



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I781904 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：104132594

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 02 日

(51)Int. Cl. : A61K31/136 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

A61K31/437 (2006.01)

A61K31/704 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

(30)優先權：2014/10/03 美國

62/059,466

(71)申請人：澳大利亞商恩吉尼克分子傳遞私人有限公司 (澳大利亞) ENGENEIC MOLECULAR DELIVERY PTY LTD. (AU)

澳大利亞

(72)發明人：布拉姆哈特 席曼許 BRAHMBHATT, HIMANSHU (AU)；麥克戴爾米德 珍妮佛 MACDIARMID, JENNIFER (AU)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 102028953B

WO 2013/088250A1

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：24 共 106 頁

(54)名稱

使細菌衍生之完整囊泡對小分子化合物增強裝載之技術

(57)摘要

本發明係關於使細菌衍生之完整囊泡增強裝載小分子化合物，其提供操作及治療優勢。

Enhanced loading of small molecule compounds into intact, bacterially derived vesicles provides operational and therapeutic advantages.

指定代表圖：

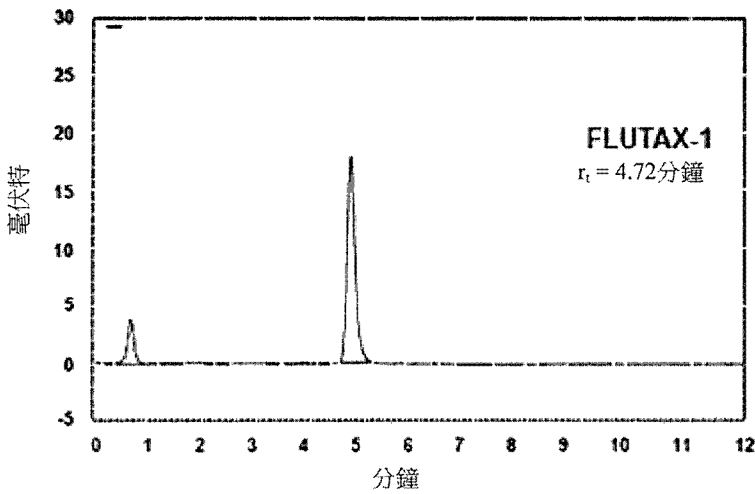


圖3

發明摘要

I781904

※ 申請案號： 104132594

※ 申請日： 104年10月2日

※IPC 分類：

A61K 31/136 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 47/50 (2017.01)

【發明名稱】

使細菌衍生之完整囊泡對小分子化合物增強裝載之技術

ENHANCED LOADING OF INTACT, BACTERIALLY DERIVED
VESICLES WITH SMALL MOLECULE COMPOUNDS

【中文】

本發明係關於使細菌衍生之完整囊泡增強裝載小分子化合物，其提供操作及治療優勢。

【英文】

Enhanced loading of small molecule compounds into intact, bacterially derived vesicles provides operational and therapeutic advantages.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（3）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

使細菌衍生之完整囊泡對小分子化合物增強裝載之技術

ENHANCED LOADING OF INTACT, BACTERIALLY DERIVED
VESICLES WITH SMALL MOLECULE COMPOUNDS

【先前技術】

封入生物活性劑之無生命但完整的細菌囊泡已用於治療目的。在例如國際專利申請案WO2003/033519中，發明人描述含有治療性核酸分子之細菌衍生完整微細胞(minicells)的製備及用途。以WO2005/079854為例，發明人亦展示，小分子藥物(無論親水性或疏水性)可封裝至微細胞中，該等微細胞在被哺乳動物靶細胞攝取時可將藥物釋放至靶細胞之細胞質中。同樣地，美國專利第8,591,862號列出發明人且表明封裝有治療劑之經殺死完整細菌細胞之製備及用途。

根據定義，殺死的細菌細胞為無生命的，微細胞亦如此。任一種類型的完整細菌囊泡均無法複製或主動侵入宿主細胞。

發明人已報導，殺死的細菌細胞及微細胞(儘管其尺寸相對較大)在與細胞接觸時可被哺乳動物靶細胞攝取，且隨後在晚期內體/溶酶體中降解，將其藥物有效負載釋放至靶細胞中。當殺死的細菌細胞或微細胞附著至靶向哺乳動物細胞之配位體時，攝取改良。WO2005/056749中說明性描述的此類配位體為雙特異性抗體，其具有(i)對微細胞表面結構具有特異性之第一臂及(ii)對非吞噬細胞哺乳動物細胞表面受體具有特異性之第二臂。

發明人亦發現，在靜脈內投與帶有腫瘤之哺乳動物宿主後，微細胞經由與包括某些腦瘤之多種實體腫瘤相關的滲漏脈管快速外滲

(WO2013/088250)，且微細胞在腫瘤微環境中積聚。微細胞被限制於腫瘤微環境中且不會穿透至正常組織中或信歸因於直徑約 $400\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$ 之微細胞無法自包圍正常(非腫瘤)組織之正常脈管逸出。

另外，發明人描述用於將藥物有效負載裝載至此類細菌囊泡中之方法。舉例而言，核酸可在濃度梯度下與囊泡一起培育時封裝至完整無生命細菌囊泡中，在此期間，核酸沿梯度向下移動至囊泡中。參見例如美國專利第8,669,101號。或者，可將編碼核酸之質體轉導至活細菌中且複製或轉錄以產生核酸。隨後可殺死封裝核酸之活細菌，得到如上文所描述之殺死的細菌細胞，或其可產生自身裝載有核酸之完整微細胞。參見例如WO2003/033519。

不同於核酸，小分子藥物典型地無法由質體產生。然而，如所述，發明人發現，可直接將此類藥物裝載至囊泡中。MacDiarmid 等人, *Cancer Cell* 11: 431-45 (2007)所報導的實驗中說明其裝載小分子藥物的方法。

對於彼2007揭示內容中報導之實驗，用1至2毫升(ml)磷酸緩衝鹽水(「PBS緩衝液」)中所含有的微細胞實現藥物裝載，該等緩衝液具有以下組成：137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na_2PO_4 、2 mM KH_2PO_4 (調節至pH 7.4)。參見P. Gerhardt等人, *MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY*,第2版, American Society for Microbiology (Washington, D.C.), 1981。在此1 ml至2 ml規模(下文，「小規模」)上，與給定藥物共同培育微細胞之後進行自微細胞移除過量藥物之工作。此工作需要離心，從而使封裝藥物之微細胞成集結粒，且隨後丟棄認為過量藥物存在於其中之上清液。隨後使微細胞再懸浮於新鮮PBS (同樣1至2 ml)中，且對於給定製劑，重複離心及上清液丟棄步驟五次至六次。在本發明中，此習知方法稱為「小規模方案」，其需要共同培育(裝載)步驟及藉由再懸浮、離心及上清液丟棄之洗滌之多個步驟，均

在1至2 ml規模上進行。

作為執行小規模方案之後續，MacDiarmid等人提取與微細胞相關的藥物，參見第433頁上及以下之最後一個完整句子，之後使用HPLC分析測定藥物濃度。對於若干抗癌藥物，MacDiarmid等人報導就例如小紅莓(doxorubicin)之「每個微細胞約1000萬個分子」而言，小規模方法之所估計的裝載效率。同上，第435頁之第一個完整句子。

【發明內容】

藉由進一步研究，發明人已發現，當與初始不含有給定螢光化合物之無生命完整細菌囊泡一起培育時，螢光化合物可出人意料地比其他類似但非螢光化合物更迅速地沿所得濃度梯度向下移動(較高外部至較低內部)至囊泡之細胞質中，且螢光化合物亦可實現出人意料地較高囊泡內濃度。沿著此等線索，發明人觀測到，例如將非螢光化合物與螢光部分連接大大改良至無生命完整細菌囊泡中之裝載、用非螢光化合物自身獲得之相對結果，然而此類修飾典型地實現分子量提高，其據信將妨礙藥物裝載。

尤其就螢光化合物之裝載而言，發明人亦已確定，當在已添加有諸如鹼金屬鹵化物鹽(例如氯化鉀、氯化鈉及溴化鉀)之二元離子化合物之培養基中實現螢光化合物之裝載時，效率的增強甚至更大。依照本發明，濃度低至約200 mM數量級之此類化合物之存在於裝載培養基中使螢光化合物之裝載效率提高兩倍或兩倍以上，其中裝載在僅約十五分鐘之後有效地完成。

更一般而言，發明人發現，可除去上文所論述之小規模方案中涉及之離心，且對於螢光及非螢光化合物兩者，小規模方案自身替換為共同培育(裝載)繼而經由交叉流過濾之洗滌之多個步驟的方法。一般而言，參見 CROSS FLOW FILTRATION METHOD HANDBOOK (29-0850-76 AB), GE Healthcare, 訪問

www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1392028292867/litdoc29085076_20140313045908.pdf。亦參見 MEMBRANE PROCESSES IN BIOTECHNOLOGY AND PHARMACEUTICS, Catherine Charcosset編, Elsevier (2012)及 STERILE FILTRATION: A PRACTICAL APPROACH, Maik W. Jornitz及 Theodore H. Meltzer編, Taylor & Francis (2000)。根據本發明，用除其他供應商外可購自 Sartorius Stedim Systems, GE Healthcare and Pall Corporation 之醫藥級過濾器進行交叉流過濾。基於由供應商提供之使用者手冊中之描述，視過濾器之尺寸、製備規模等而定，選擇適合的過濾器在熟習過濾領域之彼等者之範圍內。另外，過濾器之孔徑為標準的，例如 0.45 μm 或 0.2 μm ，視過濾目的而定。在過濾期間所施加之壓力在各步驟間變化且根據需要進行調節。

在此情形下，當在緩衝液中洗滌封裝藥物之囊泡之規模在所採用之緩衝液體積方面提高約四與五個之間的數量級(亦即，相比於小規模方案之毫升規模，在公升規模(下文，「大規模」))，例如藉由每次重複在約20公升新鮮緩衝液中重複洗滌裝載藥物之囊泡三至五次時，發現涉及出人意料的優勢。依照此途徑(下文，「大規模方法」)，因此，可例如在針對給定批次之裝載藥物之囊泡之洗步驟中採用約100公升數量級之緩衝液。

因此，本發明方法不僅使得游離內毒素水準下降，且亦使得習知小規模方案截留於囊泡外表面上保留之有效負載化合物之迄今未辨識部分減少。藉助於說明，小規模方案使得每個完整微細胞裝載許多小紅莓分子，上述 MacDiarmid 等人(2007)估計為約1000萬。在本發明之大規模方法之情況下，此數值為每個微細胞約100萬個分子(參見以下實例6)。因此，小規模方案與使一些900萬個小紅莓分子截留至封裝微細胞外層相關，與本發明方法形成顯著對比(參見實例14)。

因此，根據本發明方法，有效負載化合物截留至封裝囊泡外部減到最少，且當移除濃度梯度時，裝載化合物保持在囊泡內部。因此，本發明提供一種製備以每 10^9 個微細胞數百奈克化合物之數量級的量封入裝載化合物之完整無生命細菌囊泡的高效方法。

因此，在一個態樣中，本發明提供一種包含封入螢光小分子藥物之完整且無生命的細菌囊泡之組合物，該藥物不為小紅莓、伊立替康(irinotecan)、比山群(bisantrene)、拓朴替康(topotecan)、表柔比星(epirubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、Oregon Green® 488結合之太平洋紫杉醇(paclitaxel)或BODIPY® FL結合之長春鹼(vinblastine)。囊泡為完整細菌衍生之微細胞或殺死的細菌細胞。在一些實施例中，微細胞封入小分子藥物之至少500,000分子。較佳地，小分子藥物為生物活性的。在一些實施例中，小分子藥物之分子量為約900道爾頓或900道爾頓以下。在其他實施例中，小分子藥物為細胞毒性的。例示性小分子藥物包括(但不限於)嗎啉基蒽環衍生物，諸如PNU-159682。在某些實施例中，小分子藥物為活體內活化的。

在另一態樣中，本發明提供一種包含封入式D-L-F化合物或其鹽之完整且無生命的細菌囊泡之組合物，其中：D為小分子藥物之殘基，L為連接子，且F為螢光部分。適用於本發明之連接子之半衰期在6小時與24小時之間，或在酸性pH條件下，諸如在哺乳動物細胞之內體中降解。下文詳述說明性小分子藥物、螢光部分及連接子及其結構。

在又一態樣中，提供一種包含封入化合物之細菌衍生之完整細菌囊泡的組合物，該化合物包含活性劑經由連接子結合至能量轉移部分，其中活性劑不為Oregon Green® 488結合之太平洋紫杉醇及BODIPY® FL結合之長春鹼。在一些實施例中，能量轉移部分為發光部分，包含共軛 π 系統，或包含吡啶基部分、吡基部分或苯并咪唑基部分。

在相關態樣中，本發明係針對一種不藉由離心使多數微細胞裝載所需化合物之方法。該方法包括以下步驟：(A)在一體積所需化合物於緩衝液體中之培育溶液中培育該多數微細胞，其中體積為約100 ml或100 ml以上數量級，及隨後(B)使該多數微細胞經多個洗步驟，各包含用數量級為公升之一體積緩衝液體交叉流過濾微細胞，其中洗步驟中無一者採用離心微細胞。在一些實施例中，使與待裝載在微細胞內之所需化合物不同之二元離子化合物溶解於培育溶液中，達到約200 mM或200 mM以上數量級之濃度。較佳地，步驟(B)包含三至五個洗步驟。在一些實施例中，所需化合物為螢光的。在一些實施例中，步驟(A)之培育約4小時之時間段。在一些實施例中，所需化合物為生物活性的。所需化合物可為分子量為約900道爾頓或900道爾頓以下之小分子藥物。較佳地，小分子藥物為細胞毒性的。小分子藥物可為活體內活化的。在其他實施例中，所需化合物具有式D-L-F或為其鹽，其中D該小分子藥物之殘基，L為連接子，且F為螢光部分。較佳地，連接子之半衰期在6小時與24小時之間或在哺乳動物細胞之內體中降解。

在又一態樣中，描述涉及在有需要患者中治療癌症。治療包含向患者投與有效量之本發明所涵蓋之組合物。在一些實施例中，組合物包含細胞毒性化合物。

【圖式簡單說明】

圖1展示封裝有長春鹼BODIPY® FL之微細胞之螢光影像。該等微細胞在黑色背景上發出亮紅色螢光，指示長春鹼BODIPY® FL存在於微細胞中且不存在於外部空間中。

圖2展示封裝有FLUTAX-1之微細胞之螢光影像。該等微細胞在黑色背景上發出亮綠色螢光。因此，FLUTAX-1封裝至微細胞中且未保留在外部空間中。

圖3展示來自 1×10^9 個封裝FLUTAX-1之微細胞之提取物之HPLC

分離之例示性層析圖。在滯留時間(r_t) = 4.72分鐘時發現對應於FLUTAX-1之峰值。此峰值之區域用於藉由與已知量之FLUTAX-1之標準曲線進行比較來計算封裝至微細胞中之FLUTAX-1之量。

圖4展示封裝有與Oregon® Green-488結合之太平洋紫杉醇之微細胞之螢光影像。微細胞在黑色背景上發出亮綠色螢光展示結合物封裝至微細胞中。

圖5展示封裝有FCP之微細胞之螢光影像。微細胞在黑色背景上發出亮綠色螢光，指示FCP封裝至微細胞中。

圖6展示來自裝載FCP之微細胞(1×10^9)之提取物之HPLC分離之例示性層析圖。在滯留時間(r_t) = 3.64分鐘時發現對應於FCP之峰值。此峰值之區域用於藉由與已知量之FCP之標準曲線進行比較來計算封裝至微細胞中之FCP之量。

圖7展示封裝有BacLight™ Green之微細胞之螢光影像。該等微細胞在黑色背景上發出亮綠色螢光。因此，BacLight™ Green展示與微細胞相關且不與外部空間相關。

圖8展示由空的及封裝BacLight™ Green之微細胞之流動式細胞量測術分析產生之直方圖。x軸表示FL-1通道中之螢光，且y軸=計數。封裝BacLight™ Green之微細胞呈現相異的群體，其相比於空的微細胞移位至右側，指示該群體之微細胞為螢光的。

圖9展示封裝有小紅莓之微細胞之螢光影像。該等微細胞在黑色背景上發出亮紅色螢光，指示小紅莓存在於微細胞內而非外部空間中。

圖10展示來自 1×10^9 個封裝小紅莓之微細胞之提取物之HPLC分離之例示性層析圖。在滯留時間(r_t) = 5.5分鐘時發現對應於小紅莓之峰值。此峰值之區域用於藉由與已知小紅莓量之標準曲線進行比較來計算封裝至微細胞中之小紅莓之量。

圖11展示封裝有核酸染料SYTO 9之微細胞之螢光影像。該等微細

胞在黑色背景上發出亮綠色螢光，指示SYTO 9與微細胞而非外部空間相關。

圖12展示由空的及封裝SYTO 9之微細胞之流動式細胞量測術分析產生之直方圖。x軸表示FL-1通道中之螢光；y軸=計數。封裝SYTO 9之微細胞呈現相異的群體，其相比於空的微細胞移位至右側；因此，封裝微細胞為螢光的。

圖13展示封裝有9-胺基吡啶鹽酸鹽水合物之微細胞之螢光影像。該等微細胞在黑色背景上發出藍色螢光，指示9-胺基吡啶鹽酸鹽水合物與微細胞而非外部空間相關。

圖14展示來自 1×10^9 個封裝太平洋紫杉醇之微細胞之提取物之HPLC分離之例示性層析圖。在滯留時間(r_t) = 4.48分鐘時發現對應於太平洋紫杉醇之峰值。此峰值之區域用於藉由與已知量之標準曲線進行比較來計算封裝至微細胞中之太平洋紫杉醇之量。

圖15展示來自 1×10^9 個封裝TF.Pac之微細胞之提取物之HPLC分離之例示性層析圖。在滯留時間(r_t) = 4.57分鐘時發現對應於TF.Pac之峰值。此峰值之區域用於藉由與已知TF.Pac量之標準曲線進行比較來測定封裝至微細胞中之TF.Pac之量。

圖16展示在兩種不同波長處，具有不同濃度之葉酸之裝載小紅莓之溶液的螢光讀數。

圖17展示游離小紅莓之標準曲線之產生。

圖18展示螢光淬滅劑葉酸對小紅莓裝載量之影響。

圖19展示根據UV (250 nm)讀數之小紅莓裝載至微細胞中之HPLC定量。

圖20展示根據相對螢光(RF)讀數之小紅莓裝載量之HPLC定量。

圖21展示在來自各種離子鹽之解離之離子存在下裝載至微細胞中之FLUTAX-1之過程及量。

圖22描繪針對表示將FLUTAX-1裝載至微細胞中15分鐘之時間點，圖21中所展示之資料。

圖23展示共同培育溫度對藉由離子增強螢光介導之化合物跨膜移動至微細胞中的影響。

圖24說明人類受體酪胺酸激酶之20種亞科及58個構件(摘錄自Lemmon及Schlessinger, *Cell* 141: 1117-134 (2010))。

【實施方式】

本發明提供用於將化合物裝載至細菌衍生之完整無生命的囊泡中之方法、包括微細胞及殺死的細菌細胞及組合物(較佳醫藥級)之類別，其含有裝載此類化合物之囊泡。

(A) 定義

除非另外定義，否則本說明書中所用之所有技術及科學術語具有與熟習相關技術者通常所理解相同的含義。

為方便起見，下文提供本說明書、實例及隨附申請專利範圍中所採用之某些術語及片語之含義。在整個說明書中定義其他術語及片語。

除非上下文另外明確指示，否則單數形式「一」及「該」包括多個指示物。

如本文所使用，術語「約」將為一般熟習此項技術者理解且將在一定程度上視使用其之上下文而變化。若使用一般熟習此項技術者並不清楚的術語，則給定使用該術語之上下文，「約」將意謂特定術語至多加或減10%。

如本文所使用，除當上下文另外需要時外，術語「包含(comprise)」及該術語之變化形式，諸如「包含(comprising)」、「包含(comprises)」及「包含(comprised)」並不意欲排除其他添加物、組分、整體或步驟。

片語「生物活性(biologically active/biological activity)」用於限定或指示(視具體情況)化合物或組合物對活的物質之影響。因此，若材

料與人類或動物體中之任何細胞組織具有相互作用或對其有影響，例如藉由與細胞中之蛋白質、核酸或其他分子反應，則材料為生物活性的或具有生物活性。

本文中可互換使用之「癌症」、「贅瘤」、「腫瘤」、「惡性腫瘤」及「癌瘤」係指展現特徵為明顯失去細胞增殖控制之異常生長表型之細胞或組織。本發明之方法及組合物尤其適用於惡性、轉移前、轉移性及非轉移性細胞。

「藥物」係指在動物，尤其哺乳動物及人類中產生局部或全身性影響之任何生理學上或藥理學上活性的物質。

在本說明書中可互換使用之術語「個體(Individual)」、「個體(subject)」、「主體」及「患者」係指需要診斷、治療或療法之任何哺乳動物個體。個體(individual/subject)、主體或患者可為人類或非人類動物。因此，適合的個體可包括(但不限於)非人類靈長類動物、牛、馬、狗、貓、天竺鼠、兔、大鼠及小鼠。

術語「治療(treatment)」、「治療(treating)」、「治療(treat)」及其類似者係指在腫瘤患者中獲得所需藥理學及/或生理作用。在完全或部分預防腫瘤生長或其症狀方面，該作用可為預防性的，及/或在部分或完全穩定或治癒腫瘤方面及/或針對可歸因於腫瘤之不良作用，該作用可為治療性的。治療涵蓋在哺乳動物，尤其人類中之腫瘤之任何治療。所需治療效果可為腫瘤反應，其可量測為腫瘤塊減少或抑制腫瘤塊增加。或者或另外，所需治療效果可為總患者存活期、無進展存活期、腫瘤復發時間延長或不良作用減少。

「烷基」係指具有1至20，或1至10，或1至6，或1至4個碳原子之單價飽和直鏈或分支鏈線性烴基。烷基之實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、第三丁基、戊基、己基、戊基或辛基。C₁-C₄直鏈或分支鏈烷基亦稱為「低碳烷基」。

「伸烷基」係指具有1至20，或1至10，或1至6，或1至4個碳原子，或1或2個碳原子之二價飽和直鏈或分支鏈線性烴基。伸烷基之實例包括 $-(CH_2)_y-$ ，其中 y 為1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

「環烷基」係指具有3至10，或3至8個碳原子之環烴基。環烷基之實例包括例如金剛烷基、環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及環己烯基。「 C_{u-v} 環烷基」係指具有 u 至 v 個碳原子作為環成員之環烷基。

「雜環」或「雜環的」或「雜環基(heterocyclo)」或「雜環烷基」或「雜環基(heterocyclyl)」係指具有總計3至18個環原子、1至14個碳原子及1至6個係選自由氮、硫或氧組成之群的雜原子之飽和或部分飽和環狀基團，且包括單環及多環系統，包括稠合、橋連及螺環系統。對於具有芳族及/或非芳族環之多環系統，當存在至少一個環雜原子且連接點在非芳族環之原子處(例如1,2,3,4-四氫喹啉-3-基、5,6,7,8-四氫喹啉-6-基及十氫喹啉-6-基)時，應用術語「雜環的」或「雜環」或「雜環基(heterocyclo)」或「雜環烷基」或「雜環基(heterocyclyl)」。在一個實施例中，雜環基之氮原子及/或硫原子視情況經氧化以提供N-氧化物、亞磺醯基或磺醯基部分。更確切而言，雜環基包括(但不限於)四氫吡喃基、吡啶基、N-甲基吡啶-3-基、哌嗪基、N-甲基吡咯啉-3-基、3-吡咯烷基、2-吡咯啉酮-1-基、嗎啉基及吡咯烷基。指示碳原子數目之字首(例如 C_3-C_{10})係指雜環基部分除雜原子數目以外之碳原子總數。

經取代之烷基、伸烷基、環烷基或雜環係指分別具有1至5或1至3個並未實質上干擾化合物之抗癌活性之取代物之烷基、伸烷基、環烷基或雜環。烷基上取代基之實例包括-OH、-NH₂、-NO₂、-CN、-COOH、鹵基、鹵烷基、芳基、雜芳基、烷芳基、烷氧基、鹵烷氧基、-OR^a、側氧基(=O)、-O-COR^a、-COR^a、-SO₃H、-NHR^a、-NR^aR^b、-COOR^a、-CHO、-CONH₂、-CONHR^a、-CONR^aR^b、-NHCOR^a、-NR^cCOR^a、-NHCONH₂、-NHCONR^aH、-NHCONR^aR^b、-NR^cCONH₂、-NR^cCONR^aH、

$-\text{NR}^c\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、
 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHNHR}^a$ 、
 $-\text{NHNR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NHR}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CH}=\text{CHR}^a$ 、 $-\text{CH}=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、
 $-\text{CR}^c=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CR}^c=\text{CHR}^a$ 、 $-\text{CR}^c=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CCR}^a$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$ 、
 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$ 及 $-\text{CO}-$ 烷基，其中 R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 獨立地為烷基、鹵烷基、環
 烷基、苯基或苯甲基。在一些實施例中，取代基係選自 $-\text{OH}$ 、鹵基、
 苯基、苯甲基、吡啶基及 C_1-C_8 烷氧基。在一些實施例中，取代基係選
 自 $-\text{OH}$ 、鹵基及 C_1-C_4 烷氧基。伸烷基、環烷基或雜環基團上取代基之
 實例包括 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{COOH}$ 、鹵基、鹵烷基、烷基、
 芳基、雜芳基、烷芳基、烷氧基、鹵烷氧基、側氧基($=\text{O}$)、 $-\text{OR}^a$ 、
 $-\text{O}-\text{COR}^a$ 、 $-\text{COR}^a$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{COOR}^a$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、
 $-\text{CONHR}^a$ 、 $-\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NHCOR}^a$ 、 $-\text{NR}^c\text{COR}^a$ 、 $-\text{NHCONH}_2$ 、
 $-\text{NHCONR}^a\text{H}$ 、 $-\text{NHCONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^c\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NR}^c\text{CONR}^a\text{H}$ 、
 $-\text{NR}^c\text{CONR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、
 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NH})-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NH}_2$ 、
 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NHR}^a$ 、 $-\text{NR}^d-\text{C}(=\text{NR}^c)-\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHNHR}^a$ 、
 $-\text{NHR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NHR}^a$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CH}=\text{CHR}^a$ 、 $-\text{CH}=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、
 $-\text{CR}^c=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CR}^c=\text{CHR}^a$ 、 $-\text{CR}^c=\text{CR}^a\text{R}^b$ 、 $-\text{CCR}^a$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^a$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$ 、
 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$ 及 $-\text{CO}-$ 烷基，其中 R^a 、 R^b 、 R^c 及 R^d 獨立地為烷基、鹵烷基、環

烷基、苯基或苯甲基。在一些實施例中，取代基係選自-OH、鹵基、 C_1 - C_4 烷基、苯基、苯甲基、吡啶基及 C_1 - C_8 烷氧基。在一些實施例中，取代基係選自-OH、 C_1 - C_4 烷基、鹵素及 C_1 - C_4 烷氧基。

