P_{in}(i,j))^b - 1$$

[0315] 其中 $P_{out}(i,j)$ 是输出像素值, $P_{in}(i,j)$ 是相关矩阵值,a和b是常数。通过选择‘b’的较高值(通常为1000到100000)(a等于1),可以使具有较高强度值的图像的特征增加为更高,进而使较低的强度值抑制得低得多。一般来说,进一步增加了图像的动态灰度。此过程被称为灰度映射。这确保完全地抑制不相关、零相关和甚至在某一程度上抑制较低的相关灰度值,因此突出了高度相关的强度/灰度值。

[0316] 经过处理的USF图像:向原始USF图像应用经过处理的相关矩阵

[0317] 产生灰度映射的相关矩阵,且乘以原始的USF 2D图像,进而所得的USF 2D图像是荧光区的高浓度的特征经过突出的经过处理的USF图像。

[0318] 以上提及的算法是用于产生2D USF图像并且强调高荧光浓度区的逐步方法。应注意,不直接处理原始USF 2D图像强度;而是处理相关矩阵USF 2D图像。进而,可以通过简单地使经过处理的USF图像逐像素地除以经过处理的相关矩阵而从经过处理的USF 2D图像恢复或重新计算原始USF 2D图像强度。

[0319] US图像处理

[0320] 使用数字化仪来记录高取样速率(最大取样速率是100MS/sec)的超声A线信号。使用MATLAB控制数字化仪,通过MATLAB将数字化仪设定为在使用触发的20毫秒的延迟之后记录60毫秒的数据。这确保对含有来自UST的表面和水的高回波振幅信号的头20毫秒的US回波信号进行拒斥。因此如果水中的平均超声速度被视为每秒1480米,那么60毫秒的记录对应于记录大约4.4cm的深度信息。

[0321] A线到B模式图像产生

[0322] 记录每个扫描点处的A线,且连同坐标信息(例如,沿着轴向和横向方向在扫描点之间的绝对位置和距离)一起存储。因为所记录的A线具有振幅回波信息,所以在移除基线漂移之后将其转换为上部包络信息。沿着每个深度,A线的包络(被称为包络US信号)逐列堆叠成矩阵,所述矩阵随后作为2D图像进行存储。这意味着B模式图像或亮度模式US图像,其中灰度强度值对应于较高声阻抗失配界面,因此强调了ROI的结构信息。

[0323] 应注意,对于2D深度扫描(XZ扫描),所产生的B模式图像的数目等于深度扫描线的

数目,因为每条线的每个扫描点具有1D包络US信号。在下文USF和US图像的覆盖部分中详细阐释了需要观测的B模式的选择。

[0324] 通过自定义模板匹配算法进行管位置提取

[0325] 基于相关方法而开发自定义模板匹配算法。将超声(US) B模式图像中的管结构选择为模板,所述模板的尺寸是硅胶管的横截面直径($OD=0.64\text{mm}$)加上 0.4mm ,因此确保考虑到整个管。随后向MATLAB内置函数‘normxcorr2’给予原始的US B模式图像和模板,所述函数产生相关矩阵。随后应用取阈值,其中在0.7的相关值处截止,因此,将负、零和较低相关值抑制为零。如此产生的经过处理的相关矩阵含有与嵌入考虑中的组织样本内的三个管的位置相对应的三个区。

[0326] 双模态成像:USF图像覆盖在US图像上

[0327] 经过处理的USF图像直接覆盖到原始US B模式图像上

[0328] 经过处理的USF 2D图像用于使用利用透明度的直接图像覆盖方法作为彩色图像在稍加修改的情况下覆盖在灰度US B模式图像上。对覆盖代码进行修改以对经过处理的USF图像强度值的取阈值和透明程度进行控制。将对取阈值的控制分类为两种方法,以便最小化或移除USF图像中的尾部并且示出较高浓度荧光区。

[0329] 方法1:通过0与1之间的截止来确定此方法使用的经过处理的USF图像的所界定的取阈值。所述值确定图像中的最大强度的百分比(1是整个图像的最大强度的100%)。因此,将阈值截止以上的强度的所有百分比覆盖到背景US B模式灰度图像上。

[0330] 方法2:使用取阈值方法对经过处理的USF图像实施自定义通用形态学算法。实施取阈值的类似过程,但使用更小的截止值。将如此获得的USF图像转换为二值图像,从而形成被隔离的浓度区。在所述区中选择两个最大的区,且移除或拒斥被隔离的区的其余部分。如此产生的经过处理的二值图像表现得像遮罩,并且随后乘以经过处理的USF图像。因此,大大地减少了USF图像的尾部,且强调了较高浓度荧光区。

[0331] 观察

[0332] 对具有两个或更多个目标(在本研究中是填充有染料溶液(ICG或ADP)的硅管)的经过处理的USF图像的形态操作有时产生不与管的位置相符的区。不希望受理论束缚,相信两个相邻管的尾区彼此接近或重叠,从而产生比高浓度区的面积大的面积。因此,以上算法非故意地将那些尾重叠区选择为USF图像中的最大两个区中的一者。如果基于管的位置来选择荧光浓度区,那么可以克服此问题。

[0333] US导引的USF图像覆盖:为了突出USF图像的较高浓度区

[0334] 对US B模式图像实施模板匹配算法会产生管的位置或区。将如此获得的经过处理的相关的US B模式图像转换为二值图像。US B模式相关矩阵的此二值图像用作参考图像,且USF图像的二值图像用作自定义开发的MATLAB函数的输入图像。此函数选择在输入和参考图像之间彼此相交的区,且省略或拒斥不相交的其他区。如此获得的二值图像用于与经过处理的USF图像相乘。因此,选择位于管位置处的USF荧光浓度区,且随后用于覆盖图像程序中。

[0335] 对图像覆盖程序的额外修改包括将重叠的两个经过处理的USF2D图像并入到灰度US B模式图像上,但具有不同色彩。此色彩编码辅助在成像时区分在管中使用的不同染料溶液。红色色彩编码指示ICG样本,而绿色色彩是针对在管内分散的ADP样本。第三黄色色彩

用于强调两个重叠图像的区,其中共同重叠区域指示管填充有两种染料溶液(ICG和ADP)的混合物。

[0336] 结果和讨论

[0337] 单个目标的USF成像

[0338] 对于嵌入猪组织样本内的单个目标(单个管)实验,用于初步实验的猪组织的厚度是大约4mm-5mm,所使用的染料溶液是ADP,且目标硅胶管的规格如下:ID:0.31mm以及OD:0.64mm。

[0339] 所产生的2D USF图像含有关于温度变化的信息,且因此USF图像中的荧光区是双HIFU的焦点区域内的引发的温度的直接结果。因此,对组织内的单个管的双HIFU超声波处理的荧光响应示出为在USF图像内具有交叉形状的荧光区。此区被描绘为具有两段:(a)交叉中心区和(b)尾区。交叉中心区形成于具有染料溶液的管的位置处,且尾区是双HIFU模块的相应个别HIFU的焦点区域的末端。

[0340] 交叉中心区示出为与四个尾部相比具有相对较高的荧光强度。此观察与交叉中心区具有较高温度变化的假设一致,这是因为个别HIFU的压力在双HIFU的两个焦点区的接合点处相对较大(具有相长干扰),且沿着焦点区的主轴从中心区移动到顶点相对较小。

[0341] 在单个HIFU-USF研究中,观察到类似的目标区的荧光区的FWHM是HIFU的压力区的FWHM与染料溶液分散于其中的目标区(硅胶管)的横截面的卷积。在此双HIFU-USF研究中,可以清楚地观测到,与其中FWHM沿着深度是大约4mm-6mm且沿着横向方向是1.2mm-1.5mm的早先研究相比,荧光区的FWHM沿着深度和横向方向极大地减小到大约1mm-1.2mm。因此可以看到使用双HIFU进行USF成像会增加USF成像的轴向分辨率。在一种情况下,得出的结论是,沿着轴向方向的分辨率以此方式从7.66mm减小到1.5mm。

[0342] 具有三个目标的USF成像

[0343] 与US图像一起获得较厚猪组织样本(大约10mm-12mm厚)内的一系列类似目标(硅胶管)的USF图像。具体来说,B模式US图像给出关于三个目标的形状和位置的结构信息,且USF图像给出与分散在硅胶管内的染料溶液的浓度成比例的基础生理信息。对于多目标实验,考虑三个管且如论述布置在样本制备区段中。在这里呈现的结果使用了具有其对应的ADP滤波器组(830LP,长通滤波器+RG780,吸收滤波器)的808nm激光激发。因为基于ADP的USF图像的SNR显著高,所以不应用特征提取算法(相关以及灰度映射),且因此在覆盖中使用原始未经处理的数据。在ICG的情况下,应用特征提取算法以强调基于ICG的USF图像的低浓度区。

[0344] 已观察到,管1不展现任何荧光,因为其ADP溶液不被808nm激光源激发。另一方面,管2和管3展现响应于双HIFU超声波处理的荧光,指示了USF现象的发生。区域和荧光强度水平在管2和管3之间不同,这是因为以下事实:与管3中的未混合的ICG溶液相比,管2中的ICG浓度是不同的(ICG:ADP为大约3:2)。荧光的浓度集群精确地覆盖在B模式US图像中的管的位置处,因此进一步验证了相应管内的808nm敏感溶液、ICG染料溶液的存在。被覆盖的USF图像示出荧光的两个不同浓度区域/区。远离管的位置的荧光区被称为尾区,且管位置上的高浓度区被称为交叉中心区。取决于选定的阈值截止,尾区对较小值变得具有支配性,且对于较大值较不具有支配性。但较大的截止暗示仅显示图像中的荧光的最高浓度,但却是以失去周围信息为代价。需要保留USF图像的最大值信息,同时使荧光尾区信息最少化。为了

实现此形态,执行操作以选择接近或在管位置上的那些区。

[0345] 使用形态操作处理的USF成像

[0346] 形态操作涉及将USF图像转换为二值图像,且随后选择二值图像的与US B模式管位置重叠的那些区。形态操作的优势在于,可以选择较低的阈值截止。即使对USF图像的此类操作将具有更多的低荧光强度区,但稍后将移除或拒斥所有这些区,进而保持大部分USF荧光信息。

[0347] 显然,经过处理的USF图像的二值图像是由若干区组成。通过观察可以推断,小区大多属于由低荧光强度值组成的USF信号的尾区。因此,可以观察到,在经过处理的USF图像中不明显的低荧光尾区在二值图像中是显而易见的,且稍后可以将其移除以取得高浓度区,大多是USF图像的交叉中心区段。采用两种简化方法来选择所要的USF交叉中心区。第一种方法是选择二值图像上的两个最大区,且第二种方法是使用来自B模式US图像的管的位置以选择所要区。

[0348] 方法1:简化形态方法。

[0349] 此选择方法涉及将二值图像中的所有区单独地分割为其自身的二值图像中的每一者,并且还计算每个区内的面积。随后依据所述面积对所述区进行分类。选择最大的两个区和它们的相应二值图像,且彼此相加,并且忽略它们中的其余部分。所得的二值图像或掩模仅含有精确地位于填充有ICG溶液的两个管位置处的两个区。这些二值图像逐个地与USF图像相乘,且随后覆盖到US B模式图像上。一般形态方法的一个缺点是,存在最大两个区中的一者与所述管的位置不重叠的可能性。当两个相邻管的尾区有时重叠并且形成大于管2的荧光交叉中心区的区时,观察到此情景。因此,需要进行修改以相对于USF荧光区选择来并入管的位置。

[0350] 方法2:US辅助的形态操作方法。

[0351] 通过使用在US图像的数据处理部分中阐释的模板匹配算法,可以精确地获得目标管的位置。此图像随后根据原始USF图像的大小经过校正,且随后转换为二值图像。所得的二值US经处理图像用作形态操作算法的参考图像,以选择所关注的所要区。通过简单地找到二值US经处理图像与二值USF经处理图像之间的相交区来进行对区的选择。

[0352] 双模态成像实现:

[0353] 对于给定猪组织样本,记录两组数据。第一组数据是关于使用ADP滤波器组(715LP+RG695)的671nm激光激发,且第二组数据是关于使用ICG滤波器组(830LP+RG780)的808nm激光激发。实验模块的其余部分不变。以上论述的图像处理还适用于ADP USF数据集,且获得类似的结果。以下部分涉及将ICG和ADP USF经处理图像覆盖到US B模式图像上。要特别注意不改变两组USF成像的双HIFU UST模块和猪组织样本的位置。两个USF图像都被归一化,并且对所述两个USF图像应用阈值0.5。

[0354] 已观察到,与ICG区相比,ADP荧光浓度区受到限制。这是可以理解的,因为与ICG相比,ADP对温度变化的荧光响应(灵敏度)较高。这与以下事实结合:向两个归一化USF图像应用相同阈值;因此与ICG相比,在管填充有ADP的情况下,荧光区受到更多约束。应注意,管2填充有ICG和ADP的混合物(以3:2比率)。所有荧光区与它们的相应管位置完美重叠。在管2的情况下,即使两个经过处理的USF图像精确地重叠,但强调来自两个USF图像的荧光强度的基本想法受到低估。因此,采用另一简单形态操作来选择两个USF经过处理图像的共同区

域,且指定不同色彩来突出管2填充有ICG和ADP溶液的掺合物的意图。

[0355] USF和US的双模态成像结合修改的图像重叠算法会并入使用两个经USF处理的二值图像的共同区域的想法。这涵盖了管2位置处的大多数(90%以上)交叉中心荧光区。通过对组合的USF图像的相应像素位置处的它们的相应加权强度的乘积求和来计算所述组合的USF图像的强度水平($P_{\text{组合}}(i, j)$),如以下公式所示:

[0356] $P_{\text{USF12}}(i, j) = P_{\text{USF1}}(i, j) + P_{\text{USF2}}(i, j)$

[0357]
$$P_{\text{组合}}(i, j) = P_{\text{USF1}}(i, j) \cdot \left(\frac{P_{\text{USF1}}(i, j)}{P_{\text{USF12}}(i, j)} \right) + P_{\text{USF2}}(i, j) \cdot \left(\frac{P_{\text{USF2}}(i, j)}{P_{\text{USF12}}(i, j)} \right)$$

[0358] 一旦计算出所组合的加权荧光强度,就使其覆盖到二色USF图像上。应注意,两个USF图像的共同区域在重叠时变为零,或者在它们的相应USF图像中移除,这是因为其将被第三组合的加权USF图像覆盖。

[0359] 另外,可以进行与早先实验类似的多深度平面扫描,这稍后可以堆叠在一起以形成3维数据,稍后可以在任何所要平面处观看到所述数据。因此可以变得可能的是,使用超声波和USF成像的双模态以任何所要角度或平面捕获并目测所关注的给定区的3D曲线。

[0360] 已经在实现本发明的各种目标的过程中描述了本发明的各种实施方案。应认识到,这些实施方案仅仅说明本发明的原理。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,其众多修改和改写对于本领域技术人员来说将容易显而易见。

