(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/239058 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/748 (2015.01) *A61K 49/18* (2006.01)
A61B 8/08 (2006.01) *A61K 49/22* (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 49/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/093171

(22) 国际申请日: 2020 年 5 月 29 日 (29.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
62/853,747 2019年5月29日 (29.05.2019) US
62/853,739 2019年5月29日 (29.05.2019) US

(71) 申请人: 香 港 理 工 大 学 (**THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国香港特别行政区九龙红磡, Hong Kong (CN)。

(72) 发明人: 孙雷(**SUN, Lei**); 中国香港特别行政区九龙红磡香港理工大学生物医学工程学院, Hong Kong (CN)。 宋林(**SONG, Lin**); 中国香港特别行政区九龙红磡香港理工大学生物医学工程学院, Hong Kong (CN)。 王国浩(**WANG, Guohao**); 中国香港特别行政区九龙红磡香港理工大学生物医学工程学院, Hong Kong (CN)。 侯璇迪(**HOU, Xuandi**); 中国香港特别行政区九龙红磡香港理工大学生物医学工程学院, Hong Kong (CN)。

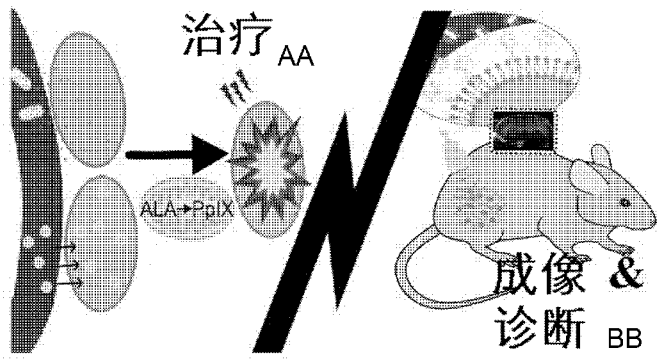
(74) 代理人: 北 京 世 峰 知 识 产 权 代 理 有 限 公 司 (**BEIJING PAT SF INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO. LTD**); 中国北京市海淀区北太平庄路 18 号城建大厦 11 层 A1110-11, Beijing 100088 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) **Title:** SURFACE MODIFIED GAS VESICLES, PREPARATION AND APPLICATIONS THEREOF

(54) 发明名称: 表面修饰气囊及其制备和应用



AA TREATMENT
BB IMAGING DIAGNOSIS

图 18

(57) **Abstract:** The present application provides surface-modified novel targeted GVs (such as PH-GV), lipid GVs and lipid targeted GVs, preparation methods therefor, and applications thereof in tumor diagnosis, imaging and treatment.

(57) 摘要: 本文提供了表面修饰的新型靶向GV(例如PH-GV)、脂质GV、脂质靶向GV、其制备方法及其在肿瘤的诊断、成像和治疗中的应用。

[见续页]

WO 2020/239058 A1

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

表面修饰气囊及其制备和应用

相关申请的交叉引用

本发明要求 2019 年 5 月 29 日提交的、申请号为 62/853,739、发明名称为“表面修饰的气囊”的美国临时专利申请；和 2019 年 5 月 29 日提交的、申请号为 62/853,747、发明名称为“生物气囊及其制备和使用方法”的美国临时专利申请的优先权，上述临时申请的全部内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

本公开涉及表面修饰的靶向 GV(例如 PH-GV)、脂质 GV、脂质靶向 GV、其制备方法及其在肿瘤的诊断、成像和治疗中的应用。

背景技术

以充气微泡作为造影剂的超声造影(CEUS)在多种疾病的诊断和管理中起着重要作用。通过将结合配体附着到微泡壳上进行表面修饰的分子靶向造影剂有助于在分子水平上使过表达的生物标志物可视化并且显著地提高成像灵敏度和特异性。由于微泡的直径为几微米，因此其仅保留在血管腔隙内。这种特性使其特别适合于使在肿瘤新血管系统上表达的分子标志物可视化。

虽然微泡在成像和治疗上的应用均已显示出令人鼓舞的结果，但其在生物医学中的潜在应用受到了其较大流体动力学尺寸(1-8 μm)的限制，因为较大流体动力学尺寸阻碍了其在静脉注射后向周围非血管组织的渗透。此外，这些微泡的气体内容物会迅速扩散到周围介质中，导致半衰期非常短(<20 分钟)。

最近的研究已证实，粒径小于 1000 nm 的纳米级超声造影剂表现出以下优点：分子量小、渗透力强和稳定性高。这种类型的造影剂包括碳氟乳液纳米滴、纳米气泡和纳米粒子。由于其纳米级尺寸，因此它们可以克服上述局限性，能够穿过肿瘤的渗漏

的有缺陷的血管系统，同时由于增强的渗透性和滞留(Enhanced Permeability and Retention，EPR)效应，它们也能够停留在健康组织的血管系统中。作为诊断成像的补充，这些纳米级超声造影剂具有作为活性药物载体进行局部药物递送的潜力，并且，由于对血管系统和细胞膜的渗透性的瞬时增加，纳米级超声造影剂还能够以空间和时间特异性的方式主动触发药物释放。尽管纳米级超声造影剂具有吸引人的益处，但将其用于诊断目的的临床转化并未取得很大的成功。纳米级超声造影剂的低气体密度和低对比度噪声比不允许在超声下以诊断频率进行高对比度成像。

最新报道的从浮游光合微生物中分离出来的气囊(gas vesicle，GV)作为一种新型超声成像纳米级造影剂具有巨大的潜力。GV 在皮摩尔浓度的频率范围内产生强烈的超声造影，表现出谐波散射，因此能够增强体内相对于背景的检测。GV 的非线性振荡会生成入射超声的谐波，该谐波可以被特异性地检测，以进一步增强对比度噪声比，从而提高灵敏度和特异性。GV 的宽度为 45-250 nm 并且长度为 200-600 nm，因此能够通过 EPR 效应进入组织间隙。与传统的超声造影剂不同(传统的超声造影剂会以不稳定的配置捕获预装气体)，GV 的 2 nm 厚的蛋白质壳排斥水，但容许气体从周围介质自由地扩散进出，从而使其在物理上稳定而不受其纳米尺寸的影响。此外，现有技术对 GV 进行基因工程改造可以设计出具有新的机械、声学、表面和功能特性的基于 GV 的造影剂，从而能够实现谐波、多路复用(multiplexed)和多模态超声成像以及细胞特异性分子靶向。由于具有上述优势，因此 GV 是超声(US)分子成像和癌症进一步治疗的非常有前途的纳米粒子。

然而，与其它纳米粒子相似，在静脉内施用后，大多数 GV 在非靶向组织(诸如，肝脏、脾脏和肺)中被摄取。现有发现认为网状内皮组织系统(reticuloendothelial system，RES)去除了 84%的天然 GV，这是由于吞噬细胞的捕获和 GV 在胆道系统中的破碎，因此在注射后 2 分钟的血液中没有 GV 残留。这限制了天然 GV 在肿瘤分子成像中的应用，因为 GV 的循环时间不会长到足以渗入到目标组织中的程度。此外，其不具有被特异性地内化到靶细胞中的能力，从而导致在细胞外相中释放大量的造影剂，这将进一步降低其成像和治疗的效率。因此，为了将 GV 转化为新型 US 分子成像剂，应将进一步的研究工作集中在改善 GV 的药代动力学特性上。

长期以来，肿瘤缺氧已被认为是肿瘤学中的关键问题。病理性缺氧可以引起肿瘤细胞内的蛋白质组变化和基因组变化以及肿瘤微环境的变化。这些变化可能会更改肿

瘤细胞的局部代谢并激活有助于肿瘤进展的适应性细胞反应。而且，缺氧的存在使实体瘤对放射疗法和化学疗法更具有抵抗力，从而导致患者的存活率较低。鉴于缺氧在肿瘤进展和抵抗癌症治疗中的作用，人们开始考虑为肿瘤组织供氧是否可以防止癌症生长和发展。已证明肿瘤氧合能够通过增加细胞敏感性来显著改善化学疗法和放射疗法并有助于克服对化学疗法和放射疗法的抗性。一些研究还暗示，肿瘤氧合与减少的细胞增殖、血管生成和转移有关，并且氧合在某些肿瘤亚型中可能具有肿瘤抑制效果。缺氧肿瘤微环境的变化可降低 HIF-1α 的表达，因而减弱缺氧驱动的途径。此外，据报道，肿瘤中的氧合作用在表观遗传程序化中起作用。在氧合后，可以重新编程几个缺氧相关基因和肿瘤抑制基因。这意味着氧合不仅可以作为癌症治疗的佐剂，而且具有逆转由缺氧引起的肿瘤部位蛋白质组变化和基因组变化的潜力。

考虑到氧气在肿瘤进展和对治疗的抗性方面具有重要作用，因此肿瘤氧合已被认为是抗癌治疗的辅助手段。高压氧(hyperbaric oxygen，HBO)疗法是治疗缺氧相关疾病的公认方法。HBO 疗法可以有效提高肿瘤部位的含氧量，并且可以改善化学疗法和放射疗法的结果，但其仍面临费用高、患者体验不佳等局限性。此外，氧不能在缺氧肿瘤的深处输送，这在某些情况下可损害临床效果。由于 HBO 疗法的局限性，科学家已试图开发出可以将大量氧气运送到肿瘤的氧气载体。人工红细胞(artificial red blood cell，RBC)替代品(诸如，全氟化碳(PFC)乳液和无细胞血红蛋白基氧气载体(HBOC))已作为第一代氧气载体被开发。尽管如此，大多数产品仍无法达到足够的循环半衰期，也无法维持生理组织氧合作用。近来，随着新型含氧微粒的发展，纳米粒子成为一种合适的载体来到达感兴趣的组织并有效地输送氧气。

对于氧气载体，基于脂质的微泡由于其良好的生物相容性和生物降解性而优选用于医学应用。微泡能够携带大量氧气，并且可以与超声结合使用以用于定位控制(site-controlled)氧气释放。充氧微泡已被证明能够改变体内缺氧微环境并增强化学疗法和放射疗法的结果。充氧微泡的进一步发展仍面临一些挑战和局限性。首先，充氧微泡在进入循环系统时可能会遇到稳定性问题(诸如，溶解和聚结)，并且这与更大的产物损失有关，后者可能导致活性氧(reactive oxygen species，ROS)的过量产生。此外，微泡由于其尺寸限制而无法通过血管系统，如果与药物输送结合，则可能会损害其效果。

光动力疗法(photodynamic therapy，PDT)已成为一种用于癌症治疗的成功临床治

疗方法，其已经获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准。PDT 依赖于光敏剂和对应光之间的协同相互作用。这两种元素分别是无毒的，但是当其一起工作时，则可以引发化学反应并实现肿瘤细胞凋亡。光敏剂可以通过血液循环选择性地进入肿瘤部位，并且当被适当激活波长的光激发时，会产生大量的 ROS。ROS(尤其是单线态氧自由基)被认为是导致癌细胞坏死和凋亡的原因。除了产生 ROS 来直接杀死癌细胞外，PDT 还可以在治疗后引起针对癌细胞的免疫反应，以及通过与癌症相关的血管系统损害切断营养供应来抑制肿瘤生长。由于具有公认的安全性、选择性和可重复性的优点，PDT 不仅被应用于皮肤病学领域，而且还用作治疗肺、呼吸道和泌尿道肿瘤的辅助疗法。在 PDT 治疗期间，氧气的可用性可能是疗效的限制因素，因为 ROS 的产生取决于氧气的浓度。然而，癌组织经常表现出缺氧的情况，这通常限制了 PDT 的有效性。因此，提高肿瘤部位的氧浓度是增强 PDT 疗效的良好策略。充氧微泡已用于增强 PDT，并且其疗效已在体外和体内得到认可。例如，已有的研究证明，在 PDT 期间微泡的存在可导致产生更多的单线态氧并增强细胞凋亡。这意味着充氧微泡与光敏剂一起可导致增强的细胞毒性。然而，由于稳定性的限制和相对较大的尺寸，充氧微泡的应用受到了限制。

与传统的癌症疗法(诸如，手术、化学疗法和放射疗法)相比，声动力疗法(sonodynamic therapy，SDT)在与癌症的持久战中已成为一种有前景的非侵入性治疗方法。SDT 是一种超声疗法，在这种疗法中，通过施用声敏剂来提高超声对肿瘤的细胞毒性效应，同时使正常组织保持完好无损。SDT 的概念与成熟的光动力疗法(PDT)非常相似，后者使用激光来激活光敏剂以产生毒性。与 PDT(其由于激光的有限穿透力而仅限于体表肿瘤应用)相比，SDT 具有能够治疗深层癌的优势，因为超声可以在三维空间中集中于深入组织内的单个点。SDT 对癌症治疗的效果已在体外和体内得到了广泛证明。在声场的存在下，ROS 的生成是造成 SDT 的细胞毒性作用的原因。超声引起的空化(cavitation)被认为与超声和敏化剂生成 ROS 的相互作用有关。空化是水性环境中气泡与超声的相互作用的表现。空化包括充气泡的成核、生长和内爆破碎的过程。惯性空化(在此期间，气泡在液体介质中迅速膨胀并猛地破裂)与 ROS 的过量产生密切相关。因此，在 SDT 的治疗应用中，微泡已被用作人工核以增强超声触发的惯性空化。微泡的添加可以降低空化阈值，从而增强 ROS 的产生和细胞毒性。然而，微泡在 SDT 疗法中的应用同样受限于其稳定性差和相对较大的尺寸。

因此，为了克服现有技术中癌症和其它一些疾病的诊断和治疗中存在的问题，亟需开发一种具有改善的药代动力学特性的新型 GV，以提高肿瘤疾病诊断的精确性和治疗效果。

发明内容

为了解决现有技术中存在的问题，本发明提供了表面修饰的新型靶向 GV(例如 PH-GV)、脂质 GV、脂质靶向 GV、其制备方法及其应用。

本发明的第一方面提供了一种经表面修饰而能够特异性靶向肿瘤部位的靶向 GV。本发明的靶向 GV 是表面被生物相容性材料(例如聚乙二醇(PEG)、壳聚糖、聚氨基酯、聚乳酸、聚烯烃、聚砜、聚碳酸酯、聚丙烯腈等或其任意组合)和/或生物靶向材料(例如透明质酸(HA)、RGD 肽、叶酸、半乳糖、葡萄糖等或其任意组合)修饰的 GV。在一些实施方案中，本发明中所使用的 PEG 的分子量为约 5000 Da。所述靶向 GV 是表面被 PEG 和/或 HA 修饰的 GV，优选表面被 PEG 和 HA 修饰的 GV (PH-GV)。

在一些实施方案中，本发明的靶向 GV 例如 PH-GV 为圆柱状，其粒径约为 400 nm。根据动态光散射(DLS)方法测定，所述靶向 GV 的粒径约为 375-425 nm，且 ζ 电位为约-23 至-31 mV。

本发明的第二方面提供了一种造影剂或诊断剂，其含有本发明第一方面所述的靶向 GV 例如 PH-GV。在一些实施方案中，所述靶向 GV 在造影剂中的浓度为约 250 pM-1 nM。

本发明的第三方面提供了一种诊断用试剂盒，其含有本发明第二方面所述的造影剂或诊断剂，以及任选地使用说明书。

在一些实施方案中，本发明第一方面所述的靶向 GV、第二方面所述的造影剂或诊断剂以及第三方面所述的试剂盒可用于诊断疾病例如癌症。所述靶向 GV 或造影剂可用于使肿瘤成像，从而诊断癌症的存在或不存在。因此，本发明还提供了第一方面所述的靶向 GV 或第二方面所述的造影剂或诊断剂在制备用于诊断疾病例如癌症的诊断剂或诊断试剂盒中的用途。本发明还提供了所述靶向 GV 或造影剂在制备用于使肿瘤成像的诊断试剂或试剂盒中的用途。

本发明的第四方面提供了一种诊断方法，所述方法包括使用本发明第一方面所述的靶向 GV、第二方面所述的造影剂或诊断剂或第三方面所述的试剂盒来诊断受试者中癌症的存在或不存在。在一些实施方案中，所述诊断包括将所述靶向 GV、造影剂或诊断剂施用于所述受试者或者将所述试剂盒应用于所述受试者。所述诊断方法还包括对所述受试者进行超声成像，从而确定癌症的存在或不存在。

本发明的靶向 GV 还可用作药物载体。因此，本发明的第五方面提供了一种药物载体，其含有本发明第一方面所述的靶向 GV 例如 PH-GV，或由其组成。在一些实施方案中，本发明所述的药物载体还包含用于治疗待治疗疾病例如癌症的药物。例如所述药物可以通过各种方式与所述药物载体连接在一起，从而通过施用药物载体将所述药物递送到体内的目标部位。将药物载体与药物连接在一起的方法以及用于治疗特定疾病例如癌症的药物均是本领域技术人员熟知的。因此，本发明的药物载体还可用于治疗疾病例如癌症。

本发明的第六方面提供了一种使用第五方面所述的药物载体治疗受试者的疾病例如癌症的方法，包括将所述药物载体施用于所述受试者。在一些实施方案中，所述方法还包括在将所述药物载体施用于所述受试者之前，将所述药物载体与用于治疗所述疾病例如癌症的药物连接在一起的步骤。

在本发明的上述方面中，所述肿瘤或癌症例如是 CD44 高表达型肿瘤，包括但不限于膀胱癌、肺癌、肾癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤等。

本发明的第七方面提供了一种靶向 GV 的制备方法，包括步骤：(a) 将生物靶向材料与 GV 连接在一起，例如通过共价缀合将生物靶向材料例如 HA 固定至 GV 的蛋白质壳。在一些实施方案中，所述方法还包括步骤(b) 将生物相容性材料与步骤(a)的产物连接在一起，例如通过酰胺形成将生物相容性材料例如 PEG 化学缀合至步骤(a)的产物。

在一些实施方案中，所述步骤(a)包括：(a1)将生物靶向材料例如 HA 与磷酸盐例如磷酸钠混合形成溶液；(a2)将 GV 溶解在磷酸盐例如磷酸钠溶液中；(a3)将 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到步骤(a1)的溶液中(优选 pH=7.4)；以及(a4)向步骤(a3)的混合物中加入步骤(a2)的溶液，从而形成靶向材料-GV(例如 H-GV)缀合物。

在一些实施方案中，所述步骤(b)包括：(b1)将靶向材料-GV 缀合物(例如来自上述步骤(a)的 H-GV 缀合物)溶解在磷酸盐缓冲液(PBS)中，并使其与 PBS 中的 EDC 和甲醇中的 NHS 混合；以及(b2)向步骤(b1)的混合物中加入生物相容性材料例如单甲氧基 PEG-胺，从而得到 PH-GV。