「芳基」係指具有6至14個碳原子且無環雜原子且具有單個環(例如苯基)或多個縮合(稠合)環(例如萘基或蒽基)之芳族基。對於多環系統，包括具有不含環雜原子之芳族及非芳族環稠合、橋連及螺環系統，當連接點在芳族碳原子處時，應用術語「芳基」或「Ar」。舉例而言，5,6,7,8四氫萘-2-基為芳基，其連接點在芳族苯環之2-位置處。

「經取代之芳基」係指經1至8，或在一些實施例中1至5，1至3或1至2個係選自由以下組成之群的取代基取代之芳基：-OH、側氧基(=O)、-NH₂、-NO₂、-CN、-COOH、鹵基、鹵烷基、烷基、芳基、雜芳基、烷芳基、烷氧基、鹵烷氧基、-OR^a、-O-COR^a、-COR^a、-COOH、-SO₃H、-NHR^a、-NR^aR^b、-COOR^a、-CHO、-CONH₂、-CONHR^a、-CONR^aR^b、-NHCOR^a、-NR^cCOR^a、-NHCONH₂、-NHCONR^aH、-NHCONR^aR^b、-NR^cCONH₂、-NR^cCONR^aH、-NR^cCONR^aR^b、-C(=NH)-NH₂、-C(=NH)-NHR^a、-C(=NH)-NR^aR^b、-C(=NR^c)-NH₂、-C(=NR^c)-NHR^a、-C(=NR^c)-NR^aR^b、-NH-C(=NH)-NH₂、-NH-C(=NH)-NHR^a、-NH-C(=NH)-NR^aR^b、-NH-C(=NR^c)-NH₂、-NH-C(=NR^c)-NHR^a、-NH-C(=NR^c)-NR^aR^b、-NR^d-C(=NH)-NH₂、-NR^d-C(=NH)-NHR^a、-NR^d-C(=NH)-NR^aR^b、-NR^d-C(=NR^c)-NH₂、-NR^d-C(=NR^c)-NHR^a、-NR^d-C(=NR^c)-NR^aR^b、-NHNH₂、-NHNHR^a、-NHR^aR^b、-SO₂NH₂、-SO₂NHR^a、-SO₂NR^aR^b、-CH=CHR^a、-CH=CR^aR^b、-CR^c=CR^aR^b、-CR^c=CHR^a、-CR^c=CR^aR^b、-CCR^a、-SH、-SR^a、-S(O)R^a、-S(O)₂R^a及-CO-烷基，其中R^a、R^b、R^c及R^d獨立地為烷基、環烷基、苯基或苯甲基。在一些實施例中，取代基係選自-OH、鹵基、 C_1 - C_4 烷基、苯基、苯甲基、吡啶基及 C_1 - C_8 烷氧基。在一些實施例中，取代基係選

自-OH、C₁-C₄烷基、鹵素及C₁-C₄烷氧基。

「鹵烷基」係指經1至5或1至3個鹵基取代之烷基。

「烷氧基」係指基團-O-烷基，其中烷基如本文所定義。「經取代之烷氧基」係指-O-(經取代之烷基)。

「鹵烷氧基」係指基團-O-鹵烷基，其中鹵烷基如本文所定義。

「鹵基」係指-F、-Cl、-Br或-I。

「雜芳基」指示具有1至14個碳原子及1至6個係選自由氧、氮及硫組成之群的雜原子之芳族基，且包括5員至18員環或環系統，包括單個環(例如咪唑基)或多個環(例如苯并咪唑-2-基及苯并咪唑-6-基)。對於多環系統，包括具有芳族及非芳族環之稠合、橋連及螺環系統，若存在至少一個環雜原子且連接點在芳環之原子處(例如1,2,3,4-四氫喹啉-6-基及5,6,7,8-四氫喹啉-3-基)，則應用術語「雜芳基」。在一個實施例中，雜芳基之氮及/或硫環原子視情況經氧化以提供N-氧化物(N→O)、亞磺醯基或磺醯基部分。在一些實施例中，雜芳基包含總共5、6或7個環原子，且分別稱為5員、6員或7員雜芳基。雜芳基之實例包括(但不限於)吡啶基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、異噻唑基、三唑基、咪唑基、異噁唑基、吡咯基、吡唑基、噻嗪基、嘧啶基、苯并呋喃基、四氫苯并呋喃基、異苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并異噻唑基、苯并三唑基、吲哚基、異吲哚基、苯并噁唑基、喹啉基、四氫喹啉基、異喹啉基、喹唑啉基、苯并咪唑基、苯并異噁唑基或苯并噻吩基。

「小規模方案」指示例示在MacDiarmid等人(2007)中之程序，其中細菌衍生之囊泡，諸如微細胞裝載有緩衝液體(典型地PBS緩衝液)中之治療有效負載，該緩衝液體積數量級為毫升，例如1至2 ml，其後裝載微細胞經多個洗步驟，涉及離心、上清液丟棄及微細胞再懸浮，同樣在毫升體積之緩衝液體中進行。

相比之下，「大規模方法」係指本發明之方法，其中裝載微細胞

經多個(例如3至5個)洗步驟，其中採用交叉流過濾(無離心)，利用適用於細胞生物學研究之體積數量級為幾十公升(例如約20公升)之每步驟PBS緩衝液或其他緩衝液體，諸如HEPES緩衝鹽水、硼酸酯緩衝鹽水及Tris緩衝鹽水。另外，對於大規模方法，使微細胞裝載有治療有效負載(諸如小分子藥物)之步驟在一體積緩衝液體(其較佳約100毫升或100毫升以上數量級)中進行，其中緩衝液體，諸如PBS緩衝液視情況具有約200 mM或200 mM以上數量級之二元離子化合物(諸如KCl)之濃度。

片語「醫藥級」指示不具有親代細胞污染、細胞碎片、游離內毒素及其他熱原質，足以符合人類靜脈內投與之管理要求。參見例如美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)之「工業熱原質及內毒素測試指南(Guidance for Industry-Pyrogen and Endotoxins Testing)」(2012年6月)。

「化合物之殘基」指示藉由自具有原子或部分，諸如氫原子、-OH或-CO-CH₃基團之化合物移除獲得之部分。因此，在一些實施例中，化合物之殘基為藉由自化合物移除氫原子獲得之部分。

「經取代之雜芳基」係指經1至8或在一些實施例中1至5、或1至3、或1至2個係選自由針對經取代之芳基所定義之取代基組成之群的取代基取代的雜芳基。

「立體異構體」及「立體異構體」指示不同之處在於一或多個立體中心之對掌性之化合物。立體異構體包括對映異構體及非對映異構體。若本發明化合物具有一或多個不對稱中心或具有不對稱取代之雙鍵，則其可以立體異構形式存在，且因此，可以個別立體異構體形式或以混合物形式產生。除非另外指明，否則該描述意欲包括個別立體異構體以及混合物。用於測定立體異構體之立體化學及分離之方法為熟知的，如MARCH'S ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY,第7版

(Wiley, 2013)之第4章中之論述所證明。

「互變異構體」係指質子位置不同之化合物的替代形式，諸如烯醇-酮基及亞胺-烯胺互變異構體，或含有連接至環-NH-部分與環=N-部分之環原子之雜芳基的互變異構形式，諸如吡唑、咪唑、苯并咪唑、三唑及四唑。同理，本文中提及「化合物」同樣包括其互變異構體。

「醫藥學上可接受之鹽」係指衍生自此項技術中熟知之多種有機及無機反離子的醫藥學上可接受之鹽，且包括例如鈉、鉀、鈣、鎂、銨及四烷基銨。當分子含有鹼性官能基時，有機或無機酸，諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及其類似者之酸加成鹽；或用諸如以下之有機酸形成：乙酸、丙酸、己酸、環戊丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、丁二酸、蘋果酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、3-(4-羥苯甲醯基)苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羥基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、草酸、4-甲苯磺酸、樟腦磺酸、甲磺酸、4-甲基雙環[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡糖庚酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、第三丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、麩胺酸、羥基萘甲酸、柳酸、硬脂酸、黏康酸及其類似者。鹽亦可為當母體化合物中所存在之酸性質子經金屬離子(例如鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)置換；或與有機鹼(例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三甲胺、N-甲基還原葡糖胺及其類似者)配位時所形成之鹽。醫藥學上可接受之鹽適用於在患者體內投與且具有合乎需要的藥理學特性。適合的鹽進一步包括HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION, AND USE, 第2版(Wiley, 2011)中所描述之彼等鹽。

在本說明書中，「有效負載」標識或限定待裝載或已裝載至微細胞中以用於遞送至靶宿主細胞之生物活性材料。

(B) 發明人之發現及其驚人本質

如所述，發明人發現，螢光本身大大增加小分子化合物至完整無生命細菌囊泡中之裝載效率。舉例而言，以下實例展示可將未經修飾之太平洋紫杉醇封裝至微細胞中以達到每個微細胞2,115個複本(分子)之濃度(實例9)，且同時太平洋紫杉醇之水可溶衍生物TF.Pac可達到每個微細胞50,000個複本(實例10)，均藉由與微細胞一起共同培育。相比之下，可將太平洋紫杉醇、FLUTAX-1及FITC結合之太平洋紫杉醇(FCP)之兩種螢光衍生物均裝載至微細胞中以達到每個微細胞270,000個複本(實例2)及230,000個複本(實例4)之較高濃度。相對於藉由未經修飾(未衍生化)之非螢光化合物達到之濃度，此等濃度分別高127倍及109倍。

預期較大分子通常將比較小分子更難裝載至囊泡中，因為咸信裝載方法需要運送通過膜通道，其中尺寸將影響移動。然而，儘管FCP(分子量：1455.6道爾頓)遠大於太平洋紫杉醇(分子量：853.9道爾頓)，螢光衍生物可達到比太平洋紫杉醇自身高109倍之囊泡內濃度。出於此原因，發明人在此方面之發現亦為非常驚人的。

可能歸因於除其(自)螢光特性外之較小尺寸優勢，小紅莓及米托蒽醌分別達到每個微細胞約800,000個複本(實例6)及759,000個複本(實例12)。螢光化合物BacLight™ Green染料(實例5)、SYTO 9(實例7)及9-AAHH(實例8)亦展現較高裝載效率。

太平洋紫杉醇、太平洋紫杉醇Oregon Green®-488之又一個螢光結合物同樣達到如此高之濃度(實例3)。同樣地以高效率將長春鹼之螢光衍生物BODIPY® FL裝載至微細胞中，如實例1所表明。利用未經修飾之長春鹼此類裝載為不可能的，其為使用BODIPY® FL結合之長春鹼以及Oregon Green® 488結合之太平洋紫杉醇以藉由螢光顯微法證明用藥物裝載微細胞之上述MacDiarmid等人(2007)之揭示內容未顯而易見之事實。參見MacDiarmid等人(2007)第432頁(圖例)之圖1(E)及(F)。

本發明之另一驚人的態樣為螢光化合物之較高裝載效率似乎與給定化合物之親水性或疏水性無關。舉例而言，太平洋紫杉醇為疏水性的，而TF.Pac及FCP均為水溶性的，且FCP之裝載效率又比TF.Pac之裝載效率大5倍。

化合物上螢光部分之結合點似乎不影響經由本發明實現之裝載效率。因此，FCP及FLUTAX-1具有相同螢光素螢光團，但對於FCP，其連接在C2'位置處，而非如FLUTAX-1中之C7位置處。又在最終微細胞內化合物濃度方面，兩種衍生物實現類似裝載效率。

此外，實例11說明，藉由葉酸淬滅小紅莓螢光以劑量依賴性方式降低小紅莓至微細胞中之裝載效率。依照本發明，此現象進一步突顯了螢光本身在增強化合物裝載至微細胞中方面之作用。

據發明人所知，還未有藉由螢光因而對化合物之傳輸或移動，尤其跨越細胞膜之移動產生影響之報導。此類影響，如發明人所證明，可歸因於螢光化合物與跨膜通道中或沿跨膜通道排列之某些分子之間的能量轉移，其增強化合物移動通過通道。相比於非螢光化合物，螢光化合物含有例如藉由電磁輻射更易於激發之電子。咸信，此類激發有助於螢光化合物與一些微細胞跨膜通道結構之間的能量轉移，使得化合物在通道中更快速移動，以及所裝載之化合物之量增加。

根據本發明之裝載方法需要濃度梯度，亦即，細胞外高於細胞內之化合物濃度。然而，如所述，涉及螢光化合物導致裝載速率及囊泡內濃度大於可習知地在單獨濃度梯度方面解釋之濃度。因此，當至微細胞中之裝載針對螢光化合物進行時，化合物之細胞內濃度提高且隨後超越細胞外濃度，且化合物持續移動至微細胞中直至達到實際飽和度。培養基中離子之存在增強螢光介導之細菌衍生之完整囊泡之裝載增強，如實例13所說明，同樣地不為濃度梯度之明顯功能。

另外，未告知關於製備含有醫藥級微細胞及殺死的細菌細胞之組

合物之習知思想，且確實未考慮在MacDiarmid等人(2007)所說明之小規模方案之情況下發生之裝載化合物在囊泡表面上之截留。發明人關於截留問題之發現揭露迄今未認識到的變量(表面截留化合物之滯滯(參見實例14))，其可能影響經由投與含有微細胞或殺死的細菌細胞之組合物遞送之有效負載化合物之有效劑量，根據以下部分(I)。亦在實例14中說明之本發明之大規模方法允許藉由緩解或甚至消除截留問題來控制此變量。

上文所描述之此等發現及其他發現係針對細菌衍生之完整微細胞，但其易於外推至殺死的細菌細胞。此係因為此兩種類型之無生命細菌囊泡之不同之處主要在於尺寸及存在或不存在細菌染色體。兩種區別均認為與化合物之裝載效率無關，化合物之裝載效率主要為細菌膜之功能(兩種類型細菌囊泡共有之特徵)。

在此方面，發明人之出人意料之發現不僅強調針對將小分子化合物裝載至完整無生命細菌囊泡中之在此所描述之方法之驚人本質且亦強調根據本發明使用其之相關組合物及方法之驚人本質。

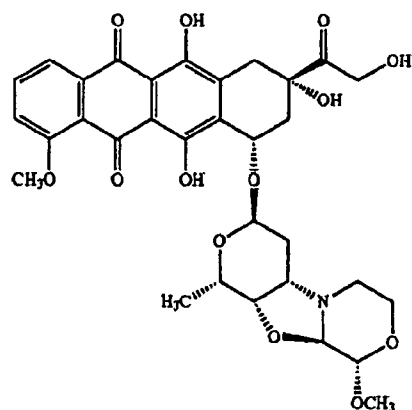
(C) 將螢光化合物裝載至細菌衍生之完整囊泡中

因此，提供包括完整無生命細菌囊泡之組合物，該囊泡封入呈現螢光之化合物。螢光為(A)固有的(自發螢光)或(B)非固有的，亦即，藉助於如下文所定義之能量轉移部分預先化學引入之螢光。

自發螢光化合物之子類別(A)原則上涵蓋在曝露於某一波長之電磁輻射後固有地呈現螢光，但典型地不一定在視覺光譜中之如下文所定義之任何小分子化合物。根據其方法學態樣，相對於子類別(A)，本發明涵蓋藉助於如上文所定義之大規模方法將任何自發螢光化合物裝載至細菌衍生之完整囊泡(包括微細胞或殺死的細菌細胞)中。根據其組成態樣，相對於子類別(A)，本發明涵蓋包含細菌衍生之完整囊泡之組合物，該等囊泡含有自發螢光化合物，其係選自排除以下化合物(先

前揭示，而未提及或暗示目前描述之螢光對囊泡裝載之影響)中之任一或多個或所有之子類別(A)：小紅莓(激發480 nm，發射580 nm)；伊立替康，喜樹鹼之半合成類似物，激發最大值為約360 nm且發射最大值為約440 nm；比山群(激發，410 nm；發射，517 nm)；拓朴替康(激發，382 nm；發射，523 nm)；表柔比星(激發，474 nm；發射，551 nm)；道諾黴素(激發，488 nm；發射，575 nm)；及米托蒽醌(激發，610及660 nm；發射，684 nm)。

包含在本發明之組成態樣下之其餘自發螢光小分子化合物之說明性實例為：達內黴素A，天然環狀烯二炔以及達內黴素A之螢光類似物(參見美國專利第5,281,710號，其內容在此以引用之方式併入)；吖啶橙(acridine orange)，激發最大值為502 nm且發射最大值為525 nm(綠色)；及喜樹鹼，天然生物鹼，激發最大值為360 nm且發射最大值為440 nm。同樣地，說明性實例為在國際專利申請案WO1998/002446中所描述之嗎啉基蒽環衍生物類別中之固有螢光化合物。在此類衍生物中有奈莫柔比星(nemorubicin) (3'-脫胺基-3'-[2(S)-甲氧基-4-嗎啉基]小紅莓)、a/k/a MMDX及其主要代謝物PNU-159682 (3'-脫胺基-3''-4'-脫水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羥基-4''-嗎啉基]小紅莓)，其結構式展示如下；以及內容在此以引用之方式併入之美國專利第8,470,984號中所描述之此四種其他此類衍生物：3'-脫胺基-3''-4'-酐的-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羥基-4''-嗎啉基]艾達黴素(idarubicin)；3'-脫胺基-3''-4'-脫水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羥基-4''-嗎啉基]道諾黴素；3'-脫胺基-3''-4'-脫水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羥基-4''-嗎啉基]-洋紅黴素(caminomycin)；及3'-脫胺基-3''-4'-脫水-[2''(S)-乙氧基-3''(R)-羥基-4''-嗎啉基]小紅莓。



PNU-159682

依照本發明，前述衍生物中之任一者之醫藥學上可接受之酸加成鹽亦為此群組自發螢光嗎啉基蒽環衍生物之成員。

非固有螢光化合物之子類別(B)涵蓋尤其包含下文所定義之(i)活性成分或部分及(ii)能量轉移部分之任何化合物。活性成分可為藥物或藥物之活性部分，藉由衍生化反應向其添加能量轉移部分。結果可為結合物，其中衍生化反應之產物因而在具有或不具有連接子之情況下將其接合的藥物或活性部分併入至能量轉移部分；或其可為結構類似物，其中反應產物表現與其藥物或活性部分之結構類似性但不同之處在於藥物或活性部分中一或多個原子、官能基或子結構經結構類似物中之其他原子、基團或子結構置換。

根據其方法學態樣，相對於子類別(B)，本發明涵蓋藉助於大規模方法將任何非固有螢光化合物裝載至細菌衍生之完整囊泡(包括微細胞或殺死的細菌細胞)中。根據其組成態樣，相對於子類別(B)，本發明涵蓋包含細菌衍生之完整囊泡之組合物，該等囊泡含有非固有螢光化合物，其係選自排除含有微細胞之組合物之子類別(B)，其中成分微細胞由含有Oregon Green® 488結合之太平洋紫杉醇或BODIPY® FL結合之長春鹼之彼等者組成。此類排除的含有微細胞之組合物由上述MacDiarmid等人(2007)揭示，而未提及或暗示目前描述之螢光對化合物跨膜移動至此類囊泡中之影響。

上文所提及之結構類似物之說明性實例為倍癌黴素(duocarmycin)之螢光開環類似物、細胞毒性抗生素，如Tietze等人，*Chemistry & Diversity* 9: 2559-70 (2012)所描述。經由涉及某些香豆素羧酸之反應流程，藥物之三甲氧基吡啶部分及(二甲胺基)乙氧基吡啶部分經螢光分子(其如同置換部分，與DNA相互作用)置換。同樣地，在本說明書內之結構類似物之示例為藥物依地福新(edelfosine)之螢光類似物(1-O-十八烷基-2-O-甲基-*rac*-甘油-3-磷酸膽鹼)，其如Mollinedo等人，*Cell Death & Dis.* 2: e158 (2011)中所描述，保存藥物之促凋亡活性。亦參見Gajate等人，*Oncogene* 31: 2627-39 (2012)。

在採用螢光結合物之實施例中，連接子可具有一定半衰期以使得當將化合物裝載至囊泡中時或當一定時間段已過去或在其後時間範圍內時(參見下文)，連接子降解，以釋放非固有螢光結合物之活性成分。或者，連接子基團在靶細胞內可為不穩定的。亦即，連接子可經熱、pH依賴性、化學(例如水解)或酶裂解，於是在攝取後將活性成分釋放至細胞中。舉例而言，在抗體-藥物結合物之情形下已發展此類不穩定連接子且其易於經調適用於本發明中。參見Ducry and Stump, *Bioconjugate Chem.* 21: 5-13 (2010)，加上下文其他論述。

上文所提及之「能量轉移部分」為在藉由適當波長電磁輻射激發後將能量轉移至附近能量受體之基團。「適當的」波長為激發能量轉移部分中之電子以使得其進入能階之電磁輻射之任何波長，其中在弛豫後，電子自能量轉移部分釋放或使得電磁輻射自能量轉移部分釋放。

說明性能量轉移部分為具有共軛 π 電子系統之基團。共軛 π 系統包括例如多個雙鍵之配位、多個芳族基團之配位、雙鍵與芳族基團之配位、雜環芳族基團及其類似者之配位。說明性能量轉移部分為吡啶基、吡嗪基、噻吩基、苯并咪唑基、菲基、吡啶基、喹啉基及卟啉基。

與本發明一致，咸信能量轉移達到之能量受體與無生命細菌囊泡

之一或多個跨膜結構相關聯。根據此觀點，當由能量轉移部分實現能量轉移時，隨後跨膜結構接收所傳遞之能量，無論經由電子或光之發射。

下文論述適用於裝載至根據本發明之完整無生命細菌囊泡中之不同類型之化合物(只要其為自發螢光或非固有螢光的)。其包括(但不限於)生物活性化合物之類別及化學治療化合物，尤其小分子化學治療化合物之子類別。

多種生物活性化合物並不為螢光的。本發明涉及一種用於提供給定化合物(其為螢光的)之經修飾之(衍生)形式之途徑，其用於將此類化合物裝載至完整無生命細菌囊泡中，且經由此類囊泡，隨後將其引入靶哺乳動物細胞中。儘管大多數分子尺寸將小於約900道爾頓，但連接螢光分子或改變藥物之結構以增強藥物至微細胞中之裝載可能將其分子量提高至約1500道爾頓。

在一個態樣中，本發明涵蓋將生物活性但非螢光化合物與螢光部分結合以形成具有下式之「經修飾之化合物」：

D-L-F，

或其鹽，其中：

D為化合物或其活性成分，

L為連接子，及

F為螢光部分。

依照本發明，此類經螢光修飾之化合物可在允許經修飾之化合物進入囊泡之條件下與完整無生命細菌囊泡一起培育。

連接子L可為在一定時間段之後或在某些條件下使得化合物或活性成分D自螢光部分F釋放。舉例而言，如上文所指出，連接子在囊泡中可具有一定半衰期以使得連接子在裝載經修飾之化合物之後某時降解以在囊泡內釋放D。或者，連接子L可在囊泡內部為穩定的但在哺乳

動物細胞之內體或溶酶體中為不穩定的。亦即，在被靶哺乳動物細胞攝取且曝露於內體或溶酶體區室內之環境後，連接子在環境因素，諸如pH或酶作用之影響下降解，以在內體或溶酶體中釋放活性成分。此類連接子之實例提供在以下部分G中。

根據相關態樣，經修飾之化合物不具有未經修飾之化合物之生物活性且在囊泡內部保持彼「非活性」狀態。連接子在內體或溶酶體中之降解使得活性形式或物種，亦即，活性成分D釋放。

更一般而言，螢光部分可在部分或完全抑制生物活性化合物之活性之位置處連接至生物活性化合物。生物活性化合物典型地具有對於生物活性而言至關重要的一或多個外部反應性基團。此等反應性基團之化學修飾或衍生化可能降低或甚至消除化合物之生物活性。此藉由以下實例中所論述之某些經修飾之化合物說明，其並未具有與對應未經修飾之化合物相關的生物活性。

在本發明技術之情況下，如下文部分(E)下所定義之小分子化合物之分子重量連續光譜上之甚至較高分子量化合物可有效地裝載至細菌衍生之完整囊泡中。因此，經修飾之化合物之分子量可為至少約1000道爾頓，或者至少約1100、1200、1300、1400或1500道爾頓。

在上文所描述之方法及組合物中之任一者之情形下，化合物或經修飾之化合物可為疏水性的，而在另一態樣中為親水性的。在又一態樣中，化合物或經修飾之化合物為水可溶的。

沿著類似線索，本發明在一個態樣中提供一種包含呈微細胞及/或殺死的細菌細胞形式之細菌衍生之完整囊泡及式D-L-F化合物或其鹽之組合物，其中D為諸如藥物之非螢光小分子化合物之殘基，L為連接子，且F為螢光部分。該組合物為適用的，尤其因為以下事實：經由未經修飾之小分子化合物之實例促進化合物裝載至囊泡中。

根據一個態樣，本說明書之細菌囊泡為細菌衍生之完整微細胞。

給定本發明裝載方法之高效率，各此類囊泡(亦即微細胞)可封裝有化合物之至少約100,000個複本。更特定而言，各微細胞可封裝有化合物之至少約200,000個複本，或者至少約300,000、約400,000、約500,000、約600,000、約700,000、約800,000、約900,000或約100萬個複本。

在一個態樣中，微細胞封入每 10^9 個微細胞至少約200 ng，或至少300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng或1,000 ng給定螢光化合物或螢光化合物之組合。相比之下，每 10^9 個微細胞所裝載之可比非螢光化合物之量典型地為小於一個數量級，亦即，數量級為幾十奈克。

根據本發明之另一態樣，完整無生命囊泡為殺死的細菌細胞。與上文描述一致，給定殺死的細菌細胞之容量比微細胞之容量大約3-4倍。因此，殺死的細菌細胞可封裝經修飾之化合物之至少約400,000個複本。更特定而言，各殺死的細菌細胞可封裝有化合物之至少約800,000個複本或者至少約1,200,000、約1,600,000、約2,000,000、約2,400,000、約2,800,000、約3,200,000、約3,600,000或約400萬個複本。

此類殺死的細菌細胞可每 10^9 個殺死的細胞封入至少約800 ng，或至少1,200 ng、1,600 ng、2,000 ng、2,400 ng、2,800 ng、3,200 ng、3,600 ng或4,000 ng化合物。

(D) 細菌衍生之完整囊泡

片語「細菌衍生之完整囊泡」及「完整無生命細菌囊泡」同義地指細菌細胞之囊泡衍生物，包括殺死的細菌細胞及細菌微細胞，其無法再生且其不能主動地啟動進入哺乳動物細胞中。在此情形下，「完整」意謂細胞包膜，亦即，質膜及周圍單元壁(其包括圍繞單層單元壁之多個層(對於衍生自革蘭氏陽性(Gram-positive)細菌細胞之囊泡)或雙層外部膜(對於衍生自革蘭氏陰性(Gram-negative)細菌細胞之囊泡))之規則連續性及結構完整性。參見BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC

BIOLOGY, 第2版(Springer, 2012)。

因此，片語「殺死的完整細菌細胞」指示細菌、藍細菌、真細菌或古細菌之完整無生命原核細胞，其具有完整細胞包膜且含有細菌物種內源的遺傳物質(核酸)。同上。對於醫藥用途，將殺死的細菌細胞之組合物儘可能徹底地與免疫原性組分及其他有毒污染物分離。用於純化殺死的完整細菌細胞之方法描述於美國專利第8,591,862號中，其相關內容在此以引用之方式併入。簡言之，可藉由抗生素殺死活細菌細胞，繼而移除細胞碎片及游離內毒素。