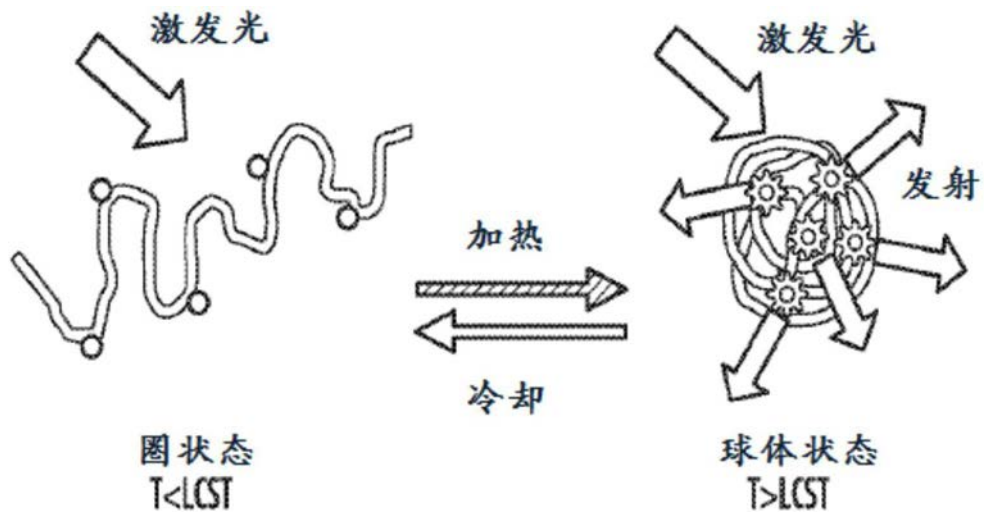


图1

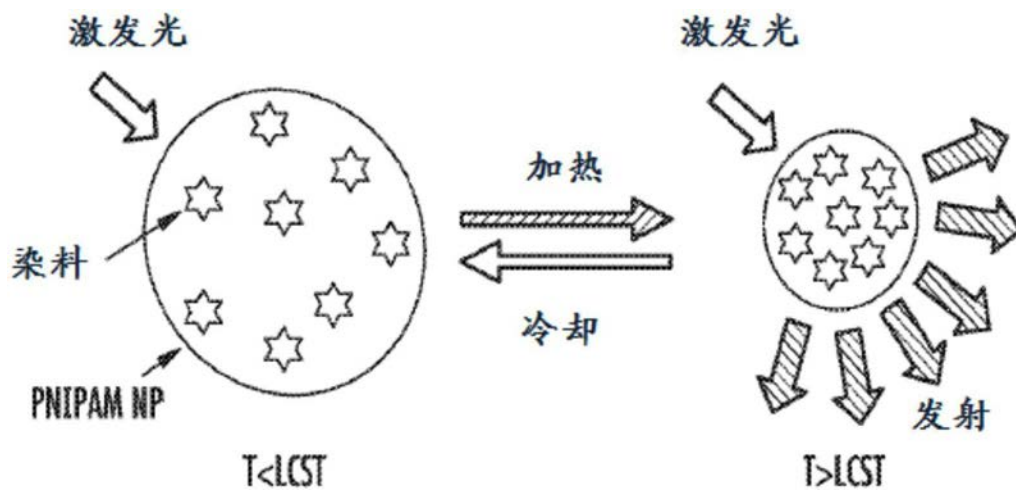


图2

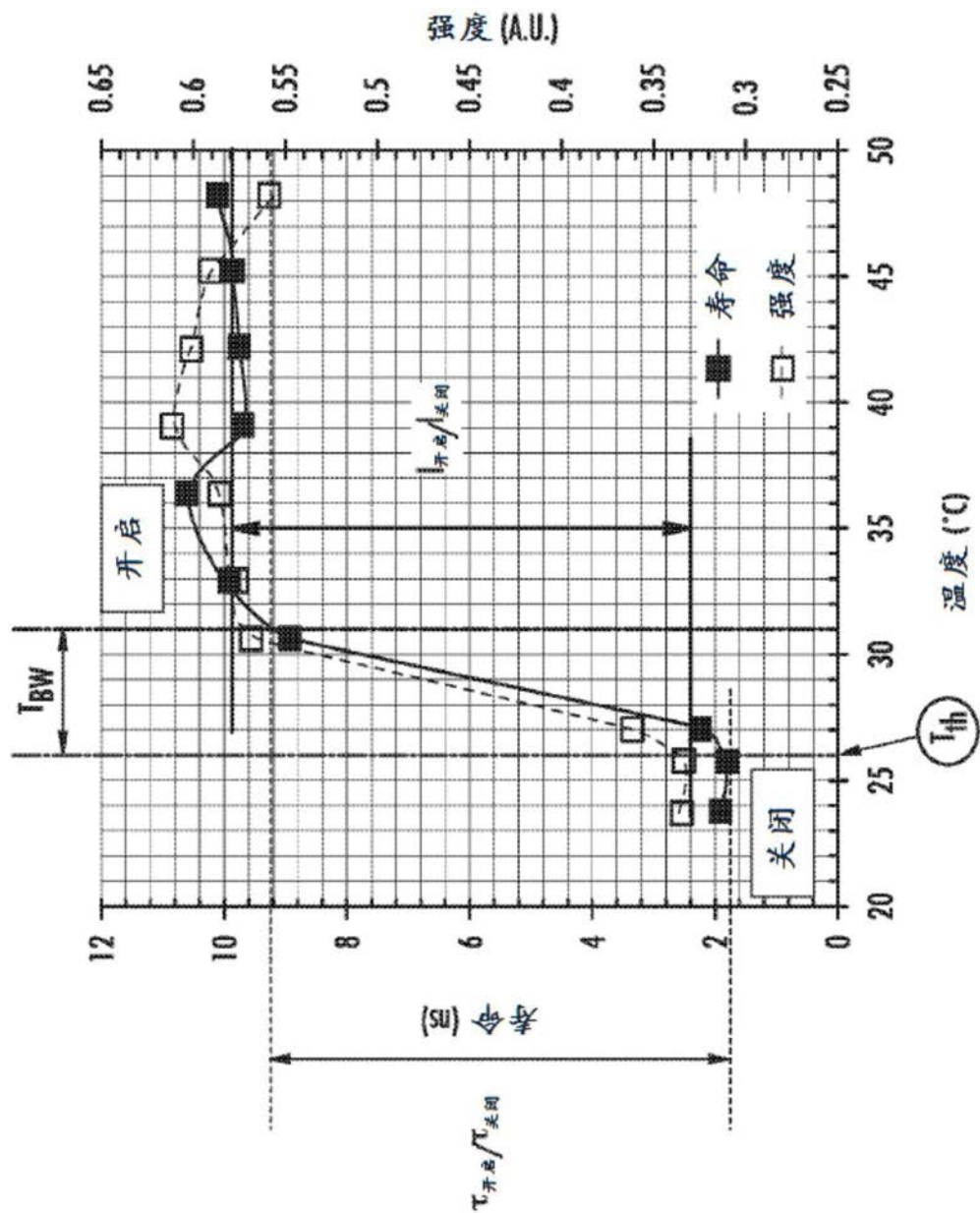


图3

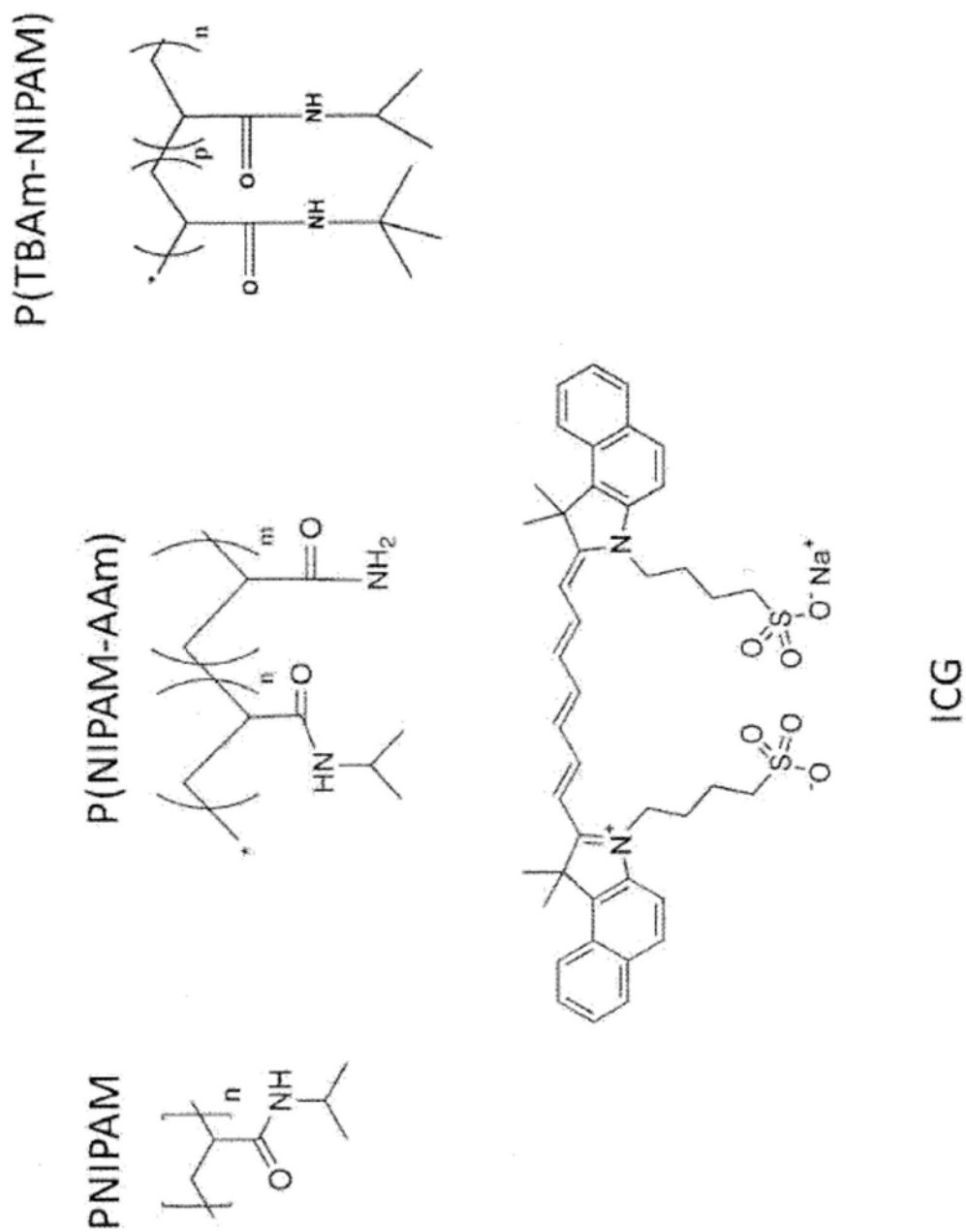


图4

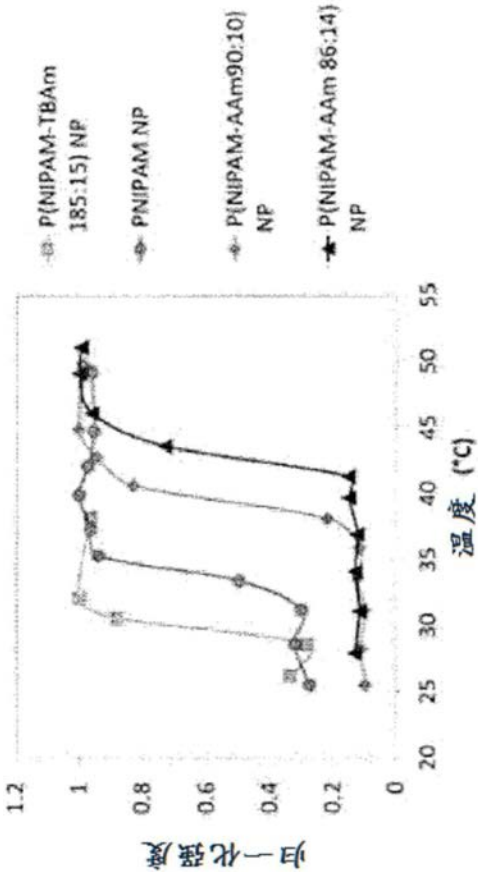


图5

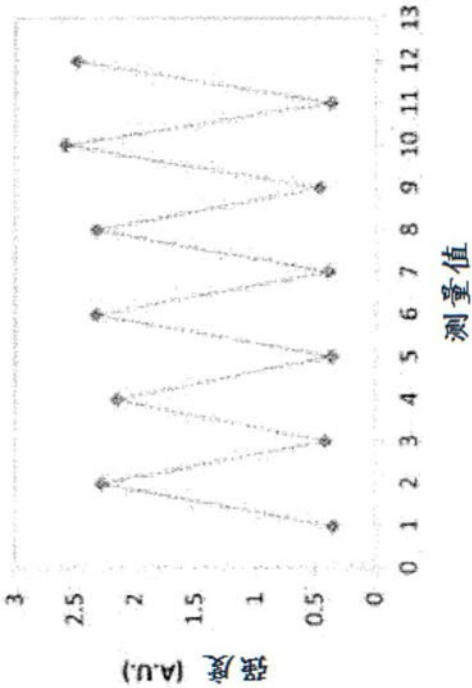


图6

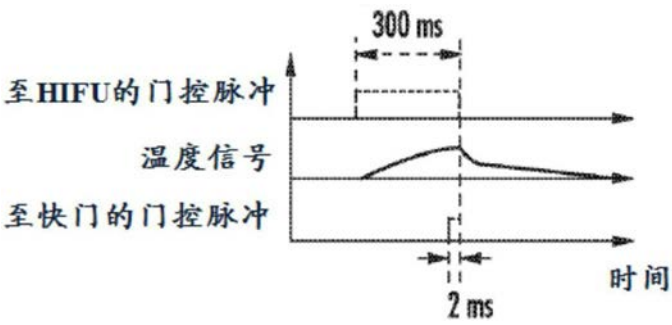


图8C

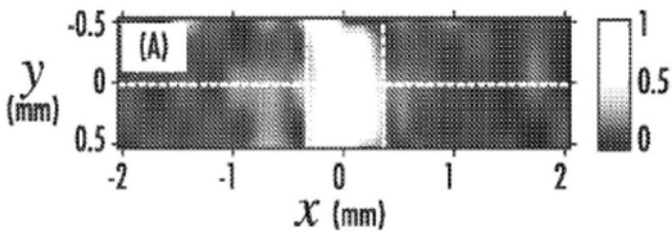


图9A

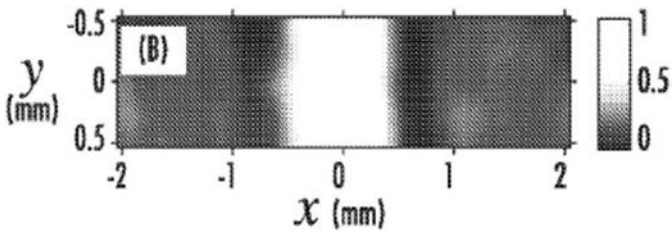


图9B

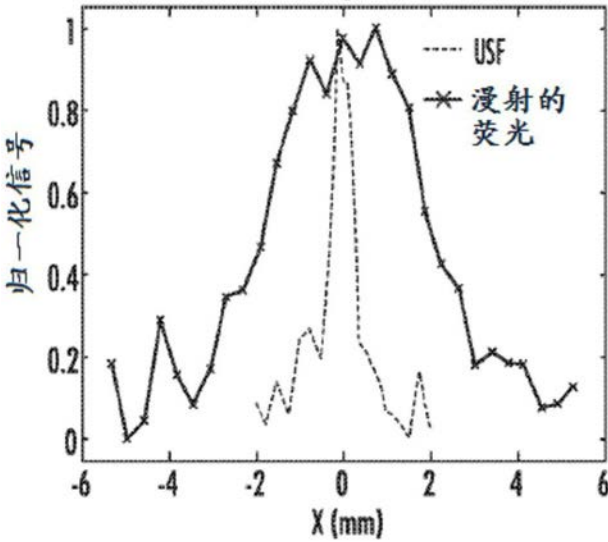


图9C

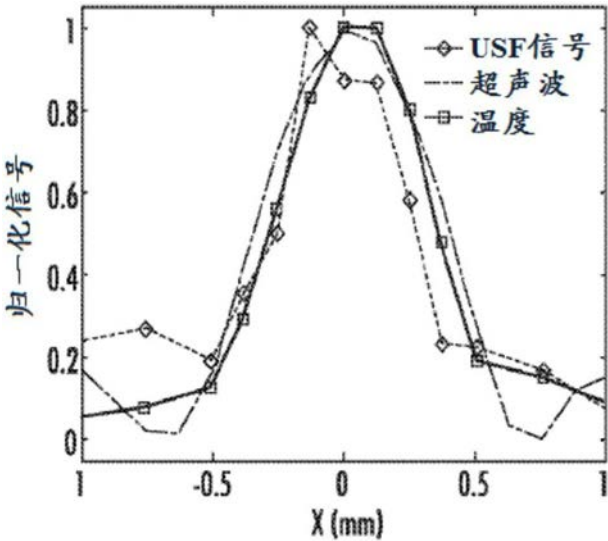


图9D



图10

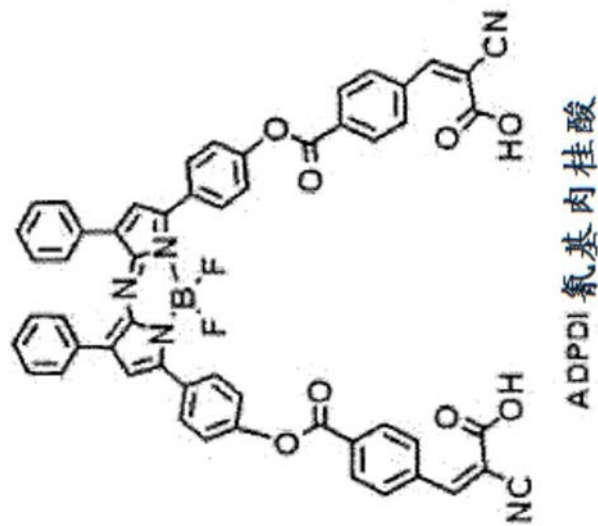
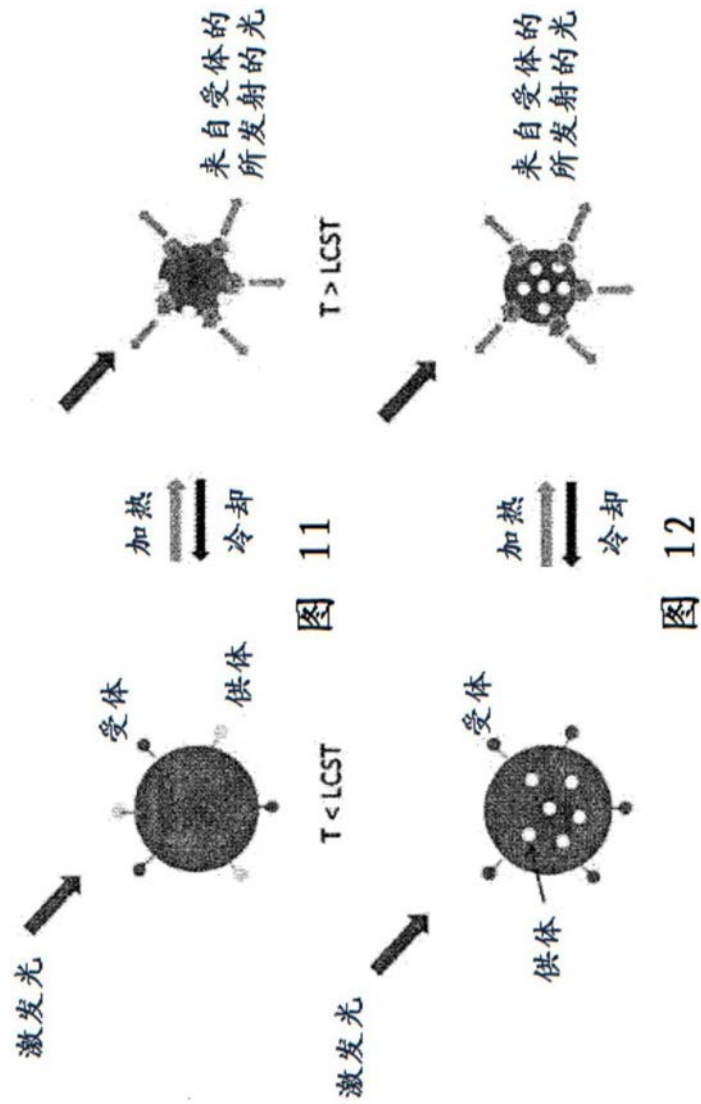