本发明的第八方面提供了一种表面被脂质分子修饰的脂质 GV。在一些实施方案中，所述脂质分子是二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、PEG、DSPE、聚乙烯醇(PVA)、甘油、甘油酯、脂肪酸、磷脂或其任意组合，优选地，所述脂质 GV 是表面经 DSPE-PEG 和 DOPC 修饰的脂质 GV。在一些实施方案中，本发明的脂质 GV 为圆柱状，其粒径可以为例如约 290-330 nm，例如约 300-330 nm，约 310-330 nm。根据动态光散射(DLS)方法测定，所述脂质 GV 的 ζ 电位为约-21.3 至-19.3 mV。本发明的脂质 GV 本身在脂质分子膜内包封有一定的气体例如空气、氧气，但可以将其设计成包封/装载/携带特定的目标气体，例如治疗性目标气体，例如氧气、一氧化氮(NO)、氢气等。因此，本发明的脂质 GV 可用作向受试者体内输送治疗性气体的载体，在这种情况下，目标气体可被脂质分子包封在 GV 的蛋白质壳内。

因此，本发明的第九方面提供了一种充气的脂质 GV，其包括本发明第八方面所述的脂质 GV 和气体，例如所述气体可以是任何气体种类，例如治疗性气体。所述气体被填充在 GV 的蛋白质壳中并被所述脂质分子包封。本发明所述的治疗性气体包括本领域已知的有助于治疗、缓解、减轻疾病或疾病症状或抑制其进展的任何气体，包括但不限于：氧气、NO、氢气等，优选氧气。因此，本发明所述的充气脂质 GV 包括但不限于充氧脂质 GV、充 NO 脂质 GV、充氢脂质 GV 等，优选充氧脂质 GV。

本发明的第十方面提供了一种治疗剂，其包含本发明第八方面所述的脂质 GV 或第九方面所述的充气脂质 GV 或由其组成。

本发明的第十一方面提供了一种造影剂或诊断剂，其包含本发明第八方面所述的脂质 GV 或第九方面所述的充气脂质 GV 或由其组成。

本发明的第十二方面提供了一种试剂盒，其包括本发明第八方面所述的脂质 GV、第九方面所述的充气脂质 GV、第十方面所述的治疗剂或第十一方面所述的造影剂或诊断剂，以及任选地使用说明书。

本发明的脂质 GV、充气脂质 GV、造影剂或诊断剂、治疗剂或试剂盒均可用于诊断或治疗疾病，例如缺氧性疾病例如癌症。因此，本发明还提供了第八方面所述的脂质 GV 或第九方面的充气脂质 GV(例如充氧脂质 GV)或第十方面所述治疗剂在制备用于治疗受试者中的疾病例如癌症的药物中的用途。本发明还提供了第八方面所述的脂质 GV 或第九方面的充气脂质 GV(例如充氧脂质 GV)或第十一方面所述的造影剂或诊断剂在制备用于诊断受试者中的疾病例如癌症的诊断试剂中的用途。本发明还提供了第八方面所述的脂质 GV 或第九方面的充气脂质 GV(例如充氧脂质 GV)或第十一方面所述的造影剂在制备用于使受试者的肿瘤成像的诊断试剂中的用途。当将所述脂质 GV、充气脂质 GV 或造影剂用于诊断疾病或使肿瘤成像的用途时，还包括对受试者应用超声造影，以确定癌症的存在或不存在。在一些实施方案中，所述药物可以与第二治疗剂例如其它癌症治疗药物或癌症治疗方法联合，以治疗癌症。在一些实施方案中，所述癌症治疗方法是例如化学疗法、放射疗法，优选 PDT 或 SDT。所述其它癌症治疗药物可以是本领域技术人员熟知的用于治疗各种癌症的药物。

本发明的第十三方面提供了一种治疗受试者中的疾病例如癌症的方法，包括向所述受试者施用第八方面的脂质 GV 或第九方面的充气脂质 GV(例如充氧脂质 GV)或第十方面的治疗剂或将第十二方面所述的试剂盒应用于所述受试者。在一些实施方案中，所述方法还包括，在将所述脂质 GV 或充气脂质 GV 或治疗剂施用给受试者后(例如施用后 1min、5min、10min、15 min、30 min、1h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、甚至 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天或 7 天，以及上述数值之间的任何时间点)，向所述受试者施用第二治疗剂或疗法，例如其它癌症治疗药物或癌症治疗方法(例如化学疗法、放射疗法，优选 PDT 或 SDT)的步骤。所述其它癌症治疗药物可以是本领域技术人员熟知的用于治疗各种癌症的药物。在一些实施方案中，所述方法还包括，在将所述脂质 GV 或充气脂质 GV 或治疗剂施用给受试者后并在应用其它癌症治疗药物或癌症治疗方法之前，向所述受试者应用超声波，从而将所述脂质 GV 或充氧脂质 GV 破坏，使其中的气体释放出来。

本发明还包括一种载体，其包含上述脂质 GV 或充气脂质 GV(例如充氧脂质 GV)或由其组成。所述载体还可以包含用于治疗疾病例如癌症的药物(例如本领域已知的用于治疗癌症的药物)或气体例如任何治疗性气体(例如上文所定义的治疗性气体)。本发明上述方面所述的癌症可以是任何会导致缺氧状态的肿瘤，例如乳腺癌，膀胱癌、

肺癌、肾癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、黑色素瘤等。

本发明的第十四方面提供了一种脂质 GV 的制备方法，包括以下步骤：(a)将脂质分子或脂质分子的混合物溶于氯仿中，并使其干燥；(b)向步骤(a)的产物中加入 HEPES 缓冲液(优选 pH=7.2)并搅拌，形成浑浊溶液；以及(c) 将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中，从而形成脂质 GV。在一些实施方案中，所述 GV 溶液是 GV 的 PBS 溶液。在一些实施方案中，步骤(a)中的所述脂质分子为 DSPE-PEG 和 DOPC 的混合物。在一些实施方案中，所述步骤(b)还包括对形成的溶液进行超声处理。在一些实施方案中，所述步骤(c)还包括向溶液中加入 HEPES 缓冲液，并温育过夜。

本发明的第十五方面提供了一种充气脂质 GV 的制备方法，该方法与本发明第十四方面的方法类似，不同之处在于步骤(c)包括：在将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中之前，向所述 GV 溶液中充气(例如氧气)直至饱和。

本发明的第十六方面提供了一种脂质靶向 GV，其表面被脂质分子和生物靶向材料(以及任选地，生物相容性材料)修饰。例如，所述脂质分子选自以下中的一种或多种：DSPE-PEG、DOPC、PEG、DSPE、PVA、甘油、甘油酯、脂肪酸、磷脂；所述生物靶向材料选自以下中的一种或多种：HA、RGD 肽、叶酸、半乳糖、葡萄糖；以及，任选地，所述生物相容性材料选自以下中的一种或多种：PEG、壳聚糖、聚氨基酯、聚乳酸、聚烯烃、聚砜、聚碳酸酯、聚丙烯腈。优选的，所述脂质靶向 GV 的表面通过 DSPE-PEG、DOPC 和 HA 进行修饰，更优选地，所述脂质靶向 GV 的表面被 DSPE-PEG、DOPC、HA 和 PEG 修饰。进一步的，本发明还提供了一种充气脂质靶向 GV，其包括本发明所述的脂质靶向 GV 和气体，例如所述气体可以是任何气体种类，例如治疗性气体。所述气体被填充在 GV 的蛋白质壳中并被所述脂质分子包封。本发明所述的治疗性气体包括本领域已知的有助于治疗、缓解、减轻疾病或疾病症状或抑制其进展的任何气体，包括但不限于：氧气、NO、氢气等，优选氧气。本发明所述的脂质靶向 GV 或充气(例如充氧)脂质靶向 GV 可作癌症治疗剂、诊断剂、造影剂和药物载体。因此，本发明还提供了本发明所述的脂质靶向 GV 或充气脂质靶向 GV 在制备用于治癌症的药物中的用途、或制备用于诊断癌症的诊断试剂中的用途。本发明所述的脂质靶向 GV 或充气脂质靶向 GV 也可以与本发明上面定义的其它癌症治疗方法或癌症治疗药物联合应用。所述癌症可以是本文上面定义的癌症。

本发明的第十七方面提供了一种脂质靶向 GV 的制备方法，其与本发明第十四方

面所述的方法类似，不同之处在于在步骤(c)包括：在将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中之前，将生物靶向材料如 HA 与 GV 连接在一起。

本发明的第十八方面提供了一种充气脂质靶向 GV 的制备方法，其与本发明第十五方面所述的方法类似，不同之处在于在步骤(c)包括：在向所述 GV 溶液中充气(例如氧气)之前，将生物靶向材料如 HA 与 GV 连接在一起。

本发明的第十九方面提供了一种药物组合物，其包含本发明任何方面的靶向 GV、脂质 GV、充气 GV、靶向脂质 GV 或充气靶向脂质 GV。

本发明还提供了使用本发明任何方面的靶向 GV、脂质 GV、充气 GV、靶向脂质 GV、充气靶向脂质 GV 或药物组合物治疗受试者的癌症的方法。本发明还提供了本发明任何方面的靶向 GV、脂质 GV、充气 GV、靶向脂质 GV、充气靶向脂质 GV 或药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途；或者其与第二治疗剂或疗法在制备用于治疗受试者中的癌症的药物组合中的用途。本发明的靶向 GV、脂质 GV、充气 GV、靶向脂质 GV 或充气靶向脂质 GV 还可用作诊断剂、造影剂、治疗剂或药物载体。在一些实施方案中，所述方法包括向所述受试者施用上述 GV 或药物组合物，然后向所述受试者施用第二治疗剂或疗法例如其它癌症治疗药物或癌症治疗方法；可选地，所述方法还包括在施用第二治疗剂或疗法之前向所述受试者应用超声波。在一些实施方案中，所述药物组合以如下方式实施：向所述受试者施用上述 GV 或药物组合物，然后向所述受试者施用第二治疗剂或疗法例如其它癌症治疗药物或癌症治疗方法；以及可选地，在施用第二治疗剂或疗法之前向所述受试者应用超声波。所述其它癌症治疗药物或癌症治疗方法如上文所定义，且所述癌症如上文所定义。

在本发明的任何方面，所述受试者可以是人类、非人灵长类动物、哺乳动物、啮齿动物等，优选人类。

附图说明

应理解，本文描述的附图仅用于示例目的。附图不一定按比例绘制，重点在于阐释本发明所教导的原理。附图不意味着以任何方式限制本发明的范围。

图 1 描绘了天然 GV 和脂质 GV 的形态、粒径分布和 ζ 电位。(A) 1nM GV 的图像。(B) GV 的 TEM 图像，示出了其形态(图像是代表性的)。比例尺，100 nm。(C)

GV 的粒径分布和 ζ 电位统计。(D)两个 GV 组的相对粒径分布。(E)通过测量其浓度，观察 GV 组在 6 个月内的稳定性。(F)通过测量其尺寸，观察 GV 组在 6 个月内的稳定性。(E)和(F)中的数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。

图 2 描绘了 GV 和 PH-GV 的表征。(a) GV 和 PH-GV 的 TEM 图像。由于 PH-HA 对 GV 的包裹和叠加，可以发现 GV 的表面已被重物质包裹。比例尺，200 nm。(b-c) 在 pH 7.4 的 PBS 中，GV 和 PH-GV 的 ζ 电位和粒径的动态光散射分析。(d) PBS 缓冲液及不同浓度的 GV 和 PH-GV(浓度范围为 125-1000 pM)的多普勒超声成像(dropper phantom)。如所指示的，在 B 模式和对比模式下获取图像。(e) d 中图像的定量分析。(f)放置不同时间后 GV 和 PH-GV 的多普勒超声成像(GV 浓度为 500 pM)。 (g)f 中图像的定量分析。

图 3 描绘了 GV 的携氧能力的测定结果。(A)在持续通入氧气一分钟后，不同浓度的天然 GV 中的氧浓度。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。*p<0.05 vs.对照。(B) 在持续通入氧气一分钟后，不同浓度的脂质 GV 中的氧浓度。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。*p<0.05 vs.对照。

图 4 描绘了 GV 的氧气释放动力学的测定结果。(A)在注射 1 ml 的 1 nM 充氧-GV/充氧-脂质-GV 后，在 5 ml 严重缺氧溶液中氧浓度的变化。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。(B)在注射 1 ml 的 1 nM 充氧-GV/充氧-脂质-GV 后，在 5 ml 严重缺氧溶液中氧浓度的变化，其中在 5 分钟时进行超声处理长达 10 秒钟。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。*p<0.05 对 vs.对照。**p<0.01 vs.对照。

图 5 描绘了充氧-GV 介导的体外和体内氧气输送。(A)将 200 μl 的充氧-PBS、充氧-脂质 GV、充氧-GV(最终浓度为 1 nM)分别加入到培养基中，并与细胞在缺氧条件下培养 1 小时后，使用缺氧试剂检测到的培养细胞中的缺氧状况的代表性图像，其中荧光信号表示缺氧的发生。(B)缺氧染色的定量。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。*p<0.05 vs.对照。比例尺，25 μm。(C)通过尾部注射分别将 200 μl 的 5 nM 充氧-GV、充氧-PBS、充氧-脂质 GV 注射到荷瘤小鼠的血管中，通过光声成像监测肿瘤部位中的氧-Hb(氧合血红蛋白)水平和脱氧-Hb(脱氧血红蛋白)水平随着时间的变化。(C)显示肿瘤含氧量在不同时间点的代表性光声图像。红色像素：氧-Hb；蓝色像素：脱氧-Hb。(D)肿瘤含氧量的定量。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。*p<0.05 vs.对照。

图 6 描绘了 GV 在体外和体内的毒性。(A、B)将 200 μl 的 PBS、GV、和脂质 GV(最终浓度分别为 1 nM)分别加入到培养基中并与细胞一起培养，分别通过 MTT 和 LDH 测定在不同时间点测量 SCC-7 细胞的细胞增殖和 LDH 毒性。数据代表 3 个独立实验的平均值±标准偏差。(C)在 GV 静脉注射前后小鼠健康状况的得分。以 30 分的量表对小鼠评分，该量表包含活动、体重和食物摄入，各 10 分。分别在注射前、注射后立即、注射后 24 小时、48 小时和一周的时间点进行评估(*N*=3，±标准偏差)。(D)在第 7 天从 GV 处理的小鼠收集的经 H&E 染色的主要器官的组织学图像。比例尺，100 μm。

图 7 描绘了体外 PDT 的光学设置。

图 8 描绘了经不同处理的 MCF-7 细胞在 PDT 之后的细胞活性。通过 CCK-8 测定来确定 PDT 对 MCF-7 细胞的体外细胞毒性。数据代表 3 个独立实验的平均值±SEM。**p<0.01 vs.对照。

图 9 描绘了不同处理对细胞凋亡的影响。上面的图：通过流式细胞术，借助于膜联蛋白-V 和碘化丙啶(PI)双重染色，对 PDT 后的细胞凋亡进行评估。下面的图：评估了早期凋亡细胞(膜联蛋白-V^+/PI^-)和晚期凋亡细胞(膜联蛋白-V^+/PI^+)占总细胞的百分比。数据代表 3 个独立实验的平均值±SEM。*p<0.05 vs.对照。

图 10 描绘了在不同处理后细胞内 ROS 的量。通过 DCFH-DA 对细胞内 ROS 染色并且通过流式细胞术对其进行分析。左图：流式细胞分析结果，横坐标表示荧光强度，纵坐标表示细胞数量；右图：左图所示结果的统计分析。数据代表三个独立实验的平均值±SEM。**p<0.01 vs.对照。

图 11 描绘了在超声辐照后 PBS(对照)、GV、PpIX 和 GV+PpIX 的 SOSG 荧光强度的增加倍数。数据表示为平均值±标准偏差(n=3)。PpIX 和 GV 的浓度分别为 10 μM 和 2 nM。

图 12 描绘了在有和没有超声处理的情况下，用 PBS(对照)、GV、PpIX、PpIX+GV 处理后细胞内 H_2DCFDA 的荧光显微图像。比例尺=20 μm。激发光波长为 488 nm。PpIX 和 GV 的浓度分别为 10 μM 和 2 nM。

图 13 描绘了(a) GV 和 PH-GV 的细胞摄取。SCC-7 细胞中 ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 的共聚焦显微镜图像。比例尺，20 μm。(b) GV 和 PH-GV 的免疫逃逸

能力。在荧光显微镜下，在鼠 RAW 264.7 巨噬细胞中的细胞摄取。(c、d)以浓度为 0.031-1 nM 的 GV、崩塌的 GV 和 PH-GV 处理 24 小时(c)和 48 小时(d)后，对 SCC-7 细胞活力的影响的测定结果。将用 PBS 处理的细胞作为对照。

图 14 描绘了在对荷瘤小鼠进行静脉内施用后 GV 和 PH-GV 的分布。(a)在静脉分别注射 ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 后，在不同的时间(单位：小时)对 SCC-7 荷瘤小鼠进行的体内 NIR 荧光成像。圆形指示肿瘤位置。(b) SCC-7 荷瘤小鼠模型在不同时间的肿瘤/肌肉(T/M)比。(c)在分别注射 ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 4、12、24 和 48 小时后取自荷瘤裸鼠的主要器官和肿瘤的离体荧光成像。(d) ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 在肿瘤和主要器官中的积聚的定量分析。误差条表示每组 5 只小鼠的标准偏差。*，$P<0.05$。

图 15 描绘了 GV 在肿瘤部位产生的超声造影。(a)在静脉注射 GV 和 PH-GV 后肿瘤的体内超声图像。绿色表示由于 GV 引起的强度增强区域。(b)对(a)中每个感兴趣区域的超声信号进行的定量分析。(c)破坏性声波处理(insonation)(650 kPa)引起的 GV 破碎及超声信号的消失。

图 16 描绘了(a)在注射 ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 后 12 小时从小鼠收集的肿瘤切片的共聚焦图像。绿色信号和红色信号分别来自 ICG 和 CD31 染色血管内皮细胞的荧光。(b)在处理 30 天后主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)和肿瘤的代表性 H&E 切片。比例尺，100 μm。(c)在对小鼠进行的 30 天的评估期期间，在不同条件下测量的体重。

图 17 描绘了空化反应实验平台和结果，(a) GV 介导空化反应实验平台俯视图；(b) GV 和 PBS 溶液信号频谱。

图 18 描绘了根据本发明的一些实施方案的表面修饰的靶向 GV 在肿瘤的诊断、成像和治疗中的应用示意图。

具体实施方式

先前的研究已经成功地证明，GV 可以在皮摩尔浓度的频率范围产生强烈的超声造影，表现出谐波散射，从而能够增强相对体内背景的检测。然而，与其它纳米粒子相似，在静脉内施用后，大多数 GV 在非靶向组织(诸如，肝脏、脾脏和肺)中被摄

取。纳米粒子的药代动力学和生物分布部分地是由其自身的表面特性决定的。而且，亲水性涂层对于纳米粒子成功的静脉内施用是必需的。本发明人发现，用生物相容性材料对 GV 进行化学表面修饰可以改善 GV 的药代动力学特性和靶向性，从而增加其在体内分子成像中的肿瘤积聚。这种表面修饰也有望增强 GV，使其成为药物递送的良好载体。