「微細胞」係指細菌細胞之衍生物，其缺乏染色體(「無染色體」)且係由二分裂期間細胞分裂與DNA分離之協調失調所產生。微細胞不同於其他小囊泡，諸如所謂「膜泡」(尺寸約為0.2 μm或0.2 μm以下)，其在某些情形下自發地產生及釋放，但其並不歸因於特異基因重排或游離體基因表現。同樣地，完整微細胞不同於細菌菌蛻(ghosts)，其並不因特異基因重排或游離體基因表現而產生。

本發明中所採用之細菌衍生之微細胞為完全完整的，如上文所論述，且因此區別於其他特徵在於外膜或界定膜破碎或降解、甚至移除之無染色體形式之細菌細胞衍生物。參見美國專利第7,183,105號第111欄第54行及以下。表徵本發明微細胞之完整膜允許治療有效負載在微細胞內保留直至攝取後在腫瘤細胞內釋放該有效負載。

根據本發明所採用之微細胞可由諸如大腸桿菌(*E. coli*)及鼠傷寒沙門氏菌(*S. typhimurium*)之細菌細胞製備。原核染色體複製與正常二分裂相聯，其涉及細胞中隔(mid-cell septum)形成。在大腸桿菌中，例如 *min* 基因(諸如 *minCD*)之突變可移除細胞分裂期間在細胞極形成隔膜之抑制，導致正常子細胞及少染色體微細胞產生。參見Boer等人, *J. Bacteriol.* 174: 63-70 (1992)；Raskin及de Boer, *J. Bacteriol.* 181: 6419-24 (1999)；Hu及Lutkenhaus, *Mol. Microbiol.* 34: 82-90 (1999)；及

Harry, *Mol. Microbiol.* 40: 795-803 (2001)。

除 *min* 操縱子突變以外，少染色體微細胞在影響隔膜形成(例如在枯草桿菌(*B. subtilis*)中之 *divIVB1* 中)之一系列其他基因重排或突變後產生。參見 Reeve 及 Cornett, *J. Virol.* 15: 1308-16 (1975)。微細胞亦可在參與細胞分裂/染色體分離之蛋白質之基因表現水準擾動後形成。舉例而言，*minE* 之過度表現導致極性分裂且產生微細胞。類似地，少染色體微細胞可由染色體分離缺陷產生，例如枯草桿菌中之 *smc* 突變 (Britton 等人, *Genes Dev.* 12: 1254-59 (1998))、枯草桿菌中之 *spoOJ* 缺失 (Ireton 等人, *J. Bacteriol.* 176: 5320-29 (1994))、大腸桿菌中之 *mukB* 突變 (Hiraga 等人, *J. Bacteriol.* 171: 1496-1505 (1989)) 及大腸桿菌中之 *parC* 突變 (Stewart 及 D'Ari, *J. Bacteriol.* 174: 4513-51 (1992))。此外，CafA 可增強細胞分裂速率及/或抑制複製後之染色體分配 (Okada 等人, *J. Bacteriol.* 176: 917-22 (1994))，導致鏈狀細胞及少染色體微細胞形成。

Min 系統存在於大多數細菌物種中，參見 Barak, *Frontiers in Microbiology* 4: Art. 378 (2013)，而在其他細菌，諸如新月柄桿菌 (*Caulobacter crescentus*) 中，已進化出另一機制以控制分裂隔膜之放置，可操控該機制以經由不等分裂產生微細胞。因此，針對本發明，可由革蘭氏陽性或革蘭氏陰性來源之任何細菌細胞製備微細胞。此外，用於本發明中之微細胞應具有完整細胞壁(亦即，為「完整微細胞」)，如上文所指出，且應區別於其他小囊泡(諸如膜泡)且與其分離，其並不由特異基因重排或游離體基因表現引起。

在給定實施例中，微細胞之親本(源)細菌可為革蘭氏陽性或其可為革蘭氏陰性的，如所提及。因此，親本細菌可選自例如以下中之任何一或多者：分類群陸生菌(Terrabacteria) (BV1)，其包括革蘭氏陽性門(放線菌門(Actinobacteria)及厚壁菌門(Firmicutes))；尤其變形菌門

(Proteobacteria) (BV2)，其為所有成員均為革蘭氏陰性的一門；及類別 BV4，其包括螺旋體門(Spirochaetes)、鞘脂桿菌門(Sphingobacteria)及浮游細菌門(Planctobacteria)以及其他革蘭氏陰性細菌，諸如酸桿菌門(Acidobacteria)。

因此，依照一個態樣，製備殺死的細菌細胞或微細胞之細菌係選自以下中之一或多者：分類群厚壁菌門(BV3)，諸如桿菌綱(Bacilli)、梭菌綱(Clostridia)及無壁菌門(Tenericutes)/柔膜菌綱(Mollicutes)；及放線菌門(BV5)，諸如放線菌目(Actinomycetales)及雙歧桿菌目(Bifidobacteriales)。在另一態樣中，親本細菌係選自以下中之任何一或多者：原細菌(Eobacteria) (綠彎菌門(Chloroflexi)、異常球菌-棲熱菌門(Deinococcus-Thermus))、藍細菌(Cyanobacteria)、熱脫硫桿菌門(Thermodesulfobacteria)、嗜熱菌(thermophiles) (產水菌門(Aquificae)、熱袍菌門(Thermotogae))、 α 、 β 、 γ (腸桿菌科(Enterobacteriaceae))、 δ 或 ϵ 變形菌門(Proteobacteria)、螺旋體門(Spirochaetes)、纖維桿菌門(Fibrobacteres)、綠菌門(Chlorobi)/擬桿菌門(Bacteroidetes)、衣原體門(Chlamydiae)/疣微菌門(Verrucomicrobia)、浮黴菌門(Planctomycetes)、酸桿菌門(Acidobacteria)、產金菌門(Chrysiogenetes)、脫鐵桿菌門(Deferribacteres)、梭桿菌門(Fusobacteria)、芽單胞菌門(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌門(Nitrospirae)、互養菌門(Synergistetes)、網團菌門(Dictyoglomi)、黏膠球形菌門芽孢桿菌目(Lentisphaerae Bacillales)、芽孢桿菌科(Bacillaceae)、李斯特菌科(Listeriaceae)、葡萄球菌科(Staphylococcaceae)、乳桿菌目(Lactobacillales)、腸球菌科(Enterococcaceae)、乳桿菌科(Lactobacillaceae)、明串珠菌科(Leuconostocaceae)、鏈球菌科(Streptococcaceae)、梭菌目(Clostridiales)、鹽厭氧菌目(Halanaerobiales)、嗜熱厭氧菌目(Thermoanaerobacterales)、支原體目

(Mycoplasmatales)、蟲原體目(Entomoplasmatales)、厭氧漿菌目(Anaeroplasmatales)、非固醇漿菌目(Acholeplasmatales)、鹽漿菌目(Haloplasmatales)、放線菌亞目(Actinomycineae)、放線菌科(Actinomycetaceae)、棒桿菌亞目(Corynebacterineae)、諾卡氏菌科(Nocardiaceae)、棒狀桿菌科(Corynebacteriaceae)、弗蘭克氏菌亞目(Frankineae)、弗蘭克氏菌科(Frankiaceae)、微球菌亞目(Micrococccineae)、短桿菌科(Brevibacteriaceae)及雙歧桿菌科(Bifidobacteriaceae)。

對於醫藥用途，本發明之組合物應包含儘可能徹底地與免疫原性組分及其他有毒污染物分離之殺死的細菌細胞或微細胞。用於純化細菌衍生之微細胞以移除游離內毒素及親本細菌細胞之方法描述於WO2004/113507中，其在此以全文引用之方式併入。簡言之，純化方法實現移除以下各者：(a)小囊泡，諸如膜泡，其尺寸通常為小於0.2 μm ；(b)自細胞膜釋放之游離內毒素；及(c)親本細菌，無論活的或死的及其碎片，其同樣為游離內毒素之來源。此類移除可尤其利用以下執行：0.2 μm 過濾器，以移除小囊泡及細胞碎片，0.45 μm 過濾器，以在誘導親本細胞形成長絲後移除親本細胞、殺死活細菌細胞之抗生素及抗游離內毒素之抗體。

在純化程序下，發明人發現，儘管其細菌來源差異，所有完整微細胞尺寸均為大致400 nm，亦即，大於膜泡及其他小囊泡且仍小於親本細菌。可藉由使用固態(諸如電子顯微法)或藉由基於液體之技術(例如動態光散射)來實現微細胞之尺寸測定。藉由各此類技術產生之尺寸值可具有誤差範圍，且不同技術之間該等值可能略微不同。因此，在乾燥狀態中之微細胞之尺寸可經由電子顯微法量測為大致400 nm $\pm$ 50 nm。另一方面，動態光散射可量測相同微細胞之尺寸為大致500 nm $\pm$ 50 nm。此外，同樣可使用動態光散射量測封裝藥物、靶向配位體之微

細胞為大致 $600\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$ 。

實際上易於調節此尺寸值之分散，例如出於將微細胞與如上文所描述之免疫原性組分及其他有毒污染物分離之目的。亦即，細菌衍生之完整微細胞之特徵在於藉由剛性膜包圍之細胞質，該剛性膜為微細胞提供剛性球形結構。此結構在透射電子顯微圖中顯而易見，其中跨越微細胞，在剛性膜之外部界限之間量測微細胞直徑。此測量提供上文所提及之 $400\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$ 之尺寸值。

衍生自革蘭氏陰性細菌之微細胞之另一結構元素為脂多醣(LPS)之O-多醣組分，其經由脂質A錨定物嵌入在外部膜中。該組分為重複碳水化合物-殘基單元之鏈，其中每鏈多達70至100個四至五個糖之重複單元。因為此等鏈在液體環境中並不如活體內一般為剛性的，所以其可採用提供珊瑚海洋環境中之海藻之一般外觀的波狀可撓性結構；即，該等鏈隨液體移動，同時其餘部分錨定於微細胞膜上。

受O-多醣組分影響，動態光散射可為微細胞尺寸提供約 500 nm 至約 600 nm 之值，如上文所指出。然而，來自革蘭氏陰性及革蘭氏陽性細菌之微細胞以同樣的方式容易地通過 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 過濾器，其證實了 $400\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$ 之有效微細胞尺寸。本發明涵蓋上文所提及之尺寸分散且尤其藉由片語「尺寸為大致 400 nm 」及其類似者中之限定詞「大致」表示。

相對於有毒污染物，本發明之組合物可含有小於約350 EU游離內毒素。在此方面之說明性實例為分別約250 EU、約200 EU、約150 EU、約100 EU、約90 EU、約80 EU、約70 EU、約60 EU、約50 EU、約40 EU、約30 EU、約20 EU、約15 EU、約10 EU、約9 EU、約8 EU、約7 EU、約6 EU、約5 EU、約4 EU、約3 EU、約2 EU、約1 EU、約0.9 EU、約0.8 EU、約0.7 EU、約0.6 EU、約0.5 EU、約0.4 EU、約0.3 EU、約0.2 EU、約0.1 EU、約0.05 EU及約0.01 EU之游離內毒素水準。

本發明之組合物亦可含有至少約 10^8 個囊泡，例如至少約 5×10^8 個。或者，組合物可含有數量級為 10^9 或 10^{10} 個囊泡，例如 5×10^9 、 1×10^{10} 或 5×10^{10} 個囊泡。此外，在任何此數量微細胞中，本發明之組合物可含有少於約10個污染活的/親本細菌細胞，例如少於約9、8、7、6、5、4、3、2或1個活的/親本細菌細胞。

(E) 小分子化合物

如所述，本發明提供用於將螢光的小分子化合物裝載至完整無生命細菌囊泡中之方法。小分子化合物可為固有螢光(自發螢光)的或可為非固有螢光的，亦即，藉助於將螢光部分添加至非螢光化合物中之螢光，之後將經修飾之化合物裝載至完整無生命細菌囊泡中。

根據本發明，小分子化合物可為「小分子藥物」，其意謂其在投與本發明組合物時為生物活性的，或其在投與後活體內轉化成生物活性形式(「經活化」)。與上述定義一致，「生物活性」係指小分子藥物與細胞中之蛋白質、核酸或其他分子反應而導致細胞中之功能改變之能力。在一個態樣中，改變為治療學上合乎需要的。生物活性可為細胞毒性的，例如其中小分子化合物為化學治療劑，亦即，其為小分子「化學治療藥物」。因此，互換採用「化學治療藥物」、「化學治療劑」及「化學療法」以意謂具有殺死或破壞贅生性細胞之能力的小分子藥物。

「小分子藥物」子類別涵蓋特徵在於具有(i)對生物過程之影響及(ii)相比於蛋白質或聚合大分子相對較低分子量之化合物。小分子藥物典型地為約900道爾頓或900道爾頓以下，下限值為約150道爾頓，如約194道爾頓之Temodar® (替莫唑胺(temozolomide))所說明，其用於治療多形性膠質母細胞瘤及其他類型之腦癌。然而，儘管大多數分子之尺寸將小於約900道爾頓，但連接螢光分子或改變藥物之結構以增強藥物至微細胞中之裝載可能將其分子量提高至約1500道爾頓。在此情形

下，「約」指示合格的分子重量值易有測量精度方面之變化及數量級為若干道爾頓或幾十道爾頓之實驗誤差。因此，小分子藥物(未經修飾、經修飾或連接至螢光分子)之分子量可為約1500道爾頓或1500道爾頓以下，約1400道爾頓或1400道爾頓以下，約1300道爾頓或1300道爾頓以下，約1200道爾頓或1200道爾頓以下，約1100道爾頓或1100道爾頓以下，約1000道爾頓或1000道爾頓以下，約900道爾頓或900道爾頓以下，約800道爾頓或800道爾頓以下，約700道爾頓或700道爾頓以下，約600道爾頓或600道爾頓以下，約500道爾頓或500道爾頓以下，或約400道爾頓或約400道爾頓以下，例如在約150至約400道爾頓範圍內。更確切而言，小分子藥物(未經修飾、經修飾或連接至螢光分子)之分子量可為約400道爾頓或400道爾頓以上，約450道爾頓或450道爾頓以上，約500道爾頓或500道爾頓以上，約550道爾頓或550道爾頓以上，約600道爾頓或600道爾頓以上，約650道爾頓或650道爾頓以上，約700道爾頓或700道爾頓以上，約750道爾頓或750道爾頓以上，約800道爾頓或800道爾頓以上，約850道爾頓或850道爾頓以上，約900道爾頓或900道爾頓以上，約950道爾頓或950道爾頓以上，約1000道爾頓或1000道爾頓以上，約1050道爾頓或1050道爾頓以上，約1100道爾頓或1100道爾頓以上，約1150道爾頓或1150道爾頓以上，約1200道爾頓或1200道爾頓以上，約1250道爾頓或1250道爾頓以上，約1300道爾頓或1300道爾頓以上，約1350道爾頓或1350道爾頓以上，約1400道爾頓或1400道爾頓以上，約1450道爾頓或1450道爾頓以上，或約1500道爾頓或1500道爾頓以上。在另一實施例中，封裝至微細胞中之小分子藥物(未經修飾、經修飾或連接至螢光分子)之分子量在約400道爾頓與約1300道爾頓之間，在約400道爾頓與約1100道爾頓之間，在約400道爾頓與約1000道爾頓之間，在約450道爾頓與約900道爾頓之間，在約450道爾頓與約850道爾頓之間，在約450道爾頓與約800道爾頓之間，在約500道爾頓

與約800道爾頓之間，或在約550道爾頓與約750道爾頓之間。

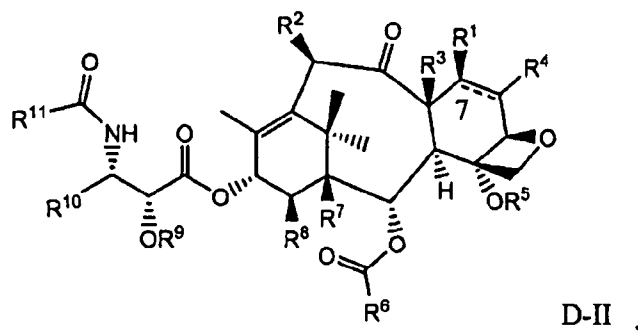
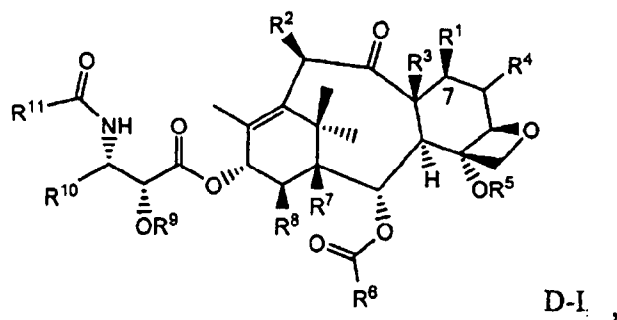
分別根據本發明之方法學及組成方面進行上文所陳述之鑑定過程時，適合的小分子化學治療藥物尤其包括(但不限於)氮芥(nitrogen mustard)、亞硝基脲、伸乙基亞胺、烷烴磺酸鹽、四嗪、鉑化合物、嘧啶類似物、嘌呤類似物、抗代謝物、葉酸類似物、蔥環、紫杉烷、長春花生物鹼及拓撲異構酶抑制劑。因此，用於本發明中之小分子化學治療藥物可尤其選自以下中之任一者：烯二炔，諸如達內黴素A、尤卡黴素(unicalamycin)、卡奇黴素(calicheamicin) γ 1及卡奇黴素 θ 1；迷亞黴素(meayamicin)，其為FR901464之合成類似物；苯并環庚烯衍生物，如例如Tanpure等人, *Bioorg. Med. Chem.* 21: 8019-32 (2013)所描述；奧瑞他汀(auristatins)，諸如奧瑞他汀E、單甲基奧瑞他汀E (MMAE)及奧瑞他汀F (其為海兔毒素(dolastatin)之合成類似物)；倍癌黴素類，諸如倍癌黴素SA及CC-1065；美登素(maytansine)及其衍生物(類美登素(maytansinoids))，諸如DM1及DM4；伊立替康(Camptosar®)及其他拓撲異構酶抑制劑，諸如拓撲替康、依託泊苷(etoposide)、米托蒽醌及替尼泊甙(teniposide)；及谷田黴素(yatakemycin)，Okano等人, *J. Am. Chem. Soc.* 128: 7136-37 (2006)詳述其合成。

更特定而言，此段落中詳述之特異性小分子化學治療藥物之任一或多者或所有為根據上述部分(C)中所陳述之鑑定之適用的彼等者之說明性實例：放射菌素-D (actinomycin-D)、愛克蘭(alkeran)、ara-C、阿那曲唑(anastrozole)、BiCNU、比卡魯胺(bicalutamide)、博萊黴素(bleomycin)、白消安(busulfan)、卡培他濱(capecitabine) (Xeloda®)、順羧酸鉑(carboplatin)、卡鉑(carboplatinum)、卡莫司汀(carmustine)、CCNU、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑(cisplatin)、克拉屈濱(cladribine)、CPT-11、環磷醯胺(cyclophosphamide)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、賽特杉

(cytoxan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、放線菌素(dactinomycin)、右雷佐生(dexrazoxane)、多烯紫杉醇(docetaxel)、DTIC、伸乙基亞胺、依託泊苷、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉賓(fludarabine)、氟尿嘧啶(flourouracil)、氟他胺(flutamide)、福莫司汀(fotemustine)、吉西他濱(gemcitabine)、六甲銨、羥基脲、艾達黴素、異環磷醯胺、洛莫司汀(lomustine)、氮芥(mechlorethamine)、美法侖(melphalan)、巰基嘌呤、甲胺嘌呤、絲裂黴素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、奧賽力鉑(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇、帕米膦酸鹽(pamidronate)、噴司他丁(pentostatin)、普卡黴素(plicamycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、鏈脲菌素(streptozocin)、STI-571、他莫昔芬(tamoxifen)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊甙、四嗪、硫鳥嘌呤、噻替派(thiotepa)、雷替曲塞(tomudex)、拓朴替康、曲奧舒凡(treosulphan)、曲美沙特(trimetrexate)、長春鹼、長春新鹼(vincristine)、長春地辛(vindesine)、長春瑞濱(vinorelbine)及VP-16。依照本發明，此等小分子化學治療藥物中之任一或多者或所有可衍生有螢光團，或視具體情況可針對固有螢光採用。

如上述部分(C)中所詳述，本發明內之組合物分別相對於固有螢光藥物(子類別(A))及非固有螢光活性劑(子類別(B))進行排除。對於子類別(A)，排除由小紅莓、伊立替康、比山群、表柔比星、拓朴替康、表柔比星、道諾黴素及米托蒽醌組成。對於子類別(B)，排除由Oregon Green® 488結合之太平洋紫杉醇及BODIPY® FL結合之長春鹼組成。

在一些實施例中，式D-L-F中之D具有以下式D-I或D-II



或為其立體異構體或化合物或立體異構體之醫藥學上可接受之鹽，

其中：

R^1 為 H、-OH、 C_{1-4} 烷氧基、-O-C(O)-(C₁₋₄ 烷基)、經取代之 C_{1-4} 烷氧基、-O-C(O)-(經取代之 C_{1-4} 烷基)、-O-CH₂-O-P(O)(OH)₂、-O-CH₂-O-(C₁₋₄ 烷基)、-O-CH₂-S-(C₁₋₄ 烷基)，或與 R^3 一起形成 -CH₂-，或與 R^4 一起為雙鍵、OR^e 或 R^e；

R^2 為 H、-OH、 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、經取代之 C_{1-4} 烷氧基、-O-C(O)-(C₁₋₄ 烷基)、-O-C(O)-(經取代之 C_{1-4} 烷基)、-O-CH₂-O-(C₁₋₄ 烷基)、-S-CH₂-O-(C₁₋₄ 烷基)、-O-C(O)-R^e 或 -R^e；

R^3 為 H、 C_{1-4} 烷基，或與 R^1 一起形成 -CH₂-；

R^4 為 H 或鹵素，或與 R^1 一起為雙鍵；

R^5 為 H、 C_{1-4} 酯基、 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基甲基、(C₁₋₄ 烷基) 硫基甲基、-C(O)-(C₁₋₄ 烷基)、-C(O)-(經取代之 C_{1-4} 烷基)、-C(O)-O(C₁₋₄ 烷基)、-C(O)-O(經取代之 C_{1-4} 烷基)、-C(O)-NH(C₁₋₄ 烷基)、-C(O)-NH(經取代之 C_{1-4} 烷基) 或 R^e；

R^6 為苯基或經取代之苯基；

R^7 為 H、-OH、-CO-(C_{1-4} 烷基)、-CO-(經取代之 C_{1-4} 烷基)、 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、(C_{1-4} 烷氧基)甲基或(C_{1-4} 烷基)硫基甲基，或與 R^8 及與 R^7 及 R^8 鍵結之碳原子一起為五員或六員非芳族雜環；

R^8 為 H、-CH₃，或與 R^7 及 R^7 及 R^8 鍵結之碳原子一起為五員或六員非芳族雜環；

R^9 為 H、 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、-CO-(C_{1-4} 烷基)、-CO-(經取代之 C_{1-4} 烷基)或 R^e ；

R^{10} 為 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、芳基或經取代之芳基；

R^{11} 為 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、苯基、經取代之苯基、-SR¹²、-NHR¹²或-OR¹²；及

R^{12} 為 C_{1-4} 烷基、經取代之 C_{1-4} 烷基、苯基或經取代之苯基；

限制條件為 R^1 、 R^2 、 R^5 及 R^9 中之至少一者為 R^e ，且 R^e 為 L 之連接點。

在一些實施例中：

R^1 為 H、OH、-CH₂SCH₃、-CH₂-O-P(O)(OH)₂、OR^e或 R^e ；

R^2 為 H、-OH、-OCO-CH₃、-CO-CH₃或-(CH₂)₂-N-嗎啉基；

R^3 為甲基，或 R^3 與 R^4 一起為伸烷基，諸如-CH₂-；

R^4 為 H 或 -F；

R^5 為 -CO-CH₃；

R^6 為苯基；

R^7 為 H 或 OH，

R^8 為 H；

或 R^7 與 R^8 一起為 -O-CO-O-；

R^9 為 H、-C(O)-CHBr-(CH₂)₁₃-CH₃、-C(O)-(CH₂)₂-NH₂、
-C(O)-(CH₂)₁₄-CH₃、-C(O)-CH₂-CH(OH)-COOH、
-C(O)-CH₂-O-C(O)-CH₂CH(NH₂)-CONH₂、-C(O)-CH₂-O-CH₂CH₂OCH₃、

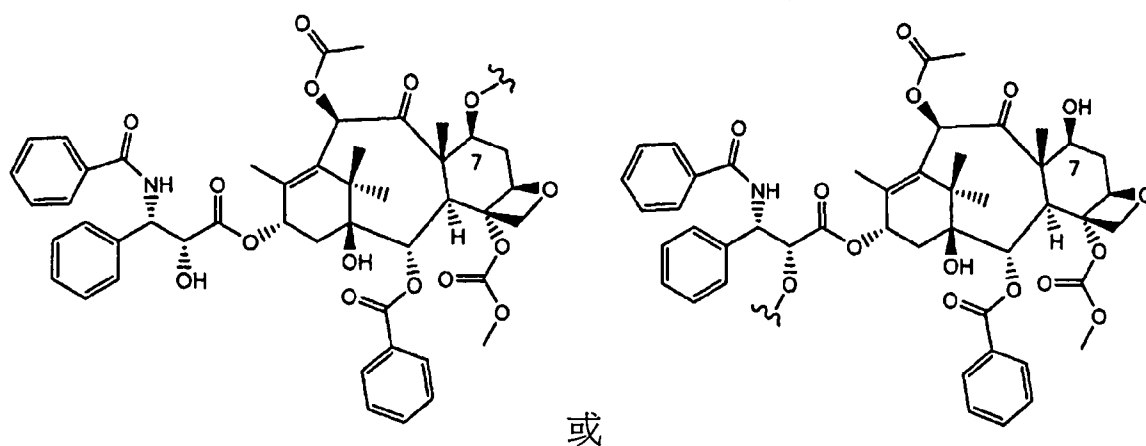
$-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{R}^e$ ；

R^{10} 為苯基、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ 、-2-呋喃基、環丙基或對甲苯甲醯基；及

R^{11} 為苯基、第三丁氧基、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{S}-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 或對氯苯基；