图13

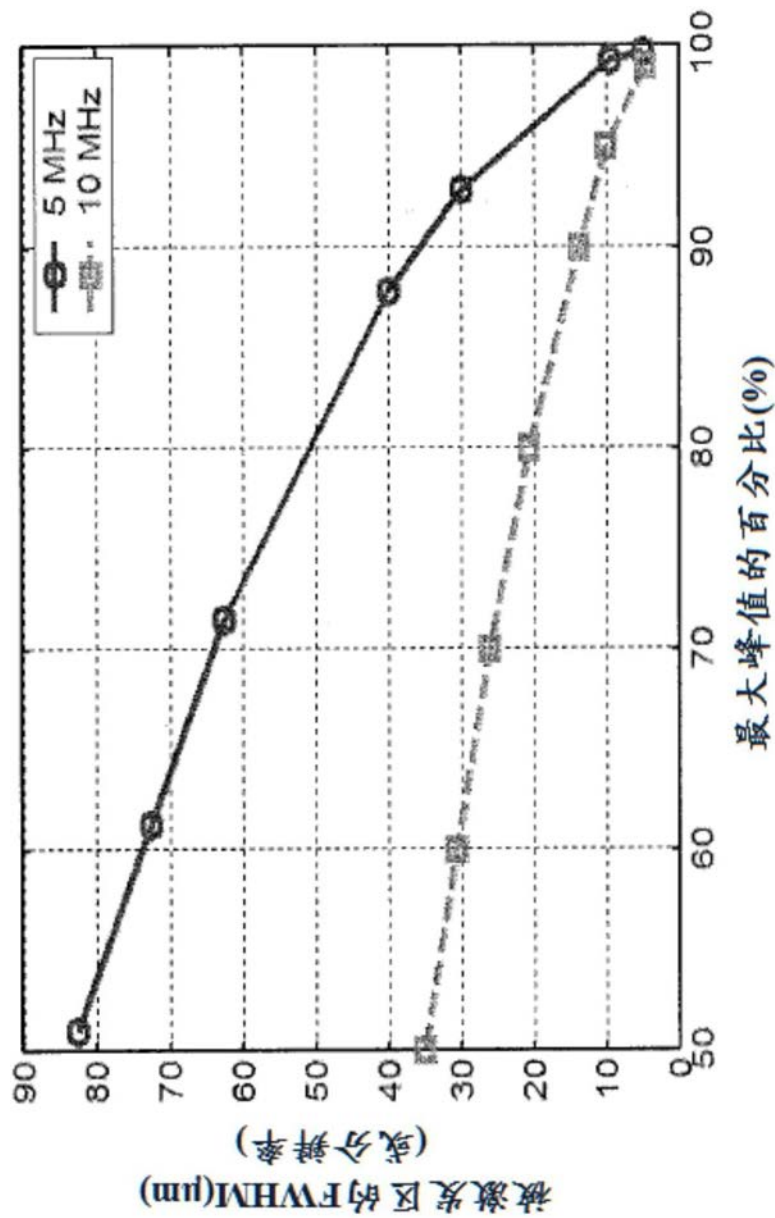


图14

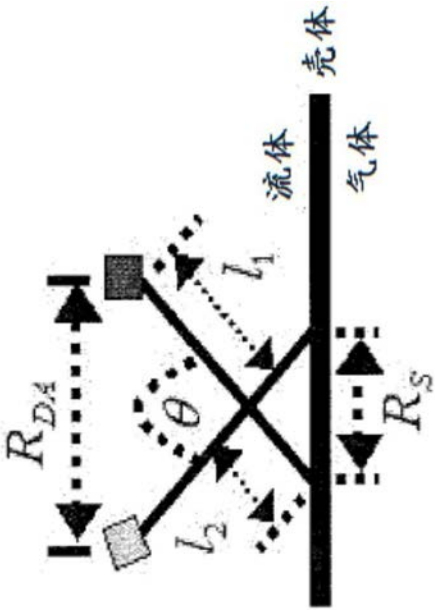


图15

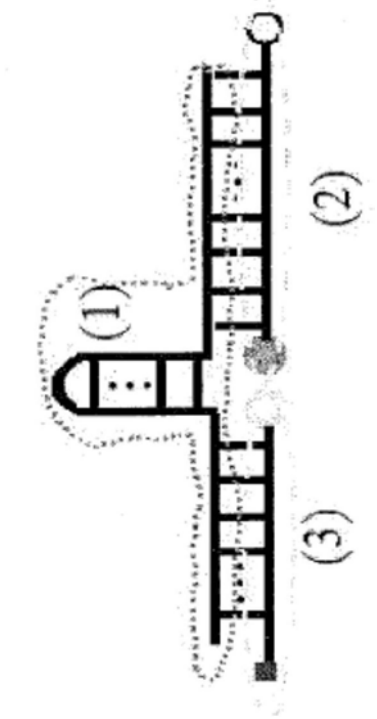


图16

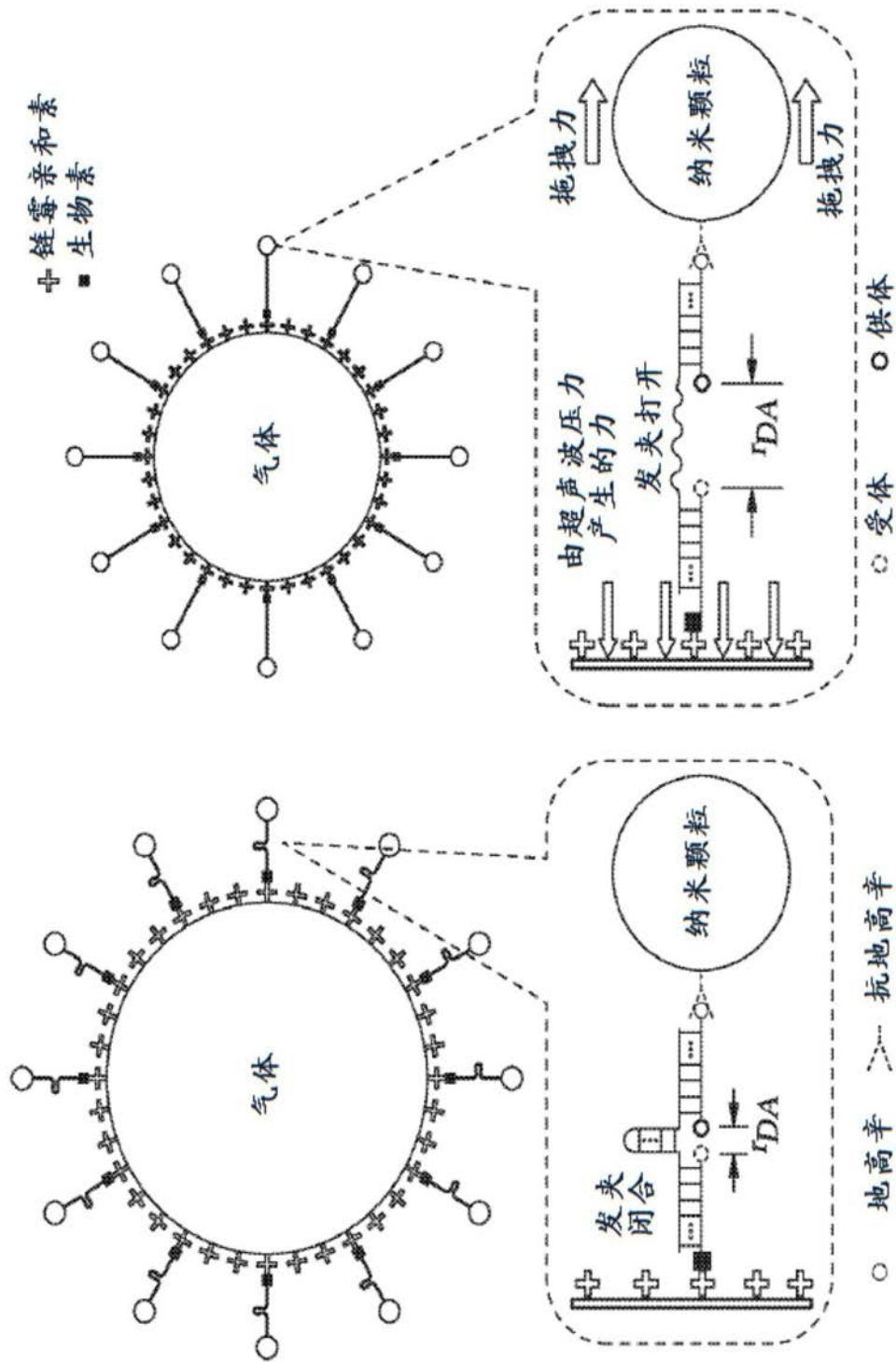


图17

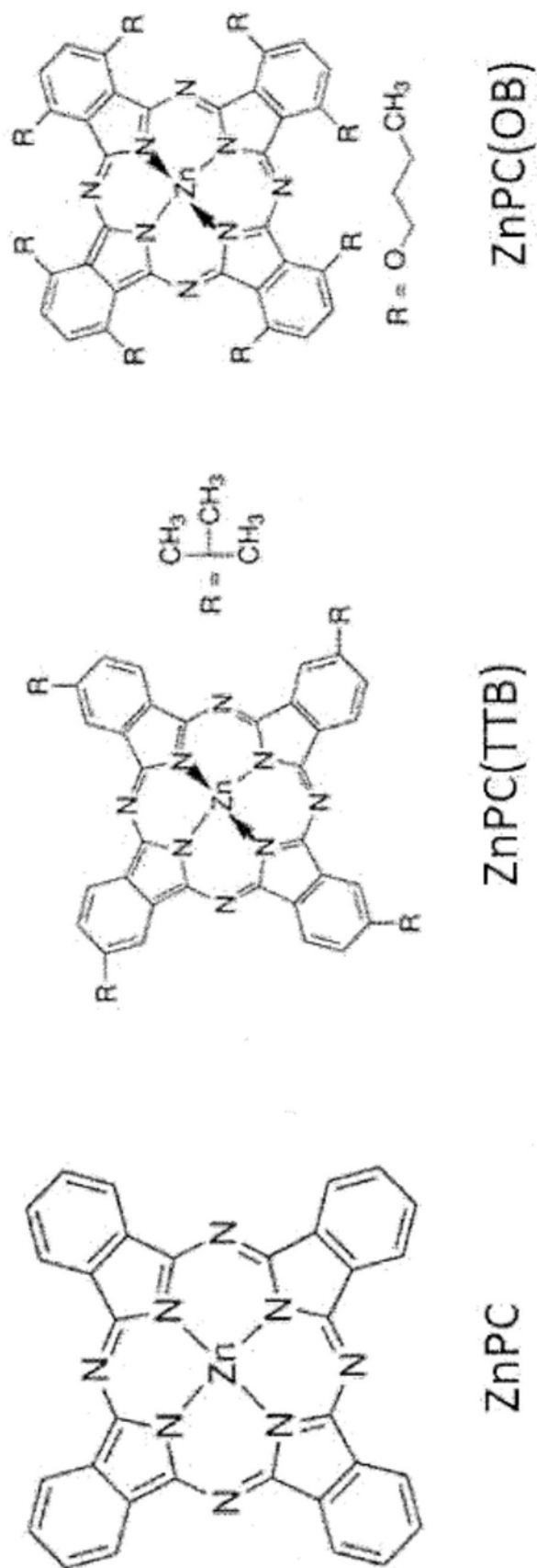


图18A

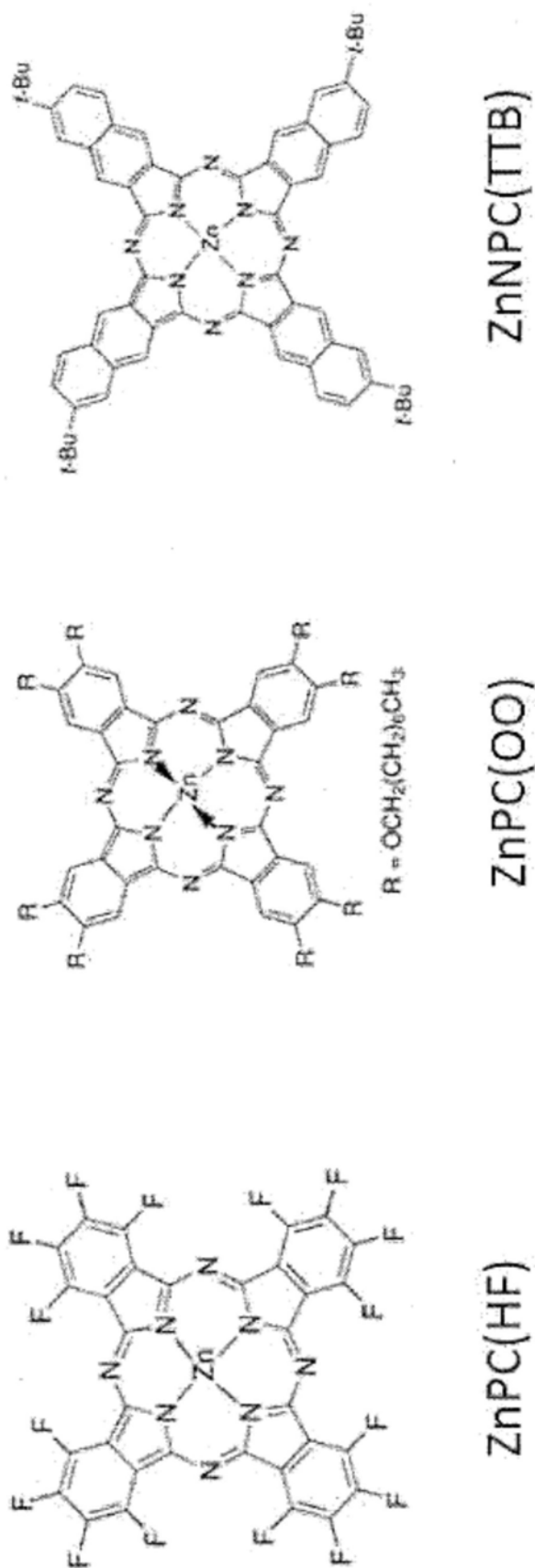


图18B

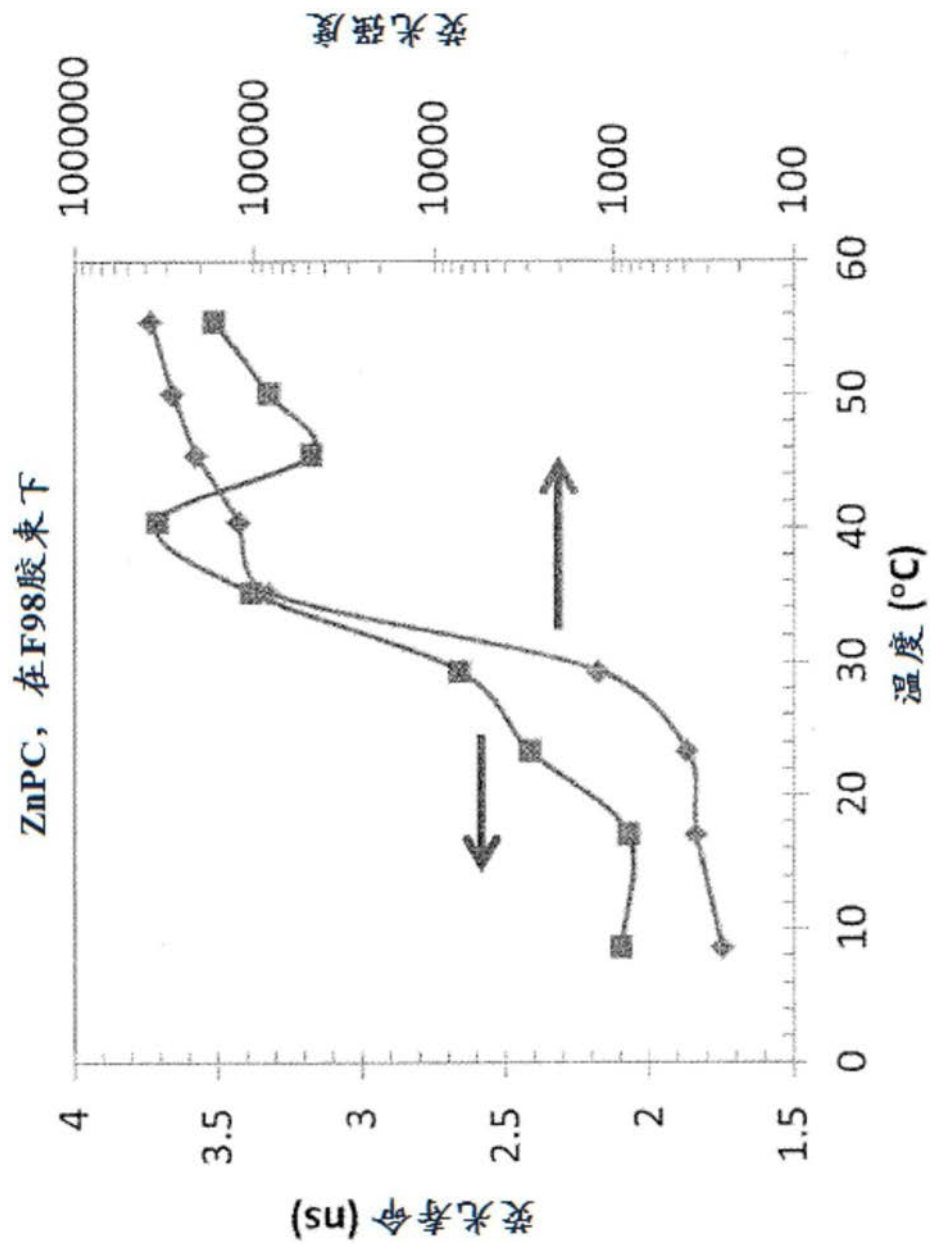


图19A

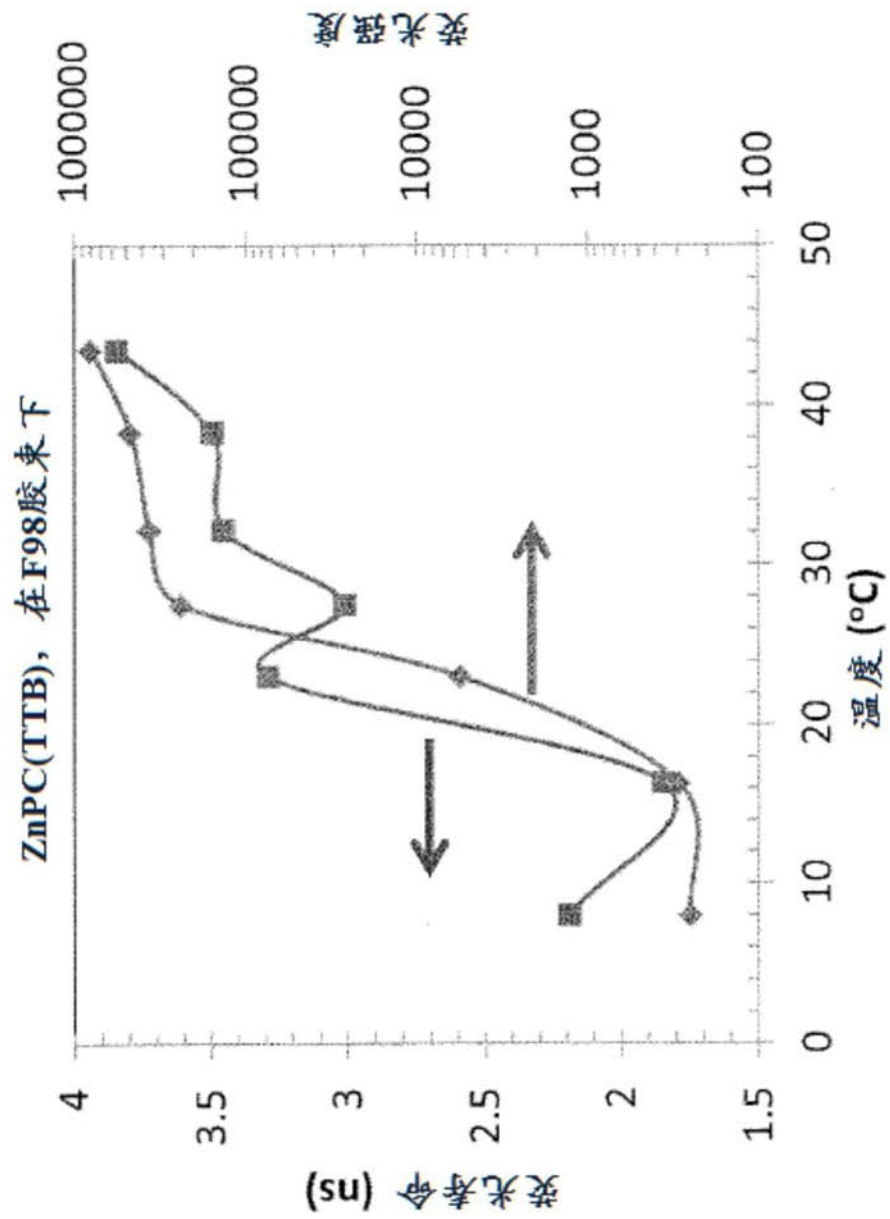


图19B

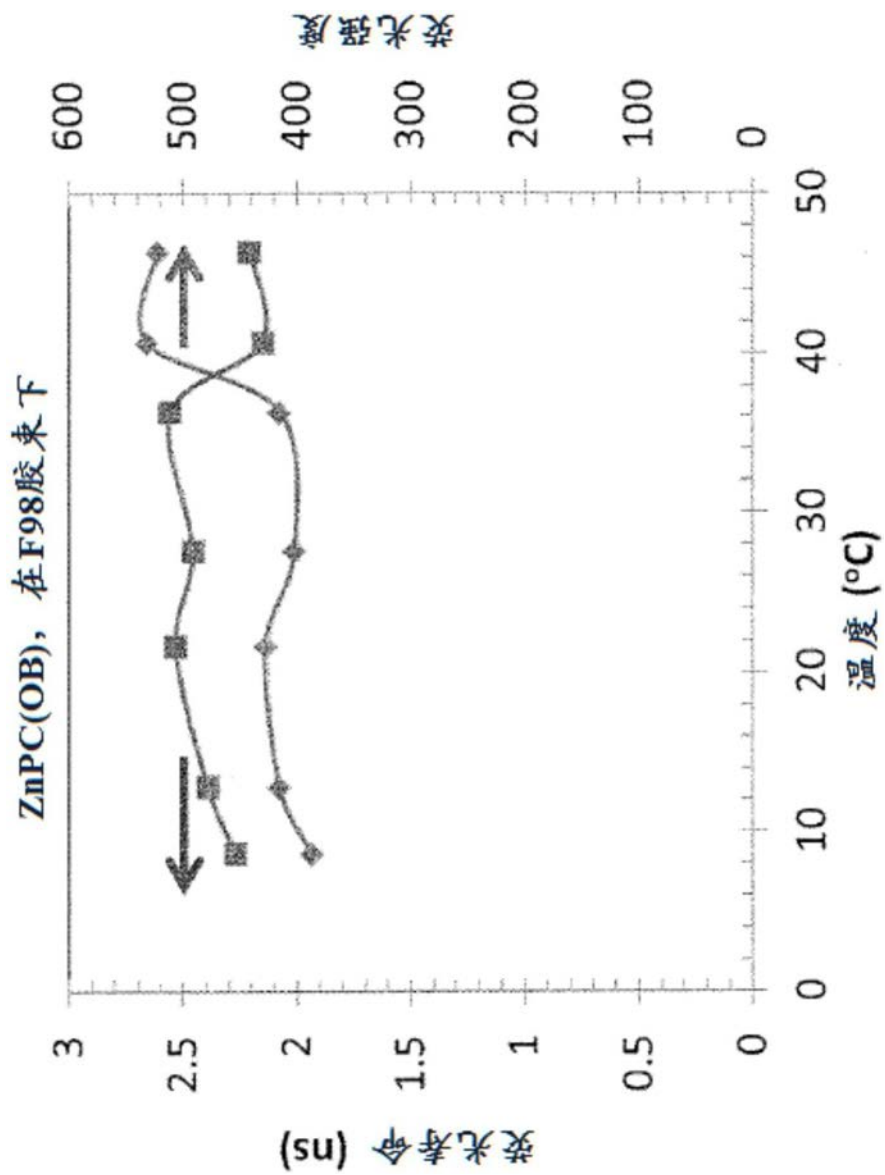