在本发明中，为了提高稳定性和靶向性，我们用生物材料来修饰 GV 纳米粒子的表面功能，经由氨羧反应成功合成了双修饰的 GV。出人意料地，发明人发现用生物材料对 GV 表面进行化学修饰大大提高了 GV 在肿瘤部位的积聚，因而可作为超声造影剂或成像剂用于体内肿瘤特异性超声分子成像。修饰的 GV 可以穿过肿瘤内皮层中的空隙并进入肿瘤组织间隙。这些结果表明，这些具有表面修饰的新型纳米级超声造影剂在肿瘤部位表现出优异的生物相容性、长血液循环和卓越的超声造影能力。本发明为将 GV 应用于肿瘤的有效血管外靶向超声分子成像以及肿瘤治疗提供了实验证据。

在一些实施方案中，通过具有良好生物相容性和靶向性的生物材料例如聚乙二醇(PEG)-缀合的透明质酸(HA)来修饰 GV 的表面。GV 表面上的 PEG 有效地减少 RES 摄取并增加在血液中的循环时间，从而导致纳米粒子选择性地积聚到肿瘤部位。HA 是一种生物相容性的天然材料，其是结缔组织的主要细胞外成分，并且对 CD44 阳性恶性癌细胞显示出内在的靶向性。本发明通过利用聚乙二醇化的 HA 来使 GV(PH-GV)粒子功能化，并且应用超声和荧光成像、免疫组织化学切片和共聚焦显微镜技术等来间接地和直接地证明修饰 GV 进入肿瘤组织的细胞内间隙的能力，证明了本发明的新型纳米级成像剂可以穿过肿瘤内皮层的缝隙并进入肿瘤组织间隙，因而可应用于特异性的、有效的超声分子成像和癌症治疗。

如前所述，认为肿瘤氧合有助于癌症治疗，而充氧微泡可以帮助将氧气输送到感兴趣的组织中，从而改善治疗效果。然而，由于稳定性的限制和相对较大的尺寸，现有充氧微泡的应用受到了限制。发明人发现，在 PDT 疗法中，oxyGV，特别是经脂质分子修饰的 oxyGV，能够提供对肿瘤增强的细胞毒性，在体内和体外对 PDT 的疗效均具有显著的增强效应。因此，本发明的新型纳米尺寸 oxyGV 可以作为有效的氧气载体来提高耗氧 PDT 的疗效。本发明还研究了 oxyGV 在体外和体内改善声动力疗法的功效的能力，证明了 oxyGV，特别是经脂质分子修饰的 oxyGV，可以在无细胞系

统中引起增强的空化和 ROS 的过量产生，并可以增强体外 ROS 的产生，从而导致 SDT 的细胞毒性增强。因此，oxyGV 可用作治疗剂来提高 SDT 的疗效。

在本发明中，术语“天然 GV”是指从自然界例如藻类中分离出来的没有经过任何修饰的纳米级气囊，而“气囊”在本文中有时也称为“纳米粒子”。本发明中涉及的 GV 包括天然 GV、脂质 GV、PH-GV、充氧-GV、充氧-脂质 GV 等类型。“脂质 GV”是指经脂质分子（例如 DOPC、DSPE、PEG 等）进行表面修饰的 GV。”PH-GV”与“PH 修饰 GV”可互换使用，是指经 PEG 和 HA 进行表面修饰的 GV。术语“充氧-GV”或“oxy-GV”可互换使用，均指其中充有氧气的 GV。类似地，“充氧-脂质 GV”、“经脂质分子修饰的 oxyGV”或“oxy-脂质 GV”等也是可互换使用的，其指的是其中充有氧气的经脂质分子进行表面修饰的 GV。

在本发明中，“表面修饰 GV”是指因表面被(例如脂质分子、靶向性材料、生物相容性材料等)修饰而具有特定功能(例如靶向性、亲水性等)的一类 GV，例如本发明的 PH-GV、脂质 GV 均属于表面修饰 GV。

实施例

统计分析

使用 SPASS 17.0 软件，经由独立样本单因素 ANOVA 测试来分析各组之间的比较。所有统计数据均使用两尾学生 t 测试和方差齐性检验来获得(p 值<0.05 认为是显著的)。

实施例 1：GV 和脂质-GV 的制备和表征

GV 的制备

在 25℃，将水华鱼腥藻(FACHB-1255，中国科学院水生生物研究所的淡水藻种库)在无菌 BO-II 培养基中在 14 小时/10 小时明/暗工作循环的荧光照明下进行培养。根据 Walsby 的方法(Buckland 和 Walsby，1971)来分离 GV。简而言之，使用通过快速添加蔗糖溶液至最终浓度为 25%而实现的高渗溶解(hypertonic lysis)来溶解藻类，以从藻类中释放出 GV。然后，在 600 g 离心 3 小时以分离 GV。分离出的 GV 可以在溶液顶部形成白色乳状层，其可以通过注射器来收集。通过离心用磷酸盐缓冲盐水(PBS)纯化 GV 三次并在 4℃储存在 PBS 中。

使用基于文献的公式(每 OD500 450 nM)(Walsby，1994)估算 GV 浓度，其中，OD500 是用紫外-可见光分光光度计(2100 Pro；GE Healthcare，美国新泽西州皮斯卡塔韦市)在 500 nm 的波长处测得的光密度。如之前所描述(Walsby 和 Armstrong，1979)的，使用大约 8.4 μL/mg 的气体体积和 107 MDa 的摩尔量来估计体积分数。使用在 200 kV 下操作的透射电子显微镜(TEM)(JEOL 2100 F；JEOL，日本东京)对 GV 形态进行成像。将去离子水中的 GV 样本(0.5 nM)沉积在涂有碳的栅格上，并在室温下干燥过夜。使用动态光散射(DLS)方法获得流体动力学尺寸。

脂质 GV 的制备

在 25 ml 的圆底烧瓶中，将总量为 1 μmol 的含有 DOPC、DSPE-PEG(2000)(4:1)的脂质混合物溶于约 100 μL 的氯仿中。然后使溶剂蒸发并使样本在真空旋转蒸发仪中干燥。然后将 1 mL 的 20 mM HEPES 缓冲液(pH=7.2)加入至脂质干燥层，在剧烈搅拌后形成浑浊溶液。然后将混合物进行超声波处理(20W，15 秒脉冲，持续 20 分钟，每个脉冲间隔 30 秒的时间)，持续 3-5 分钟，直到溶液变澄清为止。将所得脂质体溶液储存在 4℃直至进一步使用。将体积为 0.5 mL 的脂质体制备溶液加入至 GV 溶液中。同样用 20 mM HEPES 缓冲液将体积增加至 1 mL。混合溶液在摇床上温育过夜。之后，通过离心(2.4 krpm，10 分钟)将 GV 洗涤三次并且重悬于 Milli-Q 水中。最后，将脂质 GV 重悬于 PBS 中并准备使用。

粒径分布和 ζ 电位确定： 使用 90 Plus 仪器(Brookhaven，美国纽约亨茨维尔)在 90°固定角度和 25℃的温度，通过激光散射来测定脂质 GV 的粒径分布和 ζ 电位。

形态分析： 通过透射电子显微镜(TEM)在 200 kV 的操作电压下测定脂质 GV 的尺寸和形态。将脂质 GV(OD 0.1)的样本沉积在涂有碳的弗姆瓦(formvar)栅格上，并用 2%的乙酸双氧铀染色。

粒子稳定性： 为了测量脂质 GV 制剂的稳定性，分别在制造后的第 1、3 和 7 天测定脂质体包封的 GV 制剂的单粒径和浓度。

我们通过培养藻类水华鱼腥藻来生产用于本研究的 GV，并通过离心分离 GV。由于 GV 的壳对于气体分子是可渗透的，这可能会影响其氧气输送效率。因此，我们制备了两种 GV：天然 GV 和使用脂质进行表面改性以减少气体交换的 GV(脂质 GV)(C. Zhang 等, Colloids Surf. B Biointerfaces 160 (2017) 345–354；C. Zhang 等, ACS Appl.

Mater. Interfaces 10 (1) (2018) 1132–1146)。当在溶液中(图 1A)或以通过 TEM 观察到的单个囊泡的形态呈现(图 1B)时，天然 GV 和脂质 GV 没有可见的明显差异。接下来对脂质 GV 进行粒径分布和 ζ 电位的表征。我们发现，这些纳米气泡具有约 **300-330 nm** 的平均直径和均匀的分布(图 1C-图 1D)。脂质 GV 的平均粒径约为 290-330 nm (图 1C)或约 310-330 nm (DLS 测量，图 1D)，比天然 GV 大约 10 nm。脂质 GV 的 ζ 电位为约 -21.3 至-19.3 mV，其负电荷较 GV 低(图 1C)。我们还评估了 GV 在冷藏(4℃)中的稳定性，观察了两组(GV 组和脂质 GV 组)在零到六个月的时间段中的浓度(由 OD_{500} 确定)和尺寸，发现两组均无显著变化(图 1E-图 1F)。因此，我们能够生产出纳米级的带负电荷的 GV，其在溶液中储存能够长期保持稳定。

实施例 2：HA-GV 和 PH-GV 的制备和表征

HA-GV(H-GV)的制备

通过共价缀合将 HA 固定至 GV 的蛋白质壳。对于 HA-GV 合成，首先将 EDC(3.37 mM)和 NHS(2 mM)加入到 0.1 M 磷酸钠中的 HA 溶液(10mg)中(pH=7.4)。将溶液混合物在冰浴上搅拌 2 小时，并向其中滴加 6 mL 溶解在磷酸钠中的 GV (pH=7.4)。将反应混合物在 4℃再搅拌 24 小时。将所得混合物加入到超滤管(50 mL)中，并以 1.8 rpm 离心 5 分钟以去除游离的 EDC、NHS 和 HA。将所得的纳米粒子储存在 4℃的 PBS 缓冲液中。

聚乙二醇化 HA-GV (PH-GV)的制备

通过在 EDC 和 NHS 的存在下改变 PEG 与 HA 的进料比，通过酰胺形成，将 PEG 化学缀合至 H-GV 缀合物。将 H-GV 缀合物(120 mg)溶解在磷酸盐缓冲液(PBS，pH 7.2)中，将其与 PBS 中的 EDC(3.37 mg)和甲醇中的 NHS(2mg)混合。在缓慢加入单甲氧基 PEG-胺(73.5mg)后，将混合物在冰浴上搅拌 24 小时。然后将所得溶液离心，并用 PBS 洗涤 4 次，以去除过量的甲醇和 PEG。

对于细胞实验和动物成像测试，在加入 HA 和 PEG 之前的第一步，用 NIR 染料(ICG)标记 GV。简而言之，将 EDC(3.37mg)和 NHS(2mg)加入到 0.1 M 磷酸钠中的 ICG 溶液(1 mM)中(pH=7.4)。在室温下反应 30 分钟后，将该溶液加入到纯 GV 溶液中(摩尔比：ICG/GV＝1000/1)。然后在室温下将混合物摇动 4 小时，然后通过离心 4 次进行纯化。将所得混合物加入到超滤管(50 mL)中，并以 1.8 rpm 离心 5 分钟以去除游

离的 ICG。将所得的纳米粒子储存在 PBS 缓冲液中。

通过动态光散射 DLS (Varian，美国帕洛阿尔托)测量 PH-GV NP 的粒径和粒径分布。在 25℃，在 Malvern Zeta Size-Nano Z 仪器上执行 ζ 电位测量。通过透射电子显微镜(TEM)(Bruker，德国)来观察 PH-GV 的纳米结构和尺寸。通过 Multiskan Go 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific，美国马萨诸塞州)来观察 GV 和 PH-GV 的紫外-可见光吸收光谱。使用荧光分光光度计(Varian，美国帕洛阿尔托)来测量 ICG 和 ICG 标记的 PH-GV 的荧光信号。

GV 和 PH-GV 的超声信号测试： 对含有相同 GV 量的 PH-GV 和 GV 进行 US 成像。在成像前将 PH-GV 和 GV 放入滴管(5 mL)中，并将所有滴管以相同深度浸入去离子水中。使用带有 LZ250 D 换能器的高频超声系统来获取 GV 溶液的超声 B 模式图像和对比模式图像。将中心频率和输出能量水平分别设定为 18 MHz 和 4%。

为了实现最佳稳定性和可靶向性，我们修饰了 GV 纳米粒子的表面功能。经由氨羧反应成功合成了双改性的 GV。首先，用透明质酸(HA)修饰 GV 表面(透明质酸是一种由 N-乙酰基葡萄糖胺和葡萄糖醛酸重复单元组成的多糖)，以提高 GV 的生物相容性和靶向性。然后在 EDC 和 NHS 的存在下通过酰胺形成将 PEG-5000 容易地附着到 HA 缀合物的骨架上，这可以通过阻碍与血浆蛋白的非特异性相互作用而使 HA-GV 从宿主的免疫系统中隐匿，因而可以通过减少网状内皮系统（RES）清除来延长其循环时间，并且可以经由亲水性 PEG 链的空间排斥来增强胶态分散体的稳定性。PH-GV 的成功合成已通过透射电子显微镜(TEM)证实。如图 2a 所示，TEM 显示了平均粒径为 400 nm 的裸 GV 的圆柱状形态。由于 PH-HA 对 GV 的包绕和叠加，我们可以发现 GV 的表面已被重物质包裹(图 2a)。根据动态光散射(DLS)报告，GV 的粒径为约 320-380 nm，PH-GV 约为 375-425 nm；GV 的 ζ 电位在-40 至-50 mV 的范围，PH-GV 的电位为约-27 ± 4 mV (图 2b)。

此外，通过利用 PEG 的涂层，聚乙二醇化 HA-GV 的 ζ 电位由于 PEG 层的屏蔽功能而降低。如图 2a-b 所示，PH-GV 具有圆柱状形态，半径约为 400 nm，并且所有纳米颗粒均为圆柱状并显示出相对均匀的尺寸分布。PH-GV 纳米颗粒的合适粒径和负 ζ 电位确保了经由 EPR 效应实现良好的肿瘤靶向货物输送，同时减少 RES 清除。

鉴于 GV 和 PH-GV 具有很强的超声特性，因此通过高浓度(tonic)细胞溶解和离心辅助浮选纯化了来自水华鱼腥藻(Ana)的 GV，并在不同浓度下在 21 MHz 下操作的

Vevo 2100 成像系统(FUJIFILM VisualSonics，加拿大安大略省多伦多市；B 模式)中使其成像(对于成像细节，参见下面实施例)。在浓度范围为 250 pM 至 1 nM(图 2c-2d)并且气体体积分数为约 0.01%至 0.1%的情况下，GV 相对于缓冲液对照产生了强烈的对比。对比在最高浓度下最强，Ana GV 产生的散射比缓冲液对照大 23.4±2.5 (图 2e)。并且，在进行 PEG 和 HA 修饰后，GV 的超声性能不受影响。在进行下一步试验之前，我们在 PBS 和胎牛血清(FBS)中鉴定了 PH-GV 的生物稳定性。GV 和 PH-GV 的在放置超过一周的时间后仍具有很好的超声成像能力(图 2f)，并且显示出良好的稳定性(图 2g)。

实施例 3：GV 和脂质 GV 的携氧特性和氧气释放动力学的测定

使用血氧计(Portamess 913 OXY；Knick，德国)监测溶液中的氧浓度，并将数据记录为 mg/l。用氧气/氮气对不同浓度的 GV 和脂质 GV 进行充气，并且分别测定不同溶液的氧浓度。

无超声作用下氧气释放： 通过持续充入 N_2 将密封在小瓶中的 PBS 的氧浓度降低至 0.8 mg/l(严重缺氧)，以模拟缺氧条件。持续充入氧气使 PBS、GV 和脂质 GV 中达到氧气饱和。监测氧气从 GV/脂质 GV 中扩散到缺氧溶液中的氧浓度随时间的变化。在每次实验之前，都会对血氧计进行校准。所有实验均重复三次。

超声作用下氧气释放： 为研究超声(US)对 GV/脂质 GV 的氧气释放的影响，使用了 US 探针，其振荡频率为 1 MHz 并且平均声压分布值为 2.4±0.2 Mpa (标称频率：50 Hz；标称功率：30 W)。超声处理时间为 10 秒。检测超声作用后溶液中氧气浓度的变化。所有实验均重复三次。

我们比较了两个 GV 组(GV 和脂质 GV)的相对携氧特性。当对这些溶液进行持续充氧后，两组 GV 的氧浓度均持续增加并且最终变得稳定。我们发现 GV 的携氧能力远高于 PBS 和破碎的 GV，并且总体携氧能力取决于 GV 浓度(图 3A)。与 PBS 或破碎的 GV 相比，脂质 GV 也显示出相似的较好携氧能力，并且与浓度呈正相关(图 3B)。

我们还检测了不同 GV 的氧气释放动力学。我们发现，与 PBS 相比，充氧-GV 和充氧-脂质 GV 均可以显著提高严重缺氧溶液的氧浓度(图 4A)。与充氧-GV 相比，充氧-脂质 GV 在溶液中释放氧气的速度更慢。我们认为这是由于 GV 的表面修饰导致降低的氧气释放。此外，充氧-脂质 GV 的总氧气释放量更大(曲线下面积)，这是由于

GV 表面脂质的存在，因为脂质减少了 GV 的氧气释放。该特性可以在体内长时间运输情况下提高氧气输送效率。因此，脂质 GV 的携氧能力可与 GV 媲美，但显示出更慢的释放模式，因而能够更大程度地提高目标部位的氧浓度。我们还添加了 10 秒钟的超声处理步骤，使用超声来触发更多的氧气释放。超声对 PBS 的氧气释放没有影响，但是却大大增加了 GV 组的氧气释放(图 4B)。

实施例 4：充氧 GV 和充氧脂质 GV 输送氧气的能力的测定

在缺氧培养箱(1%的氧气，5%的 CO_2)中培养细胞并进行传代。使用购自 Thermo Fisher 的 Image-iT™Red Hypoxia Reagent(红色缺氧试剂)来监测加入充氧脂质 GV 之前/之后培养基中的缺氧条件。

体内实验： 所有使用实验动物的程序均已获得香港特别行政区政府卫生署和香港理工大学动物受试对象伦理小组委员会的批准。18-20 g 的雌性 Balb/c 小鼠由香港理工大学动物资源中心提供。小鼠在到达后适应房间一周，并维持正常的 12 小时光-暗循环。将小鼠圈养在常规笼子中(每笼 6 只动物)，在无特定病原体、温度为 24±2℃，相对湿度为 60-70%的条件下，其可以自由获取标准颗粒饲料和水。将用于小鼠的标准木屑用作垫料。在经过 1 周的适应后，将 0.1 ml 的 SCC-7 细胞系($1*10^7$ 细胞/ml)重悬于 100 μL 的基质胶中，并通过皮下注射植入 Balb/c 小鼠的后背。肿瘤形成发生在细胞植入后约两周，并且在体积达到约 200 mm^3 的阶段，肿瘤表现出明显的缺氧程度。