限制條件為 R^1 及 R^9 中之至少一者為 R^e 。

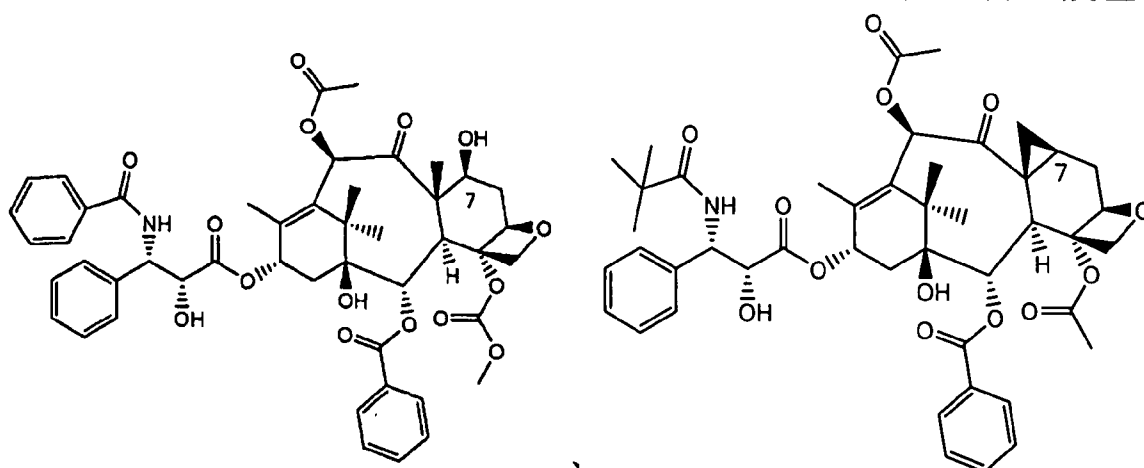
在一些實施例中，式D-L-F中之D具有下式

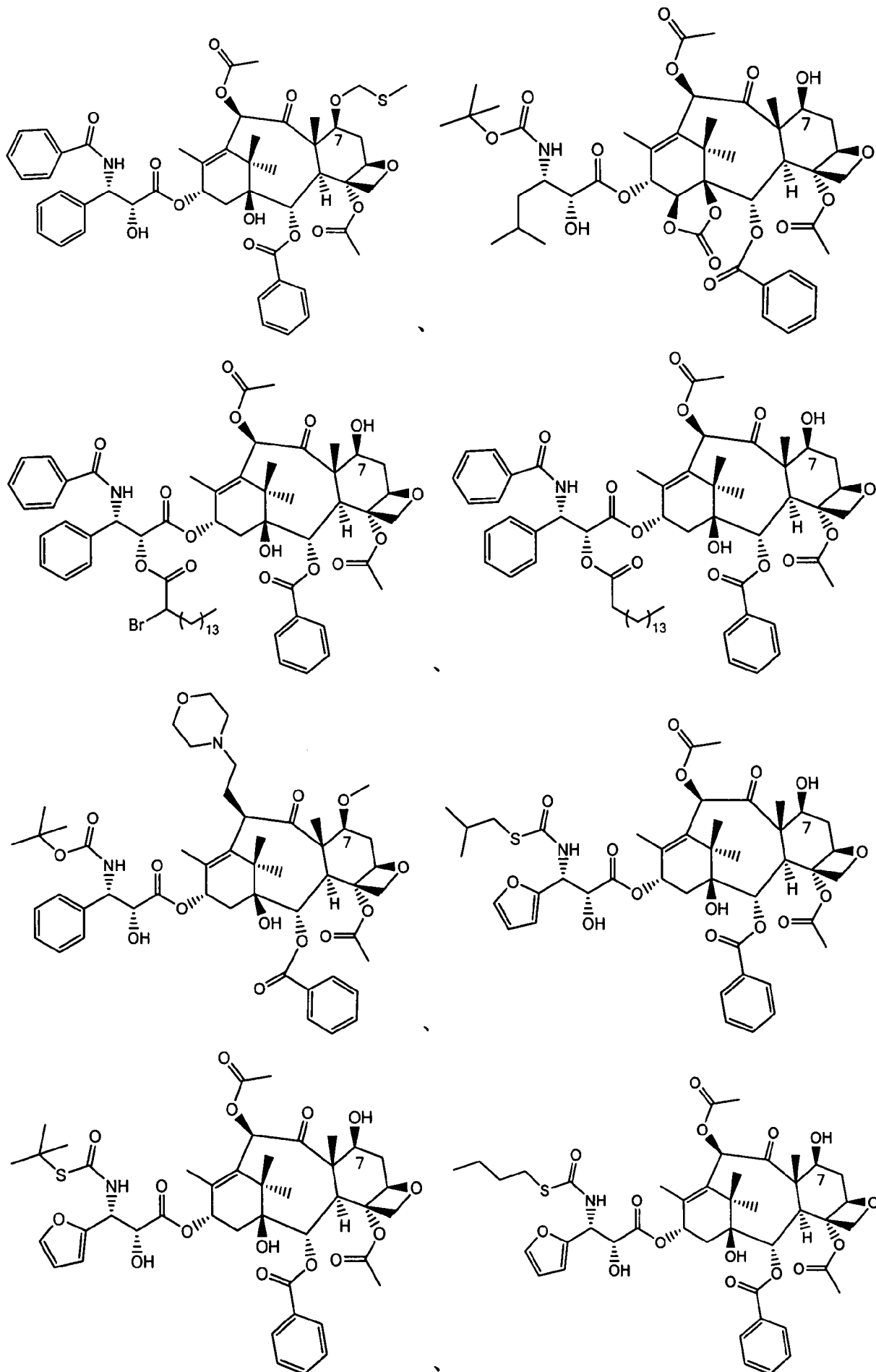


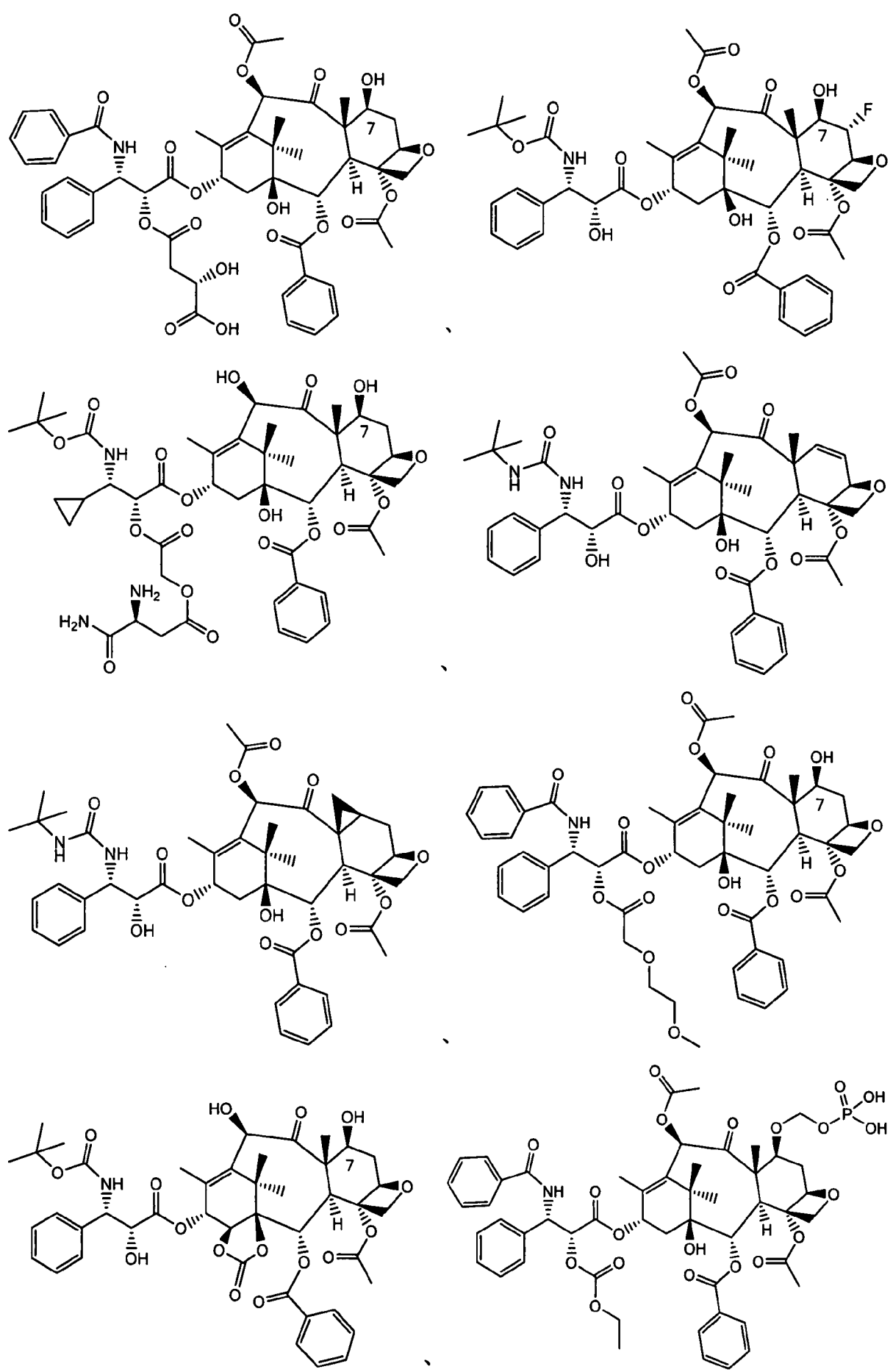
或為其立體異構體或化合物或立體異構體之醫藥學上可接受之鹽，

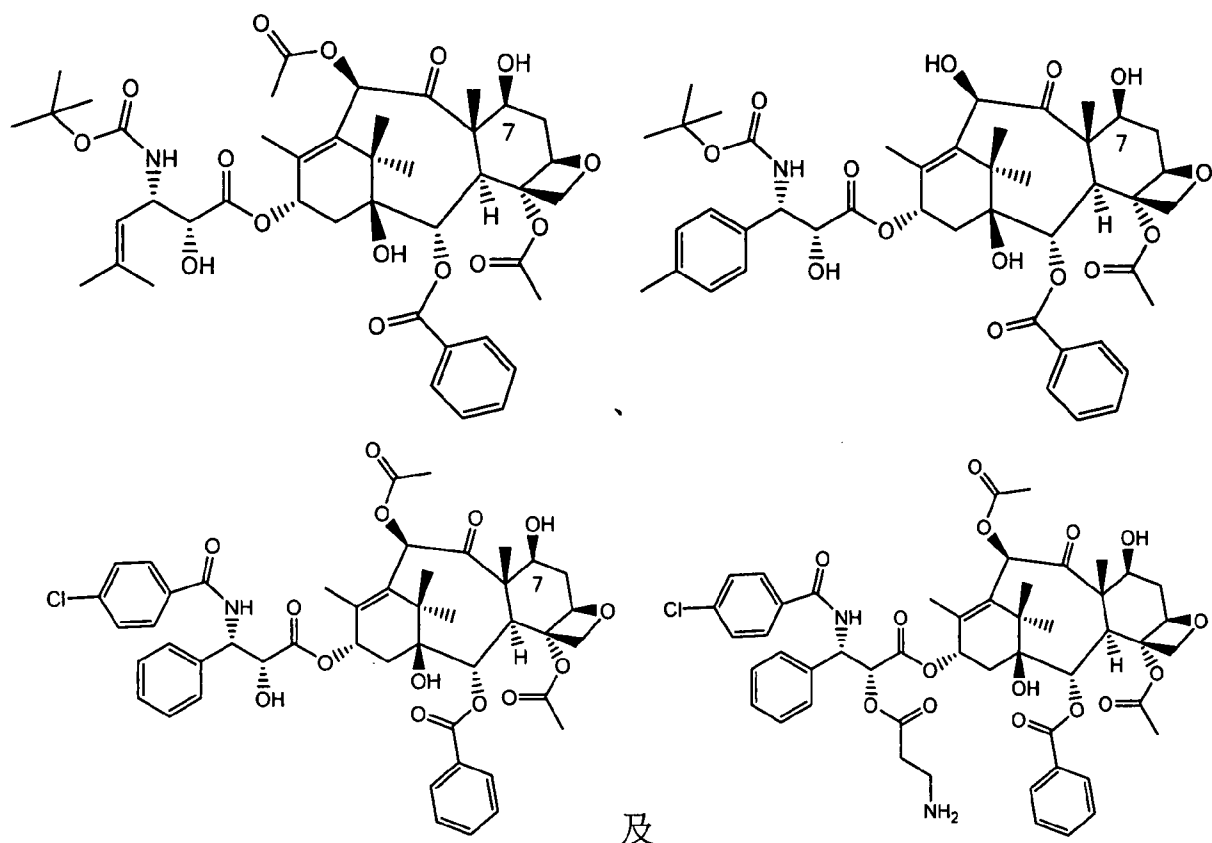
其中  表示與L之連接點。

在一些實施例中，式D-L-F中之D為選自以下之化合物之殘基：









或其立體異構體或化合物或立體異構體之醫藥學上可接受之鹽。

在一些實施例中，式D-L-F中之D為太平洋紫杉醇之殘基。

在一些實施例中，式D-L-F中之D為多烯紫杉醇之殘基。

在一些實施例中，式D-L-F中之D為長春鹼或其類似物之殘基。

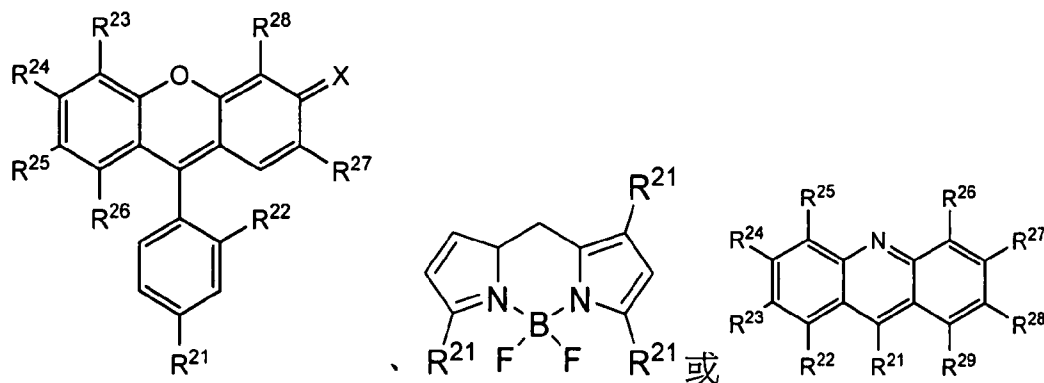
(F) 螢光部分

螢光部分為此項技術中所熟知。在一些態樣中，螢光部分之最大激發波長為760 nm及/或最大發射波長為770 nm。在一些態樣中，螢光部分之最大激發波長為600 nm及/或最大發射波長為600 nm。在一些態樣中，螢光部分之最大激發波長為500 nm及/或最大發射波長為550 nm。在一些實施例中，螢光部分之激發波長係選自380-450 nm、450-495 nm、495-570 nm、570-590 nm、590-620 nm、620-650 nm、650-700 nm或700-760 nm。在一些實施例中，螢光部分之發射波長係選自380-450 nm、450-495 nm、495-570 nm、570-590 nm、590-620 nm、620-650 nm、650-700 nm或700-770 nm。

在一些態樣中，螢光部分之分子量為約100道爾頓至約1000道爾頓或此兩個值中間的任何量，或約100道爾頓至約650道爾頓或此兩個值中間的任何量。在其他實施例中，螢光部分之分子量為約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900道爾頓或此等值中間的任何量。在又其他實施例中，螢光部分之分子量為約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650道爾頓或此等值中間的任何量。

在一個態樣中，螢光部分(F)為選自以下之化合物之殘基：二苯并呿喃衍生物，諸如螢光素、若丹明(rhodamine)、俄勒岡綠(Oregon Green)、伊紅及德克薩斯紅(Texas Red)；花青衍生物，諸如花青、吡啶羧菁、氧羧菁、硫羧菁及部花青素；蔡衍生物，諸如丹醯基及氟矽酸鈉衍生物；香豆素衍生物；噁二唑衍生物，諸如吡啶并噁、硝基苯并噁二唑及苯并噁二唑；蔥衍生物，諸如蔥醌，例如DRAQ5、DRAQ7及CyTRAK Orange；芘衍生物，諸如級聯藍(cascade blue)；噁嗪衍生物，諸如尼羅紅(Nile Red)、尼羅藍(Nile Blue)、甲酚紫及噁嗪170；吡啶衍生物，諸如原黃素(proflavin)、吡啶橙及吡啶黃；芳基次甲基衍生物，諸如金胺、結晶紫及孔雀綠；及四吡咯衍生物，諸如卟吩、酞菁及膽紅素。

在一個態樣中，螢光部分(F)為



其中

X為O或NR²⁰；

R²⁰為H或C₁₋₄烷基；

R²¹為H、C₁₋₄烷基、鹵基、-OH、-COOH、-O-C(O)-(C₁₋₄烷基)、-C(O)-O-(C₁₋₄烷基)、C₁₋₄烷氧基、鹵基、-NO₂、-SO₂Cl、-SO₃-或R^f；

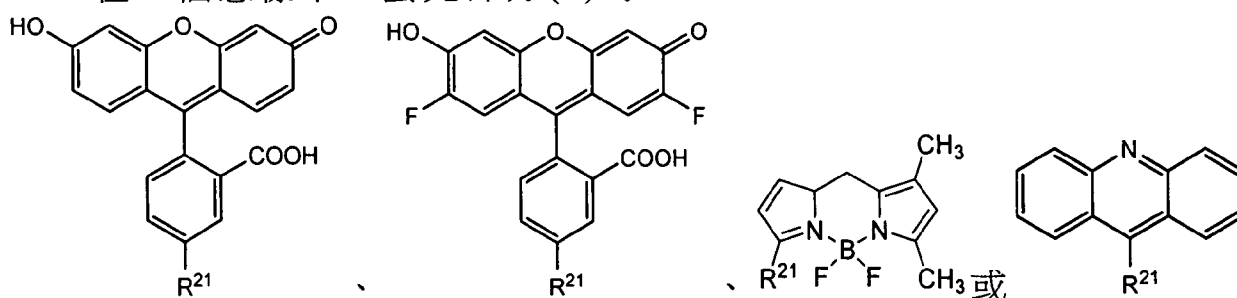
R²²為H、鹵基、-OH、-COOH、C₁₋₄烷基、經取代之C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、經取代之C₁₋₄烷氧基、-O-C(O)-(C₁₋₄烷基)、-O-C(O)-(經取代之C₁₋₄烷基)、-C(O)-O-(C₁₋₄烷基)、-C(O)-O-(經取代之C₁₋₄烷基)、-O-CH₂-O-(C₁₋₄烷基)、-S-CH₂-O-(C₁₋₄烷基)、-NO₂、-SO₂Cl、-SO₃-或R^f；

各R²³、R²⁴、R²⁵、R²⁶、R²⁷、R²⁸及R²⁹獨立地為H、鹵基、-OH、-NO₂、-CH₃或R^f，

或R²³及R²⁴接合在一起形成5員、6員或7員環，及/或R²⁴及R²⁵接合在一起形成5員、6員或7員環，及/或R²⁷及X接合在一起形成5員、6員或7員環，及/或R²⁸及X接合在一起形成5員、6員或7員環；

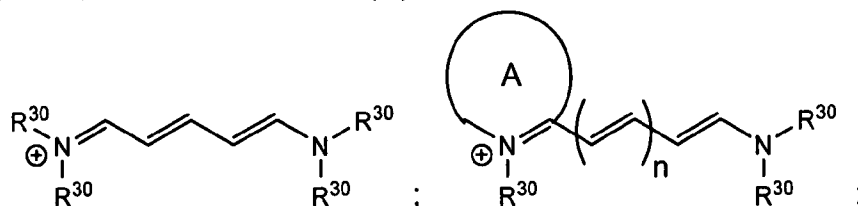
限制條件為R²¹、R²²、R²³、R²⁴、R²⁵、R²⁶、R²⁷、R²⁸及R²⁹中之至少一者且不超過兩者為R^f；其中R^f為L之連接點。

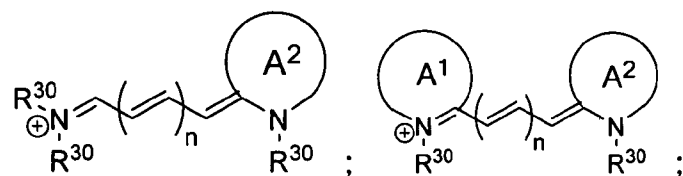
在一個態樣中，螢光部分(F)為



其中R²¹為L之連接點。

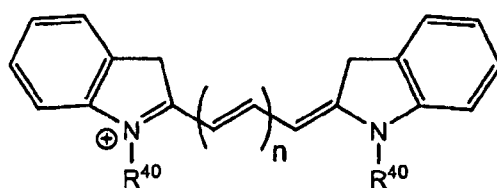
在一個態樣中，螢光部分(F)為選自以下之化合物之殘基：





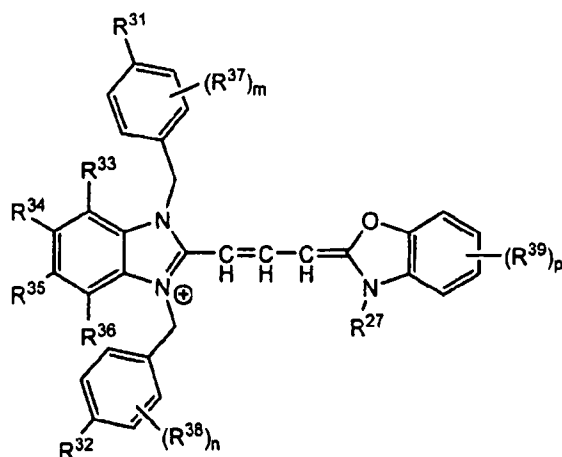
其中各 R^{30} 獨立地為氫、 C_{1-4} 烷基或經取代之 C_{1-4} 烷基， A^1 及 A^2 獨立地為含有雜芳基之視情況經取代之氮， n 為選自1至10之整數。在一些實施例中，雜芳基為吡咯、咪唑、噻唑、吡啶、喹啉、吲哚、苯并噁唑或苯并噻唑。

在一個態樣中，螢光部分(F)為



其中 R^{40} 中之一者為 R^{30} ，且另一者為 R^f 、 $L^{40}-R^f$ 、 $L^{40}-OR^f$ 、 $L^{40}-NHR^f$ ， L^{40} 為 $(CH_2)_m$ ，其中一個或兩個 CH_2 基團視情況經O、S、SO、 SO_2 、 $C(O)O$ 、 $OC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHC(O)$ 、NH置換或為視情況經取代之苯基，且 R^f 為L之連接點。

在一個態樣中，螢光部分(F)為



其中

R^{31} 及 R^{32} 獨立地為H、 $-OH$ 、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 鹵烷基、 $-O-C(O)-(C_{1-4}$ 烷基)、 $-C(O)-O-(C_{1-4}$ 烷基)、 C_{1-4} 烷氧基、鹵基或 R^f ；

R^{34} 及 R^{35} 獨立地為H、鹵基、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷基、經取代之

C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、-O-C(O)-(C₁₋₄烷基)、-C(O)-O-(C₁₋₄烷基)、
-O-CH₂-O-(C₁₋₄烷基)、-S-CH₂-O-(C₁₋₄烷基)或R^f；

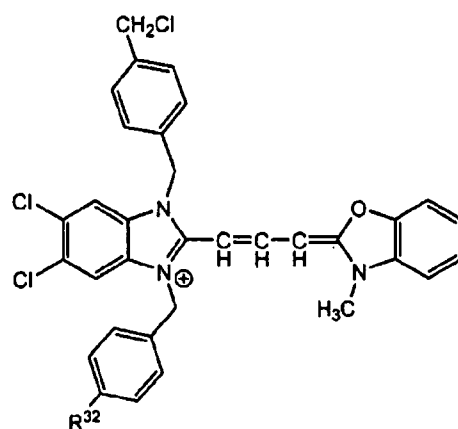
各R³³及R³⁶獨立地為H、鹵基、-OH、-CH₃或R^f；

各R³⁷、R³⁸及R³⁹獨立地為鹵基、-OH、-CH₃或R^f；

各m、n及p獨立地為0、1、2、3或4；

限制條件為R³¹、R³²、R³³、R³⁴、R³⁵、R³⁶、R³⁷、R³⁸及R³⁹中之至少一者且不超過兩者為R^f；其中R^f為L之連接點。

在一個態樣中，螢光部分(F)為



其中R³²為L之連接點。

(G) 連接子

本發明之連接子(L)將螢光部分或螢光團連接至小分子化合物。在一特定態樣中，連接子為一鍵，亦即，螢光部分直接連接至小分子化合物。

在一些實施例中，連接螢光部分不會明顯降低藥物(D)之活性，從而經修飾之化合物為生物活性及/或醫藥有效的。在一些實施例中，連接螢光部分降低或消除藥物(D)之活性，從而經修飾之化合物具有降低的生物及/或醫藥活性或者為生物非活性及/或醫藥無效的。

適用於此目的之其他連接子包括出於結合兩個分子之目的熟知的連接子。

在一些態樣中，連接子(L)為穩定的且不會在投與後降解，且螢光部分及藥物之結合物為生物及/或醫藥活性的。例示性穩定連接子包括(但不限於)乙醯基丙胺酸(參見實例2)及 β -丙胺酸(參見實例3)。在其他態樣中，連接子在生理條件(例如在非凍乾狀態中)下之半衰期比微細胞裝載時間長，以使得在將經修飾之化合物裝載至微細胞中之後螢光部分/螢光團及小分子化合物在連接子分解後變得分離。一般而言，裝載微細胞需要約4小時。因此，連接子之半衰期可為至少4小時、6小時、8小時、10小時、12小時、14小時、16小時、18小時、20小時、22小時或24小時。較佳地，連接子之半衰期在6-24小時或8-24小時內。舉例而言，當用作連接子時，2'-(3-胺基丙醯基)部分之半衰期為約8小時。

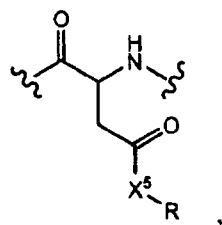
在其他態樣中，連接子在細菌囊泡內為穩定的，但可為pH敏感性的，且因此，在低於中性之pH下較不穩定。因為內體/溶酶體中之pH明顯低於正常細胞環境中之pH，所以此類pH敏感性連接子僅在靶哺乳動物細胞之內體/溶酶體中可降解。在此類酸性條件下，連接子可水解。舉例而言，酯可水解成醇殘基及羧酸，或醯胺可水解成胺及羧酸。

已知 pH 敏感性連接子例如由 Nie 等人在 POLYMERIC BIOMATERIALS: MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS, 第16章, 第413-32頁(Dumitriu編, 2013)中說明，其描述用於藥物遞送之酸不穩定連接子。國際專利申請案 WO2006/108052 亦描述酸不穩定連接子，其在溶酶體中可見之條件下可降解。Duncan, *Nature Reviews Cancer* 6: 688-701 (2006)描述在曝露於溶酶體酶後可降解之連接子，例如組織蛋白酶B)裂解 Gly-Phe-Leu-Gly 及聚麩胺酸(PGA)或以降低pH，例如脲連接子在內體及溶酶體(pH 6.5至pH <4.0)中降解。美國專利第5,306,809號描述適用於免疫治療劑之酸不穩定連接子。

舉例而言，美國專利第6,521,431號描述乙醇酸或乳酸；羥基酯，

諸如3-羥基丁酸、2-羥基丙酸及5-羥基羊油酸；胺基酸；原酯；酸酐；磷嗪；磷酸酯作為連接子之用途。

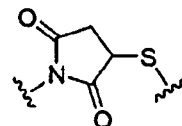
公開申請案US2013/0071482描述具有一或多個諸如以下之部分之連接子



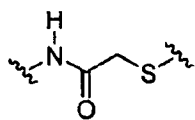
其中X⁵為O或NH，且針對R之結構詳述在'482公開申請案中。

公開申請案US2013/0261094描述諸如以下之連接子：

-OQ-(C_nH_{2n})-S(R')(R'')-(C_mH_{2m})-CH₂-A 或
 -R⁹N-Q-(C_nH_{2n})-S(R')(R'')-(C_mH_{2m})-CH₂-A，其中n及m為0至20，且較佳地1至10之整數；R'及R''獨立地為電子孤對、氧部分(諸如=O)或氮部分諸如(=N-R^x)，其中R^x為原子之同源組或異源組；A為結合部分；且Q為直接鍵、C=O、C=NH或C=NR^p基團，其中R^p為C₁-C₃烷基，且R⁹可為氫原子或C₁-C₃烷基。