图19C

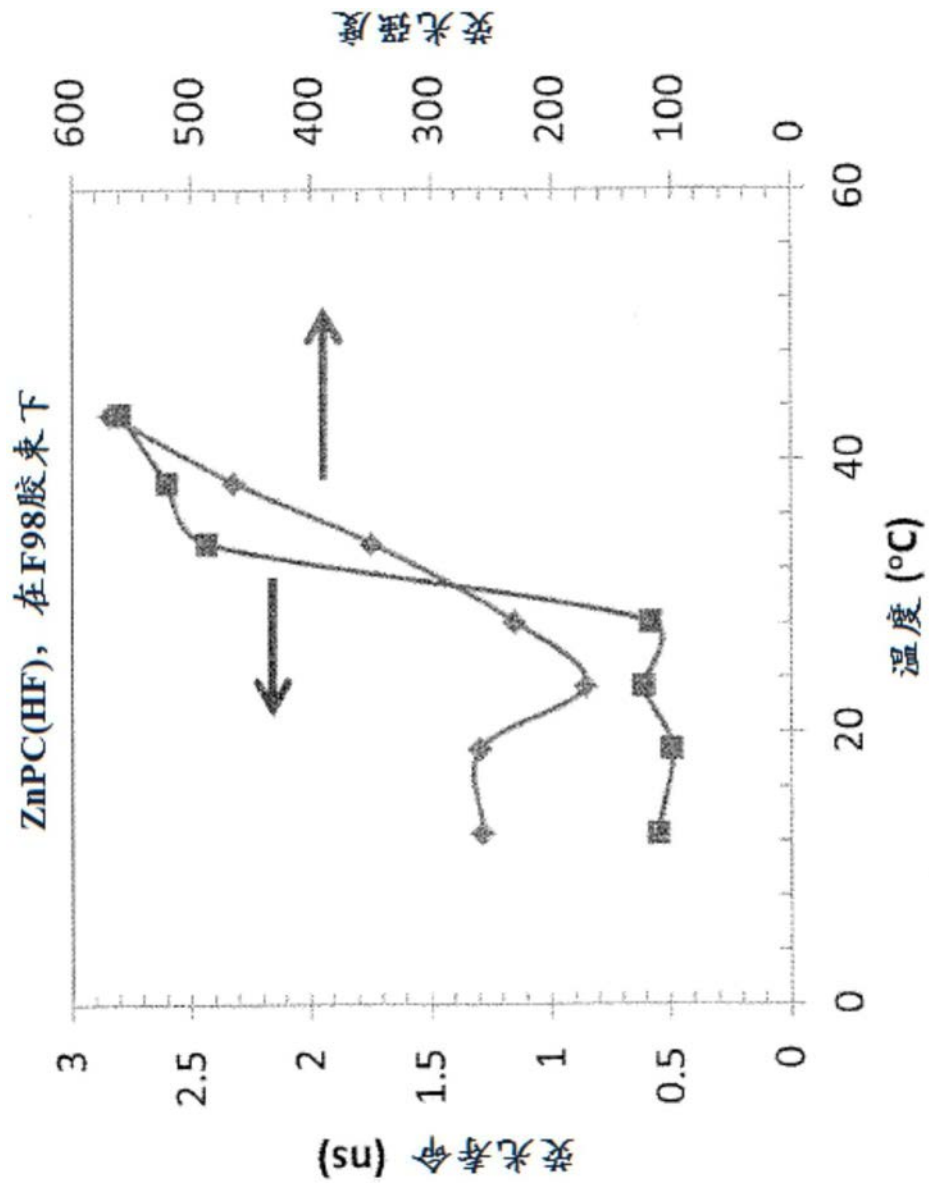


图19D

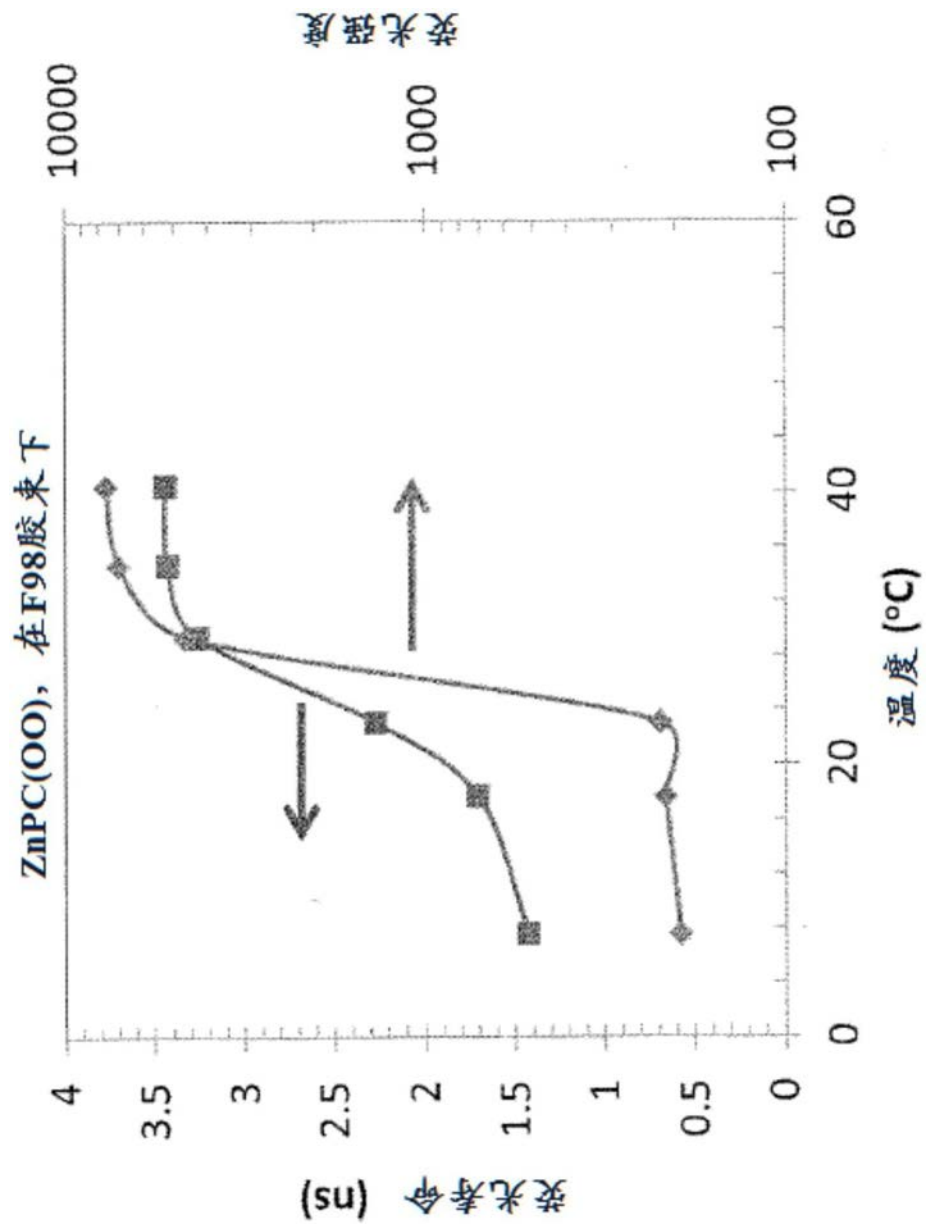


图19E

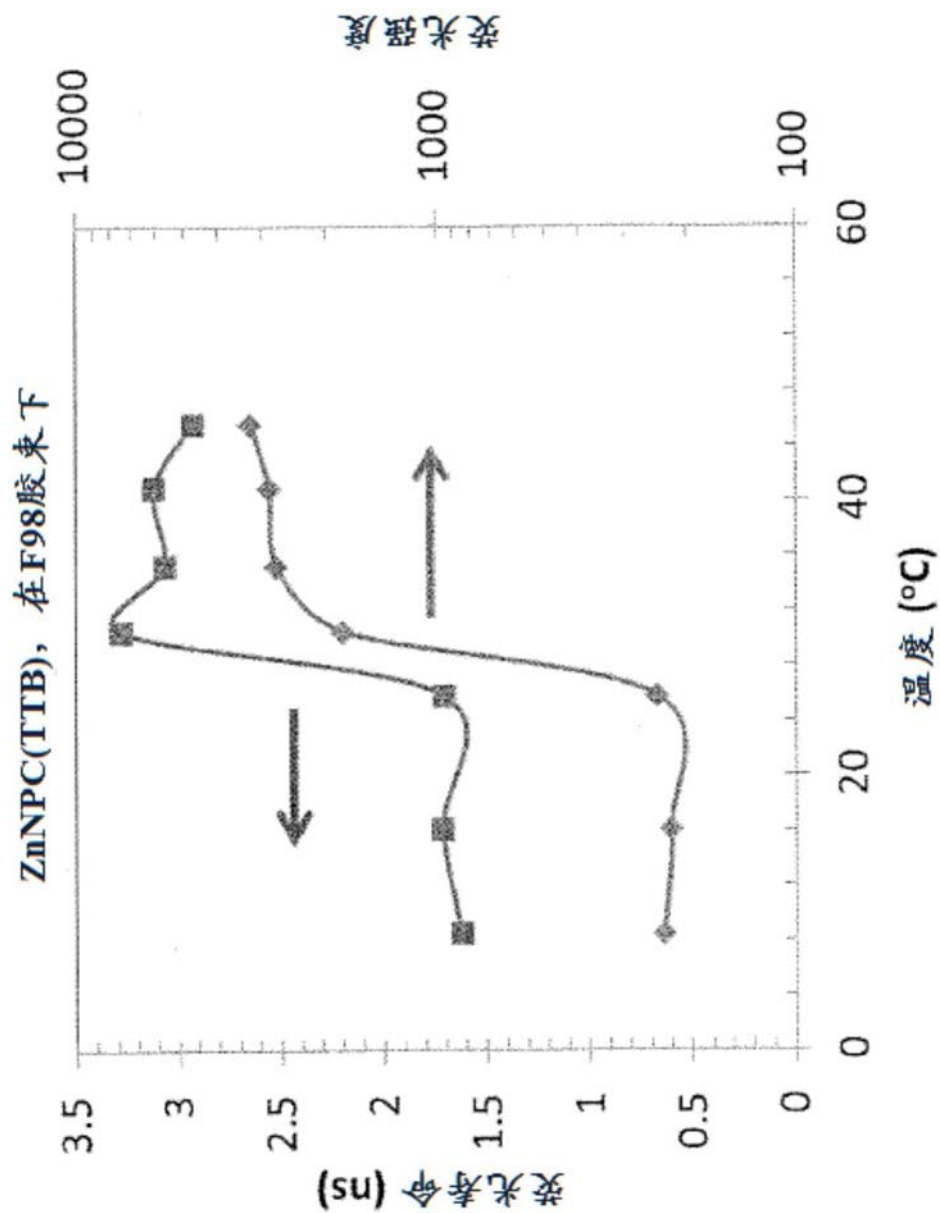


图19F

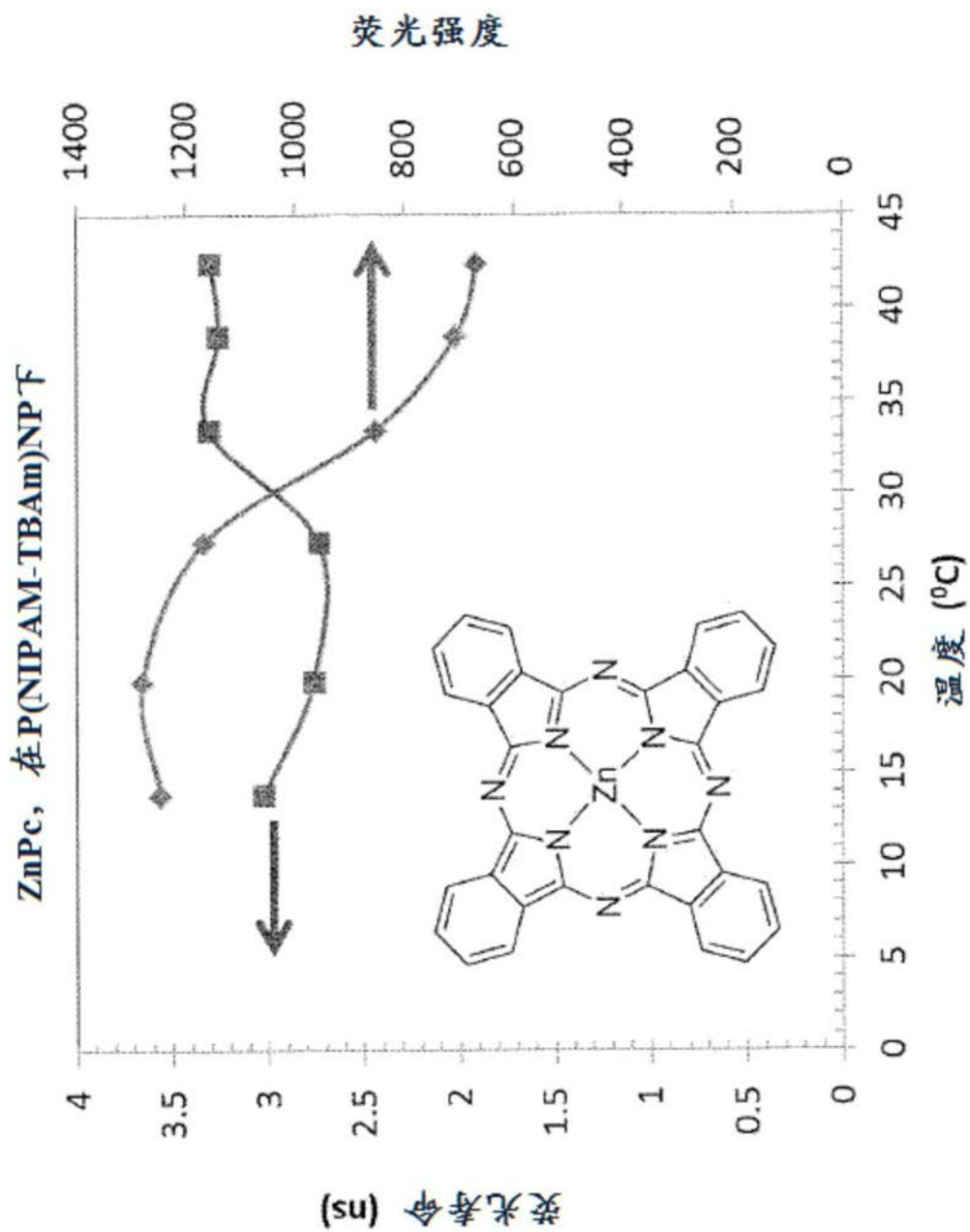


图20A

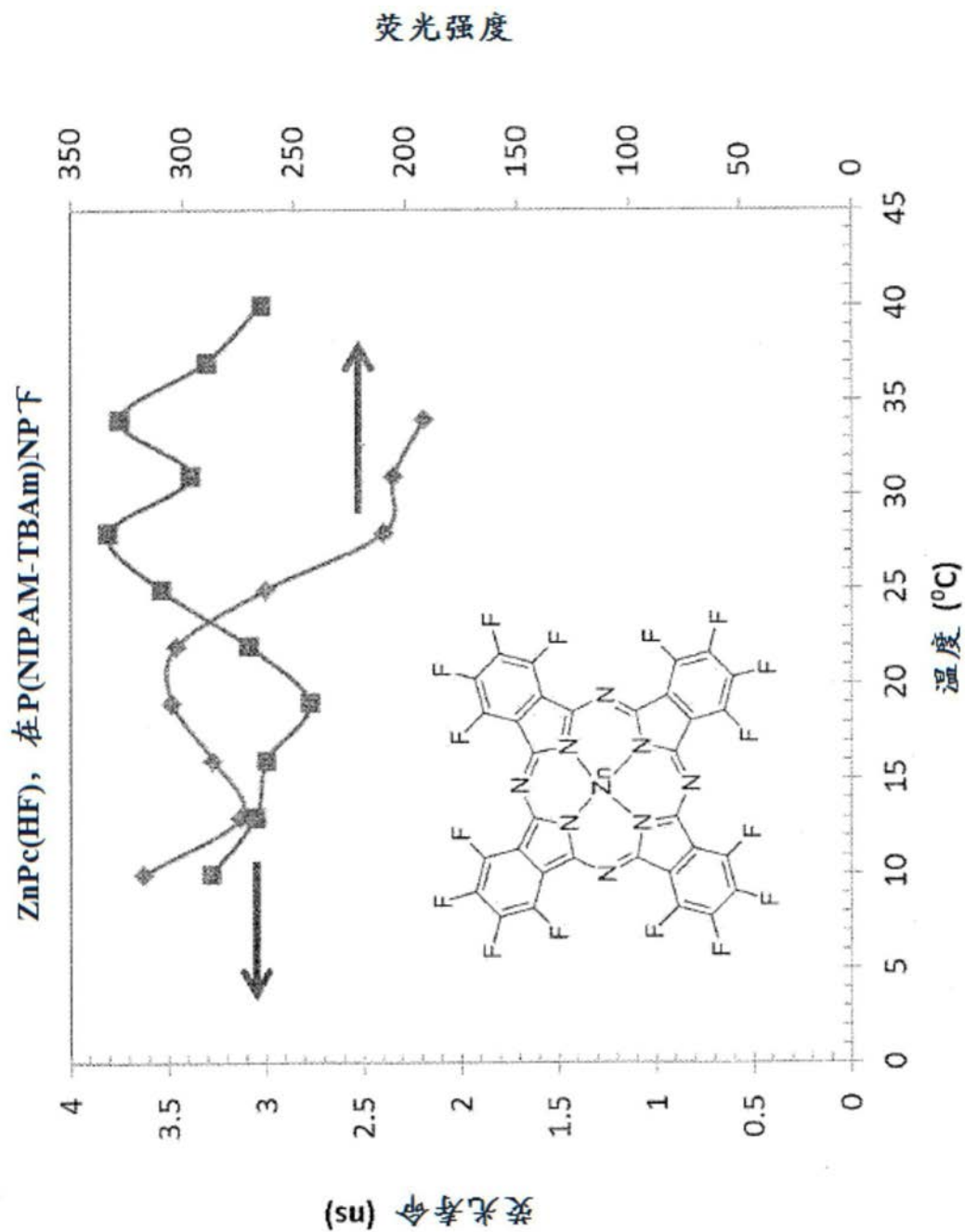


图20B

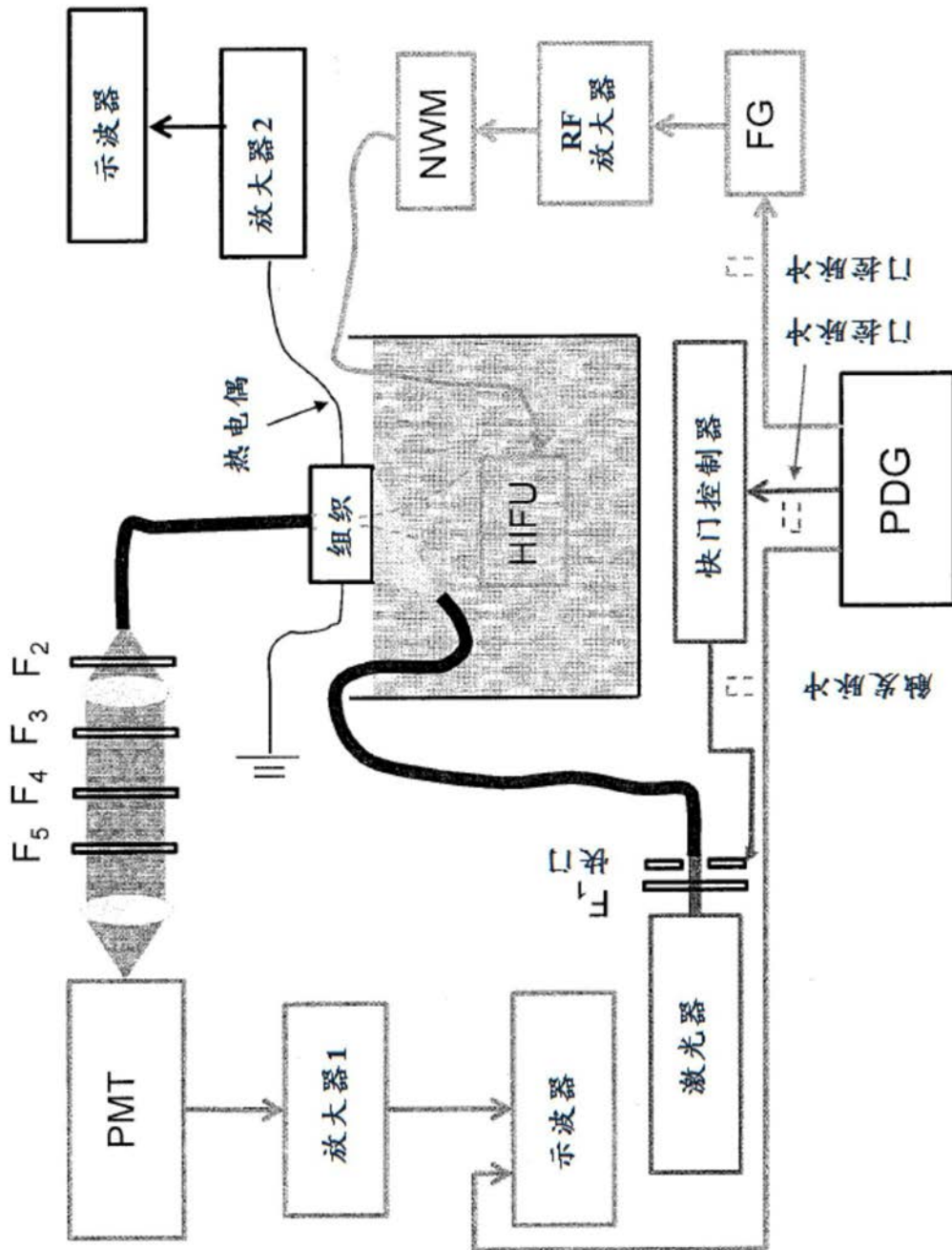


图21A

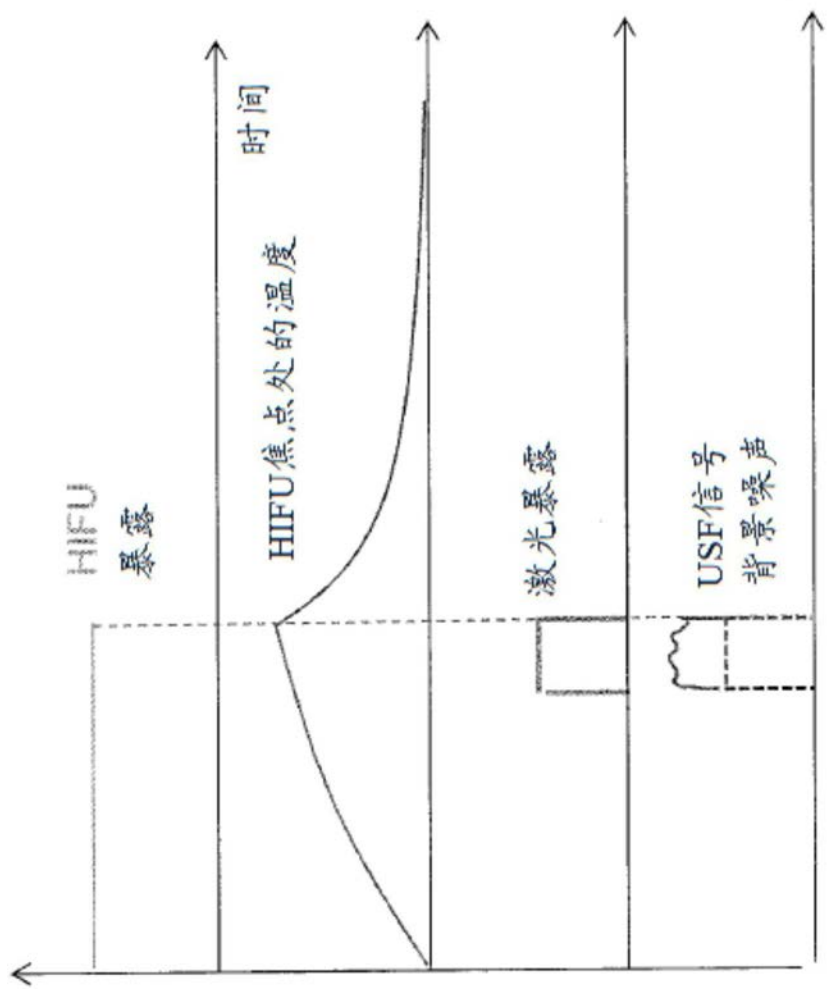


图21B

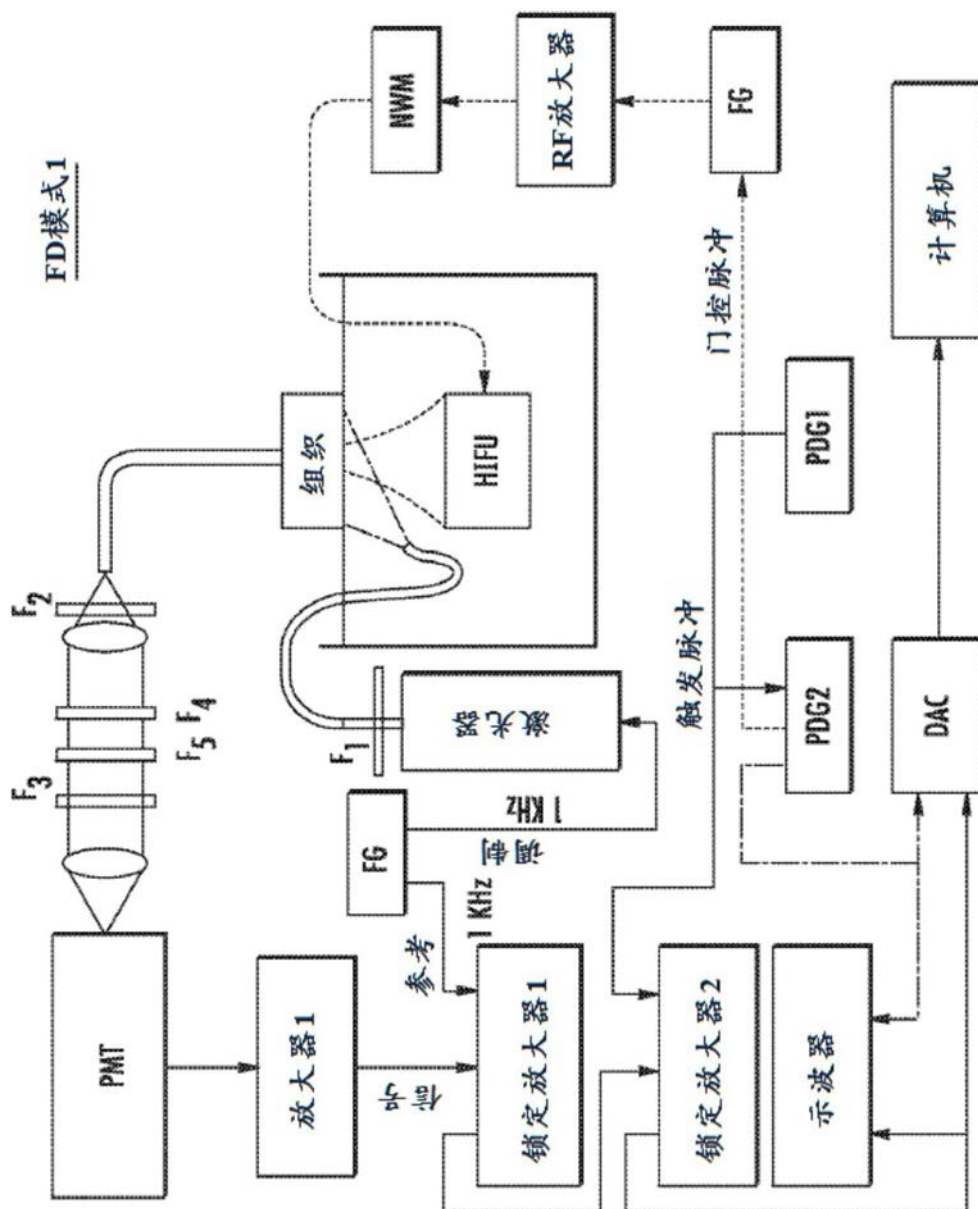


图21C

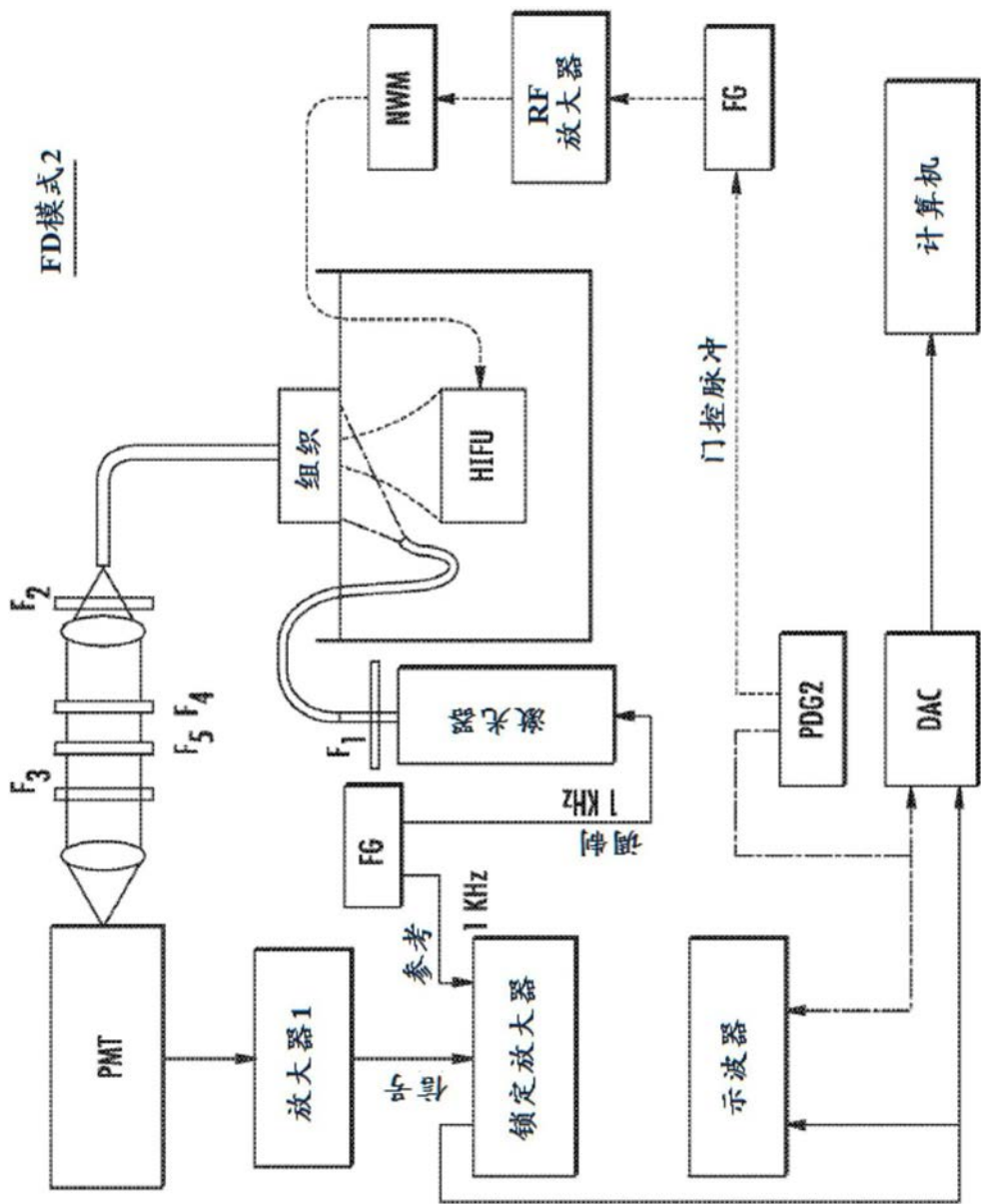