使用光声成像测量氧/脱氧-Hb 水平： 小鼠注射充氧脂质 GV 后，通过具有混合 US 换能器(中心频率=21 MHz；空间分辨率=75 μm)的 Vevo LAZR 光声成像仪(Fujifilm Visualsonics，荷兰阿姆斯特丹)来监测皮下肿瘤中的氧-Hb 和脱氧-Hb 水平。记录并储存 pO_2 水平以供后面在各组之间进行比较。

进一步评估了各 GV 组(充氧 GV 和充氧-脂质 GV)在体外和在体内肿瘤块中改变细胞的缺氧条件的能力。我们在缺氧条件下使人乳腺癌 MCF-7 细胞生长 24 小时，并使用 Image-iT Red Hypoxia Reagent(红色缺氧试剂)监测其缺氧水平。与未经处理的对照和 PBS 处理组相比，充氧 GV 和充氧-脂质 GV 的加入显著降低了所观察到的缺氧水平(图 5A-图 5B)。

我们还执行了体内概念验证研究，以确定注入尾静脉的充氧-GV 提高裸鼠中缺氧

皮下肿瘤氧合水平的能力。通过在处理前和处理后(0、5 和 15 分钟)经由光声成像使氧合血红蛋白(氧-Hb)和脱氧血红蛋白(脱氧-Hb)的水平可视化来监测肿瘤氧合。充氧-GV 组和充氧-脂质 GV 组的注射均导致肿瘤中的氧-Hb 水平升高，但 PBS 对照则未升高(图 5C)。此外，与对照相比，加入充氧-GV 使肿瘤中的氧饱和度(sO_2)提高 20%，但充氧-脂质 GV 的加入使 sO_2 提高 50%(图 5D)。

因此，在我们的初步实验中，在体内环境中，在增加含氧量的情况下，用脂质对 GV 的表面改性显示出明显更好的结果，证明其稳定性和氧气输送能力增强。

实施例 5：体外和体内毒性检测

细胞活力和 LDH 测定： 从中国科学院在上海的细胞库获得人乳腺癌细胞系(MCF-7)。按照标准细胞培养说明，将 MCF-7 细胞在带有 L-谷氨酰胺的高葡萄糖(4.5 g/l)杜氏改良伊格尔培养基中进行培养。所有培养基均补充有 10%(体积/体积)的胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/ml)。在 37℃，在 5%的 CO_2 和 95%的空气气氛中，使细胞生长直至 70%-80%汇合，然后进行胰蛋白酶化和收集，以用于细胞培养和体内研究。之后，在不同的时间点(24 小时、48 小时和 72 小时)向细胞培养基中加入不同剂量的脂质 GV(1 nM)。之后，使用 Pierce LDH 细胞毒性测定试剂盒(Life Invitrogen)根据制造商的说明来进行 LDH 测定。根据制造商的说明通过 MTT 测定和凋亡测定来测定细胞活力和凋亡。

体内毒性确定： 对经脂质 GV 处理的小鼠执行尸检，并收集组织样本(肝脏、肺和肾脏)以进行组织学检查。将从小鼠生物测定收集的肝脏、肺和肾脏样本固定在 10%的福尔马林缓冲液中，通过常规组织学技术进行处理，并用苏木精和曙红染色。使用配备有照相机(Olympus Q-Color-5)的光学显微镜(Olympus BX51)执行显微镜检查，并使用 Image Pro-Express 软件将图像记录在计算机中。

为了测试两个 GV 组(GV 和脂质 GV)的毒性和生物安全性，我们使用了体外 LDH 和 MTT 测定，发现两个 GV 组均未产生明显的细胞毒性。将 GV 或脂质 GV(最终浓度＝1 nM)加入至培养基，使其温育 24、48 或 72 小时。与对照相比，GV 处理下均未观察到 LDH 或 MTT 水平的显著升高(图 6A-图 6B)。接下来，我们通过观察在 GV 注射之前、以及在 GV 注射之后 24、48 和 72 小时小鼠健康的三个基本量度(活动、体重和食物摄入)来测试各 GV 组的体内生物安全性。以 30 分的量表对小鼠评分，我们观察到这些指标在这段时间内没有减少(图 6C)。我们还使用苏木精和曙红(H&E)染色在

GV 施用后一周测定小鼠的主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)。与对照组相比，两个 GV 组的组织切片均未显示出明显的病理异常或病变(图 6D)。因此，我们确定 GV 和脂质 GV 对细胞没有细胞毒性，并且没有对所测试的小鼠造成任何明显损害。

实施例 6：oxyGV 与 PDT 的组合对细胞毒性和细胞凋亡的影响

光动力疗法设置： 使细胞以 100 mW/cm^2 的功率暴露于激光，持续 5 分钟。在图 7 中示出了用于 PDT 处理的光学设置。通过光纤生成波长为 396 nm 的光源，将其对准孔径并照射至 35 mm 的细胞培养皿。细胞培养板的位置由双轴电动线性平台手动控制。在处理后，将细胞在新鲜培养基中培养 4 小时，然后准备用于不同分析。

细胞培养： 从上海细胞库获得人乳腺癌细胞系(MCF-7)。在 37℃，在 5%的 CO_2 湿润气氛中，使 MCF-7 细胞在高葡萄糖杜氏改良伊格尔培养基(DMEM，4.5 g/L 的 D-葡萄糖)中生长，该培养基补充有 100 U/ml 含 10%胎牛血清(FBS)的青霉素-链霉素。

细胞活力测试： 在预备试验中，将 MCF-7 细胞随机分为八组：(1)对照，(2)仅使用激光，(3)仅使用 PpIX，(4) PpIX 加激光(PDT)，(5) PpIX +GV+激光(PDT+GV)，(6) PpIX +oxyGV+激光(PDT+oxy-GV)，(7)GV+激光，(8)oxyGV+激光。对于 PpIX 处理，将细胞与 10 μM 的 PpIX 在补充有 10%的 FBS 的 DMEM 培养基中温育 4 小时的药物加载时间。使用细胞计数试剂盒-8(Sigma-Aldrich)根据制造商的说明来测定在 PDT 后的不同时间点的细胞活力。简而言之，将细胞以每孔 5000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，并在 100 μL 的培养基中温育 24 小时。在 37℃，在 5%的 CO_2 中，通过每孔加入 10 μl 的 CCK-8 试剂持续 1 小时来测定细胞毒性。在 450 nm，作为检测波长，测量经处理样本对空白对照的吸光度。通过与对照组中未经处理的细胞进行比较来确定经处理细胞的活力。

细胞凋亡测试： 以 5×10^5 个细胞的密度将细胞接种在 6 cm 培养皿中，温育 24 小时。使用 Alexa Fluor 488 膜联蛋白 V/死亡细胞凋亡试剂盒(Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明来测量细胞凋亡。收集细胞，并在室温下用 5 μL 的膜联蛋白 V 缀合物和 1 μL 的 PI 工作溶液温育 15 分钟。通过 FACS Calibur 流式细胞仪和 BD Accuri C6 软件(Becton-Dickinson，USA)分析细胞。

图 8 描绘了不同处理对细胞活力的影响。通过 CCK-8 测定来确定不同处理对 MCF-7 细胞的体外细胞毒性。数据代表 3 个独立实验的平均值±SEM。**p<0.01 vs.对

照。

为了确定 oxyGV 是否可以提高 PDT 的疗效，如图 8 所示，在 PDT 处理后 4h，使用 CCK-8 测定来确定 ALA-PDT 对 MCF-7 细胞系的细胞毒性。我们发现 ALA-PDT(PpIX+激光)在 PDT 后 4 小时使 MCF-7 细胞的细胞活力明显降低至 75%(图 8，$p<0.05$)。在加入 oxyGV 的情况下，在 ALA-PDT 处理下，MCF-7 细胞的细胞活力降至 62%，而天然 GV(不含氧气的 GV)对 ALA-PDT 引起的细胞死亡影响很小。同时，其它组(包括仅使用 PpIX、仅使用激光、GV+激光、oxyGV+激光)对细胞活力无影响。由于这些组的影响可忽略不计，因此在以下实验中将细胞分为四组：(1)对照，(2) PpIX +激光(PDT)，(3) PpIX +GV+激光(PDT+GV)，(4) PpIX +oxyGV+激光(PDT+oxy-GV)。

接下来，我们通过流式细胞术研究了 oxyGV 对 ALA-PDT 引起的细胞凋亡的影响，如图 9 所示。在图 9 上图中的每个小图中，左下象限中的细胞代表活细胞，右下象限和右上象限均显示凋亡细胞，并且坏死细胞出现在左上象限。如图 9 下面的图所示，在对照组、PDT 组和 PDT+GV 组中分别有 94.1%、74.7%和 79.2%的活细胞。然而，PDT+oxyGV 组中仅检测到 66.4%的活细胞。这意味着在 PDT 期间加入 oxyGV 会导致明显更高的死亡和凋亡率。

实施例 7：OxyGV 在 PDT 期间对 ROS 产量的影响

细胞内 ROS 测试： 使用 DCFH-DA(Sigma-Aldrich)测量细胞内 ROS 产生。简而言之，在 37℃，将用 PBS 稀释的 10 μM 的 DCFH-DA 加入到 MCF-7 细胞中，持续 20 分钟。然后将细胞用 PBS 洗涤三次。使标记的细胞胰蛋白酶化，并通过流式细胞仪进行分析。

ROS 的过量产生被认为是 PDT 期间造成肿瘤细胞的细胞毒性的原因。因此，我们使用流式细胞术进一步研究了在 PDT 后细胞内 ROS 是否增加，结果在图 10 中示出。正如预期的那样，在所有三个 PDT 处理组中均检测到过量的 ROS 产生，而与其它组相比，在加入 oxyGV 的情况下，总体细胞内 ROS 显著增加。

实施例 8：无细胞系统中单线态氧的生成

SDT 设置： 在本研究中，使用直径为 5 cm 的 1 MHz 平面超声换能器(Olympus，日本东京)进行超声处理。使用超声发生器(AFG 3251；Tektronix Company，美国俄勒

冈州)和功率放大器(Model 500 A250 CAR；Souderton，美国宾夕法尼亚州)来生成超声脉冲。在 25℃，将细胞暴露于距换能器 10 cm 的超声中，其通过无气泡去离子水而耦合。通过水听器(HGL-200；Onda，美国加州森尼维尔市)来表征声强和声场。测得空间峰值时间平均强度为 8 W/cm^2；固定脉冲重复频率(PRF)为 1000 Hz 时，占空比为 20%。总体超声处理持续时间为 5 分钟。细胞培养实验溶液的温度升高控制在 2.5℃内。在超声处理后，将细胞在新鲜培养基中培养 4 小时，然后准备用于不同分析。

单线态氧的生成： 使用 SOSG (10 μM)来检测单线态氧的生成。将溶液暴露于超声中并在暴露时间内避光。通过酶标仪在 488 nm 的激发波长和 530 nm 的发射波长下测量 SOSG 的荧光强度。

为了研究 GV 是否可以增强 SDT 期间的 ROS 产生，我们使用 SOSG 荧光探针在超声辐照下测试了无细胞系统中单线态氧的产生，结果如图 11 所示。对于单线态氧检测，我们注意到在超声处理前后，单独使用 PpIX(10 μM)组、单独使用 GV(2 nM)组和 PpIX 加 GV 组的 SOSG 荧光强度的百分比显著增加。值得注意的是，与单独使用 PpIX 相比，与 PpIX 一起加入 GV 使得产生单线态氧的效率是其两倍以上。这些结果表明，在超声作用下 GV 和 PpIX 之间存在协同作用，从而提高单线态氧的产量。

实施例 9：GV 在 SDT 期间对 ROS 产量的影响

试验方法参照上述实施例 7。

ROS 的过量产生被认为是造成 SDT 期间对肿瘤细胞的细胞毒性的原因。因此，我们使用荧光成像进一步研究了在 SDT 后细胞内 ROS 是否增加，如图 12 所示。正如预期的那样，在所有三个 SDT 处理组中均检测到过量的 ROS 产生，而与其它组相比，在加入 GV 的情况下，总体细胞内 ROS 显著增加。

实施例 10：空化表征

通过被动空化检测来表征空化强度(见图 17)。将平面单元件超声换能器(中心频率=5 MHz，带宽=4.8-5.2 MHz)作为接收器垂直于治疗超声换能器放置并与其共聚焦对齐。使其与 1 MHz 的治疗换能器同步。在每个实验期间，FUS 换能器都会向有或没有 GV(浓度=2 nM)的培养基发出超声脉冲。超声参数与细胞培养和 ROS 表征实验中使用的参数保持相同。将 GV 装入放置在 FUS 换能器和接收换能器的共聚焦区域处的 5 mm 琼脂-凝胶立方曲面中。在每个 FUS 脉冲的超声处理期间，通过示波器(LeCroy

715 Zi；LeCroy，美国纽约 Chestnut Ridge)获取接收换能器的 RF 数据。将所获取的 RF 数据传输到频谱，并通过宽带信号(4.8 MHz–5.2 MHz)内的积分来计算惯性空化强度。

实施例 11：GV 和 PH-GV 的靶向性和免疫逃逸（以下实施例均来自 P20914US）

GV 和 PH-GV 的细胞培养和细胞内化：在 37℃和 5%的 CO_2 下，将人类鳞状细胞癌细胞系(SCC7 细胞)和 NIH-3T3 细胞在 8 孔培养箱中在补充有 10%的 FBS 和 1%的抗生素溶液的杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium，DMEM)/高葡萄糖培养基中培养。第二天，用冷 PBS 洗涤两种细胞，并在 5%的 CO_2 气氛下，在 37℃，将其与 IGV 一起温育 4 小时。在温育后，所有细胞均用冷 PBS 彻底洗涤。最后，在-20℃，将细胞在冷乙醇中固定 15 分钟，然后用含有 DAPI 的封固剂将细胞在黑暗中封固 10 分钟。通过共聚焦显微镜(Olympus，USA)观察 ICG 标记的 PH-GV 和 ICG 标记的 GV 的细胞内化，并且将 ICG 的激发波长和发射波长分别设定为 780 nm 和 800 nm。

为了研究 PH-GV 对 CD44 高表达肿瘤细胞的靶向效率，将其用 NIR 荧光团 ICG 标记，然后与 SCC7 癌细胞系和 NIH3T3 细胞一起进行温育。与低表达细胞系(NIH3T3)相比，该研究中使用的癌细胞已被证明在其表面上过表达 CD44。然后使用共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)检查在预定时间点固定的细胞。图 13a 显示了 SCC7 细胞在用 PBS 溶液、ICG 标记的 GV 和 ICG 标记的 PH-GV 纳米粒子温育 6 小时后的 CLSM 图像。如 CLSM 图像所示，PH-GV 纳米粒子的 ICG 细胞内分布与 GV 溶液有很大不同。在用 ICG 标记的 PH-GV 溶液温育 6 小时后，ICG 的大量荧光分布在整个细胞质中，而在用 ICG 标记的 GV 处理的 SCC7 细胞中，则未在细胞质中观察到强烈的红色荧光。

通过荧光显微镜进一步评估了鼠 RAW 264.7 巨噬细胞中 PH-GV 和 GV 纳米粒子的细胞摄取(图 13b)。PBS 用作对照。捕获的图像显示，游离 GV 在具有强烈红色荧光的巨噬细胞中被广泛内化。然而，在 PH-GV 纳米粒子组中，来自巨噬细胞的红色荧光信号减少。FACS 分析表明，与游离 GV 组相比，巨噬细胞中 PH-GV 纳米粒子的内化减少了约 40%。因此，PH-GV 纳米粒子的 PEG 表面修饰可以明显减少巨噬细胞的内化。

实施例 12：GV 和 PH-GV 的生物安全性

根据动物研究协议，当肿瘤体积达到 2000 mm^3 时处死动物。为了对比处理效果，在注射 2 天后收集所有组中的一部分肿瘤用于苏木精-曙红(H&E)染色。

为了评估 GV 的生物安全性，在处理 14 天后收集主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏)并通过 H&E 染色进行检查。

在 SCC7 癌细胞中在不同浓度(GV，0-1 nM)下研究了 GV 和 PH-GV 纳米粒子对细胞毒性和细胞凋亡的影响。如图 13c 所示，在温育 24 小时后，即使在最高浓度(1 nM)下，也几乎没有检测到游离 GV 和 PH-GV 纳米粒子对细胞的毒性。并且崩塌的 GV 也没有引起 SCC7 癌细胞的明显细胞毒性。

为了进一步研究 GV 和 PH-GV 的安全性，我们将 SCC7 细胞的温育时间延长至 48 小时。图 13d 表明，游离 GV、崩塌的 GV 和 PH-GV 纳米粒子这三组未以浓度依赖方式引起明显的细胞死亡。因此，预期 GV 和 PH 改性 GV 在转移性 SCC7 癌细胞中的毒性是可忽略不计的。

实施例 13：GV 和 PH-GV 在裸鼠体内的生物分布

根据香港理工大学动物护理和使用委员会(CC/ACUCC)批准的协议来执行动物实验。向无胸腺裸鼠(七周龄，雌性，20-24 g)的皮下部位注射 4×10^6 SCC7 细胞的 PBS 悬浮液(80 μL)。当肿瘤尺寸(在右腿区域)达到 120 mm^3 的平均尺寸时，将小鼠随机分为三组：(a)将游离的 ICG 溶液注入小鼠的尾静脉中；(b)将 ICG 标记的 GV 溶液注入小鼠的尾静脉中；以及(c)将 ICG 标记的 PH-GV 溶液注入小鼠的尾静脉中。在注射后的 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 小时，使用 IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences，USA；激发滤光片：780 nm，发射滤光片：800 nm)来获取荧光图像。

在一剂注射后达到最高积聚量时，收集 SCC7 肿瘤和正常器官(心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺和肌肉)，将其用于获取荧光信号强度。

由于 GV 在体外实验展现出的良好的靶向功能和免疫逃逸的能力，我们将 ICG 标记的 PH-GV 注射入荷瘤小鼠内，使用实时 NIRF 成像技术进一步评估了纳米粒子的体内生物分布和肿瘤靶向特性。如图 14a-b 所示，对于游离的 ICG 组和 ICG 标记的 GV 组，在早期时间点(0.5-2 小时)，在小鼠的正常器官(肝脏、肺、脾脏等)中检测到了大量的荧光信号，这是由于网状内皮系统(RES)在这些器官中的捕获所致，然后这些荧