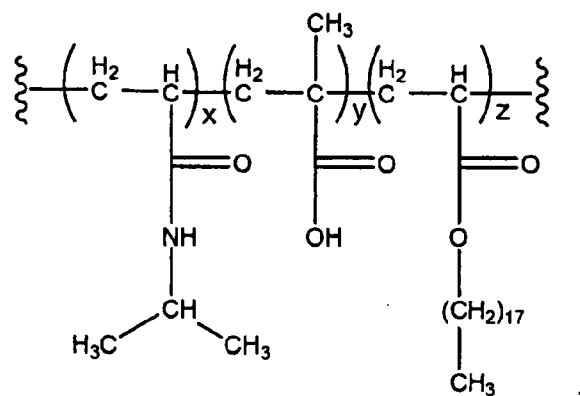


公開申請案US2012/0121615描述連接子，諸如



或

公開申請案US2005/0112065描述pH敏感性連接子，諸如檸檬醯基或醯肼連接子；或酶敏感性連接子。申請案詳述之此類連接子之實例包括：



其中x、y、z獨立地為0、1、2、3、4或5，限制條件為x、y及z中之至少一者不為0。在一些實施例中，x、y及z獨立地為1、2、3、4或5。

Nicoletti等人, *Int'l J. Antimicrob. Agents* 33: 441-48 (2009)描述作為連接子之多肽GlyPheLeuGly。

上文所提及之公開案之各別內容在此以全文引用之方式併入。一些公開案在描述連接子時使用給定化合物之名稱。在任何情況下，當充當連接子時，任何給定化合物二價自由基，以使得其可連接藥物及螢光部分以提供根據本發明之經修飾之(螢光)化合物。

在一個態樣中，連接子(L)係選自由以下組成之群：一鍵、
-C(O)-O-、-C(O)NH-、-OC(O)-(CHR⁵⁰)_qNR⁵¹C(O)-及
-OC(O)-(CHR⁵⁰)_qC(O)NR⁵¹-(CHR⁵²)_u-NH-C(S)-NH-，其中R⁵⁰、R⁵¹及R⁵²
獨立地為H或C₁₋₄烷基，且q及u獨立地為1、2、3、4、5、6或7。

在另一態樣中，L係選自由以下組成之群：
-O-C(O)-CH(CH₃)-NHC(O)-、-O-C(O)-(CH₂)₂-NH-CO-及
-O-C(O)-(CH₂)₃C(O)NH-(CH₂)₆-NH-C(S)-NH-。

在一些態樣中，連接子為-(CHR⁵²)_p，其中-(CHR⁵²)-中之至少一者
經來自以下基團之一者置換：-O-、-((CHR⁵²)-O)_q-、-S-、-S-S-、
-C(O)NH-、-C(O)O-及-CR⁵²=NNH，其中R⁵²為H或C₁₋₄烷基；且其中p
為選自2-10之整數，且q為選自1-7之整數。在一些實施例中，p為2至
10 (包括端點)之整數，且q為1至7 (包括端點)之整數。

(H) 治療方法及組合物

依照本發明之另一態樣，經由配位體將如上文所描述之組合物之裝載化合物之完整且無生命的細菌囊泡導入靶哺乳動物腫瘤細胞中。在一些實施例中，配位體為「雙特異性的」。亦即，配位體對微細胞及哺乳動物(腫瘤)細胞組分兩者呈現特異性，其從而使得給定囊泡結合至靶細胞，其中後者吞噬前者。雙特異性配位體使微細胞靶向腫瘤細胞之用途進一步描述於WO 05/056749及WO 05/079854中，且雙特異性配位體使殺死的細菌細胞靶向腫瘤細胞之用途進一步描述於美國專利第8,591,862號中，其各別內容在此以全文引用之方式併入。在此類配位體連接至囊泡後，配位體之未佔用特異性(「單一特異性」)隨屬直至其與靶(腫瘤)哺乳動物細胞相互作用。

配位體可藉助於配位體與細胞膜上之組分(諸如多醣、糖蛋白或多肽)之間的相互作用連接至囊泡之細胞膜。表現配位體錨定於囊泡之表面上以使得配位體之表面組分結合部分曝露，從而使得該部分可在囊泡與哺乳動物細胞接觸時結合靶哺乳動物細胞表面組分。

或者，可藉由細菌衍生之囊泡之活的對應物，例如藉由微細胞之親本細胞或藉由在其變成殺死的細胞之前的細菌細胞表現且呈現配位體。在此情況下，配位體不需要對囊泡之特異性且僅呈現對哺乳動物細胞所特有的組分之特異性。亦即，此類組分無需對腫瘤細胞本身或甚至對在治療下之特定種類腫瘤細胞而言為獨特的，只要腫瘤細胞在其表面上呈現該組分即可。

在靜脈內投與後，囊泡在腫瘤微環境中快速積聚。隨上文所描述之滲漏的腫瘤脈管變化而出現之此積聚實現將封裝囊泡之治療有效負載遞送至腫瘤細胞，其隨後內化封裝囊泡。

發明人已發現，此遞送途徑適用於哺乳動物腫瘤細胞之範圍，包括通常抗拒微細胞之特異性黏附及內飲作用之細胞。舉例而言，包含

引導在抗-HER2受體或抗-EGF受體處之抗體或抗體衍生物(參見下文)之配位體可在靶向之非吞噬細胞(諸如肺臟、卵巢、大腦、乳房、前列腺及皮膚癌細胞)之範圍上使微細胞結合至各別受體。

因此，在各類型非吞噬細胞攝取囊泡之前實現結合。亦即，在本發明之情形下，適合的靶細胞呈現細胞表面組分，藉由囊泡上之配位體，其結合引發該囊泡之內飲作用。

更確切而言，發明人發現，(a)微細胞或殺死的細菌細胞上之配位體與(b)哺乳動物細胞表面受體之間的相互作用可活化至靶宿主細胞，諸如腫瘤細胞之晚期內體/溶酶體區室中之攝取路徑，此處稱為「受體介導之內飲作用」(rME)路徑。藉由此rME路徑，發明人發現，細菌衍生之囊泡經由早期內體、晚期內體及溶酶體處理，導致將其有效負載釋放至哺乳動物宿主細胞之細胞質中。此外，為核酸之有效負載不僅在晚期內體/溶酶體區室中逃避完全降解，且亦藉由宿主細胞表現。

用於此遞送途徑之配位體可為「雙特異性的」，如上文所描述，因為其分別結合至攜有有效負載之囊泡及靶細胞上之表面組分，且其與後一組分之相互作用導致囊泡被攝取至rME路徑中。在任何情況下，依照本發明，若與組分之相互作用實際上接入需要自靶細胞表面之胞溶質內化之細胞內吞路徑，則給定靶細胞表面組分可為配位體結合之候選物。此類候選物易於經由一種分析評估在本發明中之適用性，其中將在其表面上呈現候選物組分之細胞類型活體外與攜有配位體之微細胞共同培育，該配位體結合候選物且亦接合至經偵測(例如經由共焦顯微鏡目測)之螢光染料或其他標記。(此種活體外分析由MacDiarmid(2007)在第436頁圖3之圖例中描述。)因此，標記之所觀測到之內化構成此類分析之肯定指示：所測試之靶細胞表面組分適用於本發明。

候選物靶細胞表面組分之說明性實例為(A)受體酪胺酸激酶或

「RKT」(其為以類似於其他整合膜蛋白之速率進行組成型內化(內飲作用)之跨膜蛋白質家族)之成員。參見Goh及Sorkin, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a017459 (2013)。RKT之家族由例如 Lemmon 及 Schlessinger, *Cell* 141: 1117-134 (2010)描述。下表列出在二十種亞科中所有五十八種人類蛋白質組中之RTK，可測試其中之任何一或多者在本發明中之適用性，如上文所描述(亦參見圖24)。

表1	
RTK亞科	例示性RTK
ErbB	EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4
Ins	InsR、IGF1R、InsRR
PDGF	PDGFR α 、PDGFR β 、CSF1R/Fms、Kit/SCFR、Fit3/Flk2
VEGF	VEGFR1/Flt1、VEGFR2/KDR、VEGFR3/Flt4
FGF	FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4
PTK7	PTK7/CCK4
Trk	TrkA、TrkB、TrkC
Ror	Ror1、Ror2
MuSK	MuSK
Met	Met、Ron
Axl	Axl、Mer、Tyro3
Tie	Tie1、Tie2
Eph	EphA1-8、EphA10、EphB1-4、EphB6
Ret	Ret
Ryk	Ryk
DDR	DDR1、DDR2
Ros	Ros
LMR	LMR1、LMR2、LMR3
ALK	ALK、LTK
STYK1	SuRTK106/STYK1

同樣地，說明性實例為以下之成員：(B)膜結合、高親和力葉酸結合蛋白(葉酸受體)之類別，其結合葉酸且減少葉酸衍生物，且其介導四氫葉酸遞送至細胞內，(C)膜結合細胞激素受體之亞群，其在同源細胞激素，諸如IL13之內化方面起作用；(D)表面抗原，諸如CD20、CD33、間皮素及HM1.24，其在某些癌細胞上表現且介導同源單株抗體，例如CD20之實例中之利妥昔單抗之內化；及(E)黏附受體(整合素)、跨膜糖蛋白之家族，其經由內體路徑運輸且為癌細胞黏附至細胞外基質之主

要介體。

根據本發明，配位體可為視具體情況展現所需一或多種特異性之任何多肽或多醣。較佳配位體為抗體。在其當前用途中，術語「抗體」涵蓋藉由免疫原性反應之活體外或活體內產生獲得之免疫球蛋白分子。因此，「抗體」類別包括單株抗體及人類化抗體以及抗體衍生物，諸如單鏈抗體片段(scFv)、雙特異性抗體等。已知大量不同雙特異性蛋白質及基於抗體之配位體，如Caravella及Lugovskoy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14: 520-28 (2010)之綜述文章所證明，其在此以全文引用之方式併入。根據本發明適用之抗體可同樣藉由已知重組DNA技術獲得。

因此，作為非限制性實例，依照本發明，攜有對表面組分(諸如腫瘤抗原)之特異性之抗體可用於使微細胞靶向待治療的腫瘤中之細胞。在此方面，說明性細胞表面受體包括RTK表皮生長因子受體(EGFR)、血管內皮生長因子受體(VEGFR)、血小板衍生之生長因子受體(PDGFR)及似胰島素生長因子受體(IGFR)中之任一者；在若干實體腫瘤(包括腦瘤)中高度表現及在一些垂體腺瘤中過度表現之葉酸受體中之每一者。此類雙特異性配位體可同樣靶向突變體或變體受體，例如IL-13R α 2受體，其在50%至80%之人類多形性膠質母細胞瘤中表現(參見Wykosky等人, *Clin Cancer Res.* 14: 199-208 (2008)；Jarboe等人, *Cancer Res.* 67: 7983-86 (2007)；Debinski等人, *J. Neurooncol.* 48: 103-11 (2000)；及Okada等人, *J. Bacteriol.* 176: 917-22 (1994))，但與其生理對應物IL4R/IL13R不同，其在正常組織中表現。參見Hershey, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 677-90 (2003)。因此，正常大腦細胞中幾乎不存在IL13R α 2。參見Debinski及Gibo, *Mol. Med.* 6: 440-49 (2000)。另外，轉移至大腦中之腫瘤可能過度表現某些受體，其亦可為適合的靶標。舉例而言，Da Silva等人, *Breast Cancer Res.* 12: R46 (1-13) (2010)展示乳癌之腦轉移表現RTK之HER家族之所有成員。HER2在20%腦轉

移中擴增且過度表現，EGFR在21%腦轉移中過度表現，HER3在60%腦轉移中過度表現，且HER4在22%腦轉移中過度表現。有趣地，在滯留於大腦中之乳癌細胞中HER3表現增加。

(I) 調配物及投與途徑及時程

本發明之組合物之調配物可以單位劑型呈現，例如在安瓿或小瓶中或在多劑量容器中，具有或不具有所添加之防腐劑。調配物可為油性或水性媒劑中之溶液、懸浮液或乳液，且可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。適合的溶液用接受者之血液等張，且藉由鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液說明。或者，調配物可呈凍乾粉末形式，以便使用適合的媒劑，例如無菌、無熱原質水或生理鹽水復原。調配物亦可呈積存製劑形式。此類長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內)或藉由肌肉內注射來投與。

在一些態樣中，提供包括治療有效量之小分子化合物之含有囊泡之組合物。抗贅生劑之「治療學上有效」的量為根據本發明所討論之藥劑之劑量。若小分子化合物在囊泡中呈非活性形式，則「治療學上有效」的量係指在靶細胞之內體/溶酶體中釋放有效量之經活化化合物之非活性化合物。

因此，在本發明之情形下，當投與攜有治療有效負載之微細胞時，可參考在動物模型中或在人類個體中腫瘤或腫瘤症狀之預防或改善來衡量治療有效量，如下文進一步描述。在給定實例中對於特定個體證明為「治療有效量」之量可能不對針對100%所討論之腫瘤進行類似治療之個體有效，但博學的臨床師認為此類劑量為「治療有效量」。在此方面，適當的劑量亦將隨例如腫瘤之類型、階段及嚴重程度而變化。在任何情況下，根據本發明，當根據整個描述考慮時，活體外測試(實例3及實例4)及活體內測試(實例5、實例7及實例8)以及用於定量活體內藥物分佈(實例9)之方法之本發明說明授權熟知候選藥物之臨

床前及臨床測試之個體經由常規實驗測定針對特定指示之活性劑之治療有效量。同樣地，當「治療學上有效的」用於指醫藥組合物中之微細胞之數量時，該數量可基於封裝至微細胞中之抗贅生劑及藥劑在治療腫瘤方面之功效來確定。在此方面，可用臨床或病理學參數，諸如腫瘤塊來量測治療效果。因此，腫瘤塊減少或增加減少可用於量測治療效果。

本發明內之調配物可經由各種途徑局部或全身投與且投與至哺乳動物體中之各種部位，以實現所需治療效果。在一特定態樣中，投與途徑為靜脈內注射。

一般而言，可以藉由常規測試所界定之適當的劑量使用本發明之調配物，以獲得最佳生理效果，同時使任何潛在毒性減至最小。可根據多種因素選擇給藥方案，該等因素包括患者之壽命、重量、性別、醫學病況；腫瘤之嚴重程度或階段；投與途徑；及患者之腎及肝功能。

獲得產生最大功效而副作用極小範圍內之濃度之最佳精度可能且典型地將需要基於藥劑到達靶部位及靶細胞之動力學之方案。可在測定治療方案之最佳濃度時考慮囊泡或藥劑之分佈、平衡及消除。可分別調節囊泡及治療劑之劑量以實現所需效果。

此外，可使用藥物動力學/藥效動力學建模系統使調配物之劑量投與最佳化。因此，可選擇一或多個劑量方案且可使用藥物動力學/藥效動力學模型來測定一或多個劑量方案之藥物動力學/藥效動力學概況。基於特定之此類概況，可隨後選擇達成所需藥物動力學/藥效動力學反應之投與劑量方案中之一者。舉例而言，參見WO 00/67776。

可向腫瘤患者投與本發明之調配物一週至少一次歷經若干週。因此，可投與調配物一週至少一次歷經若干週至若干月之時間段。

更確切而言，本發明調配物可一日至少一次投與約2天、約3天、約4天、約5天、約6天、約7天、約8天、約9天、約10天、約11天、約

12天、約13天、約14天、約15天、約16天、約17天、約18天、約19天、約20天、約21天、約22天、約23天、約24天、約25天、約26天、約27天、約28天、約29天、約30天或約31天。或者，調配物可每天投與約一次或每約2天、約3天、約4天、約5天、約6天、約7天、約8天、約9天、約10天、約11天、約12天、約13天、約14天、約15天、約16天、約17天、約18天、約19天、約20天、約21天、約22天、約23天、約24天、約25天、約26天、約27天、約28天、約29天、約30天或約31天或31天以上投與約一次。

在本發明之另一實施例中，調配物可每週投與約一次或每約2週、約3週、約4週、約5週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週、約11週、約12週、約13週、約14週、約15週、約16週、約17週、約18週、約19週或約20週或20週以上投與約一次。或者，調配物可一週至少一次投與約2週、約3週、約4週、約5週、約6週、約7週、約8週、約9週、約10週、約11週、約12週、約13週、約14週、約15週、約16週、約17週、約18週、約19週或約20週或20週以上。

或者，調配物可每月投與約一次或每約2個月、約3個月、約4個月、約5個月、約6個月、約7個月、約8個月、約9個月、約10個月、約11個月或約12個月或12個月以上投與約一次。

調配物可以單一日劑量形式投與。或者，總日劑量可以每日兩次、三次或四次之分開劑量投與。

因此，參考以下實例將更容易理解通常描述之本發明，該等實例以說明方式提供且並不意欲限制本發明。本文中所參考之所有公開可獲得的文獻(包括(但不限於)專利)尤其以引用之方式併入。

實例

發明人觀測到，在不同之處在於螢光類型(固有相對於非固有)及化合物結構之裝載化合物之廣泛範圍中，螢光相關之裝載增強之效

果。對於非固有螢光化合物，差異分別涉及螢光團及連接子(若存在)之性質。

一般而言，實例涉及將多種螢光化合物裝載至細菌衍生之完整囊泡中。對於所有實例，起始物質均為衍生自腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*)鼠傷寒血清變型(鼠傷寒沙門桿菌(*S. typhimurium*))之 *minCDE*-染色體缺失突變體之空的完整微細胞之緩衝組合物，游離內毒素水準不超過每 10^9 個微細胞約5 EU。參見美國專利第8,449,877號(產生實質上缺乏游離內毒素之微細胞組合物)。

對於裝載囊泡(此處為微細胞)，實例1至實例5、實例7至實例10、實例12及實例13中之方法與上文所描述且MacDiarmid等人(2007)中所說明之小規模方案基本上一致。舉例而言，在給定實驗中，可將PBS緩衝液中之空的微細胞添加至微量離心管中且離心(16,000 g，10分鐘)。在丟棄所得上清液之後，微細胞集結粒將再懸浮於視情況具有0.01 (w/v)所添加之明膠之PBS緩衝液(所謂「BSG緩衝液」)中，且與有效負載化合物(通常每ml微細胞懸浮液約200 μ g至約1 mg)一起培育。將由此獲得之裝載之微細胞離心(16,000 g，10分鐘)且丟棄裝載上清液。隨後將藉由使集結粒再懸浮於1 ml緩衝液中洗滌裝載之微細胞，離心微細胞(16,000 g，10分鐘)，且丟棄上清液洗液。此類洗步驟通常重複三次。最後，將使微細胞再懸浮於PBS或BSG緩衝液中。

當待裝載之螢光化合物為水可溶(如許多前述實例之情況一般)時，化合物截留至囊泡外表面明顯減少。因此，在較小規模上洗滌為足夠的，准許使用小規模方案。然而，在實例6及實例11中，裝載之化合物為小紅莓，其為兩親性而非親水性的，且因此截留為顯著因素。因此，儘管此等實例之裝載步驟在較小規模上，亦即，裝載在約毫升規模體積之緩衝液體中進行，但洗步驟涉及利用公升規模體積之緩衝液體之交叉過濾(無離心)，因此構成大規模方法。

最後，**實例14**將小規模方案與大規模方法進行比較，突顯利用後者所實現之改良稠度及純度。

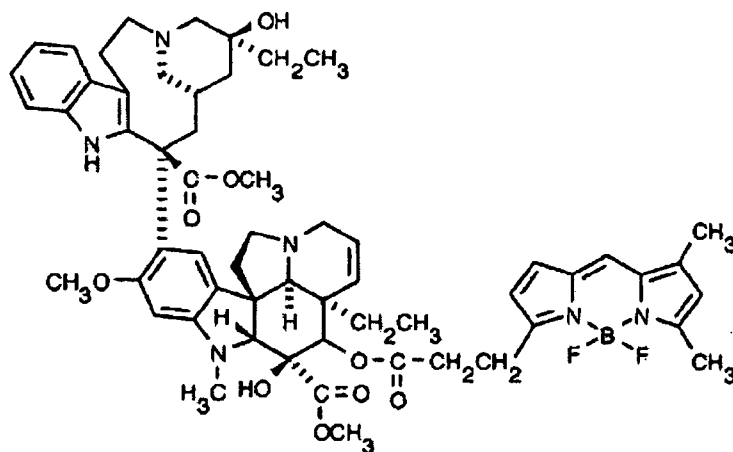
在該等實例中，將封裝有效負載之微細胞安裝至玻璃載片上以便藉由螢光顯微法，使用Leica型號DM LB光顯微鏡，100×放大率(Leica Microsystems, Germany)進行目測。使用Leica DC攝影機及Leica IM影像管理軟件採集結果，其中採用適當的過濾器以准許目測有效負載螢光。

實例1. 裝載長春鹼BODIPY® FL

此實例表明長春鹼之螢光結合物至細菌衍生之微細胞之細胞質中之封裝。長春鹼為習知用於治療某些類型癌症，包括霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸癌及睪丸癌之抗微管藥物。

所採用之化合物長春鹼 BODIPY® FL為市售的且獲自 Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Molecular Probes®品牌。該化合物為經由亞甲基連接子與螢光染料BODIPY® FL之結合物長春鹼。在此情形下，諸如BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650及BODIPY 650/665之其他BODIPY螢光團可取代 BODIPY® FL。參見 THE MOLECULAR PROBES® HANDBOOK - A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES (第11版)，部分1.4，「BODIPY染料系列(BODIPY Dye Series)」，其內容在此以引用之方式併入。

長春鹼BODIPY® FL具有定義明確的螢光特徵(激發505 nm，發射513 nm；紅色螢光)。其結構描繪如下。



在起始組合物含有空的微細胞之情況下，根據小規模方案裝載(培育在每ml溶液1 mg結合物中)長春鹼BODIPY® FL且洗滌，其中洗步驟重複三次。螢光成像之結果(圖1)揭示，所有裝載之微細胞發出亮紅色螢光，指示長春鹼BODIPY® FL已傳遞至微細胞細胞質中。另外，長春鹼BODIPY® FL分子保留在微細胞內，儘管在整個洗步驟中濃度梯度反轉。

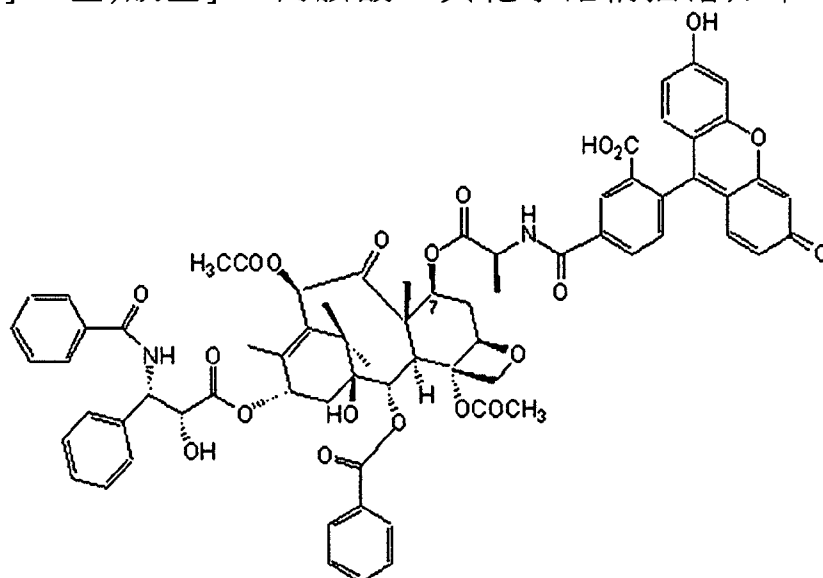
實例2.裝載FLUTAX-1

此實例表明太平洋紫杉醇之螢光結合物至細菌衍生之完整囊泡之細胞質中之封裝。太平洋紫杉醇為使微管穩定之紫杉烷，且因此在細胞分裂期間干擾微管之正常分解。作為有絲分裂抑制劑，太平洋紫杉醇用於化學療法中以治療肺癌、卵巢癌及乳癌、頭頸癌及卡堡氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)之晚期形式。

所採用之螢光紫杉烷衍生物FLUTAX-1為太平洋紫杉醇與螢光素經由乙醯基丙胺酸連接子之市售結合物。習知地，認為FLUTAX-1為治療學上無效的；因此，其僅作為研究試劑出售。對於此實例，結合物獲自市售來源Tocris Biosciences (Bristol, UK)。

FLUTAX-1 (分子量：1283.2)具有定義明確的螢光特徵(激發約495 nm，發射約520 nm；綠色螢光)。衍生物之正式名稱為2aR,4S,4aS,6R,9S,11S,12S,12aR,12bS)-6,12b- 雙 (乙 醯 氧

基)-9-[(2*R*,3*S*)-3-(苯甲醯胺基)-2-羥基-1-側氧基-3-苯基丙氧基]-12-(苯甲醯氧基)-2*a*,3,4,4*a*,5,6,9,10,11,12,12*a*,12*b*-十二氫-11-羥基-4*a*,8,13,13-四甲基-5-側氧基-7,11-亞甲基-1*H*-環癸[3,4]苯并[1,2-*b*]氧雜環丁-4-基酯 *N*-[(3',6'-二羥基-3-側氧基螺[異苯并呋喃-1(3*H*),9'-[9*H*]二苯并呋喃]-5-基)羰基]-*L*-丙胺酸。其化學結構描繪如下。



將如上文所描述製備之PBS中之微細胞與1 ml之200 $\mu\text{g/ml}$ FLUTAX-1溶液一起培育，且隨後依照小規模方案反覆洗滌。

螢光成像(圖2)揭示，所有微細胞發出亮綠色螢光，表明FLUTAX-1已傳遞至微細胞細胞質中，且大量FLUTAX-1分子保留囊封，儘管在整個洗步驟中濃度梯度反轉。相比於封裝FLUTAX-1之微細胞，背景呈現黑色，證明極少至無外部FLUTAX-1。

藉由自微細胞提取藥物，繼而HPLC分析且與已知濃度之FLUTAX-1樣品之標準曲線進行比較來測定封裝在微細胞內之FLUTAX-1之量。如上述MacDiarmid等人(2007)所描述，針對封裝有小紅莓之微細胞進行微細胞提取。針對FLUTAX-1之定量研發出一種HPLC方法。HPLC方法特徵包括(i)移動相：乙腈：MilliQ dH₂O，50:50，以2毫升/分鐘之流動速率等度溶離12分鐘。(ii)固定相：Metalchem 3u Taxsil，100 mm $\times$ 4.6 mm加上C18濾筒。(iii)管柱溫度：40°C。(iv)偵

測：(a) SPD-M10Avp二極體陣列偵測器-228 nm；(b) RF-10AXL螢光偵測器(Shimadzu)-激發495 nm，發射520 nm。(v)注射體積：50 μ l。(vi) HPLC系統：Shimadzu SCL-10AVP系統，包含SIL-10AVP自動注射器、LC-10Advp泵、DGU-14A脫氣器、CTO-10Avp管柱烘箱、RF-10AXL螢光偵測器及SPD-M10Avp二極體陣列偵測器，利用Class-VP版本7.2.1軟件(Shimadzu corporation, Kyoto, Japan)。