图21D

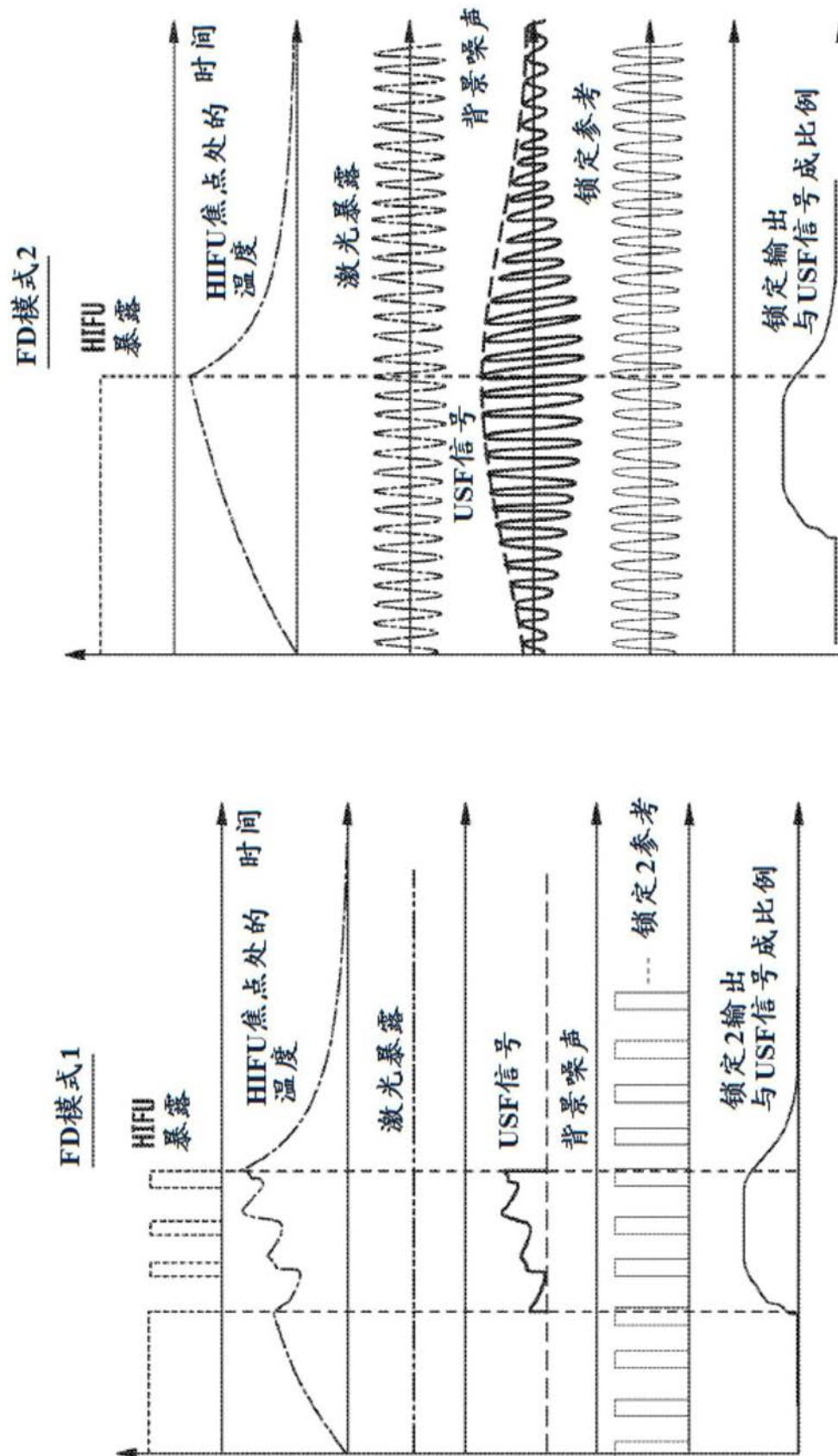


图21E

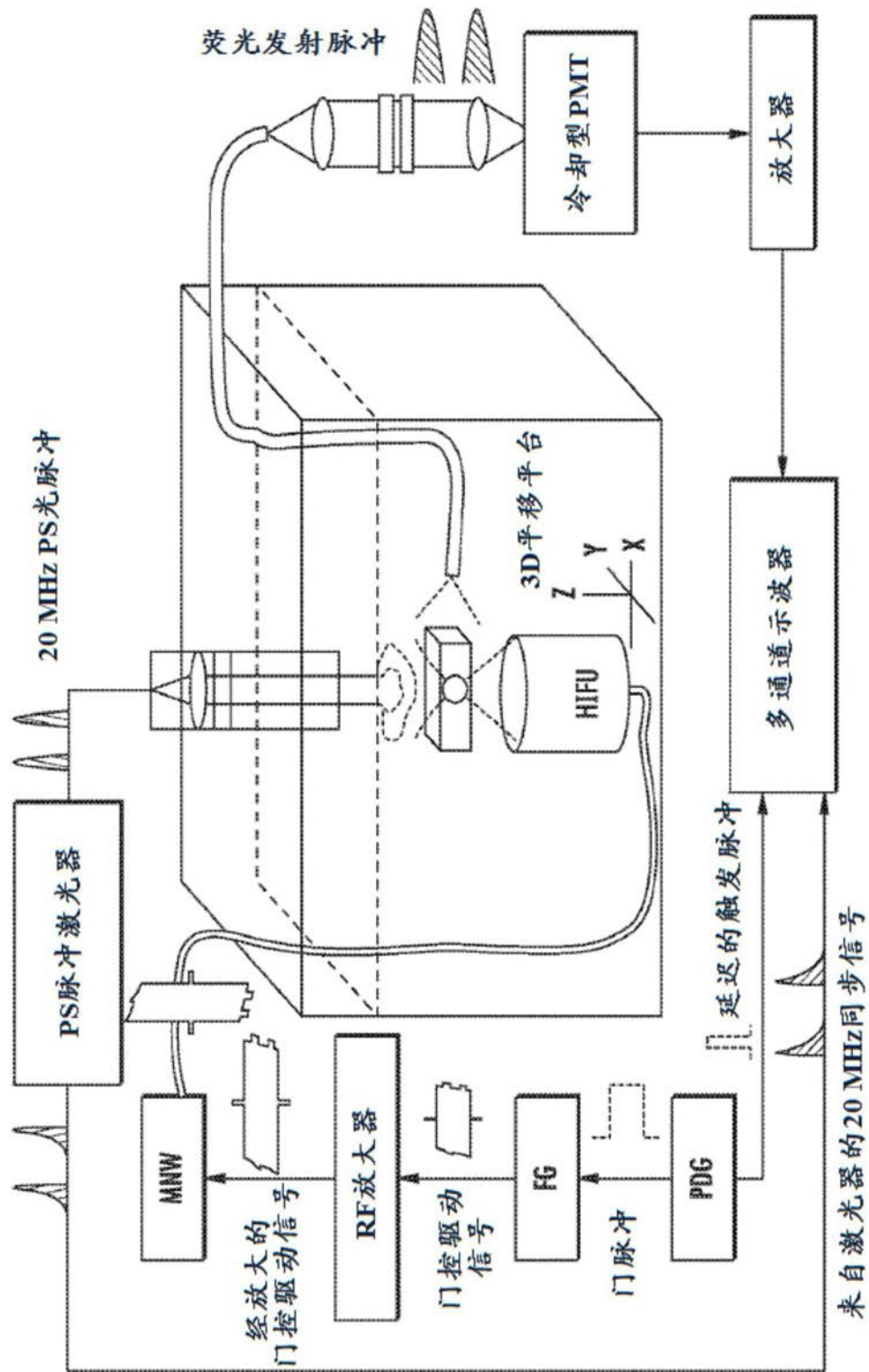


图21F

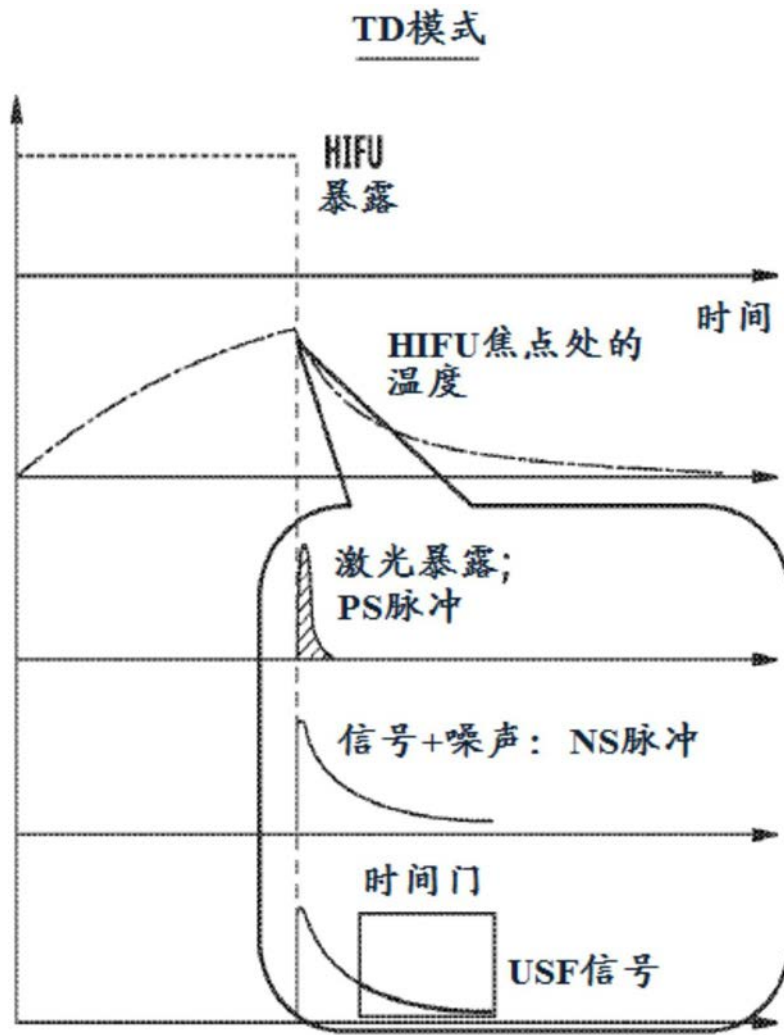


图21G

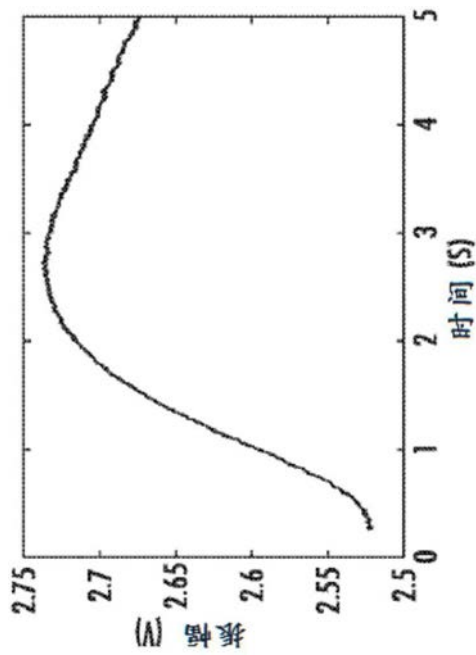


图22A

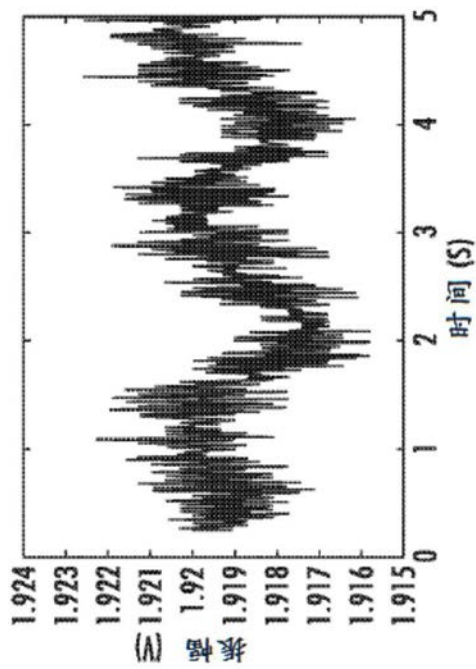


图22B

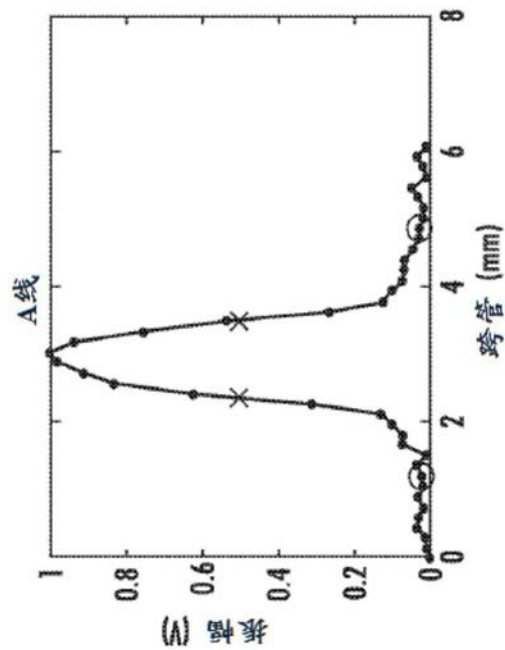


图22C

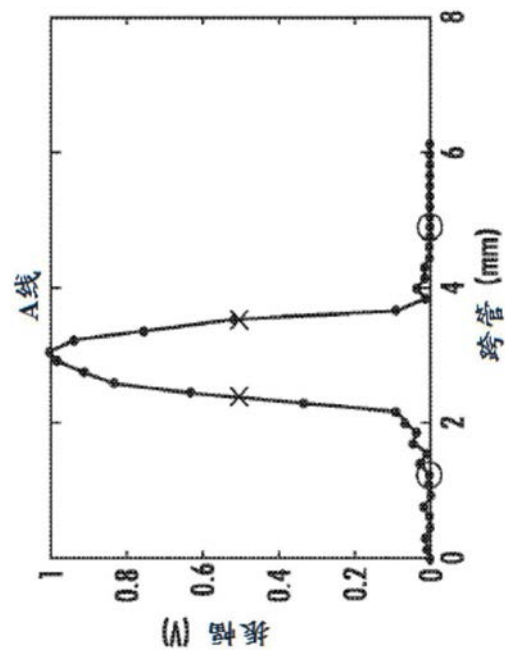


图22D

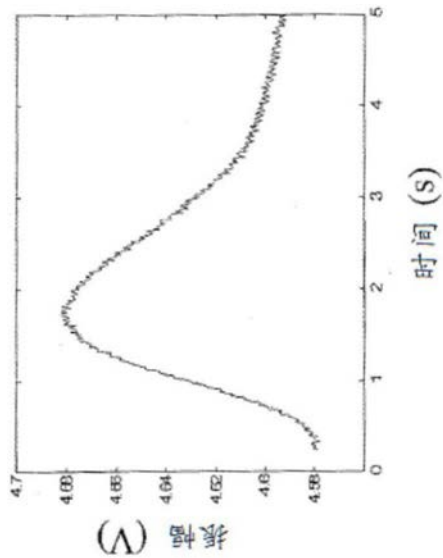


图22E

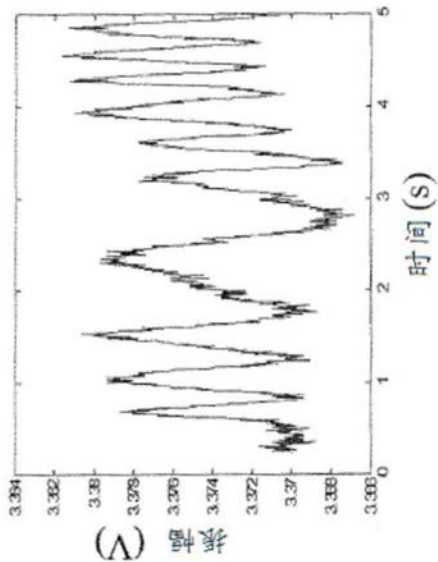