光信号随时间逐渐减少。相反，ICG 标记的 PH-GV 在整个小鼠体内产生一致的荧光信号达 8 小时，而正常器官中没有高荧光信号增加。并且在静脉注射后 8 小时在肿瘤部位观察到明显荧光。ICG 标记的 PH-GV 荧光稳定增加，并在 12 小时达到峰值。随后，肿瘤部位的荧光从 24 小时到 48 小时逐渐减少，表明 PH-GV 从肿瘤组织中持续排出。然而，在施用 ICG 和 ICG 标记的 GV 后，在肿瘤组织中未发现强荧光信号。这种鲜明差异可能归因于 PH-GV 增强的免疫逃逸和特异性肿瘤靶向能力。

为了研究表面修饰后的 GV 是否可以有效减少肝脏摄取并改善在肿瘤中的积聚，在 SCC7 荷瘤模型中研究了表面修饰后的 GV 的体内靶向能力。如图 14c-d 所示，对于 ICG 标记的 GV 处理组，在体内注射后 4 小时在肝脏中检测到高荧光。即使在处理后 12 小时，肝脏中仍存在高水平的荧光。同时，在肿瘤和其它器官中没有出现明显的荧光。肿瘤中的低浓度和肝脏中的高含量表明，大多数 GV 被 RES 捕获，从而导致纳米粒子在血液中的迅速清除。相反，对于 ICG 标记的 PH-GV 处理的小鼠，在 48 小时的过程中，肿瘤中的荧光水平比其它器官强得多。肿瘤中最大的荧光信号发生在处理后 12 小时，然后荧光信号随时间略有下降。另一方面，在肝脏和脾脏中检测到低水平的荧光。综上所述，PH 修饰显著降低了 PH-GV 的 RES 摄取，并改善了血液循环和及肿瘤分布情况。PH-GV 的优异肿瘤积聚能力将有利于其在超声分子成像中的进一步应用，并在几乎没有副作用的情况下广泛提高治疗效果。

实施例 14：通过 PH-GV 进行体内癌症的 US 成像

根据香港理工大学动物护理和使用委员会(CC/ACUCC)批准的协议来执行动物实验。向裸鼠(七周龄，雌性，20-24 g)的皮下部位注射 4×10^6 SCC7 细胞的 PBS 悬浮液(80 μL)。当肿瘤尺寸(在右腿区域)达到 120 mm^3 的平均尺寸时，将小鼠随机分为两组：(a)将 GV 注入小鼠的尾静脉中；(b)将 PH-GV 注入小鼠的尾静脉中。在注射后，在 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 小时，在 Vevo 2100 成像系统上记录肿瘤部位的 US 图像。

在一剂注射后达到最高积聚量时，执行高功率的 US 刺激，这可导致 GV 的破碎。并且，应用 Vevo 2100 成像系统来记录 US 刺激前后的 US 图像和信号强度，以进行分析。使用 Vevo 2100 Workstation 软件来测量回声成像的信号强度。

除了 PH-GV 的优异肿瘤积聚性外，我们还向 SCC7 荷瘤模型静脉注射 GV 和 PH-GV，以证明表面修饰 GV 能够在体内产生超声造影，并且显示良好的非线性信号(图

15a)。首先，我们在 SCC7 荷瘤裸鼠的尾静脉中注入 GV 或 PH-GV(200 μL，浓度 20.0 nM)，并使用 Vevo 2100 成像系统获取非线性超声图像(以 18 MHz 传输)。在图 15a 中呈现了在注射后 0、0.5、1、2、4、8、12、24 和 48 小时显示肿瘤部位的超声图像。这些图像中的绿色突出了在静脉注射后肿瘤内部超声信号增强的区域。在 PH-GV 组中，我们可以观察到 8 小时后肿瘤部位的超声信号强度大大增强。与注射 PH-GV 之前的信号相比，在注射后(p.i.) 4、8、12 和 24 小时，肿瘤中的 US 信号分别增加了 1.05±0.13、1.2±0.41、1.51±0.25 和 1.35±0.12 倍(图 15b)。该积聚也在注射后 12 小时达到峰值，如荧光成像所显示的，并在注射后 12 小时后开始减少。然而，在 GV 处理的小鼠中未发现回声强度的显著变化。为了确认 PH-GV 是造成所观察到的造影的原因，我们在超崩塌压力(supra-collapse pressure)(650 kPa)下施加了超声脉冲，从而导致造影消失(图 15c)。含有 GV 的目的区域表现出的反向散射信号比注射缓冲液的对照强 60±14%(p=0.008)；该差异在 GV 破碎后消失(p=0.23)。

实施例 15：PH-GV 在荷瘤小鼠中的滞留

我们研究了静脉注射后实体瘤内 GV 和 PH-GV 的间质渗透。在静脉注射 ICG 标记的 GV 或 ICG 标记的 PH-GV 后 12 小时从小鼠提取的肿瘤切片用 DAPI(蓝色)和抗 CD31 抗体(红色)染色，以进行共聚焦成像(图 16a)。对于 ICG 标记的 GV 组，如图 16a 所示，我们在肿瘤切片中未发现 ICG 荧光信号(绿色)，因为体内 GV 的快速清除速度导致血液循环时间不足，因此游离 GV 很难渗透通过肿瘤组织周围的血管。与之形成鲜明对比的是，PH-GV 组中的 ICG 荧光远远高于 GV 组，这表明用 PH 修饰 GV 可以增强肿瘤的积聚和滞留，这是因为有更长的循环时间用于 PEG 的 EPR 效应和 HA 的靶向性。更重要的是，我们观察到大量 ICG 荧光信号远离血管定位，这表明 PH-GV 纳米粒子可能会渗透通过肿瘤部位周围的血管并在肿瘤细胞内化，以实现有效的肿瘤内扩散。

实施例 16：GV 和 PH-GV 的细胞毒性

将 SCC7 细胞以每孔 8000 个细胞的密度接种在 96 孔板中，并在 5% CO_2 的温育箱中于 37℃过夜培养。第二天，将细胞用 PBS 洗涤 3 次，并与一系列浓度的 GV、破碎的 GV 和 PH-GV 溶液在相同条件下温育 24 小时和 48 小时。通过 CCK-8 测定试剂盒评估细胞活力。在 450 nm 下测量光密度(OD)，并通过酶标仪进行记录。

还通过 3'6'-二(O-乙酰基)-4'5'-二[N,N-二(羧甲基)氨甲基]荧光素、四乙酰氧基甲酯

(钙黄绿素 AM)/碘化丙啶(PI)染色(Sangon Biotech，中国上海)来研究细胞毒性。将U87细胞以 1×10^5 个细胞的密度接种在6孔板中，并使其生长至80-90%汇合。用平行浓度的GV、破碎GV和PH-GV将SCC7细胞温育24小时。在用PBS洗涤几次并浸入新鲜培养基(1 mL)中后，将黑暗中的对照组在新鲜 DMEM 培养基中温育。在去除新鲜DMEM培养基后，将PBS中的钙黄绿素 AM(4 μmol/L)和PI溶液(4 μmol/L)加入到SCC7细胞中，并在5%的 CO_2 下，在37℃，将其温育30分钟。最后，使用PBS将细胞清洗三次。通过荧光显微镜获得细胞的荧光图像。

为了研究 GV 的体内毒性，收集正常器官并进行 H&E 染色。如图 16b 所示，从心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏的病理分析来看，用 GV 和 PH-GV 处理的小鼠没有明显的损伤或毒性信号。如图 16c 所示，在处理后 30 天内观察到各个处理组在处理期间体重变化的相似的变化趋势。值得注意的是，在我们的研究中未观察到 GV 和 PH-GV对小鼠的急性毒性或不良反应。

上述对实施例的描述是为方便本技术领域的普通技术人员能理解和应用本发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改，并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此，本发明不限于本文公开的具体实施例，本领域技术人员根据本发明的原理，在不脱离本发明范畴的情况下所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种经表面修饰而能够特异性靶向肿瘤部位的靶向 GV，其表面被生物靶向材料和/或生物相容性材料修饰。

2. 根据权利要求 1 所述的靶向 GV，其中所述生物靶向材料选自以下中的一种或多种：HA、RGD 肽、叶酸、半乳糖、葡萄糖，优选 HA；和/或，所述生物相容性材料选自以下中的一种或多种：PEG、壳聚糖、聚氨基酯、聚乳酸、聚烯烃、聚砜、聚碳酸酯、聚丙烯腈，优选 PEG。

3. 根据权利要求 1 所述的靶向 GV，其是表面被 HA 和 PEG 修饰的 PH-GV。

4. 一种制备权利要求 1-3 中任一项所述的靶向 GV 的方法，包括：

(a) 将生物靶向材料与 GV 连接在一起；和/或

(b) 将生物相容性材料与步骤(a)的产物连接在一起。

5. 一种表面被脂质分子修饰的脂质 GV，优选地，所述脂质分子选自以下中的一种或多种：DSPE-PEG、DOPC、PEG、DSPE、PVA、甘油、甘油酯、脂肪酸、磷脂。

6. 根据权利要求 5 所述的脂质 GV，其是表面被 DSPE-PEG 和 DOPC 修饰的脂质 GV。

7. 一种充气脂质 GV，其包含权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV 和治疗性气体，优选氧气。

8. 一种脂质靶向 GV，其表面被脂质分子和生物靶向材料以及任选地生物相容性材料修饰，优选地

所述脂质分子选自以下中的一种或多种：DSPE-PEG、DOPC、PEG、DSPE、PVA、甘油、甘油酯、脂肪酸、磷脂；

所述生物靶向材料选自以下中的一种或多种：HA、RGD 肽、叶酸、半乳糖、葡萄糖；

所述生物相容性材料选自以下中的一种或多种：PEG、壳聚糖、聚氨基酯、聚乳酸、聚烯烃、聚砜、聚碳酸酯、聚丙烯腈。

9. 根据权利要求 8 所述的脂质靶向 GV，其是表面被 DSPE-PEG、DOPC 和 HA 以及任选地 PEG 修饰的 GV。

10. 一种充气脂质靶向 GV，其包含权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV 和治疗性气体，优选氧气。

11. 一种制备权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV 的方法，包括：

(a) 将脂质分子或脂质分子的混合物溶于氯仿中，并使其干燥；

(b) 向步骤(a)的产物中加入 HEPES 缓冲液并搅拌，形成浑浊溶液；以及

(c) 将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中，从而形成脂质 GV。

12. 一种制备权利要求 8 或 9 所述的脂质靶向 GV 的方法，包括：

(a) 将脂质分子或脂质分子的混合物溶于氯仿中，并使其干燥；

(b) 向步骤(a)的产物中加入 HEPES 缓冲液并搅拌，形成浑浊溶液；以及

(c) 将生物靶向材料与 GV 连接在一起，然后将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中，从而形成脂质靶向 GV。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的方法，还包括：

在步骤(c)中，在将步骤(b)的产物加入到 GV 溶液中之前，向所述 GV 溶液中充气例如氧气直至饱和，从而形成权利要求 7 所述的充气脂质 GV 或权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV。

14. 一种造影剂或诊断剂，其含有权利要求 1-3 中任一项所述的靶向 GV、权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV 或权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV。

15. 一种治疗剂，其含有权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV 或权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV。

16. 一种药物载体，其含有权利要求 1-3 中任一项所述的靶向 GV、权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV 或权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV，以及任选地用于治疗待治疗疾病的药物。

17. 一种药物组合物，其含有权利要求 15 所述的治疗剂或权利要求 16 所述的药物载体。

18. 权利要求 1-3 中任一项所述的靶向 GV、权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV、权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV、权利要求 14 所述的造影剂或诊断剂在制备用于诊断受试者的癌症的诊断试剂或诊断试剂盒中的用途。

19. 权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV、权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV、权利要求 15 所述的治疗剂、权利要求 16 所述的药物载体或权利要求 17 所述的药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。

20. 权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV、权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV、权利要求 15 所述的治疗剂、权利要求 15 所述的药物载体或权利要求 17 所述的药物组合物与第二治疗剂或疗法在制备用于治疗受试者的癌症的药物组合中的用途，其中所述药物组合以如下方式施用：

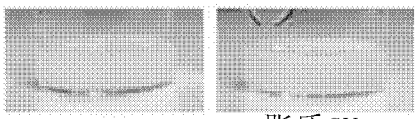
向所述受试者施用权利要求 5 或 6 所述的脂质 GV、权利要求 7 所述的充气脂质 GV、权利要求 8-9 中任一项所述的脂质靶向 GV、权利要求 10 所述的充气脂质靶向 GV、权利要求 15 所述的治疗剂、权利要求 15 所述的药物载体或权利要求 17 所述的药物组合物；然后

向所述受试者施用所述第二治疗剂或疗法例如 PDT 和 SDT 疗法，

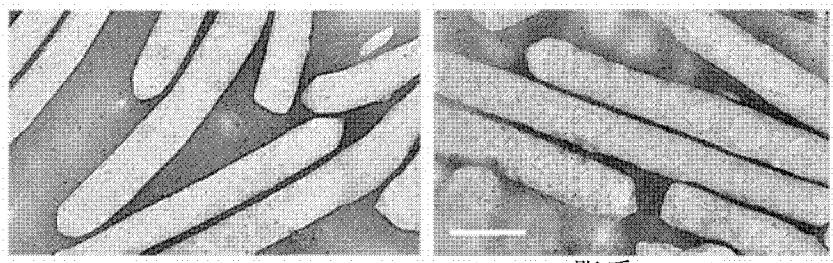
其中任选地，在向所述受试者施用所述第二治疗剂或疗法之前，向所述受试者应用超声波。

21. 根据权利要求 18-20 中任一项所述的用途，其中所述癌症包括但不限于：膀胱癌、肺癌、肾癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、黑色素瘤。

A.



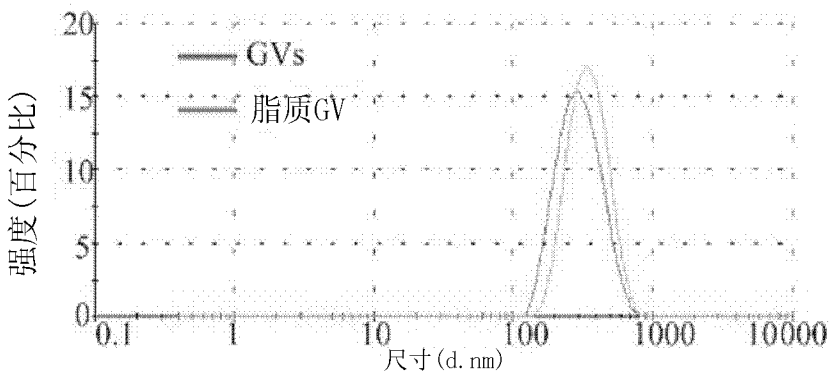
B.



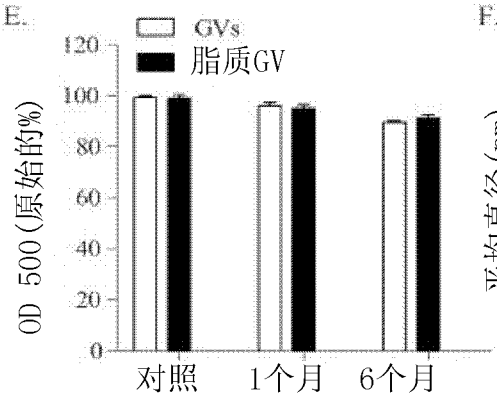
C.

	尺寸(nm)	ζ 电位(mV)
GVs	295±5	-14.7±0.8
脂质GV	310±20	-20.3±1.1

D.



E.



F.

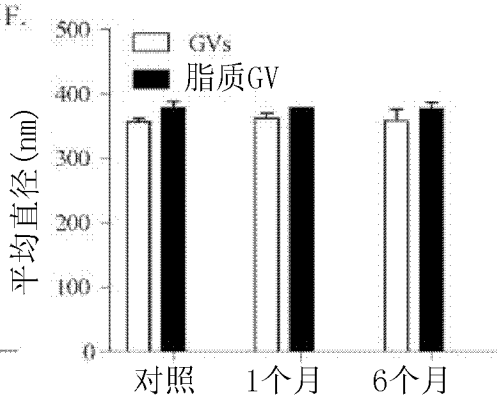


图 1

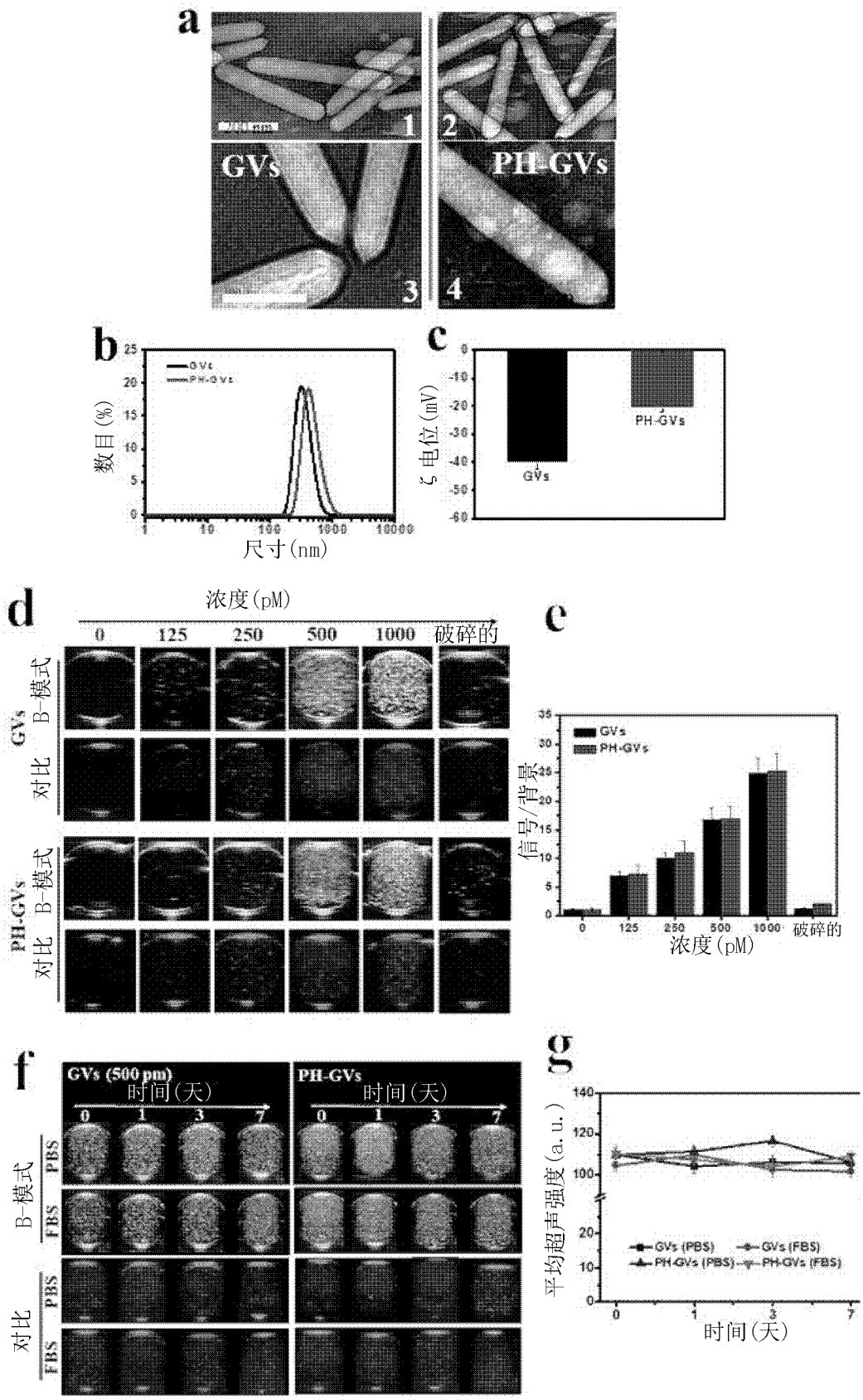

a
1
2
GVs
PH-GVs
3
4
b
GVs
PH-GVs
数目(%)
尺寸(nm)
c
ζ电位(mV)
PH-GVs
GVs
d
浓度(pM)
0
125
250
500
1000
破碎的
GVs
B-模式
对比
PH-GVs
B-模式
对比
e
GVs
PH-GVs
信号/背景
浓度(pM)
f
GVs (500 pm)
时间(天)
PH-GVs
时间(天)
B-模式
PBS
FBS
对比
PBS
FBS
g
平均超声强度(a.u.)
GVs (PBS)
GVs (FBS)
PH-GVs (PBS)
PH-GVs (FBS)
时间(天)