藉由HPLC測定用此等藥物裝載條件獲得之FLUTAX-1含量為每 1×10^9 個微細胞570 ng (圖3)。藉由使用亞佛加厥數(Avogadro's number)，此等於每個微細胞封裝之約270,000個FLUTAX-1分子，其為太平洋紫杉醇封裝之顯著改良，其中每個微細胞FLUTAX-1分子比太平洋紫杉醇分子多127倍(參見下文實例9)。因為TF.Pac (太平洋紫杉醇之水可溶衍生物)，此同樣為驚人的，每個微細胞僅提供多25倍的分子(參見實例10)。結果指示，螢光素螢光團增強FLUTAX-1進入及保留在微細胞中。

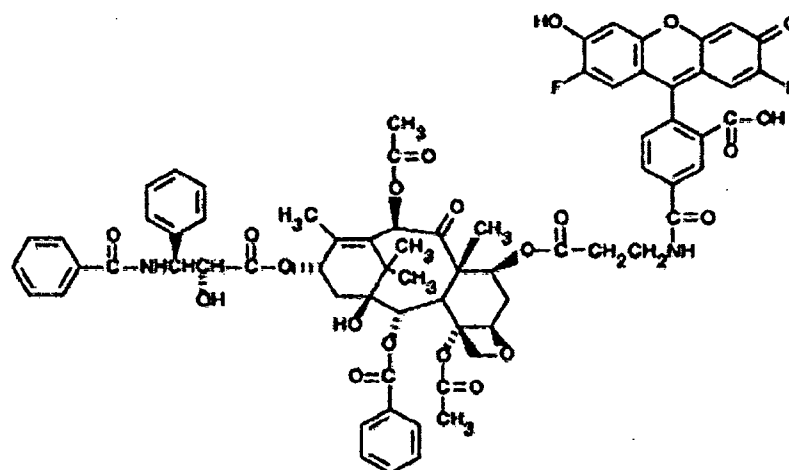
實例3.裝載太平洋紫杉醇Oregon Green®-488

此實例表明，可將另一螢光太平洋紫杉醇結合物太平洋紫杉醇Oregon Green®-488 a/k/a 「FLUTAX-2」封裝至細菌衍生之完整囊泡之細胞質中。對於此衍生物，經由 β -丙胺酸連接子將氟化螢光素部分Oregon Green®-488結合至太平洋紫杉醇之C7。氟化螢光素部分賦予衍生物分子螢光(激發約495 nm，發射約525 nm；綠色螢光)以及改良的水溶性。

所涉及之太平洋紫杉醇之衍生化產生生物非活性且因此治療無效之化學實體，其僅出於研究目的出售。太平洋紫杉醇Oregon Green®-488為市售的，因此，且對於此實例，其獲自Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)。

衍生物之正式名稱為L-丙胺酸、N-[(2',7'-二氟-3',6'-二羥基-3-側氧

基螺[異苯并呋喃-1(3H),9'-[9H]二苯并呋喃]-5-基)羰基]-(2aR,4S,4aS,6R,9S,11S,12S,12aR,12bS)-6,12b-雙(乙醯氧基)-12-(苯甲醯氧基)-9-[(2R,3S)-3-(苯甲醯胺基)-2-羥基-1-側氧基-3-苯基丙氧基]-2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-十二氫-11-羥基。其化學結構表示如下。



根據小規模方案製備含微細胞之PBS，將其裝載(100 $\mu\text{g/ml}$ 結合物溶液之外部裝載濃度)且洗滌。螢光成像(圖4)揭示，所有微細胞發出亮綠色螢光，指示太平洋紫杉醇 Oregon Green®-488已傳遞至微細胞細胞質中，且甚至在整個洗步驟中濃度梯度反轉後，大量結合物分子保留在微細胞中。相比於裝載之微細胞，背景呈現黑色證明極少至無外部太平洋紫杉醇 Oregon Green®-488。

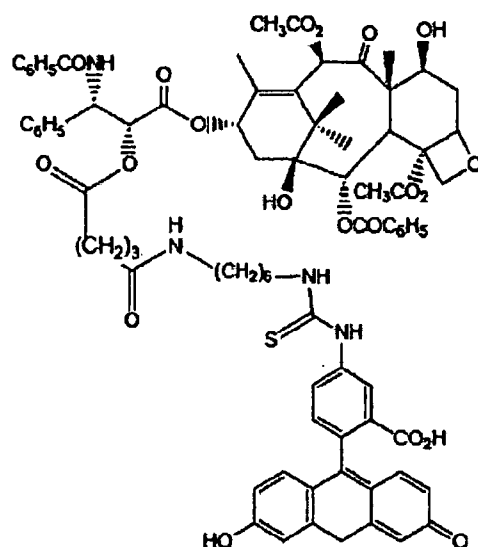
必須間接測定封裝在微細胞內之太平洋紫杉醇 Oregon Green®-488之量，因為在此實例中破壞裝載之微細胞同樣導致裝載之化合物分解，妨礙藉由HPLC分析進行之定量。因此，經由螢光顯微法，將裝載有太平洋紫杉醇 Oregon® Green-488之微細胞中之(綠色)螢光強度與針對裝載有小紅莓之微細胞(其在提取及定量條件下為穩定的)目測到之(紅色)自發螢光進行比較。參見下文實例6，展示每 10^9 個微細胞封裝約800 ng小紅莓。相對於在小紅莓之情況下觀測到之螢光，裝載有太平洋紫杉醇 Oregon Green®-488之微細胞所觀測到之螢光之較高

強度指示針對後者之類似濃度，亦即，每 10^9 個微細胞約800 ng藥物。此值與裝載太平洋紫杉醇之微細胞觀測到之每 10^9 個微細胞小於10 ng藥物之值形成對比(下文實例9)。

實例4.裝載FITC結合之太平洋紫杉醇

此實例表明太平洋紫杉醇之異硫氰酸螢光素(FITC)衍生物(縮寫字「FCP」)有效封裝至細菌衍生之完整囊泡之細胞質中。螢光素基團(與FLUTAX-1中所見一致)經由5-側氧基-5-((6-硫脲基己基)胺基)戊酸連接子(亦即，相對較長的連接子結構域)結合至太平洋紫杉醇分子上之C2'位置而非C7位置(如FLUTAX-1及太平洋紫杉醇Oregon Green®-488中一般)。在此，螢光素基團同樣賦予衍生物分子螢光(激發：495 nm；發射：519 nm)，且連接子提高其水溶解度。

FCP不為生物活性的且目前僅出於研究目的使用。對於此實例，FCP獲自IDT Australia Ltd. (Boronia, Victoria)。其化學結構呈現如下。



在如所描述之起始組合物之情況下，根據小規模方案製備含微細胞之PBS，經由與FCP溶液(300 μ g/ml)一起培育而裝載，且洗滌。螢光成像(圖5)揭示，微細胞發出亮綠色螢光，指示FCP已傳遞至微細胞細胞質中，且在整個洗步驟中濃度梯度之反轉留下囊封在微細胞中之大量FCP分子。存在極少至無外部FCP，如相對於封裝FCP之囊泡背景之

黑色外觀所反映。

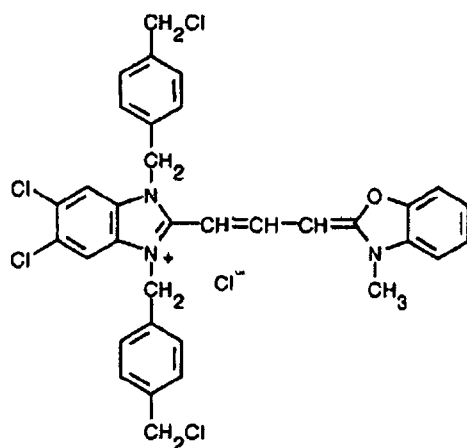
藉由自微細胞提取藥物，繼而HPLC分析來測定封裝在微細胞內之FCP之量。進行微細胞提取，且如上文針對FLUTAX-1之定量所描述採用HPLC方法。

用此等藥物裝載條件獲得之FCP含量定量為每 1×10^9 個微細胞550 ng (圖6)。此等於每個微細胞封裝之約230,000個分子FLCP。此為太平洋紫杉醇封裝之顯著改良，其中每個微細胞多109倍分子，儘管FCP為較大分子(分子量1455.6相對於853.9)之事實。

所封裝之FCP分子之數量類似於FLUTAX-1之數量(約270,000)。FCP及FLUTAX-1具有相同螢光團。儘管結合不同，C2' (FCP)相對於C7 (FLUTAX-1)，但太平洋紫杉醇Oregon Green®-488共有與FLUTAX-1相同之C7結合位置。因此展示，螢光素螢光團之結構且非分子之結合點對於促進藥物分子裝載至微細胞中而言至關重要。因此展示，結合點對螢光介導之化合物裝載至根據本發明之細菌衍生之完整囊泡中之增強而言並非至關重要。

實例5.裝載*BacLight*TM Green

此實例表明，細菌染劑*BacLight*TM Green可容易地封裝於細菌衍生之完整囊泡中。綠色螢光染料(吸收/發射分別為約480/516 nm及約581/644 nm) *BacLight*TM Green為市售的，且對於此實例獲自Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Molecular Probes®品牌。其化學結構描繪如下。



將 *BacLight™ Green* 溶液添加至含微細胞之 PBS 緩衝液中達到 200 nM 之最終濃度。依照小規模方案，在室溫下培育微細胞 30 分鐘且如上文所描述進行三次重複洗步驟。

螢光成像(圖 7)揭示，所有微細胞發出亮綠色螢光，指示 *BacLight™ Green* 已裝載至微細胞中。相對於 *BacLight™ Green* 染色之微細胞，黑色背景之外觀證明極少至無外部染劑。

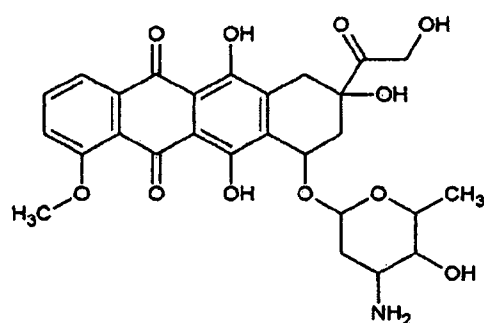
藉由流動式細胞量測術 (Beckman Coulter FC500) 分析封裝有 *BacLight™ Green* 之微細胞。用抗-LPS 亞萊克薩 (alexa) 螢光 647 (AF647) 抗體標記空的微細胞及封裝 *BacLight™ Green* 之微細胞。首先，使用 FL4 通道分析微細胞以偵測抗-LPS AF647 染色之微細胞。在使用 FL4 螢光相對於向前散射之點陣圖中目測微細胞群體，且對該群體進行閘控以僅選擇抗-LPS AF647 染色之微細胞，不考慮任何碎片。

在 FL1 通道上分析閘控群體以偵測 *BacLight™ Green* 螢光。直方圖 (圖 8) 表示當相比於空的微細胞 (對數標度) 時，作為完全相異群體之 FL1 螢光具有較大偏移之封裝 *BacLight™ Green* 之微細胞。此指示，歸因於有效 *BacLight™ Green* 併入，大於 95% 之微細胞為螢光的，且其表示，具有比空的微細胞所呈現大許多的 FL1 螢光之單一螢光群體。

實例 6. 裝載小紅莓

此實例表明，可將兩親性、自發螢光細胞毒素有效地封裝至細菌

衍生之囊泡之細胞質中。以下展示細胞毒素小紅莓之蒽環結構。小紅莓用於癌症化學療法中，其藉由化學半合成衍生自鏈黴菌屬細菌且為市售的。



依照大規模方法(在小規模上裝載加上大規模中之多個洗步驟，無離心，利用交叉流過濾)，含微細胞之PBS緩衝液裝載有小紅莓，且經由螢光顯微法(激發480 nm，發射580 nm；紅色螢光)目測裝載之微細胞。成像結果(圖9)揭示，所有微細胞發出亮紅色螢光，其中相比於封裝小紅莓之微細胞，背景呈現黑色。

藉由自微細胞提取藥物(如所描述)，繼而HPLC分析來測定封裝在微細胞內之小紅莓之量。HPLC方法特徵包括(i)移動相：0.1 M甲酸銨(pH 3.0)：MilliQ H₂O：乙腈。梯度0.2分鐘28:72:0至28:42:30，等度5分鐘，變至28:72:0，以1.25毫升/分鐘之流動速率等度15分鐘。(ii)固定相：Waters XBridge Phenyl，3.5 μm × 4.6 mm × 150 mm加上C18濾筒。(iii)管柱溫度：40°C。(iv)偵測：螢光-激發480 nm，發射560 nm。(v)注射體積：10 μl。(vi) HPLC系統：Shimadzu 10AVP系統，包含自動進樣器、溶劑脫氣器、四元泵、管柱加熱器及螢光偵測器，利用Class-VP版本7.2.1軟件(Shimadzu corporation, Kyoto, Japan)。

藉由與已知量之小紅莓樣品之線性標準曲線進行比較，利用HPLC測定用此等藥物裝載條件獲得之小紅莓之含量為大致每1 × 10⁹個微細胞770 ng (圖10)。此等於裝載至各微細胞中之約800,000個小紅莓分子。

實例7.裝載螢光核酸染劑

SYTO® 9為綠色螢光之核酸結合細菌染劑(激發約485/6 nm，發射約498/501 nm)。對於此實例，其獲自Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), Molecular Probes®品牌。

將SYTO® 9溶液添加至含微細胞之PBS緩衝液中達到20 µM之最終濃度。依照小規模方案，培育微細胞30分鐘且如先前所描述進行三次重複洗步驟。

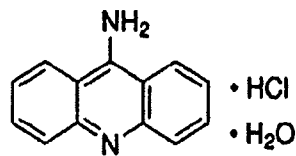
使用如上文所描述之螢光顯微鏡目測封裝SYTO® 9 Green之微細胞，其中採用適當的過濾器以准許目測SYTO® 9螢光。螢光成像(圖11)揭示，SYTO® 9已在極少至無外部染劑之情況下併入微細胞中。

藉由流動式細胞量測術(Beckman Coulter FC500)分析封裝有SYTO 9®之微細胞。用抗-LPS亞萊克薩螢光647 (AF647)抗體標記空的微細胞及SYTO® 9染色微細胞。首先，使用FL4通道分析微細胞以偵測抗-LPS AF647染色之微細胞。在使用FL4螢光相對於向前散射之點陣圖中目測微細胞群體，且對該群體進行閘控以僅選擇抗-LPS AF647染色之微細胞，不考慮任何碎片。隨後在FL1通道上分析閘控群體以偵測SYTO 9螢光。

由此獲得之直方圖(圖12)表示當相比於空的微細胞(對數標度)時，作為相異群體之FL1螢光偏移之SYTO 9染色微細胞。此指示，歸因於SYTO 9併入，微細胞為螢光的，且其表示，具有比空的微細胞所展示大許多的FL1螢光之螢光群體。

實例8.裝載9-胺基吡啶化合物

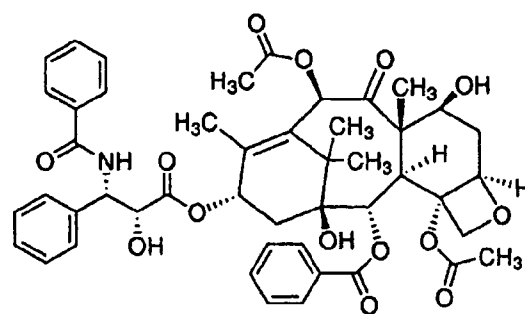
此實例表明作為鹽酸鹽水合物化合物之螢光染料9-胺基吡啶可封裝至細菌衍生之完整囊泡之細胞質中。化合物9-胺基吡啶鹽酸鹽水合物(9-AAHH)可獲自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)且具有下文所展示之結構。



經由小規模方案製備裝載有9-AAH (培育溶液：500 $\mu\text{g/ml}$)之含微細胞之PBS (2.5×10^{10})且進行螢光顯微目測(激發400 nm，發射420 nm；藍色螢光)。螢光成像結果(圖13)指示9-胺基吡啶已傳遞至微細胞細胞質中且保留在那裏，儘管在整個洗步驟中濃度梯度反轉。

實例9.太平洋紫杉醇之低效裝載

此實例表明，將疏水性、非螢光細胞毒性藥物太平洋紫杉醇(參見以下結構)裝載至細菌衍生之完整囊泡之細胞質中之效率低於太平洋紫杉醇之螢光衍生物之效率。



太平洋紫杉醇

根據小規模方案製備含微細胞之PBS緩衝液。因此，將空的微細胞(游離內毒素水準 $\leq$ 每 10^9 個微細胞約2 EU)添加至微量離心管中且離心(16,000 g，10分鐘)。丟棄上清液且使微細胞集結粒徹底再懸浮於0.9 ml PBS緩衝液中，該緩衝液經調節至pH 3 (必需較低pH以使高疏水性太平洋紫杉醇保持溶解狀態持續至少30分鐘)。隨後向微細胞懸浮液中添加100 μl 之6 mg/ml太平洋紫杉醇(於1:1十六醇聚氧乙烯醚EL:EtOH中)，得到600 $\mu\text{g/ml}$ 之外部太平洋紫杉醇濃度。微細胞在37°C下旋轉培育隔夜。藉由離心洗滌來洗滌過量太平洋紫杉醇溶液及非特異性連接至微細胞表面之分子。亦即，離心(16,000 g，10分鐘)培育後微細胞且

丟棄太平洋紫杉醇裝載上清液。藉由使集結粒徹底地再懸浮於1 ml PBS (pH 7.4)中，離心微細胞(16,000 g，10分鐘)且丟棄上清液洗液來洗滌裝載太平洋紫杉醇之微細胞。重複洗步驟三次。最後，使裝載太平洋紫杉醇之微細胞再懸浮於PBS中(pH 7.4)。

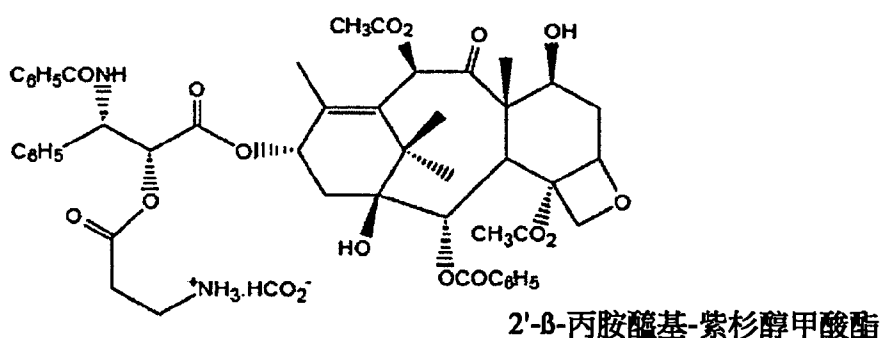
使用HPLC分析如上所述測定封裝在微細胞內之太平洋紫杉醇之量。針對太平洋紫杉醇定量研發出之HPLC方法具有包括以下之特徵：

- (i)移動相：乙腈及MilliQ dH₂O，等度0.24分鐘37:63，自37:63至60:40持續5分鐘之梯度溶離，隨後歷經1分鐘移動相返回至初始溶劑組成37:63且維持在此水準下直至以2毫升/分鐘之流動速率結束(操作時間8分鐘)；
- (ii)固定相：Metalchem 3u Taxsil，100 mm × 4.6 mm加上C18濾筒；
- (iii)管柱溫度：40°C；
- (iv)偵測：SPD-M10Avp二極體陣列偵測器-228 nm；
- (v)注射體積：50 µl；及
- (vi) HPLC系統：Shimadzu SCL-10AVP系統，包含SIL-10AVP自動注射器、LC-10Advp泵、DGU-14A脫氣器、CTO-10Avp管柱烘箱、SPD-M10Avp二極體陣列偵測器，利用Class-VP版本7.2.1軟件(Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)。

藉由與已知量之太平洋紫杉醇樣品之線性標準曲線進行比較，藉由HPLC定量用此等藥物裝載條件獲得之太平洋紫杉醇含量為每 1×10^9 個微細胞3 ng (圖14)。此等於每個微細胞囊封之2115個太平洋紫杉醇分子，或大致分別比FCP及FLUTAX-1少110-130倍。採用額外途徑以試圖使微細胞裝載有更大量之太平洋紫杉醇。其包括改變溶劑、緩衝劑、pH；使用環糊精/太平洋紫杉醇，包括複合物；使用增溶物，諸如水楊酸鈉及NN-二乙基菸鹼鹽胺；及使用膜不穩定方法、化學(例如EDTA、CaCl₂處理)及物理(諸如音波穿孔)方法。所有測試途徑產生類似結果，其中太平洋紫杉醇裝載效率在每 1×10^9 個微細胞0-10 ng範圍內。

實例10.裝載水可溶太平洋紫杉醇類似物

此實例表明2'-β-丙胺鹽基紫杉醇甲酸酯或「TF.Pac」(參見以下結構)(太平洋紫杉醇之水可溶類似物)之裝載效率僅略微高於太平洋紫杉醇自身之裝載效率。



歸因於結合至太平洋紫杉醇之C2'-β-丙胺鹽基甲酸酯，TF.Pac具有改良的可溶性。非市售，TF.Pac為合成的以闡明是否其僅為抑制太平洋紫杉醇至細菌衍生之完整囊泡中之有效裝載的水溶解度不佳。太平洋紫杉醇可溶於水中直至0.3 μg/ml，同時TF.Pac之可溶性為至少2 mg/ml。

依照小規模方案使含微細胞之PBS緩衝液裝載有TF.Pac (裝載溶液：每ml蒸餾水0.1%乙酸1 mg化合物)。

因此藉由自微細胞提取藥物，繼而HPLC分析來測定封裝在微細胞內之TF.Pac之量。如上文針對封裝有小紅莓之微細胞所描述進行微細胞提取。所使用之HPLC方法與針對太平洋紫杉醇定量研發出之方法一致。

藉由HPLC定量用此等藥物裝載條件獲得之平均TF.Pac含量為每 1×10^9 個微細胞78 ng (圖15)，其等於每個微細胞封裝之約50,000個TF.Pac分子。因此裝載效率略微大於太平洋紫杉醇，但比FLUTAX-1小約5.4倍。採用諸多緩衝劑以試圖使微細胞裝載有更大量TF.Pac；然而，利用上文所描述之方法獲得之效率未提高。因此，僅提高化合物之水溶解度無法增強至細菌衍生之完整囊泡中之裝載。

實例11.小紅莓螢光淬滅劑葉酸影響小紅莓至完整微細胞中之裝載

此實例測定螢光化合物在淬滅其螢光時至細菌衍生之完整囊泡中之裝載效率是否降低。在此情況下，化合物為自發螢光藥物小紅莓(Dox)，且淬滅劑為葉酸(FA)。參見Husseini, *Adv. Sci. Lett.* 7: 726 (2012) (FA淬滅Dox螢光)。

材料及方法

將含小紅莓之PBS (100 $\mu\text{g/ml}$)與各種濃度(亦即，0 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 及400 $\mu\text{g/ml}$)之FA混合。在室溫下培育溶液隔夜，且隨後經由0.1 μm 過濾器過濾以使溶液滅菌，且移除任何顆粒。

在第二天，用螢光盤讀取器量測各溶液之等分試樣之螢光(激發波長：485 nm，發射波長：590 nm及620 nm)。同時，用PBS緩衝液洗滌微細胞且隨後裝載有各Dox + FA溶液中之一者或另一者，該等溶液先前以 2.5×10^{10} 個微細胞/毫升之密度製備，體積在約1 ml與2 ml之間。在30分鐘、1小時、2小時、4小時、6小時及隔夜之時刻自處理組中之每一者取出樣品(500 μl)。

對於每一時間點，對微細胞進行以下小規模方案：

1. 離心微細胞-16,000 g持續7分鐘。
2. 丟棄上清液(SN)且使集結粒再懸浮於1 ml PBS緩衝液(pH 7.4)中。
3. 離心微細胞-16,000 g持續7分鐘。
4. 丟棄SN且使集結粒再懸浮於0.5 ml PBS緩衝液中。
5. 傳送微細胞懸浮液通過0.8 μm 過濾器。
6. 用另外0.5 ml PBS洗滌過濾器且與微細胞組合。
7. 離心微細胞-16,000 g持續7分鐘。
8. 丟棄SN且使集結粒再懸浮於1 ml PBS緩衝液中。
9. 離心微細胞-16,000 g持續7分鐘。
10. 丟棄SN且使集結粒再懸浮於1 ml PBS緩衝液中。

11. 離心微細胞-16,000 g持續7分鐘。

12. 丟棄SN且最後使集結粒再懸浮於350 μ l PBS緩衝液中。

a. 對於微細胞定量，使用針對奈米粒子示蹤分析 (Malvern Instruments, UK)之Nanosight技術等分20 μ l微細胞。

b. 對於提取及HPLC分析，使40 μ l微細胞成球粒(16,000 g，15分鐘，丟棄SN，且集結粒儲存在-20℃下)。

裝載小紅莓之微細胞作為離心集結粒呈現粉紅色。基於經由眼部測試評估之相對顏色強度，顯而易見，在時間點中之每一者完成洗步驟後，在400 μ g/ml葉酸存在下裝載之微細胞含有明顯少於在葉酸不存在下裝載之彼等微細胞之小紅莓。相比於0 μ g/ml葉酸，在50 μ g/ml葉酸樣品中同樣觀測到略微較少的裝載量。

表2.小紅莓裝載溶液之螢光讀數結果

μ g/ml FA	螢光%	
	Em λ 590 nm	Em λ 620 nm
0	100%	100%
50	93%	94%
400	61%	59%

觀測到，50 μ g/ml及400 μ g/ml葉酸在不同程度上淬滅100 μ g/ml Dox溶液之螢光(圖16)。當在485 nm處激發溶液且在590 nm或620 nm處量測發射時，此保持為真。使用400 μ g/ml葉酸，小紅莓淬滅更顯而易見，其中小紅莓螢光發射信號損失約40%，而使用較低濃度之50 μ g/ml葉酸小紅莓發射螢光僅損失6%-7%。

藉由比色定量微細胞_{Dox}樣品

除使用HPLC測定微細胞樣品中之每一者之Dox含量以外，採用比色分析量測小紅莓含量，因為此量測與Dox螢光無關。

小紅莓標準曲線

產生游離小紅莓之標準曲線。經由生物光度計在490 nm處一式兩份量測各種濃度之含小紅莓之PBS之吸光率。

結果

對平均資料進行線性回歸，其產生公式 $y = 0.019x$ ，其中 y 為吸光率(Abs_{490nm})且 x 為小紅莓之 $\mu g/ml$ (圖17)。因此，對於所量測之微細胞 D_{ox} 樣品，

$$\text{小紅莓 } \mu g/ml = Abs_{490nm} / 0.019$$

微細胞 D_{ox} 樣品之比色

根據上表，在比色管中用PBS緩衝液(pH 7.4)將來自各微細胞 D_{ox} 樣品之微細胞補足至200 μl 。亦在比色管中在200 μl PBS (pH 7.4)中補足含有空的微細胞之『空白』樣品。在490 nm處量測空白微細胞樣品及所有微細胞 D_{ox} 樣品之吸光率。