图22F

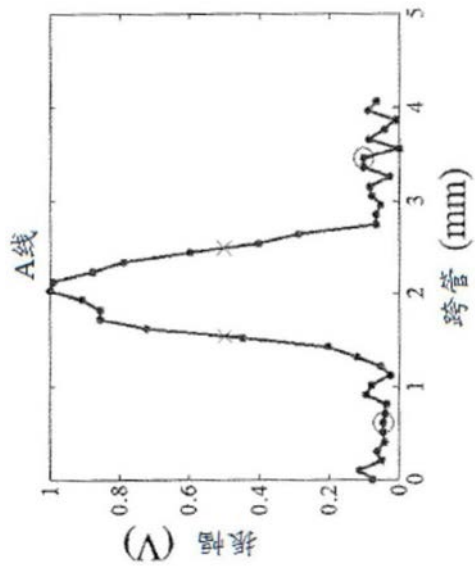


图22G

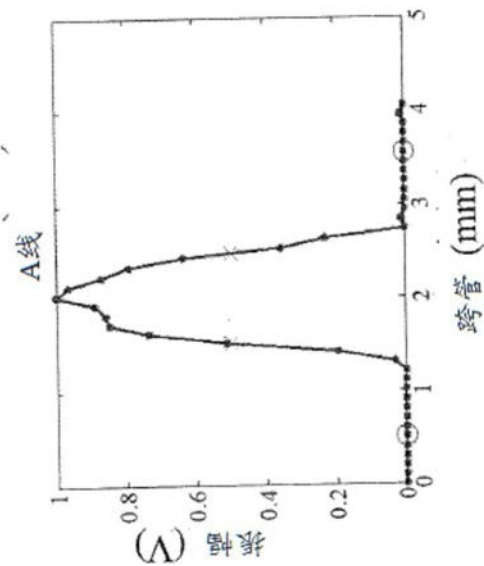


图22H

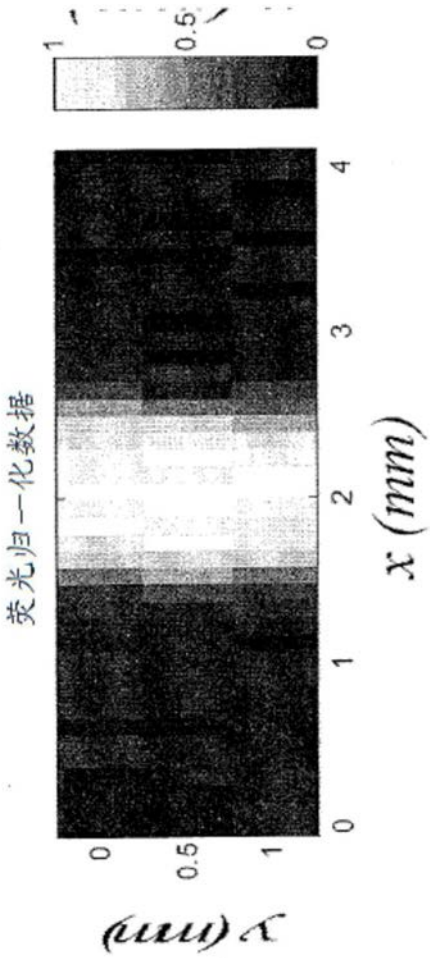


图23A

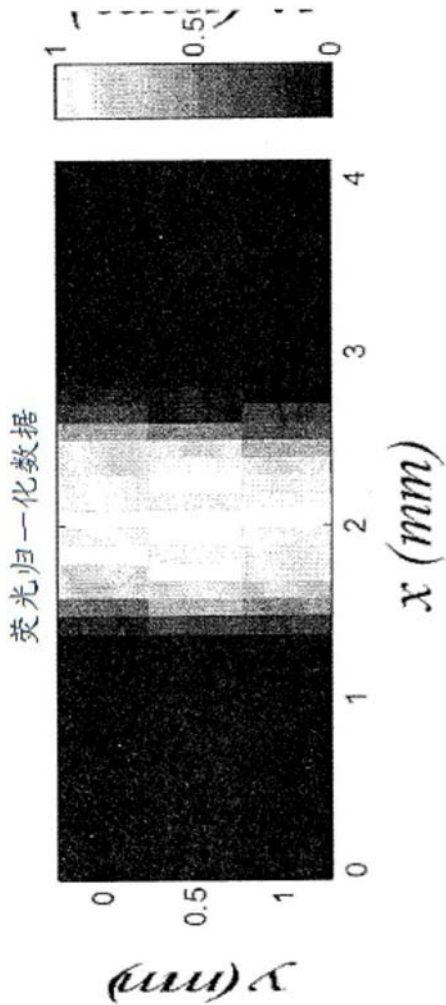


图23B

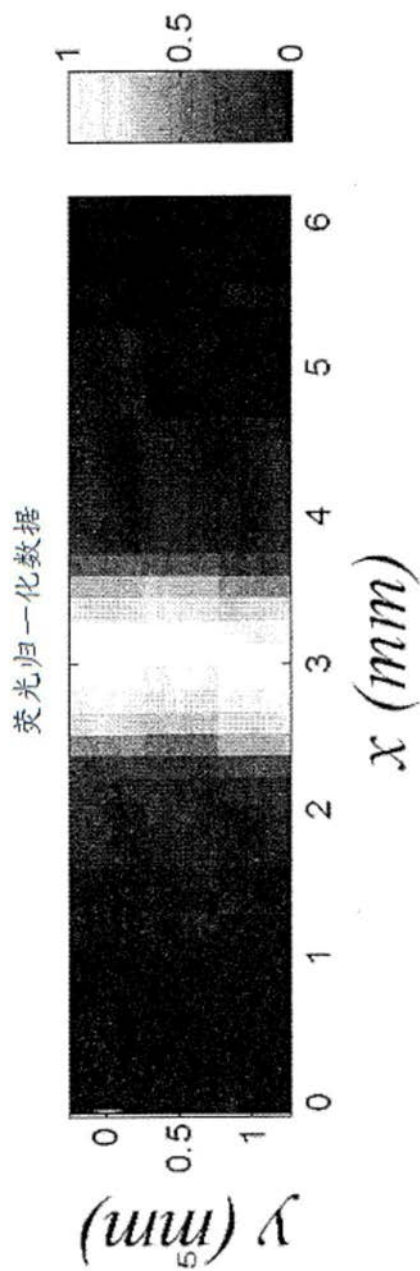


图23C

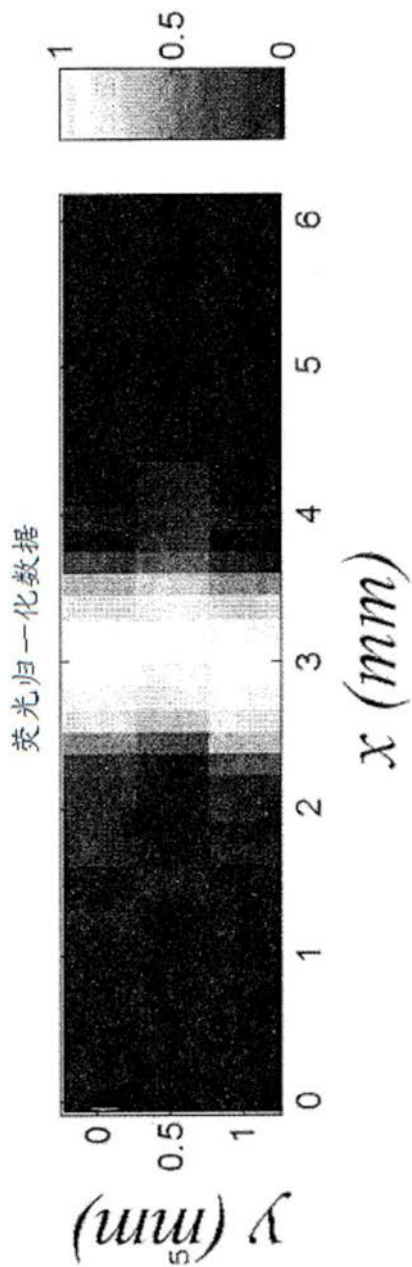


图23D

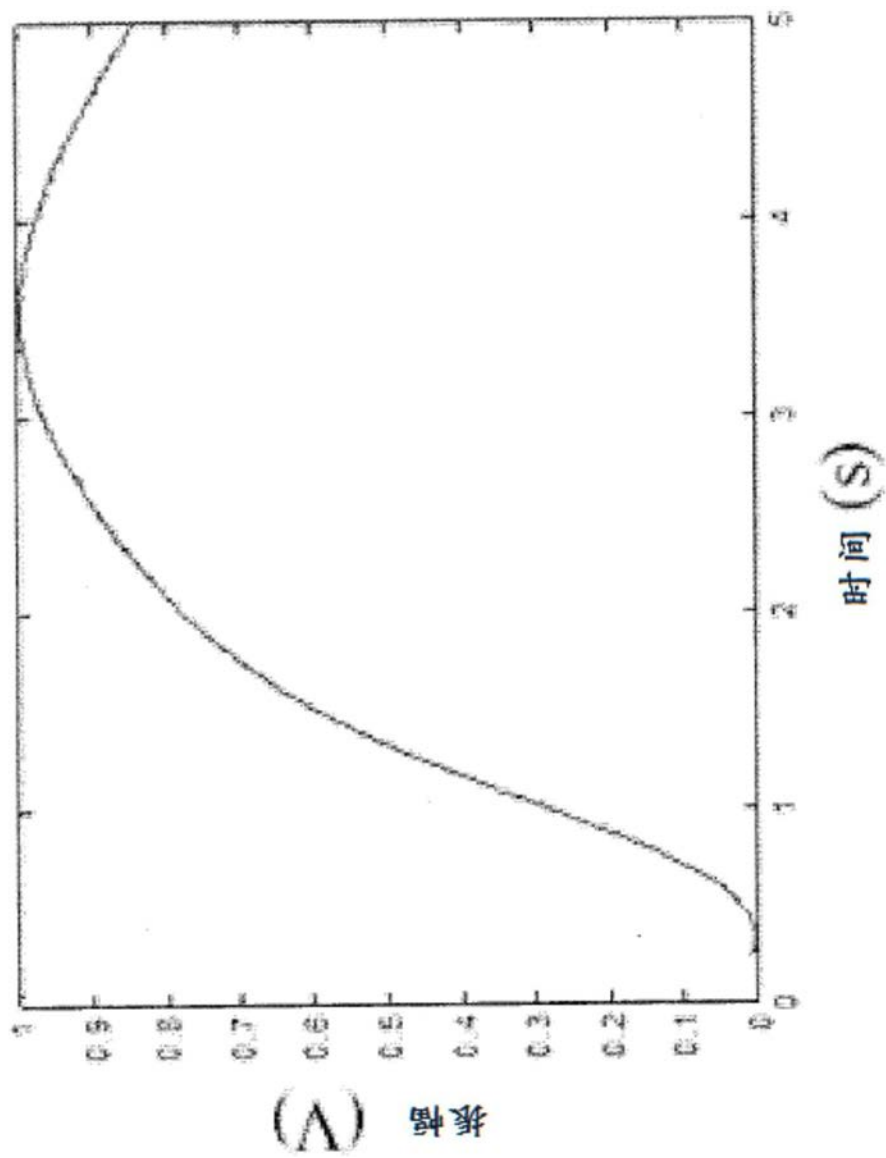


图24A

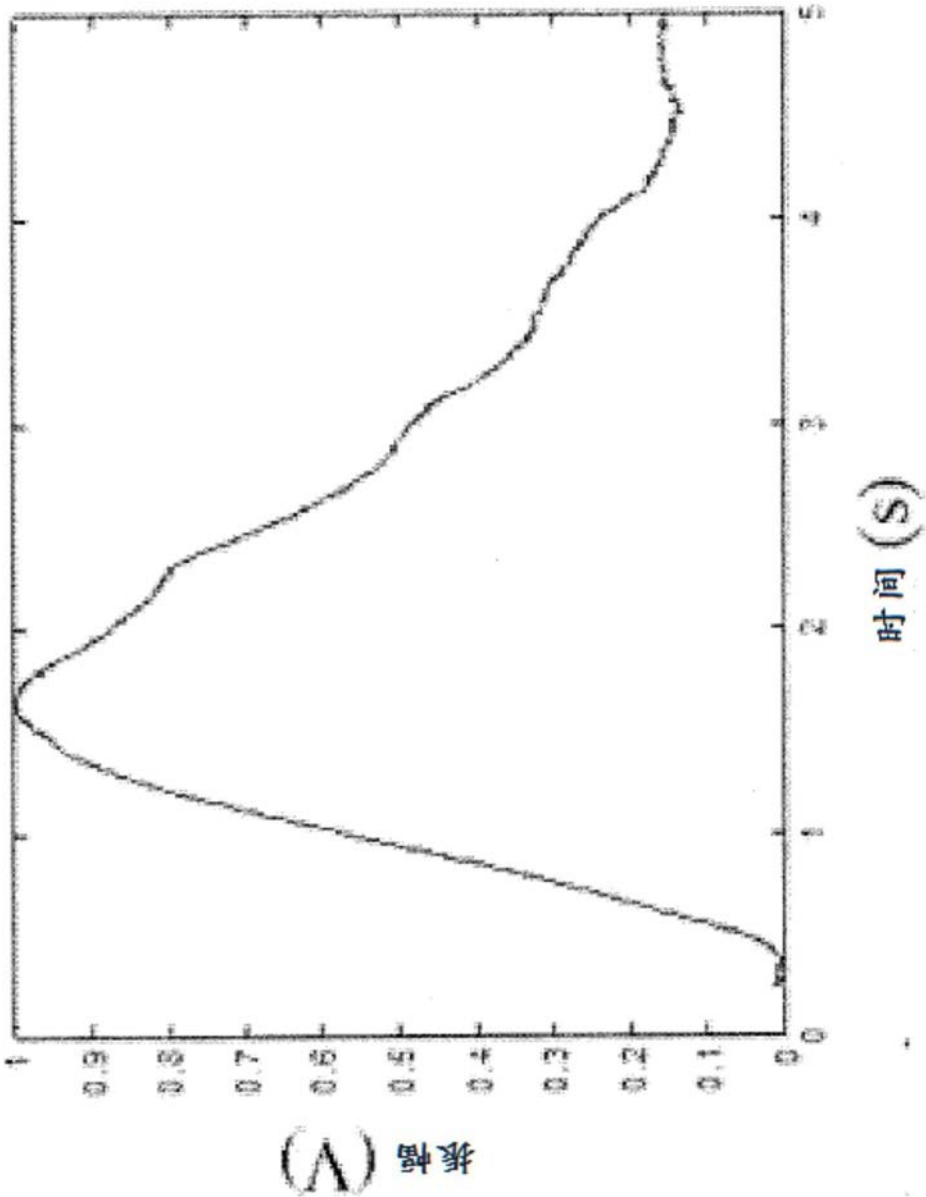


图24B

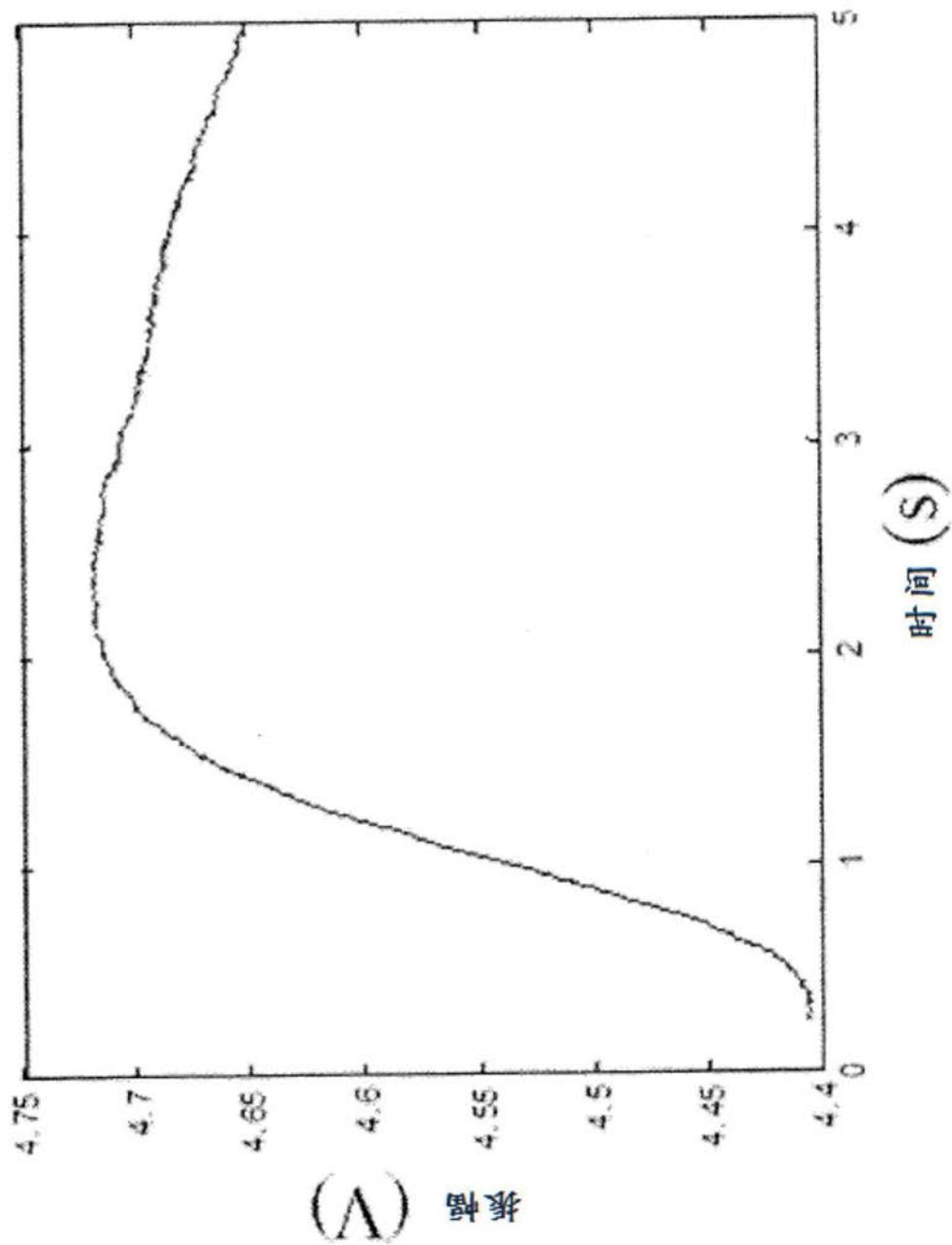