图 2

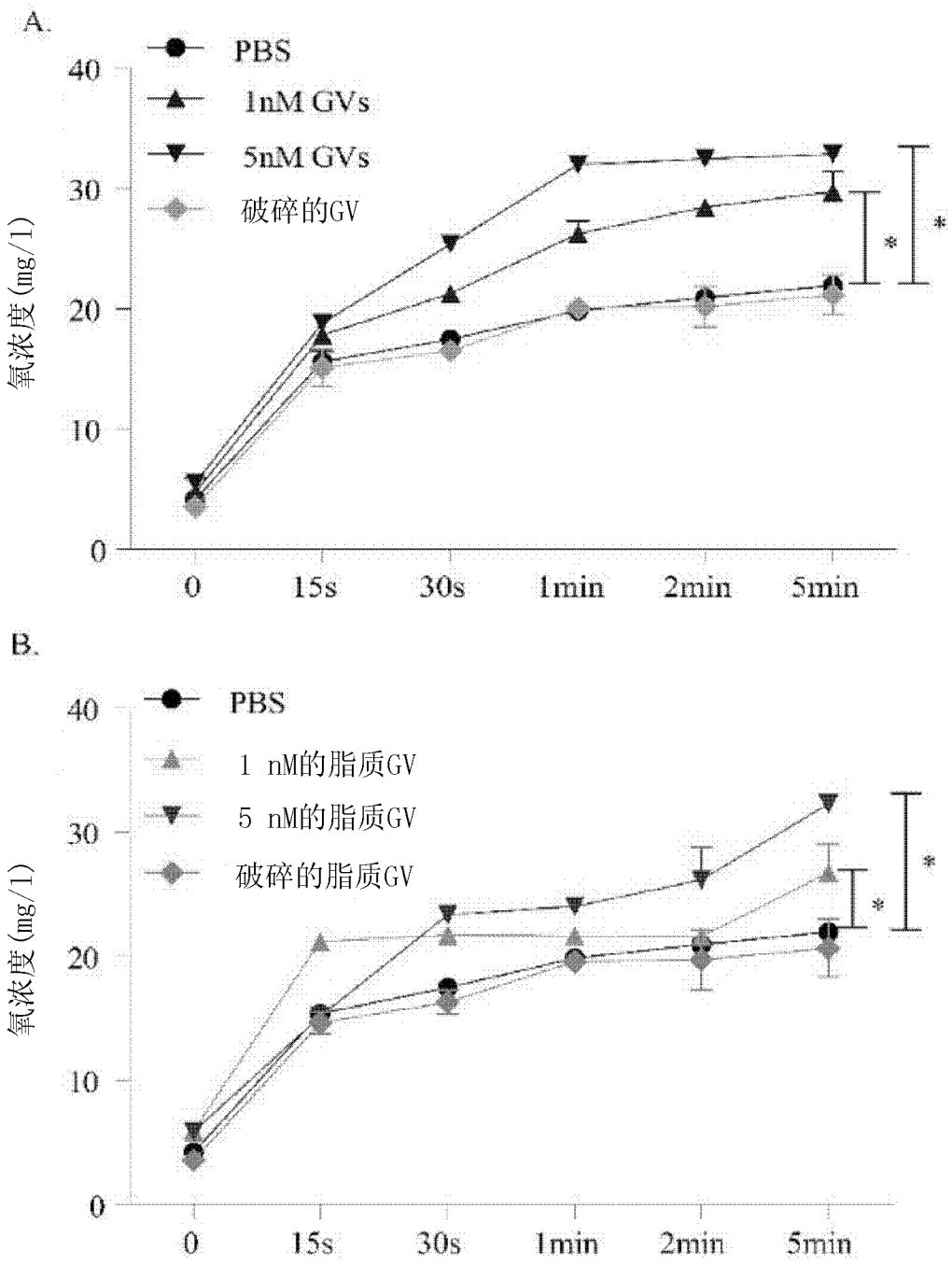

A.
PBS
1nM GVs
5nM GVs
破碎的GV
氧浓度(mg/l)
40
30
20
10
0
0
15s
30s
1min
2min
5min
*
*
B.
PBS
1 nM的脂质GV
5 nM的脂质GV
破碎的脂质GV
氧浓度(mg/l)
40
30
20
10
0
0
15s
30s
1min
2min
5min
*
*

图 3

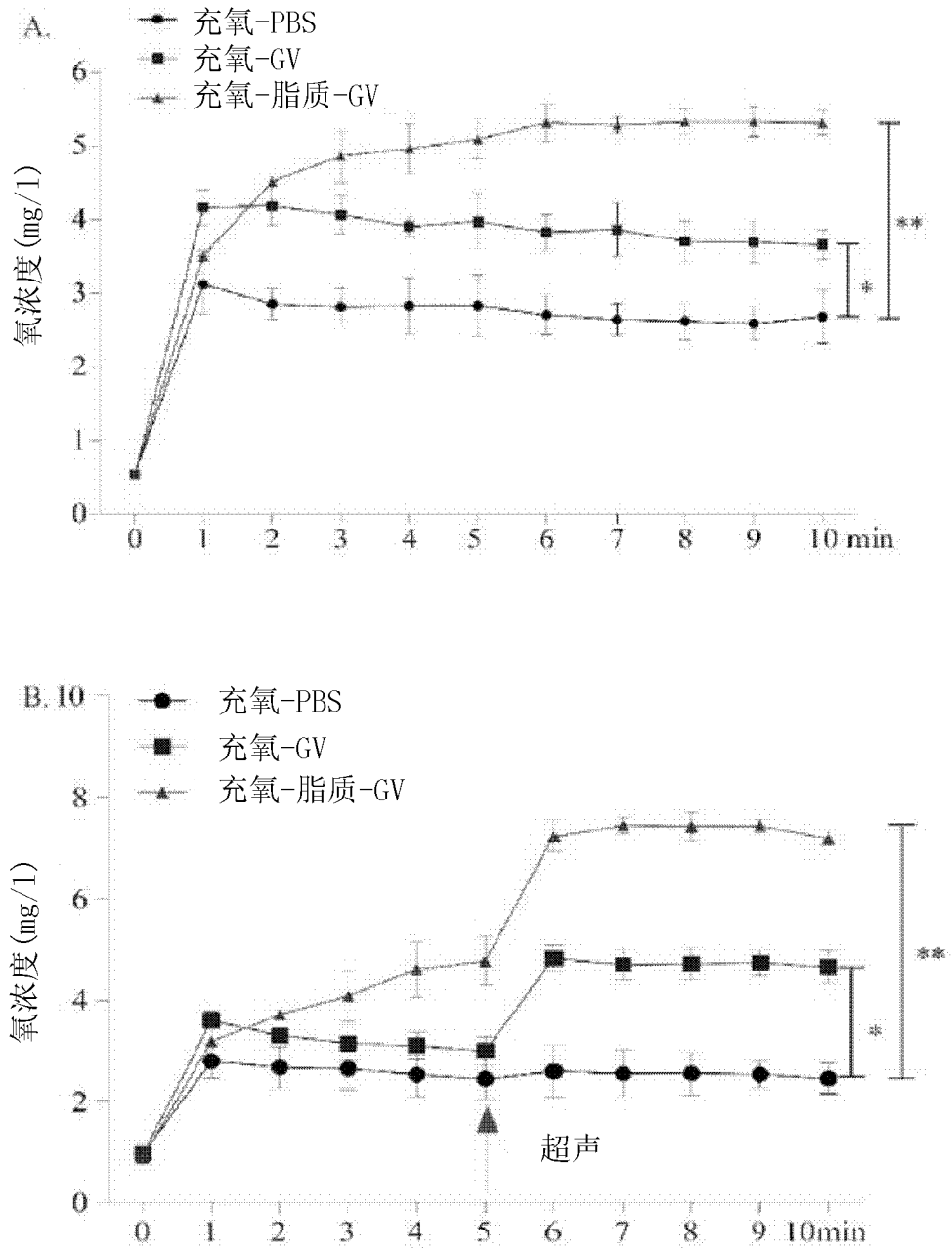

A.
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
氧浓度(mg/l)
0
1
2
3
4
5
6
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 min
*
**
B. 10
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
氧浓度(mg/l)
0
2
4
6
8
超声
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10min
*
**

图 4

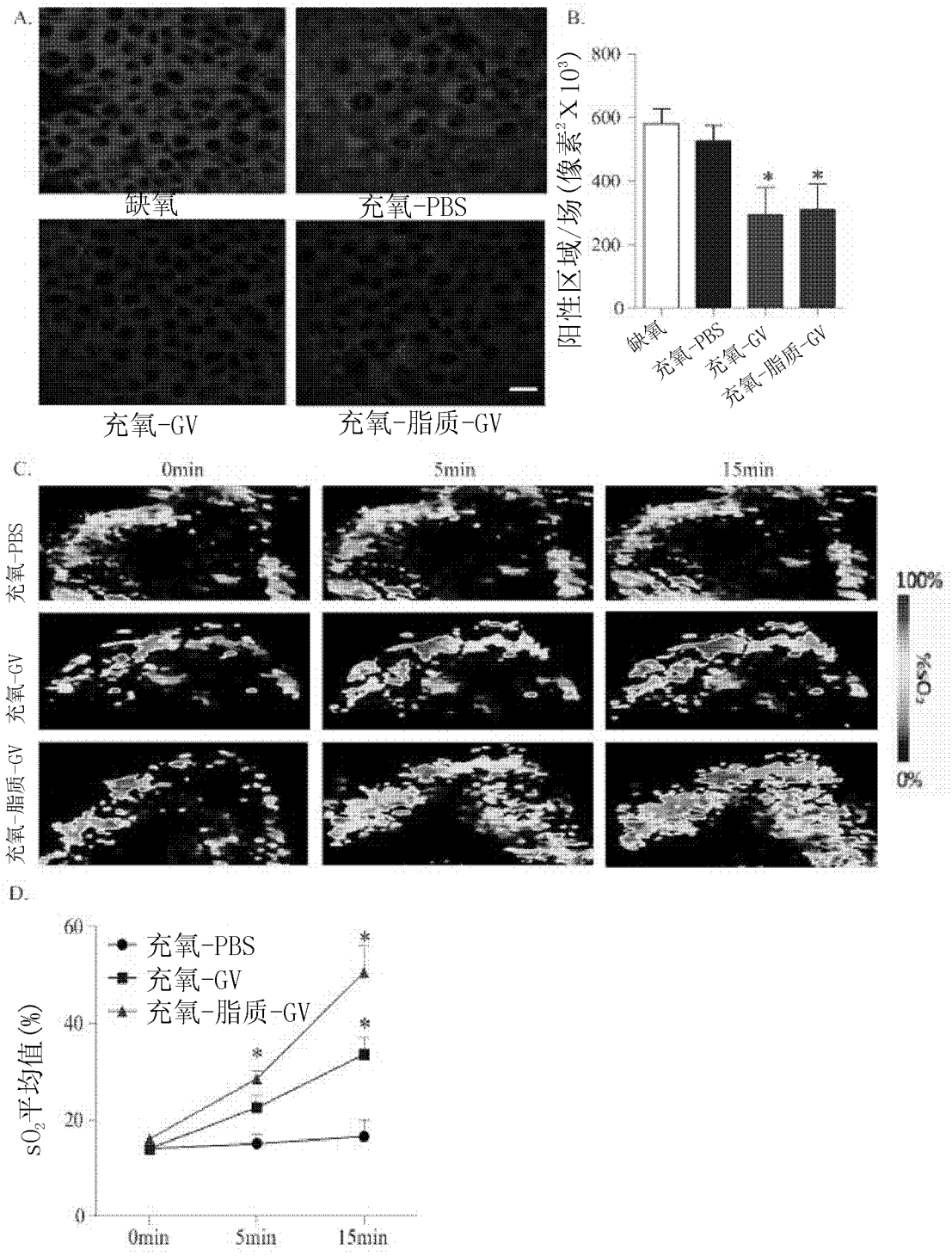
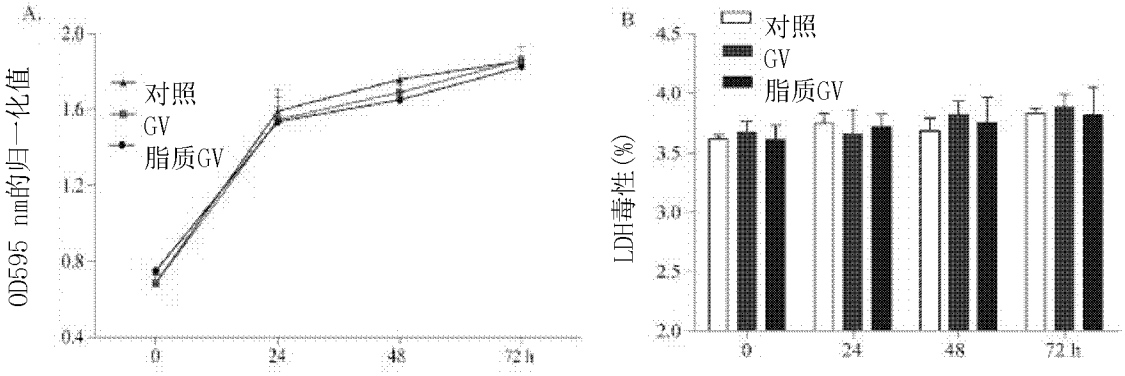

A.
缺氧
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
B.
阳性区域/场(像素^2 X 10^3)
800
600
400
200
0
缺氧
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
C.
0min
5min
15min
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
100%
sO_2
0%
D.
sO_2平均值(%)
60
40
20
0
充氧-PBS
充氧-GV
充氧-脂质-GV
0min
5min
15min

图 5



C.