表3. 微細胞 D_{ox} 樣品之比色分析結果

樣品		Abs490	減去空白	Dox $\mu g/ml$	每 10^9 個EDV之Dox ng
空的EDV (空白)		0.472	n/a	n/a	n/a
30分鐘	0FA	0.596	0.124	6.5	435
	50FA	0.533	0.061	3.2	214
	400FA	0.476	0.004	0.2	14
1小時	0FA	0.525	0.053	2.8	186
	50FA	0.529	0.057	3.0	200
	400FA	0.447	-0.025	-1.3	-88
2小時	0FA	0.576	0.104	5.5	365
	50FA	0.649	0.177	9.3	621
	400FA	0.588	0.116	6.1	407
4小時	0FA	0.641	0.169	8.9	593
	50FA	0.592	0.12	6.3	421
	400FA	0.5	0.028	1.5	98
6小時	0FA	0.554	0.082	4.3	288
	50FA	0.548	0.076	4.0	267
	400FA	0.499	0.027	1.4	95
隔夜	0FA	0.735	0.263	13.8	923
	50FA	0.68	0.208	10.9	730
	400FA	0.567	0.095	5.0	333

結果呈現於以上表3中。大多數樣品過於接近0.472之空白吸光率

(亦即，其在0.1之生物光度計誤差內)而不為適用的。對於大部分樣品而言，此比色分析之靈敏度過低，且因此大多數時間點之量測值波動。參見圖18。

HPLC結果

如上述MacDiarmid等人(2007)所描述，微細胞集結粒經處理以便藉由HPLC進行分析。使用UV_{250nm}偵測及相對螢光(RF)偵測兩者對各樣品中之Dox進行定量。

來自UV_{250nm}讀數之HPLC定量呈現於圖19中，且來自相對螢光(RF)讀數之HPLC定量展示於圖20中。觀測到存在於裝載溶液中之葉酸之提高的量不利地影響小紅莓至微細胞中之裝載。葉酸之外部濃度愈高，裝載至完整微細胞中之小紅莓之濃度愈低。

實例12.裝載米托蒽醌

此實例說明米托蒽醌二鹽酸鹽(MTX) (固有螢光細胞毒性藥物，亦稱為「米托蒽醌(Mitozantrone)」)至細菌衍生之完整囊泡中之增強裝載。蒽醌抗贅生劑MTX充當II型拓撲異構酶抑制劑，且已用於治療癌症，諸如轉移性乳癌、急性骨髓白血病及非霍奇金氏淋巴瘤。

米托蒽醌購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。如上文所描述製備空的完整微細胞($3.2 \times 10^{10}/\text{ml}$)。Centricon®管柱(0.65 μm)獲自Millipore (Billerica, MA)，無菌PBS (pH 7.4)獲自Sigma-Aldrich，且可注射鹽水獲自Livingstone Int'l (Rosebery, NSW)。

在鹽水中製備2 mg/ml之MTX儲備溶液且經由0.1 μm 過濾器過濾。(米托蒽醌可溶於水達到大致5-7.5 mg/ml。)將所得溶液儲存在4°C下且避光。

小規模方案經調適用於此實例中。因此，在單獨試管中以781 μl 等分試樣(2.5×10^{10} 最終)形式提供微細胞。在台式Eppendorf離心機上以13,200 rpm旋轉試管8分鐘。移除上清液；使集結粒再懸浮於1 ml PBS

緩衝液(pH 7.4)中，且隨後再次旋轉。使由此獲得之集結粒再懸浮於850 μ l PBS緩衝液中。

將一定體積(150 μ l) MTX (2 mg/ml儲備液)添加至各微細胞懸浮液中以得到300 μ g/ml (外部濃度)之最終裝載溶液。伴隨在旋轉器上混合，在37°C下培育樣品2小時、4小時或隔夜(約12小時)。

在培育後，以13,200 rpm旋轉微細胞8分鐘且丟棄上清液。用1 ml PBS (pH 7.4)洗滌集結粒且如上所述進行離心。丟棄上清液。

使集結粒再懸浮於0.5 ml PBS (pH 7.4)中且在室溫下旋轉培育15分鐘。在培育之後，將各樣品施加至0.65 μ m Centricon®管柱上，且以200 g旋轉1分鐘或直至全部樣品流過。將流過物收集至新試管中。將新一批次0.5 ml PBS (pH 7.4)施加至同一過濾器中，且旋轉，且將流過物添加至初始0.5 ml樣品中。

以13,200 rpm將樣品離心8分鐘，且丟棄上清液。隨後使各樣品再懸浮於350 μ l PBS (pH 7.4)中。

使用NanoSight Ltd (Amesbury, Wiltshire, UK)之產品LM20奈米粒子分析系統，利用含10 μ l微細胞之990 μ l PBS (pH 7.4)進行微細胞樣品計數。結果如下：

2小時： $6.24 \times 10^{10}/\text{ml}$

4小時： $5.77 \times 10^{10}/\text{ml}$

隔夜： $5.93 \times 10^{10}/\text{ml}$

以13,200 rpm旋轉各樣品批料(20 μ l)8分鐘，且移除上清液，繼而進行針對微細胞樣品中之MTX含量之HPLC分析。

經由HPLC，各樣品中裝載至微細胞中之MTX之量量測為251 nm處之峰面積(注射體積：50 μ l)。對於一式兩份樣品對(1、2：2小時裝載；3、4：4小時裝載；及5、6：隔夜裝載)，結果展示如下，包括每個樣品之MTX含量及每 10^9 個微細胞之MTX之量。

表4			
樣品	面積(254 nm)	每個樣品MTX 含量(μg)	每 10^9 個微細胞 MTX含量(μg)
1	59644	0.563	0.452
2	60080	0.568	0.455
3	58718	0.555	0.481
4	59241	0.560	0.485
5	74435	0.703	0.593
6	66313	0.626	0.528

對於樣品5及樣品6，在裝載隔夜之情況下， 10^9 個微細胞平均裝載有約0.56 μg MTX。此意謂各微細胞含有約759,000個MTX分子，基於藥物之約444之分子量，根據*The Merck Index Online* (2014)。

相比於同MTX一樣為固有螢光的小紅莓之濃度，微細胞內部MTX濃度出人意料地較高。參見 Consoli 等人, *Leukemia* 11: 2066-74 (1997)；及 Bell, *Biochim Biophys Acta* 949: 132-37 (1988) (MTX之最大激發及發射分別為約610 nm及685 nm)。亦參見 Smith 等人, *Cancer Res.* 52: 4000-08 (1992) (較低紅色螢光為514 nm)。因此，威信，略微小於小紅莓之MTX之較高裝載效率隨其螢光而變化。

實例13.在離子存在下裝載螢光化合物

此實例展示，離子之存在使初始實例所證明之螢光介導之囊泡裝載增強更顯著。因此，認為囊泡培養基中之來自鹽解離之離子與細菌衍生之囊泡(此處為微細胞)之完整膜中之通道相互作用以強化對螢光化合物移動通過跨膜通道、化合物與通道中或沿通道排列之分子之間的能量轉移之上文所論述之作用。

與小規模方案一致，用1 ml PBS (pH 7.4)洗滌微細胞(每試管 2.5×10^{10})一次，且離心(16,000 g，7分鐘)且丟棄上清液。在15%乙醇、85% PBS (pH 7.4)中，在具有或不具有200 mM KCl (Sigma-Aldrich)之情況下使經洗滌之微細胞裝載有100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FLUTAX-1 (Tocris Biosciences)。

在37°C下旋轉試管。自各處理移出一個試管以便在15分鐘、45分

鐘、2小時及5個小時中之每一者時洗滌。各處理洗滌三次以移除試劑且保留微細胞。

經由HPLC以上文所描述之方式量測FLUTAX-1水準。因此，將量測值(UV 228 nm)與已知FLUTAX-1量之標準曲線進行比較且外推得到 1×10^9 個微細胞內之FLUTAX-1量。

如圖21所描繪，結果展示，在裝載溶液中包括200 mM KCl顯著增強FLUTAX-1至完整微細胞中之裝載。亦即，較高鹽濃度與超過兩倍之裝載至微細胞中之螢光藥物之量相關。實際上，在短至微細胞/藥物共同培育15分鐘之後，效果顯而易見。

為闡明其他離子鹽是否具有此效果，在等莫耳量之不同鹽存在下測試FLUTAX-1至微細胞中之裝載；且如前所述藉由HPLC量測裝載量。因此，用1 ml PBS (pH 7.4)洗滌微細胞(每試管 2.5×10^{10})一次，且(16,000 g，7分鐘)且丟棄上清液。在15%乙醇、85% PBS (pH 7.4)中，在具有或不具有200 mM KCl、NaCl或KBr之情況下使經洗滌之微細胞裝載有100 μ g/ml FLUTAX-1。在37°C下旋轉試管。自各條件移出一個試管以便在15分鐘及1小時中之每一者時洗滌。各處理如上文所描述洗滌三次。

如上文所描述裂解且提取微細胞，且在HPLC條件下操作裂解物以便量測FLUTAX-1水準。將量測值(UV 228 nm)與已知FLUTAX-1量之曲線進行比較且外推獲得 1×10^9 個微細胞中之FLUTAX-1之量。

結果展示於圖21中。在200 mM下，所測試之鹽中之每一者顯著增強螢光藥物至微細胞中之裝載，其中在15分鐘及1小時時間點時改良顯而易見。圖22中之條形圖表示來自15分鐘時間點之結合資料。在各實驗(例如無鹽相對於200 mM KCl)中所進行之相同處理提供高度一致的一式兩份資料。

鹽KCl、NaCl及KBr中之每一者提高螢光藥物至細菌衍生之完整囊

泡中之裝載效率，此處在15分鐘時提高了大致2倍。裝載實際上在培育約4小時內完成。此等觀測結果強調，在將陽離子及/或負離子添加至外部環境中之情況下藉由共同培育囊泡及螢光化合物來增強螢光化合物至完整囊泡中之裝載。相比之下，離子對另外類似但非螢光化合物之裝載無此類影響。

發現此離子效果受共同培育溫度影響。舉例而言，當在HEPES鹽水緩衝液(pH 6.8)中製備細菌衍生之完整微細胞且經由基本上如上文所描述，分別在室溫(約22℃)及約37℃下與小紅莓一起共同培育裝載藥物時，基於HPLC之不同時間點囊泡內小紅莓水準之定量之結果如下：

表5

每10 ⁹ 個EDV Dox ng		
時間點(小時)	37℃	RT
0	0	0
2	1910	684
4	2281	1009
6	1846	1215
8	1886	846
24	2957	1466

此等資料之圖形表示(圖23)展示，當在約37℃下進行共同培育時裝載至微細胞中之螢光化合物之量比在室溫下大超過100%。(膜降解導致比約37℃高許多之不可行的任何共同培育溫度。)

實例14.本發明大規模方法優於習知小規模方案之優勢

此實例將上文相對於MacDiarmid等人(2007)所論述之小規模方案與本發明之大規模方法進行比較。如該實例所表明，本發明方法為含有細菌衍生之完整囊泡之組合物提供出人意料地較佳稠度及純度。此係因為本發明之大規模方法不僅明顯降低內毒素水準，且亦減少截留在囊泡外部之有效負載化合物。

小規模方案

基本上根據MacDiarmid等人(2007)之方法製備完整微細胞且裝載有小紅莓，不同之處在於微細胞不攜有任何靶向雙特異性配位體，且因此將不會被靶宿主細胞攝取。在37°C下與藥物(約1 ml/mg)一起旋轉培育隔夜後，裝載之微細胞經五次洗步驟，其需要離心(13,200 rpm，10分鐘)及所得集結粒於1 ml BSG緩衝液(pH 7.4)中之再懸浮。

隨後在補充有10%胎牛血清、2 mM L-麩醯胺酸及100 U/ml青黴素G及鏈黴素兩者之Gibco RPMI-1640組織培養基(以每孔0.5 ml形式)中將經洗滌之裝載小紅莓之微細胞(1×10^8)與雌激素受體陰性MDA-MB-468人類乳癌細胞(每孔 10^4 個細胞)一起培育。

隨後經由共聚焦顯微鏡每24小時監測細胞。在兩天內，癌細胞在其核內呈現紅色螢光，表明小紅莓進入，但裝載之微細胞未被細胞靶向攝取。因此，小規模方案導致額外小紅莓在微細胞表面上之截留，其瀝濾至組織培養基中且進入癌細胞中。

大規模方法

獨立於封裝小紅莓之微細胞製備五個批料且用結合EGFR之雙特異性配位體靶向(參見MacDiarmid等人(2007)第443頁第二段「實驗程序(Experimental Procedures)」)。根據大規模方法，裝載小紅莓且靶向EGFR之微細胞經五次PBS緩衝液連續洗滌，每次洗滌約20公升，經由較大交叉流過濾器。

對於微細胞之各批料，如上文所描述測定小紅莓濃度，且經由標準LAL分析量測游離內毒素之水準。參見例如Dawson, *LAL Update*, 第22卷，第3期 (2005年10月)。結果列表於下方。

表6		
EGFR ⁺ 微細胞 ^{Dox} 批次	Dox濃度(每 1×10^9 個微細胞)	游離內毒素水準(每 1×10^9 個微細胞EU)
1	612 ng	2.25 EU
2	688 ng	2.05 EU
3	764 ng	2.7 EU
4	639 ng	5.55 EU

5	659 ng	2.4 EU
平均值	672 ng	2.99 EU
標準差	58 ng	1.45 EU

如此等結果所展示，大規模方法提供每 1×10^9 個微細胞約 672 ng $\pm$ 58 ng 之裝載微細胞之平均小紅莓濃度。A 用大規模方法實現之實質上改良之純度藉由每 1×10^9 個微細胞 2.99 EU $\pm$ 1.45 EU 之平均游離內毒素水準來證明。

雖然已說明且描述某些實施例，但應理解，可根據一般技術者在不脫離如以下申請專利範圍中所定義之其較廣態樣之技術之情況下在其中進行改變及修改。

上文所說明性地描述之實施例可在不存在未特定揭示之任何一或多個要素、一或多個限制之情況下適當地實踐。舉例而言，術語「包含」、「包括」、「含有」等應廣泛地且無限制地理解。另外，本文中所採用之術語及表述以說明且不受限制之方式使用，且在使用此等術語及表述時不欲排除所展示及所描述特徵之任何等效物或其部分，但應認識到可在所主張之技術之範疇內進行各種修改。另外，片語「主要由……組成」應理解為包括彼等特定列舉之要素及彼等並未顯著影響本發明之基本及新穎特徵之額外要素。片語「由……組成」不包括任何未規定之要素。

就在本說明書中所描述之特定實施例而言本發明並非限制性的。如熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離其精神及範疇之情況下進行許多修改及改變。除本文中所列舉之彼等者外，熟習此項技術者自前述描述將顯而易見在本發明之範疇內之功能上等效之方法及組合物。此類修改及改變意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇內。本發明僅受隨附申請專利範圍之項目以及此申請專利範圍所授權之等效物之

完整範疇限制。應理解，本發明不限於特定方法、試劑、化合物組合物或生物系統，其當然可改變。同樣應理解，本文所使用之術語僅出於描述特定實施例之目的且不意欲為限制性的。

另外，在根據Markush群組描述本發明之特徵及態樣時，熟習此項技術者應認識到，本發明亦從而根據Markush群組成員之任何個別成員或子群組進行描述。

熟習此項技術者應理解，出於任何及所有目的，尤其就提供書面說明而言，本文所揭示之所有範圍亦涵蓋其任何及所有可能的子範圍及子範圍組合。任何列出範圍可因足夠說明而容易地識別且能夠將同一範圍分解為至少相同的兩份、三份、四份、五份、十份等。作為非限制性實例，本文所論述之各範圍可容易地分解為下部三分之一、中間三分之一及上部三分之一等。熟習此項技術者亦應理解，所有語言，諸如「高達」、「至少」、「大於」、「小於」及其類似者均包括所列舉之數字且係指可隨後如上文所論述分解為子範圍之範圍。最終，熟習此項技術者將理解，範圍包括各個別成員。

本說明書中所提及之所有公開案、專利申請案、頒予專利及其他文獻均以引用的方式併入本文中，該引用程度就如同已特定地且個別地將各個公開案、專利申請案、頒予專利或其他文獻以全文引用的方式併入本文中一般。在以引用的方式併入之正文中所含之定義若與在本發明中之定義矛盾，則將其排除在外。

其他實施例闡述於以下申請專利範圍中。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種包含完整細菌衍生之微細胞(minicell)之組合物，其中：
 - (a) 該微細胞封入至少500,000個PNU-159682分子，及
 - (b) 該微細胞進一步包含雙特異性抗體，其包含(i)對微細胞表面結構具有特異性之第一臂及(ii)對表皮生長因子受體(EGFR)具有特異性之第二臂。
2. 如請求項1之組合物，其中該表皮生長因子受體(EGFR)係在腦瘤中。
3. 如請求項1或2之組合物，其中該微細胞封入至少約200 ng之PNU-159682。
4. 一種不藉由離心將PNU-159682裝載於多數微細胞中之方法，其包含
 - (a) 在緩衝液體中一體積的PNU-159682之培育溶液中培育該多數微細胞，其中該體積為約100 ml或100 ml以上數量級；及隨後
 - (b) 對該多數微細胞進行多個洗步驟，各包含用數量級為公升之一體積緩衝液體交叉流過濾該等微細胞，其中該等洗步驟中無一者採用離心該等微細胞。
5. 如請求項4之方法，其中使與該PNU-159682不同之二元離子化合物溶解於該培育溶液中以達到約200 mM或200 mM以上數量級之濃度。
6. 一種有效量之如請求項1至3中任一項之組合物之用途，其係用於製備治療有需要患者之癌症之藥劑。

圖式



圖

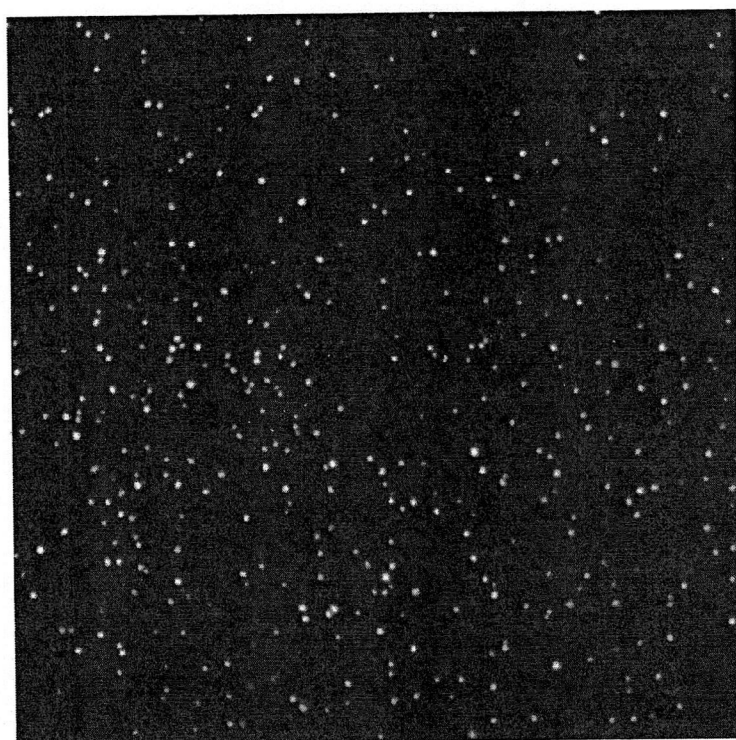


图2

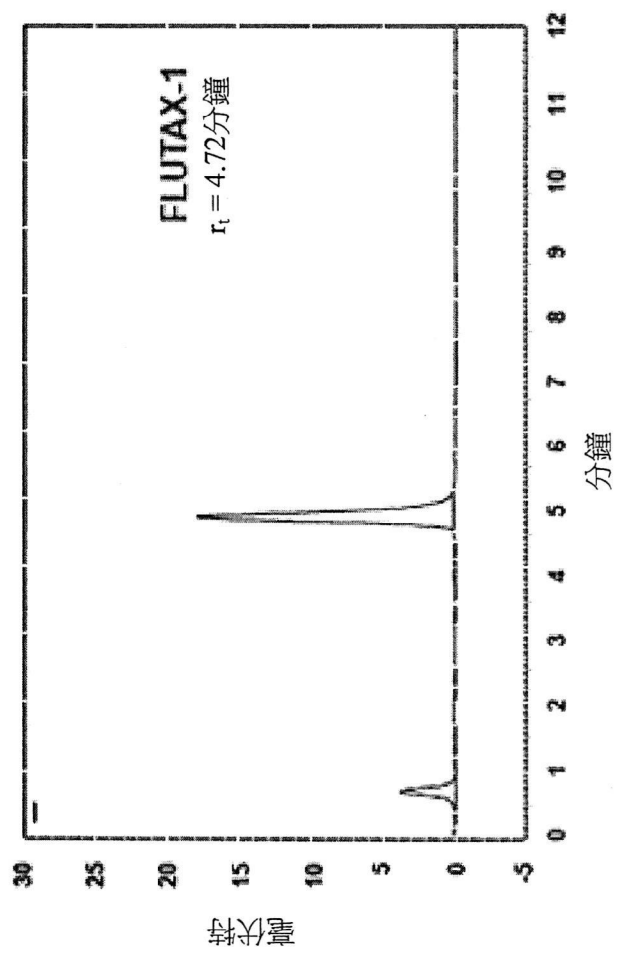
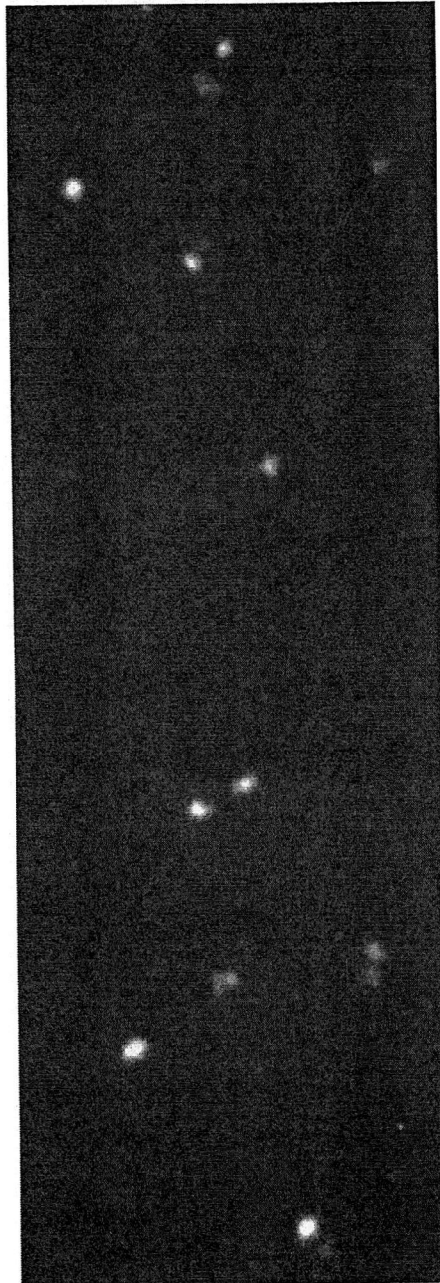


圖3



4
圖

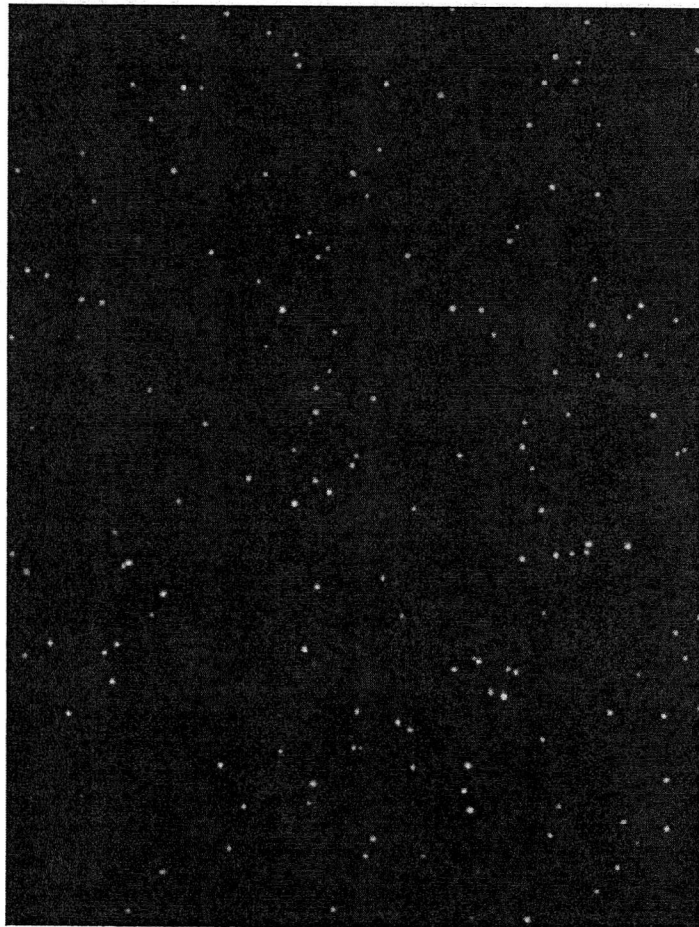


圖 5

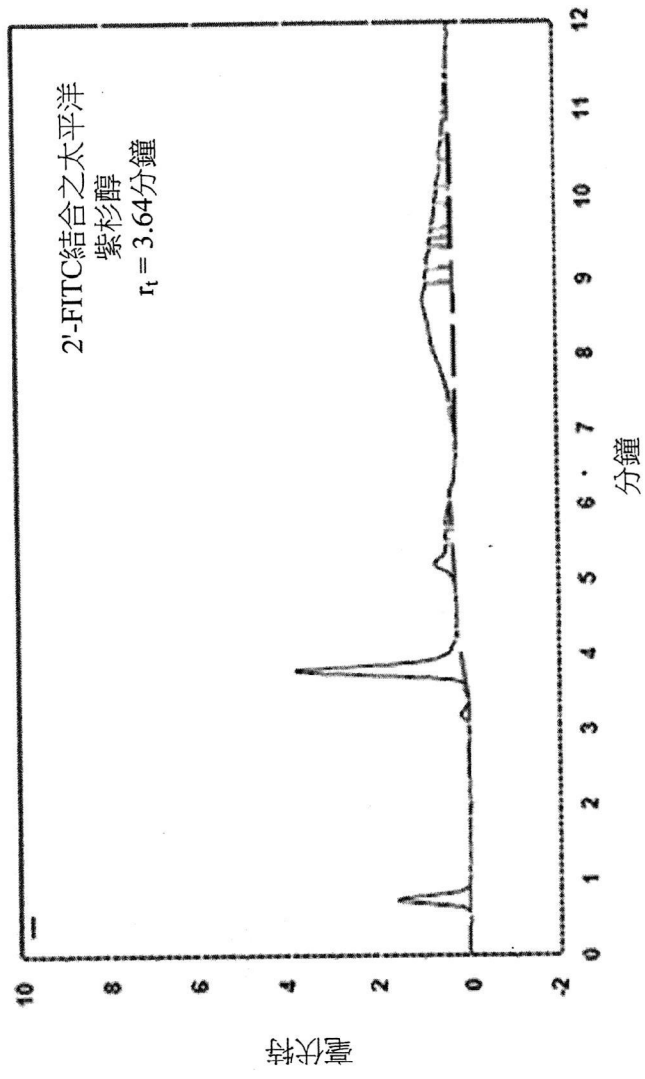
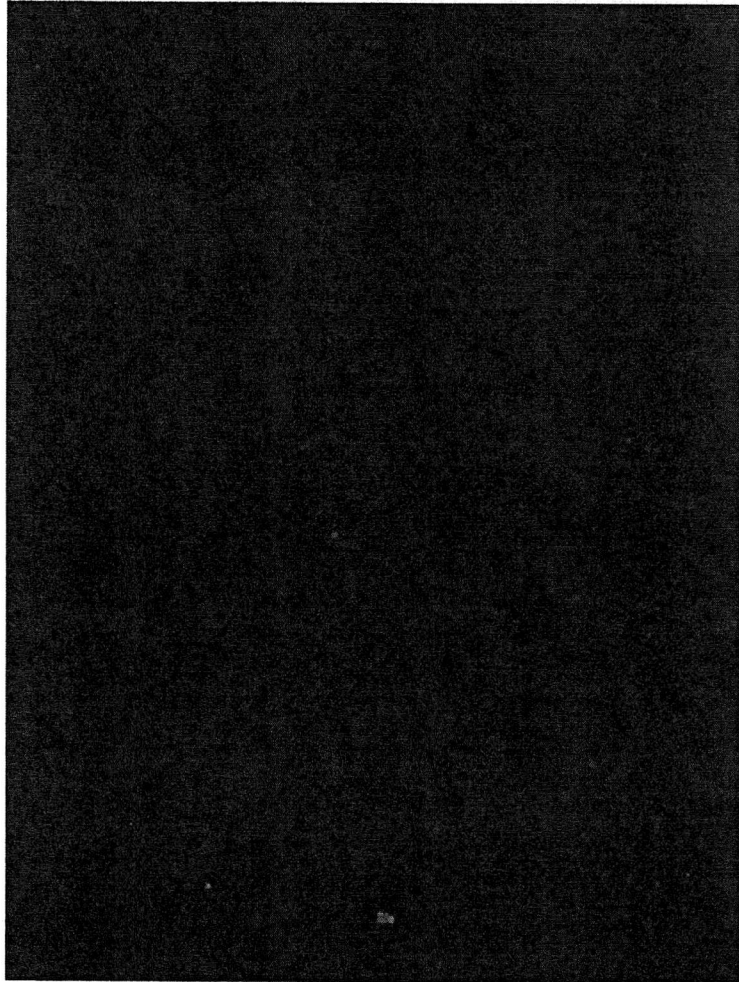