图24C

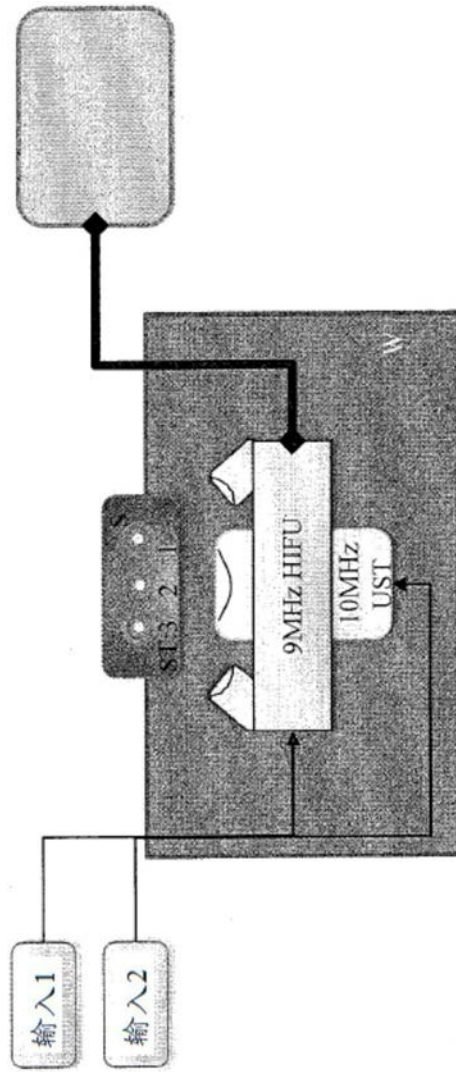


图26

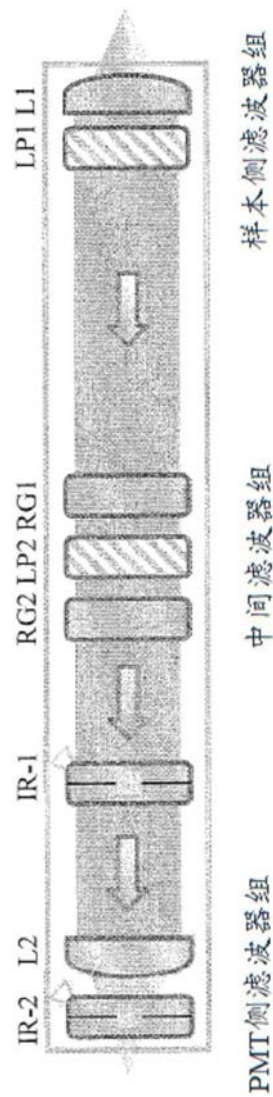


图27

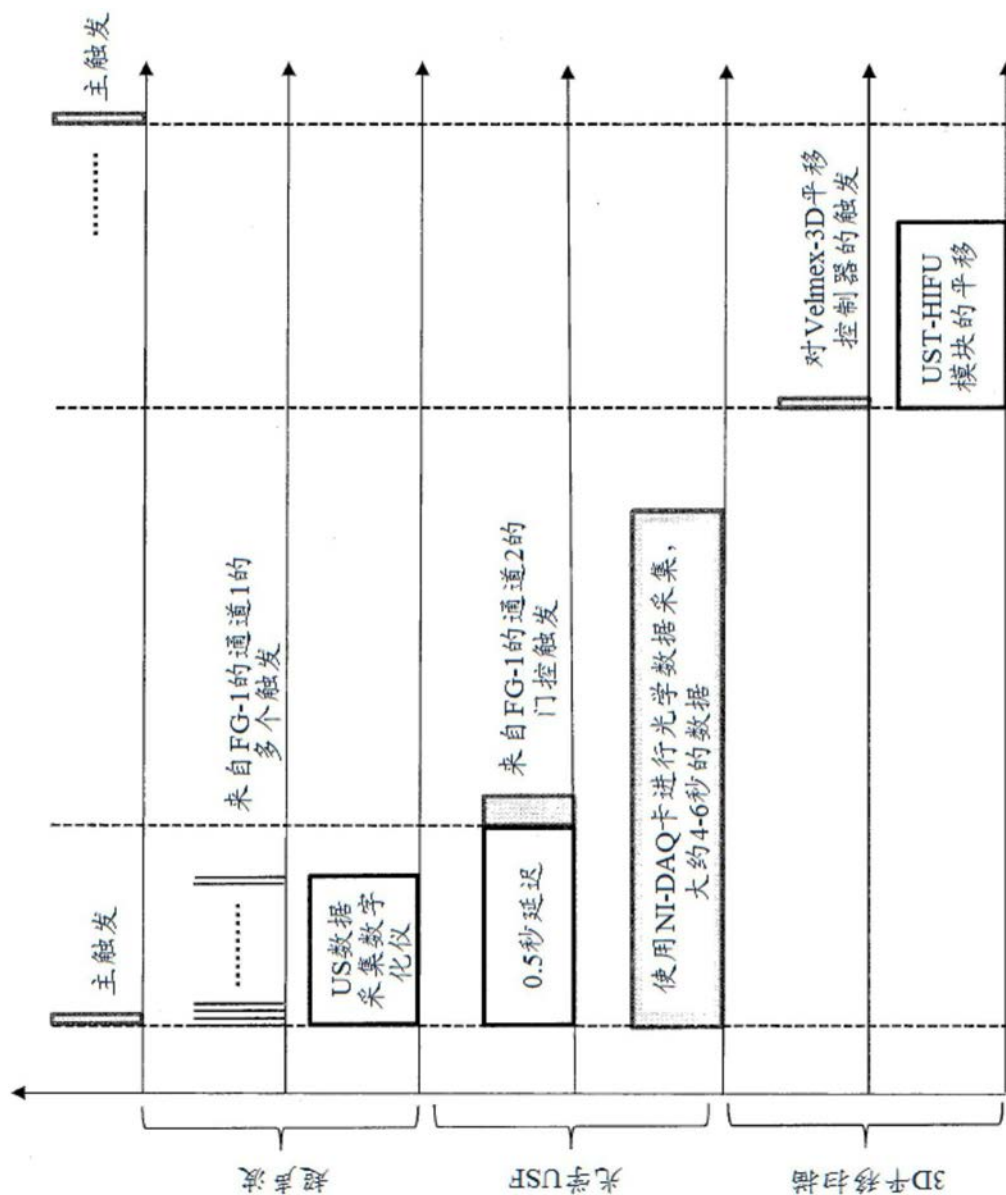


图28

专利名称(译)	用于高分辨率成像的系统和方法		
公开(公告)号	CN107430074A	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN201680019537.X	申请日	2016-02-08
申请(专利权)人(译)	德克萨斯大学系统董事会		
当前申请(专利权)人(译)	德克萨斯大学系统董事会		
[标]发明人	袁保红 程冰冰 韦明元		
发明人	袁保红 程冰冰 韦明元		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/52 A61B8/12		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/52 G01N2021/6441		
优先权	14/615993 2015-02-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

在一个方面，本文描述了成像方法。在一些实施方案中，本文所描述的成像方法包括：将超声波可切换荧光团安置在环境中；使所述环境暴露于超声波束，以在所述环境内产生激活区；将所述荧光团安置在所述激活区内，以将所述荧光团从关闭状态切换为开启状态；使所述环境暴露于一束电磁辐射，进而激发所述荧光团；在所述环境内的第一位置处检测光致发光信号，所述光致发光信号包括由所述荧光团发射的超声波荧光信号以及背景信号中的至少一者；使所述光致发光信号与参考信号相关以产生所述第一位置的相关系数；以及使所述光致发光信号乘以所述第一位置的所述相关系数，以产生所述第一位置的经修改的光致发光信号。