	对照	GV	脂质GV
前	30	30	30
后	30	30	30
24小时	30	30	30
48小时	30	30	30
7天	30	30	30

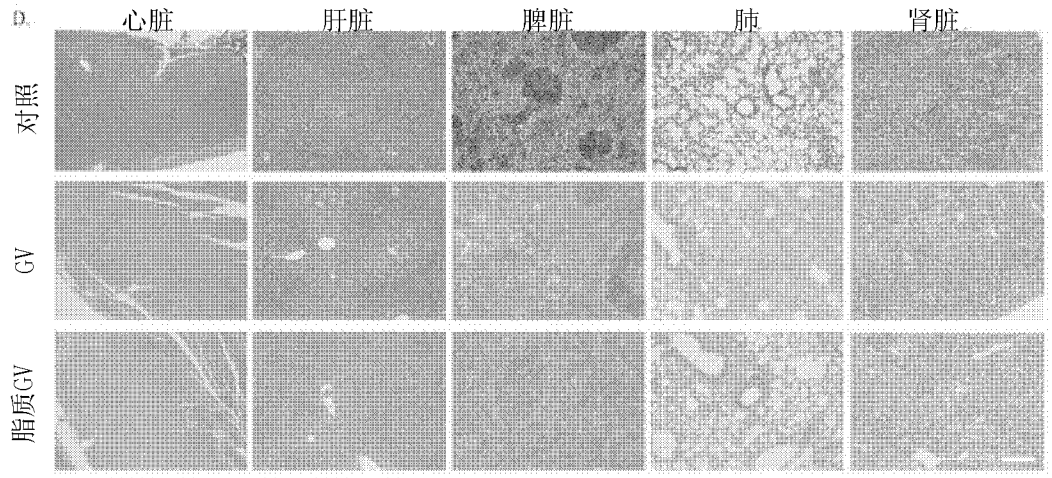


图6

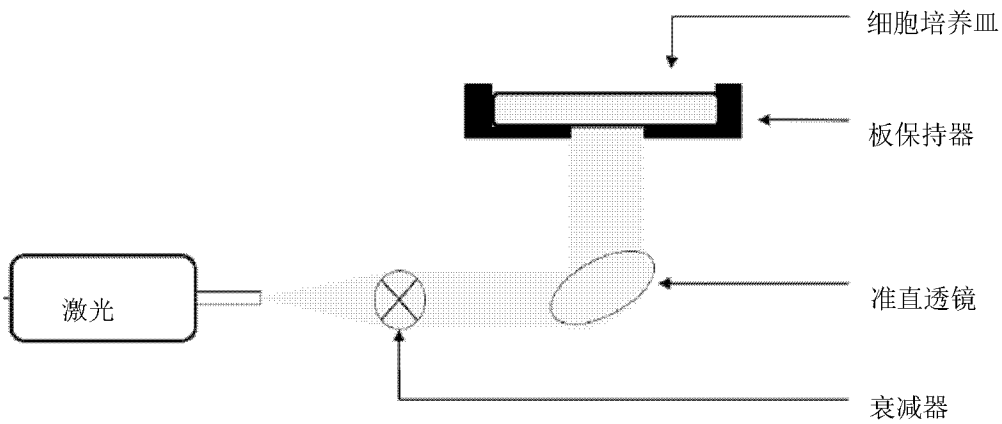


图 7

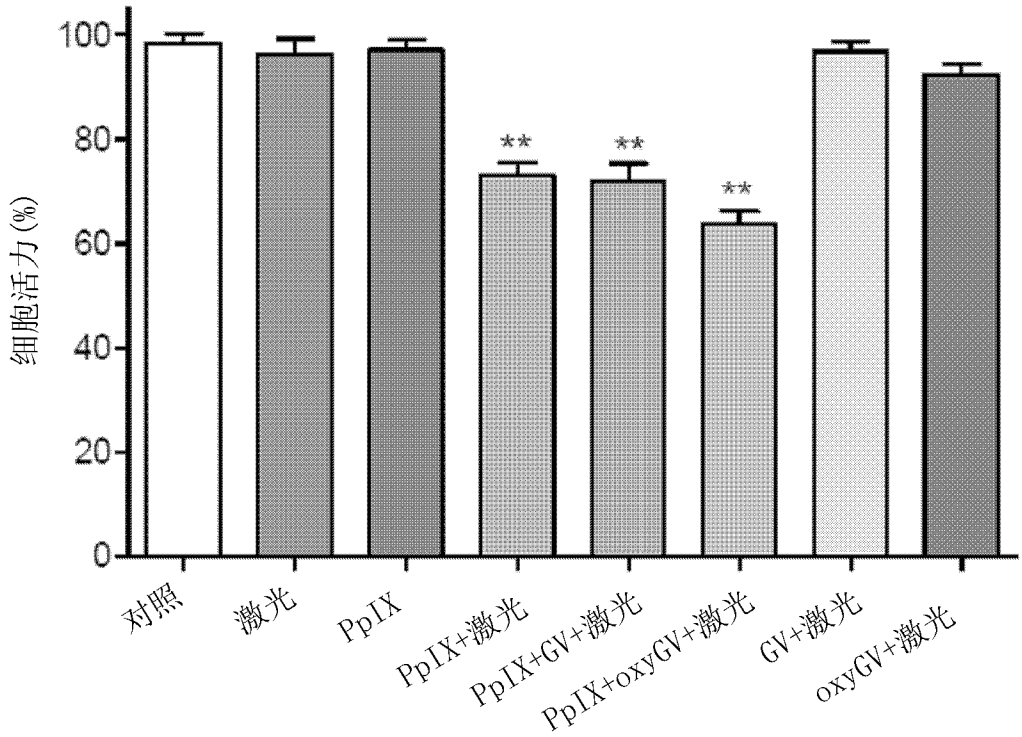
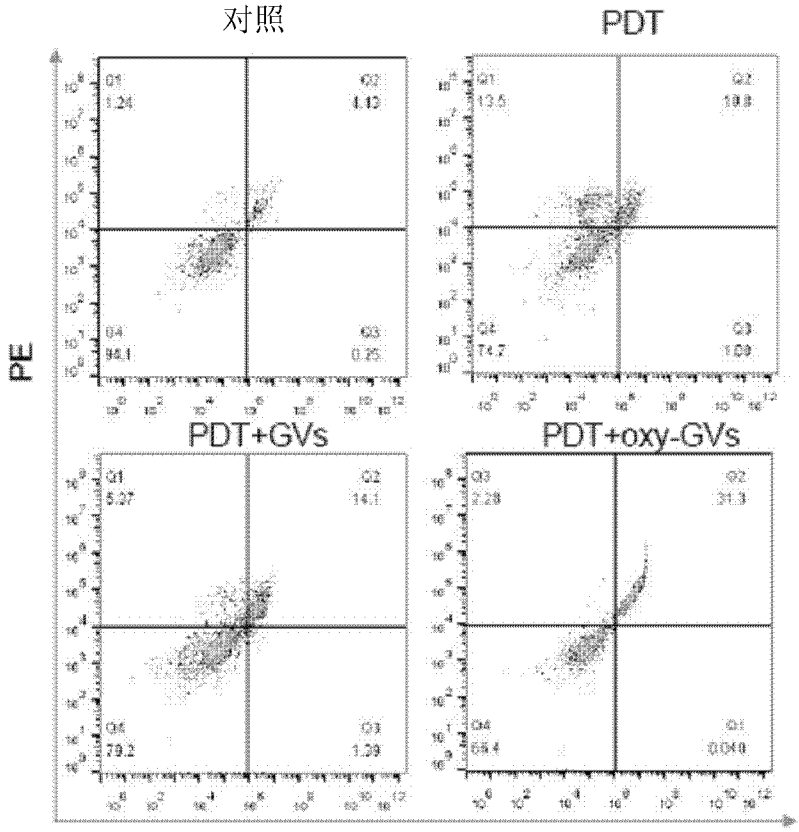

细胞活力(%)
100
80
60
40
20
0
**
**
**
对照
激光
PpIX
PpIX+激光
PpIX+GV+激光
PpIX+oxyGV+激光
GV+激光
oxyGV+激光

图8


对照
PDT
PDT+GVs
PDT+oxy-GVs
PE
膜联蛋白-V

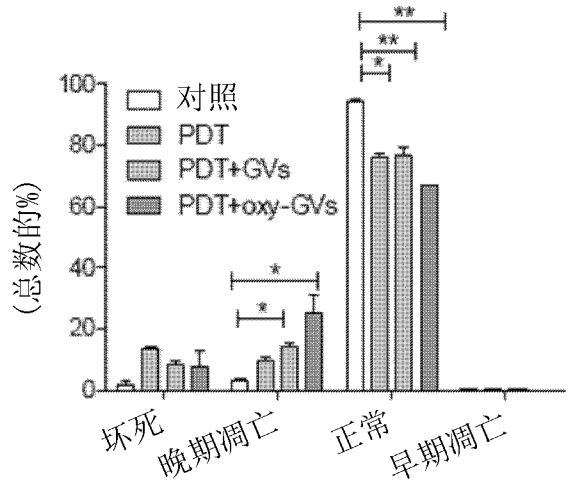

对照
PDT
PDT+GVs
PDT+oxy-GVs
(总数的%)
100
80
60
40
20
0
坏死
晚期凋亡
正常
早期凋亡

图 9

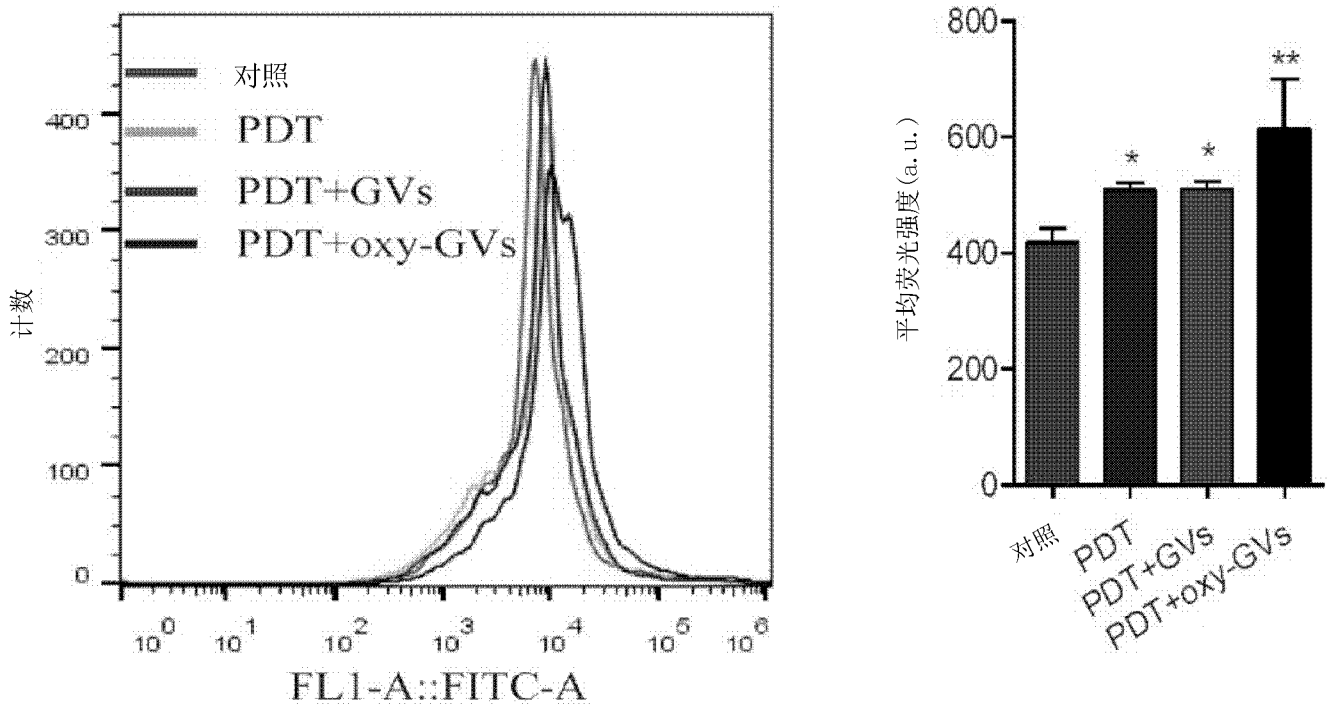

对照
PDT
PDT+GVs
PDT+oxy-GVs
计数
400
300
200
100
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
FL1-A::FITC-A
平均荧光强度(a.u.)
800
600
400
200
0
*
*
**
对照
PDT
PDT+GVs
PDT+oxy-GVs

图 10

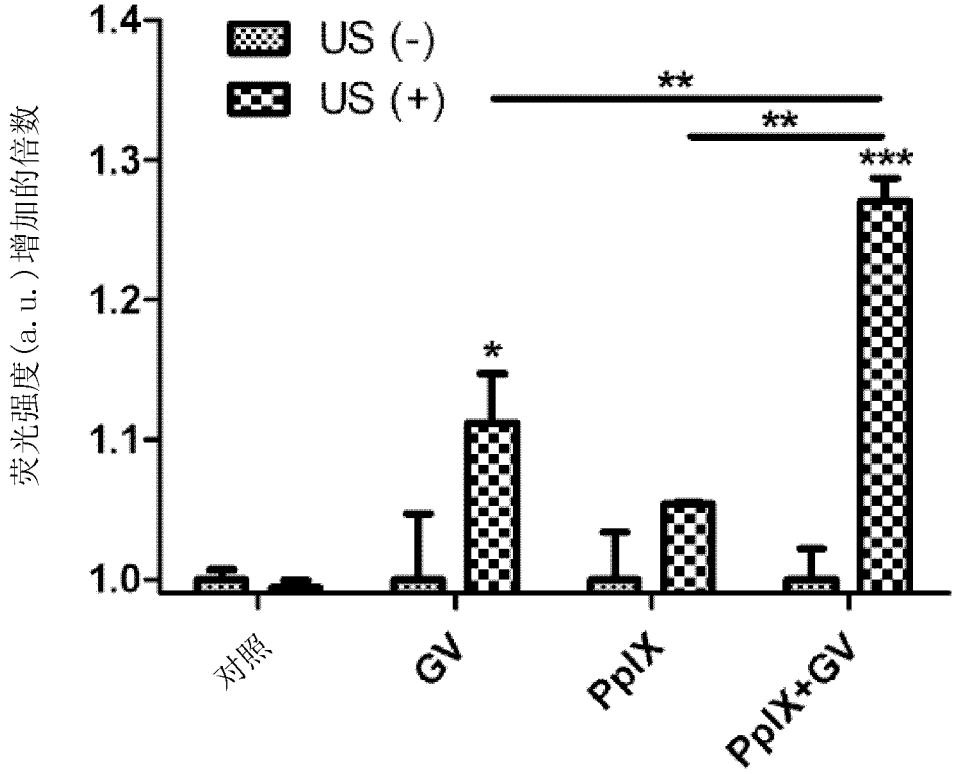

1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
荧光强度(a. u.)增加的倍数
US (-)
US (+)
**
**
***
*
对照
GV
PpIX
PpIX+GV

图 11

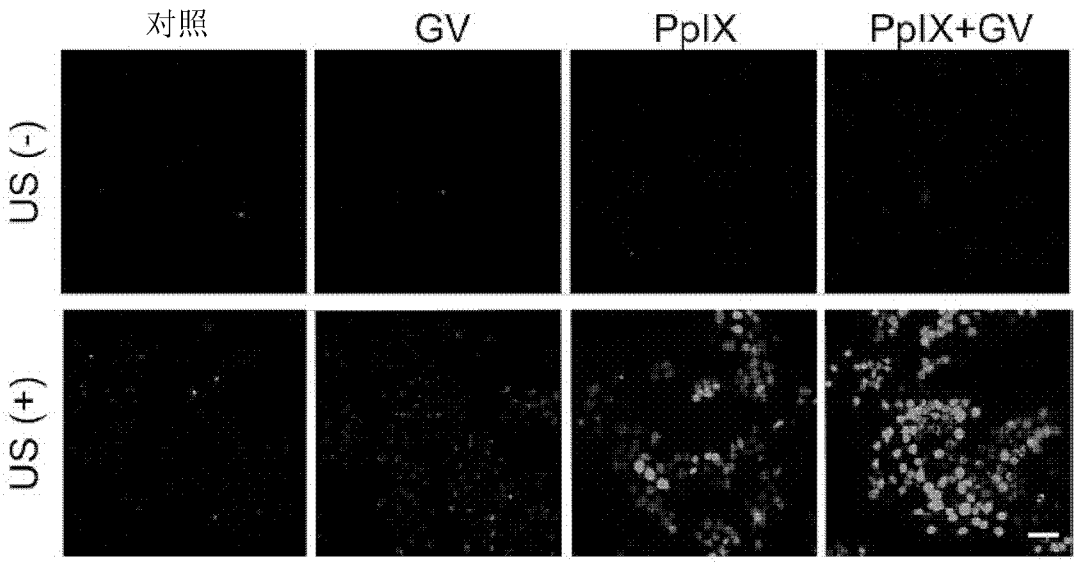

对照
GV
PpIX
PpIX+GV
US (-)
US (+)

图 12

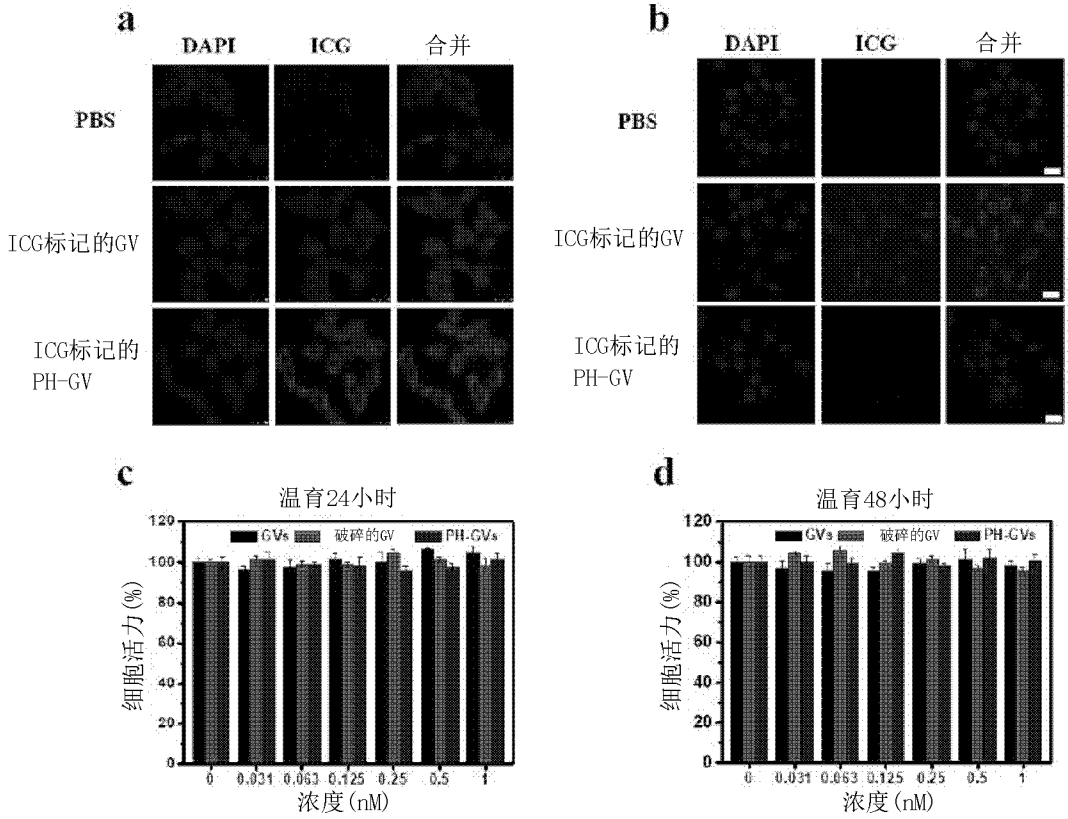

a
DAPI
ICG
合并
PBS
ICG标记的GV
ICG标记的
PH-GV
b
DAPI
ICG
合并
PBS
ICG标记的GV
ICG标记的
PH-GV
c
温育24小时
GVs
破碎的GV
PH-GVs
细胞活力(%)
浓度(nM)
d
温育48小时
GVs
破碎的GV
PH-GVs
细胞活力(%)
浓度(nM)

图 13

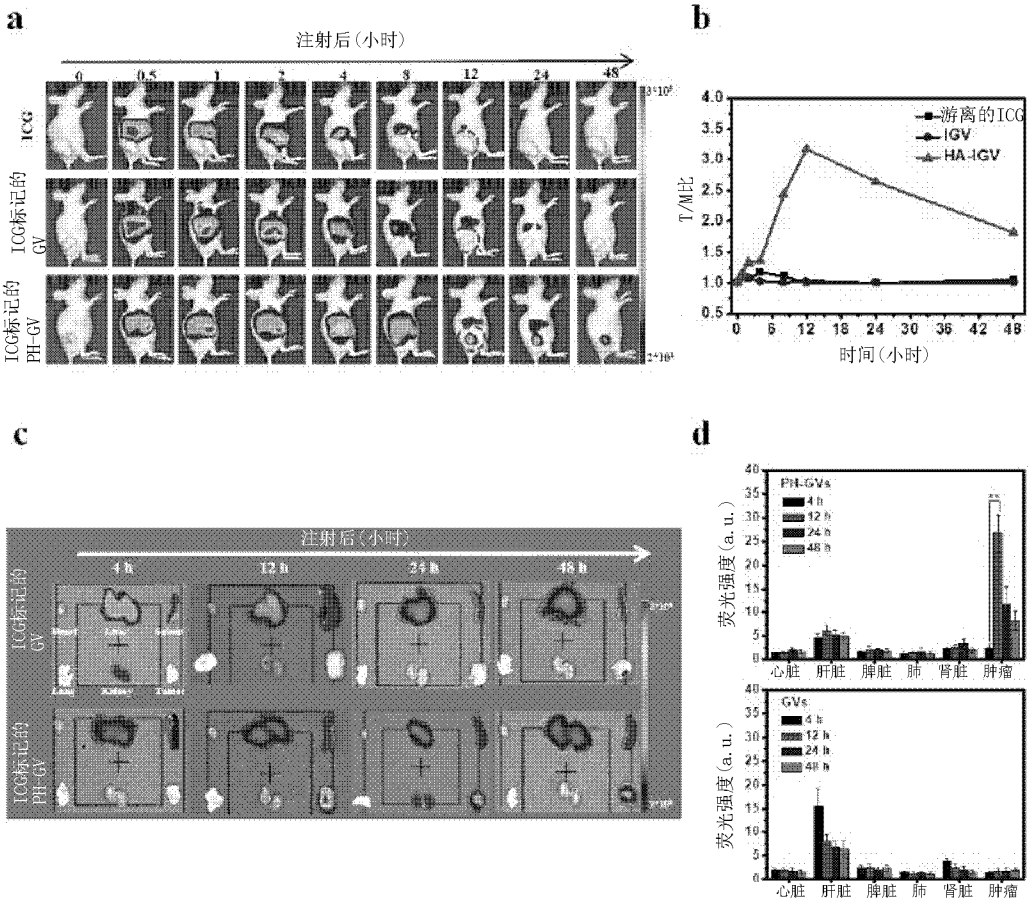

a
注射后(小时)
0
0.5
1
2
4
8
12
24
48
ICG
ICG标记的GV
ICG标记的PH-GV
b
游离的ICG
IGV
HA-IGV
T/M比
时间(小时)
c
注射后(小时)
4 h
12 h
24 h
48 h
ICG标记的GV
ICG标记的PH-GV
d
PH-GVs
GVs
荧光强度(a.u.)
心脏
肝脏
脾脏
肺
肾脏
肿瘤

图 14

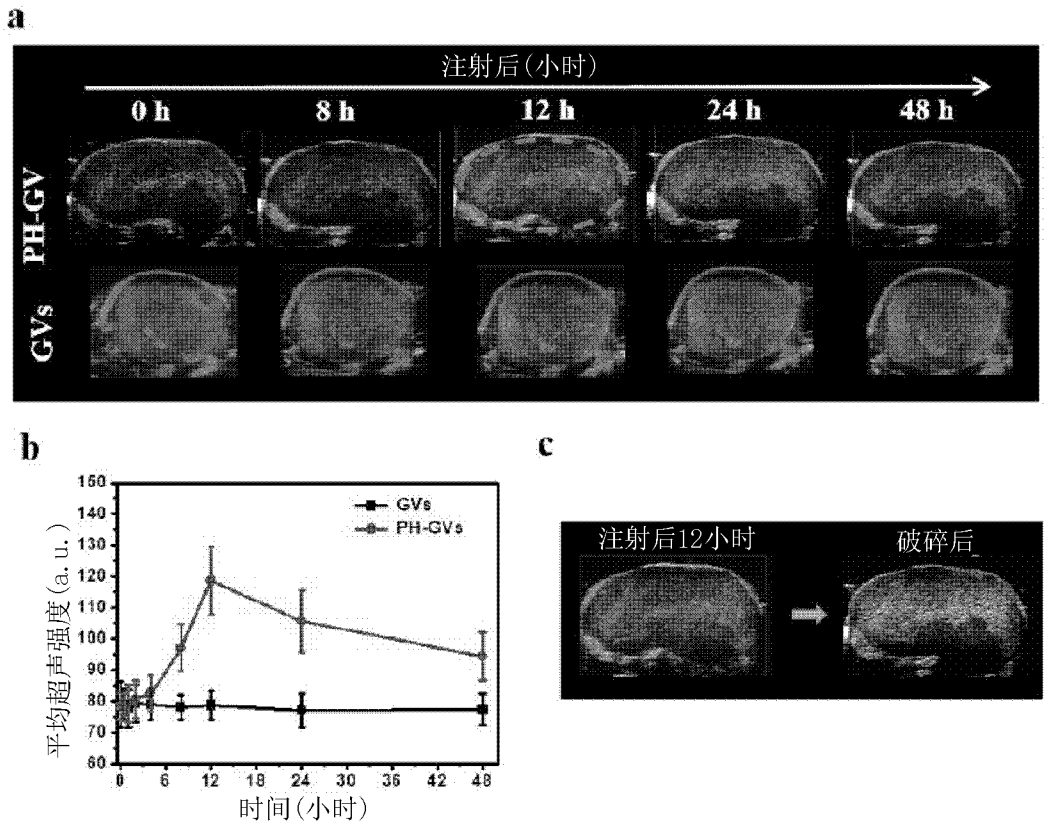

a
注射后(小时)
0 h
8 h
12 h
24 h
48 h
PH-GV
GVs
b
平均超声强度(a. u.)
时间(小时)
GVs
PH-GVs
c
注射后12小时
破碎后

图 15

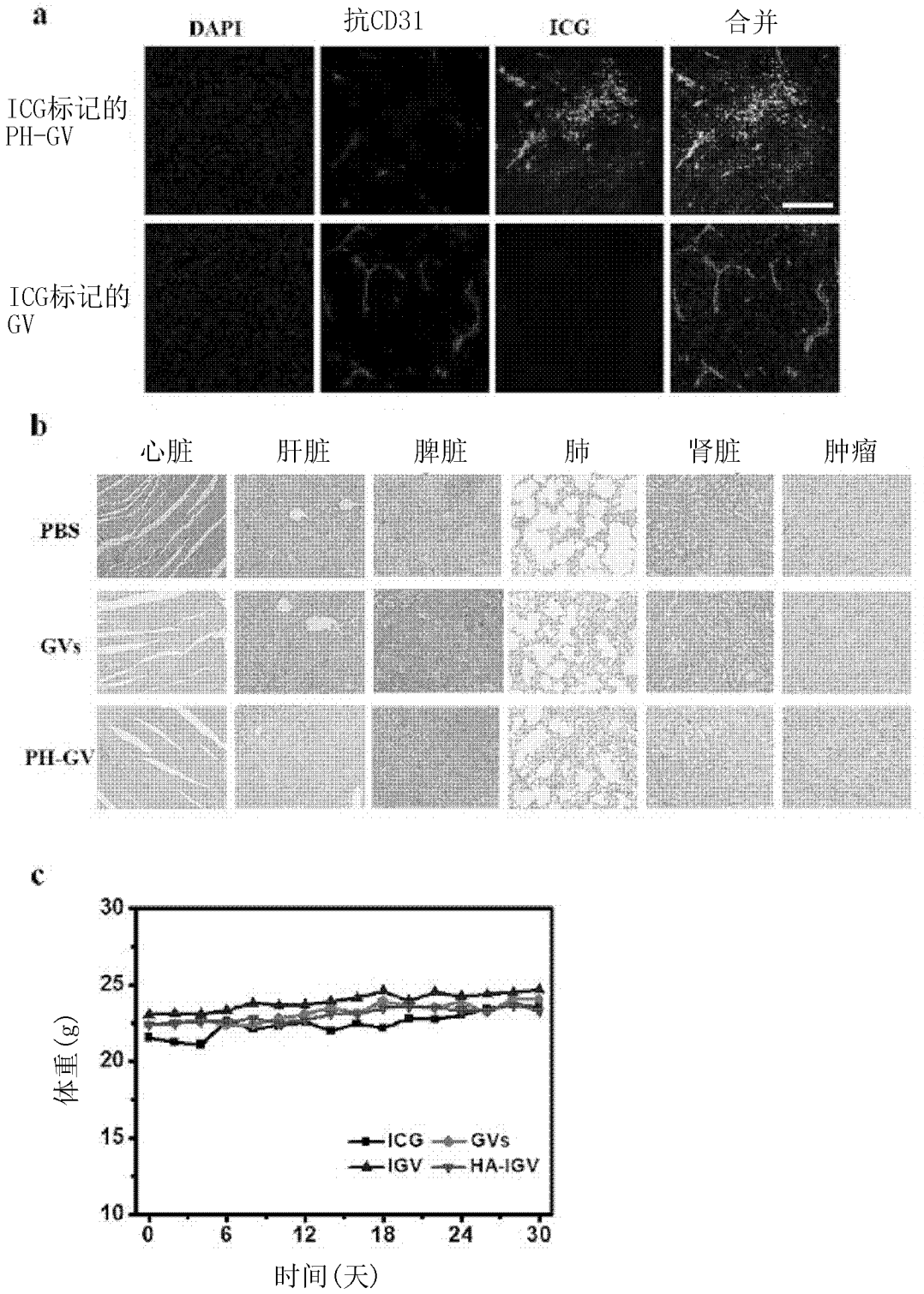

a
DAPI
抗CD31
ICG
合并
ICG标记的PH-GV
ICG标记的GV
b
心脏
肝脏
脾脏
肺
肾脏
肿瘤
PBS
GVs
PH-GV
c
体重(g)
时间(天)
ICG
GVs
IGV
HA-IGV

图 16

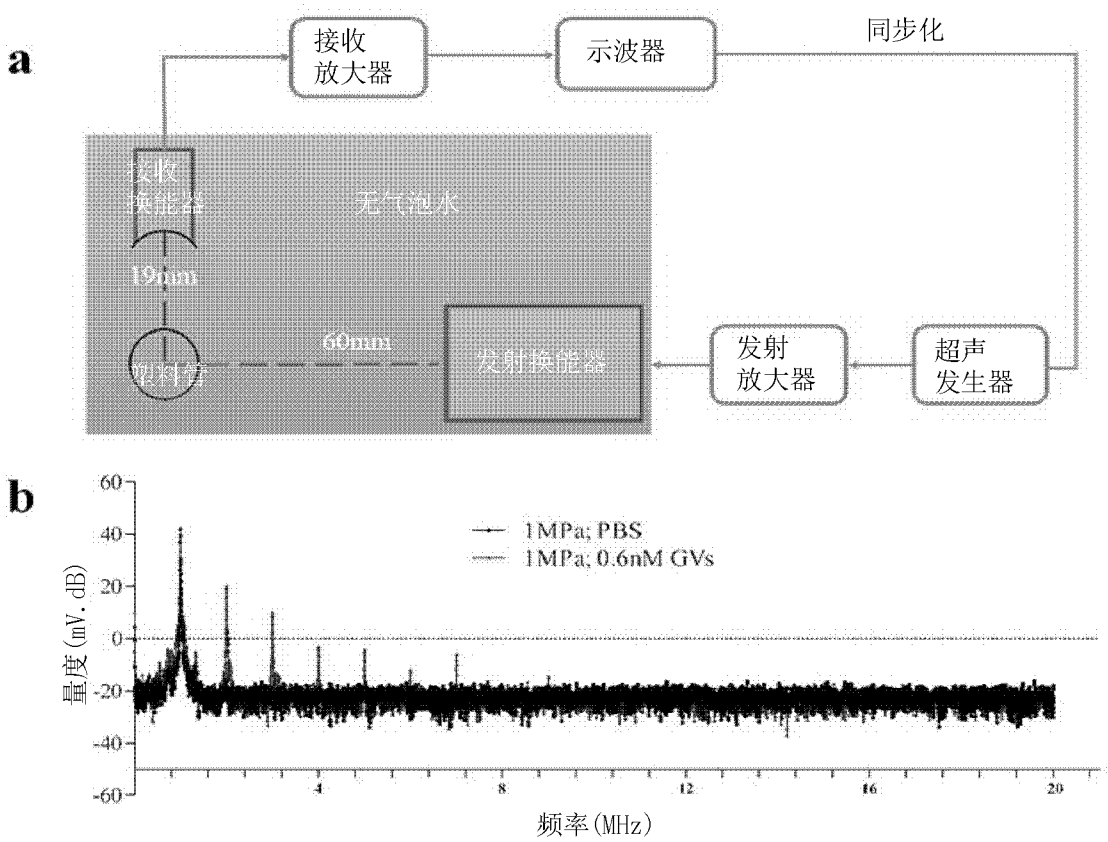

a
接收
放大器
示波器
同步化
19mm
无气泡水
60mm
发射换能器
发射
放大器
超声
发生器
b
1MPa; PBS
1MPa; 0.6nM GVs
量度(mV. dB)
频率(MHz)

图 17

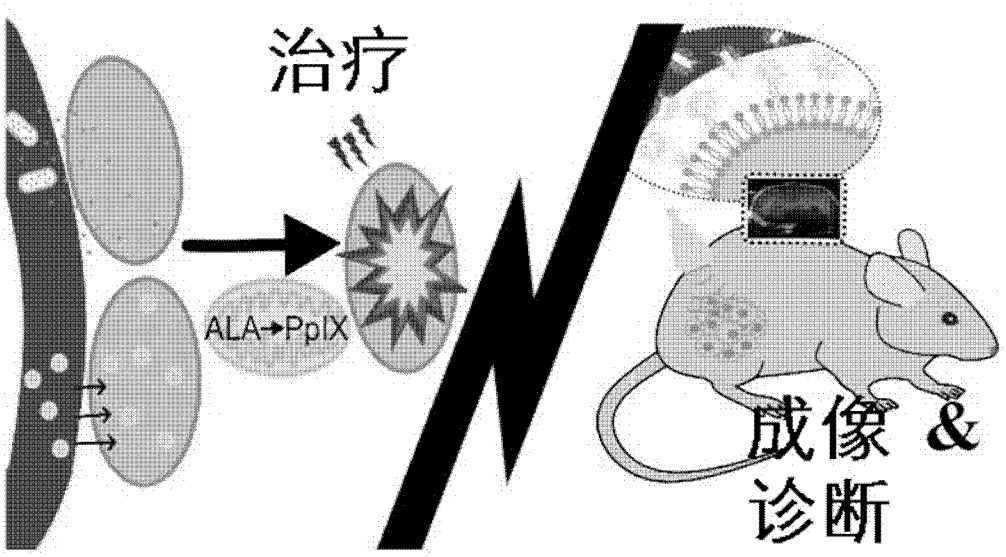


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/093171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/748(2015.01)i; A61B 8/08(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 49/14(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; A61K 49/22(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61B; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; EPTXT; USTXT; CNKI; ISI Web of Science: 香港理工大学, 孙雷, 气囊, 伪空胞, 充气微泡, 胞外囊泡, 靶向, 修饰, 结合, 一部分, 交联, 肿瘤, 聚乙二醇, 肽, 透明质酸, 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺, 二油酰磷脂酰胆碱, 氧气, THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY, Sun Lei, gas vesicle, GV, gas nanostructure, extracellular vesicle, EV, target, modify, moiety, bind, cross link, tumor, polyethylene glycol, PEG, RGD, peptide, hyaluronic acid, HA, DSPE, DOPC, oxygen

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WANG, G. et al. "Surface-modified GVs as Nanosized Contrast Agents for Molecular Ultrasound Imaging of Tumor" *Biomaterials,* Vol. 236, 28 January 2020 (2020-01-28), ISSN: 0142-9612, pp. 1-11	1-21
X	LAKSHMANAN, A. et al. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" *Nature Protocols,* Vol. 10, No. 12, 07 September 2017 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, abstract, page 2051, left-hand column, paragraph 1, page 2053, left-hand column, paragraphs 1, 2	1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12
X	US 2014288421 A1 (The Regents of the University of California) 25 September 2014 (2014-09-25) description, paragraphs [0015], [0023]-[0026]	1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 12

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 July 2020	**24 August 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAKSHMANAN, A. et al. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" *Nature Protocols,* Vol. 10, No. 12, 07 September 2017 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, abstract, page 2051, left-hand column, paragraph 1, page 2053, left-hand column, paragraphs 1, 2	7, 10, 13-21
Y	US 2006216810 A1 (Lu-Kwang Ju) 28 September 2006 (2006-09-28) description, paragraphs [0073]-[0075]	7, 10, 13-21
Y	US 2014288421 A1 (The Regents of the University of California) 25 September 2014 (2014-09-25) description, paragraphs [0015], [0023]-[0026]	7, 10, 13-21
A	LAKSHMANAN, A. et al. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" *Nature Protocols,* Vol. 10, No. 12, 07 September 2017 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, pp. 2050-2080	3, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/093171

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2014288421 A1	25 September 2014	None	
US 2006216810 A1	28 September 2006	US 9107949 B2	18 August 2015
		US 6413763 B1	02 July 2002
		US 6036940 A	14 March 2000
		EP 0956337 A1	17 November 1999
		US 2002132312 A1	19 September 2002
		WO 9821311 A1	22 May 1998
		AU 5359198 A	03 June 1998
		US 2002068356 A1	06 June 2002
		US 7022509 B2	04 April 2006

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/093171

A. 主题的分类

A61K 35/748(2015.01)i; A61B 8/08(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 49/14(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; A61K 49/22(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61B; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;EPTXT;USTXT;CNKI;ISI Web of Science：香港理工大学，孙雷，气囊，伪空胞，充气微泡，胞外囊泡，靶向，修饰，结合，一部分，交联，肿瘤，聚乙二醇，肽，透明质酸，二硬脂酰磷脂酰乙醇胺，二油酰磷脂酰胆碱，氧气，THE HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY, Sun Lei, gas vesicle, GV, gas nanostructure, extracellular vesicle, EV, target, modify, moiety, bind, cross link, tumor, polyethylene glycol, PEG, RGD, peptide, hyaluronic acid, HA, DSPE, DOPC, oxygen

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	WANG, G. 等. "Surface-modified GVs as Nanosized Contrast Agents for Molecular Ultrasound Imaging of Tumor" Biomaterials, 第236卷, 2020年 1月 28日 (2020-01-28), ISSN: 0142-9612, 第1-11页	1-21
X	LAKSHMANAN, A. 等. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" Nature Protocols, 第10卷, 第12期, 2017年 9月 7日 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, 摘要、第2051页左栏第1段、第2053页左栏第1，2段	1、2、4、5、8、9、11、12
X	US 2014288421 A1 (The Regents of the University of California) 2014年 9月 25日 (2014-09-25) 说明书第[0015]、[0023]-[0026]段	1、2、4、5、8、9、11、12

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 7月 28日	2020年 8月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	王炜晨
传真号 (86-10)62019451	电话号码 （86-512）88996454

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	LAKSHMANAN, A. 等. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" Nature Protocols, 第10卷, 第12期, 2017年 9月 7日 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, 摘要、第2051页左栏第1段、第2053页左栏第1，2段	7、10、13-21
Y	US 2006216810 A1 (Lu-Kwang Ju) 2006年 9月 28日 (2006-09-28) 说明书第[0073]-[0075]段	7、10、13-21
Y	US 2014288421 A1 (The Regents of the University of California) 2014年 9月 25日 (2014-09-25) 说明书第[0015]、[0023]-[0026]段	7、10、13-21
A	LAKSHMANAN, A. 等. "Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI" Nature Protocols, 第10卷, 第12期, 2017年 9月 7日 (2017-09-07), ISSN: 1750-2799, 第2050-2080页	3、6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/093171

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
US 2014288421 A1	2014年 9月 25日	无	
US 2006216810 A1	2006年 9月 28日	US 9107949 B2	2015年 8月 18日
		US 6413763 B1	2002年 7月 2日
		US 6036940 A	2000年 3月 14日
		EP 0956337 A1	1999年 11月 17日
		US 2002132312 A1	2002年 9月 19日
		WO 9821311 A1	1998年 5月 22日
		AU 5359198 A	1998年 6月 3日
		US 2002068356 A1	2002年 6月 6日
		US 7022509 B2	2006年 4月 4日