圖6



7
回

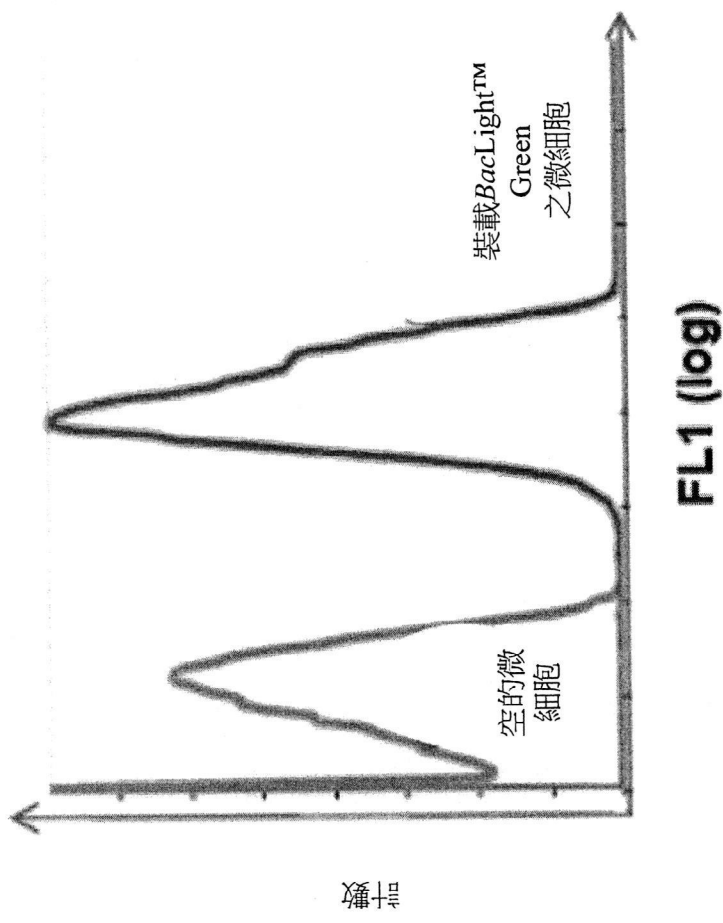
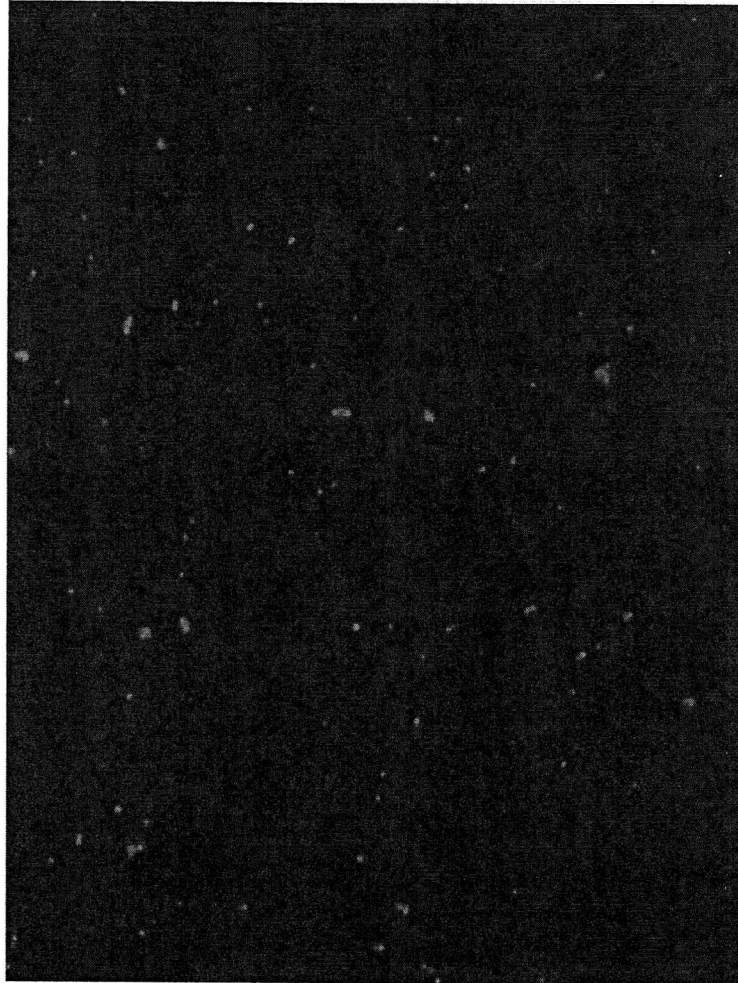


圖8



6

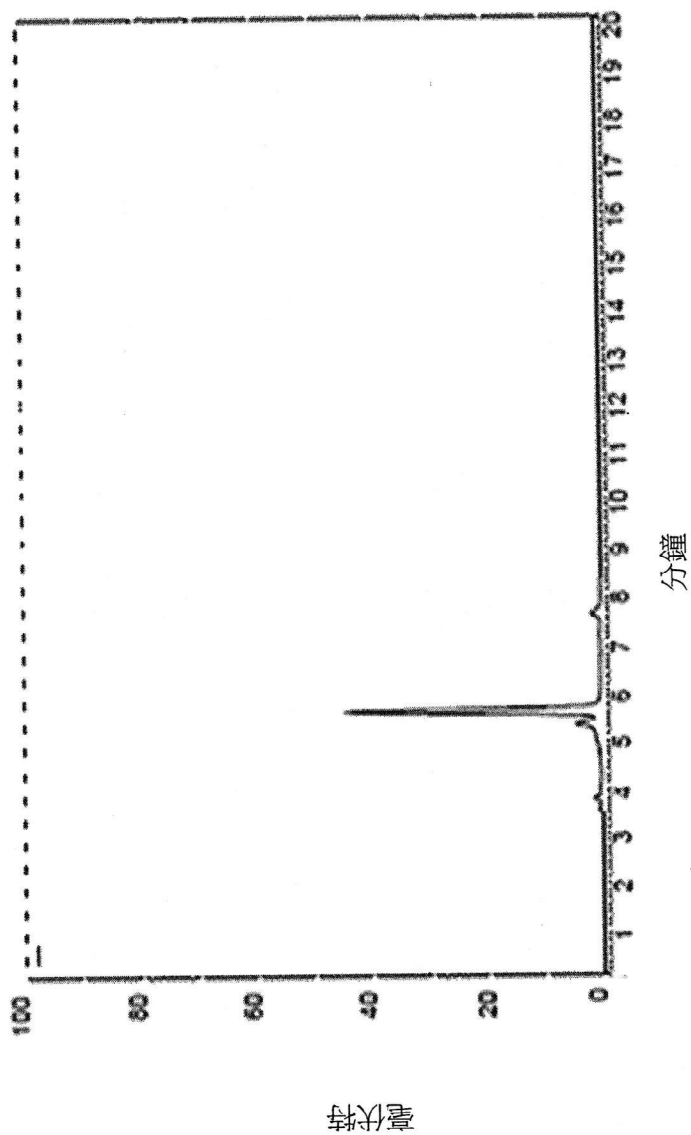
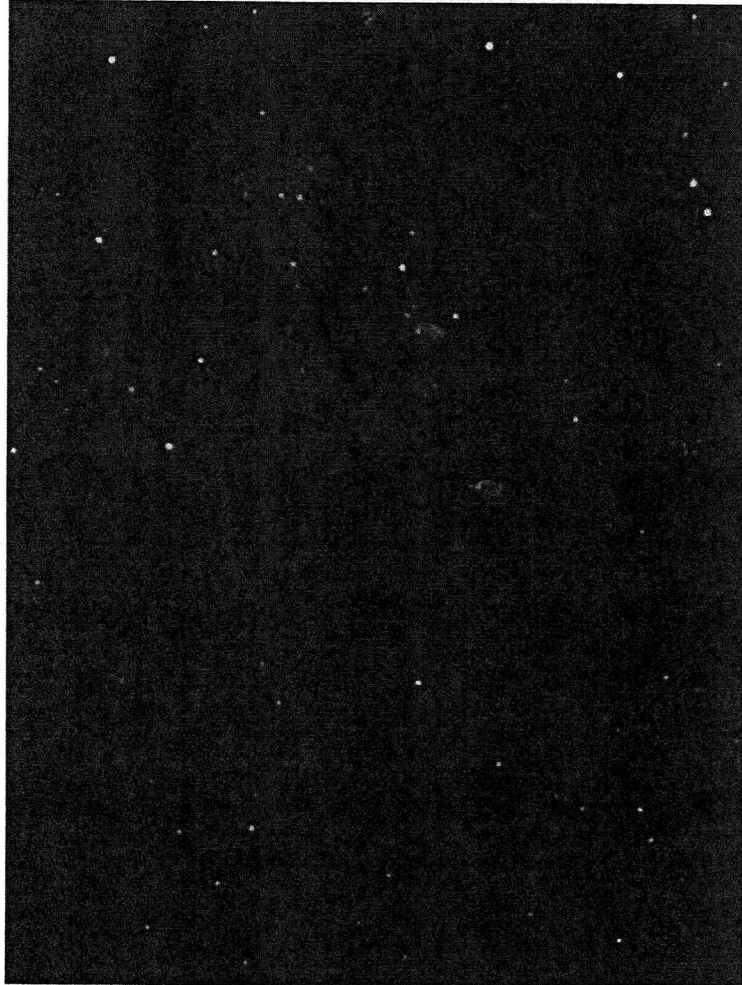


圖10



11
回

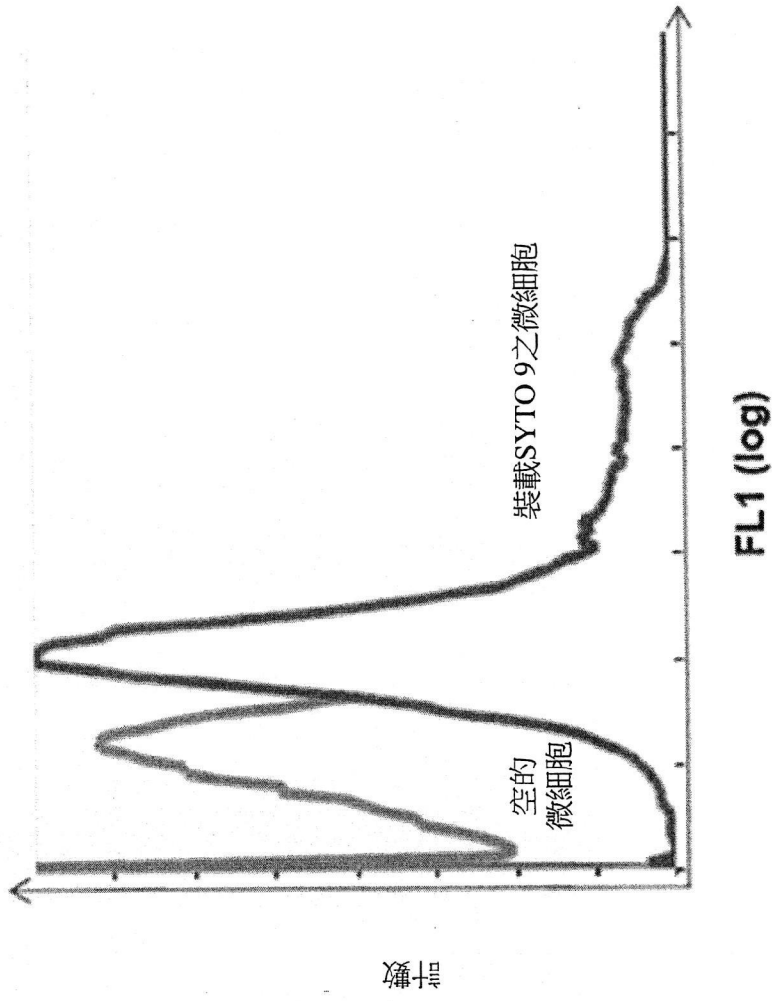


圖12

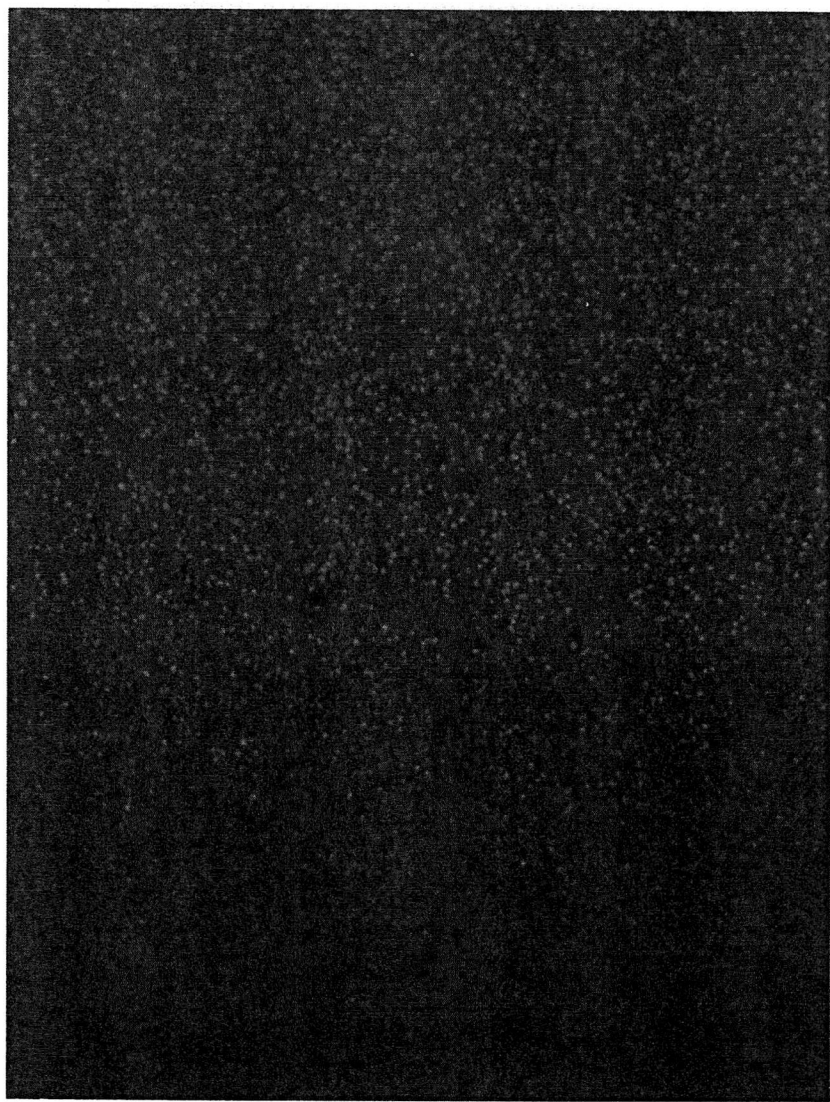


圖13

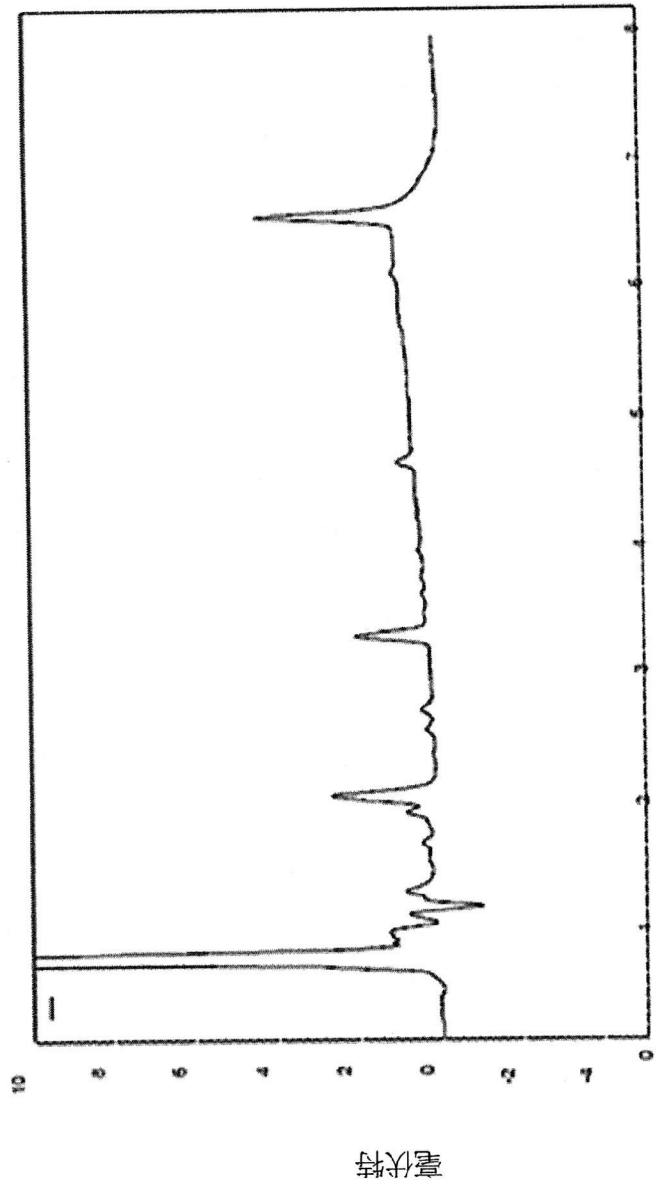


圖14

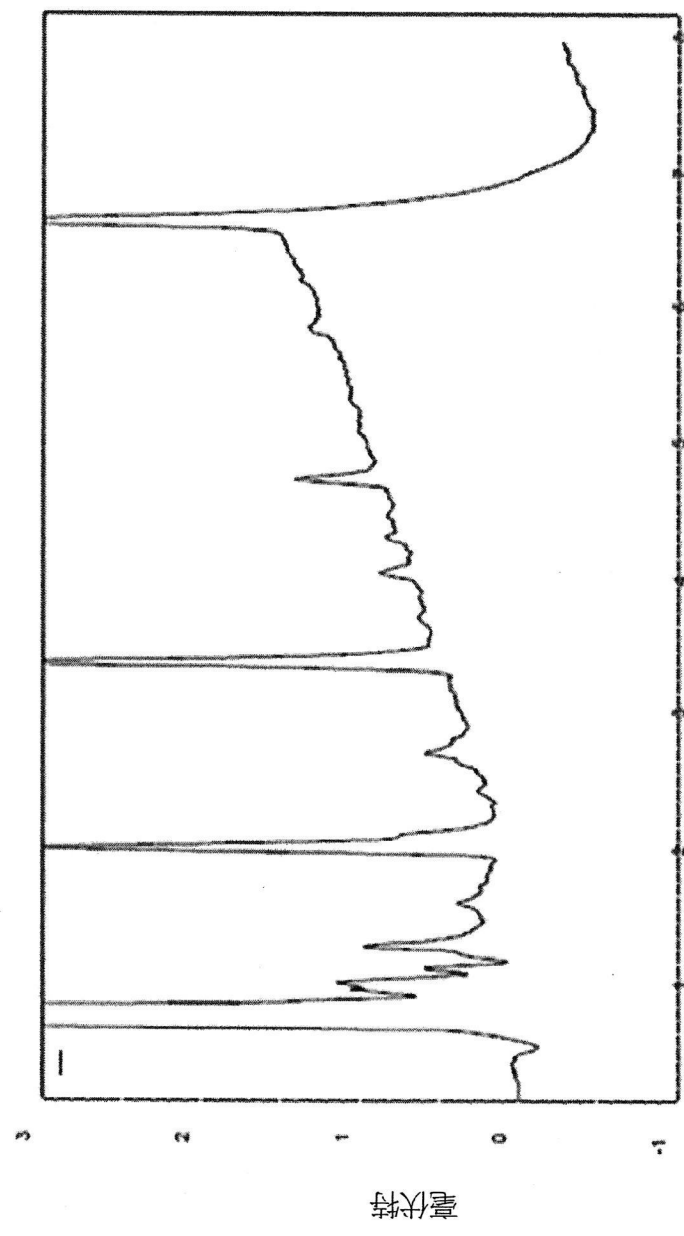


圖15
分鐘

藉由葉酸淬滅小紅莓螢光

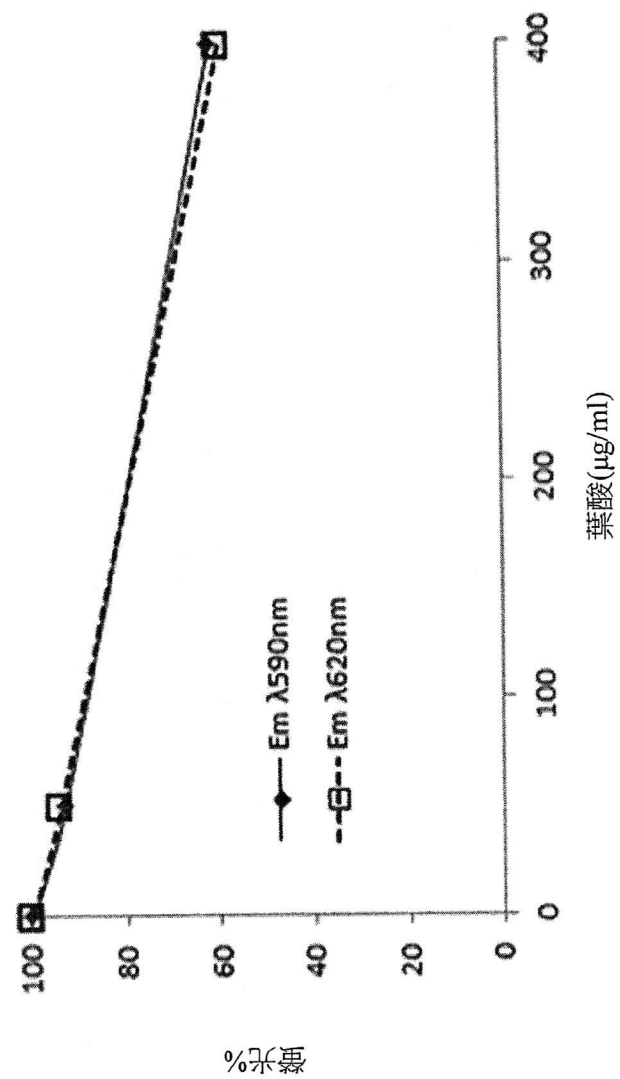


圖16

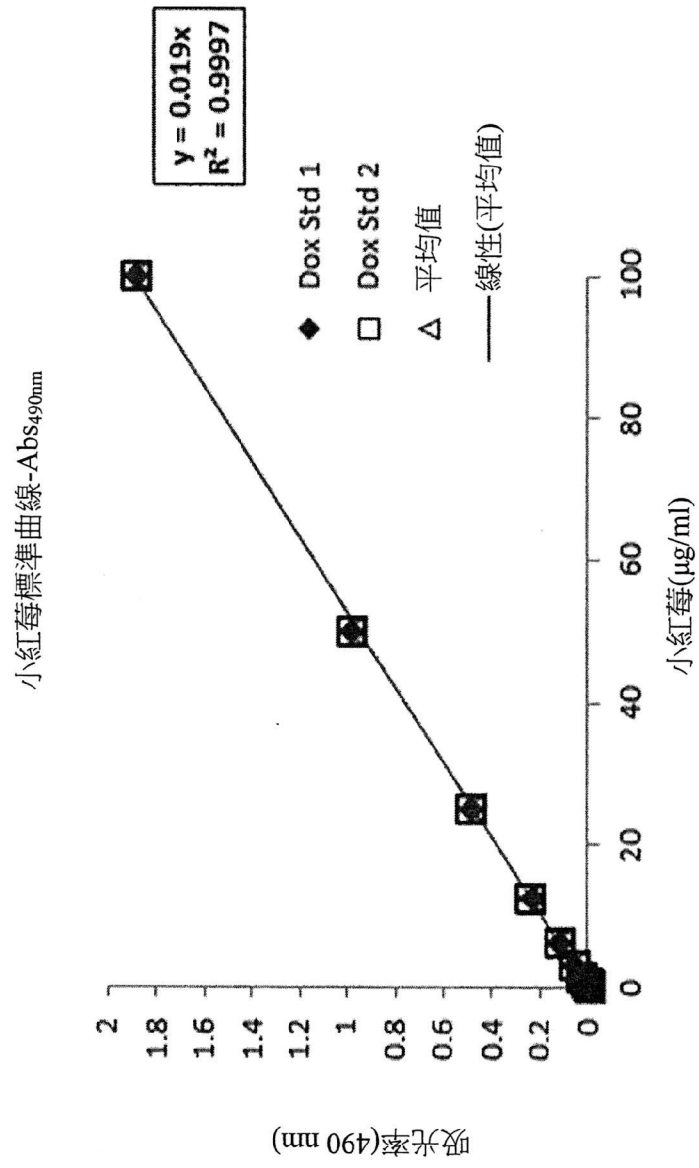
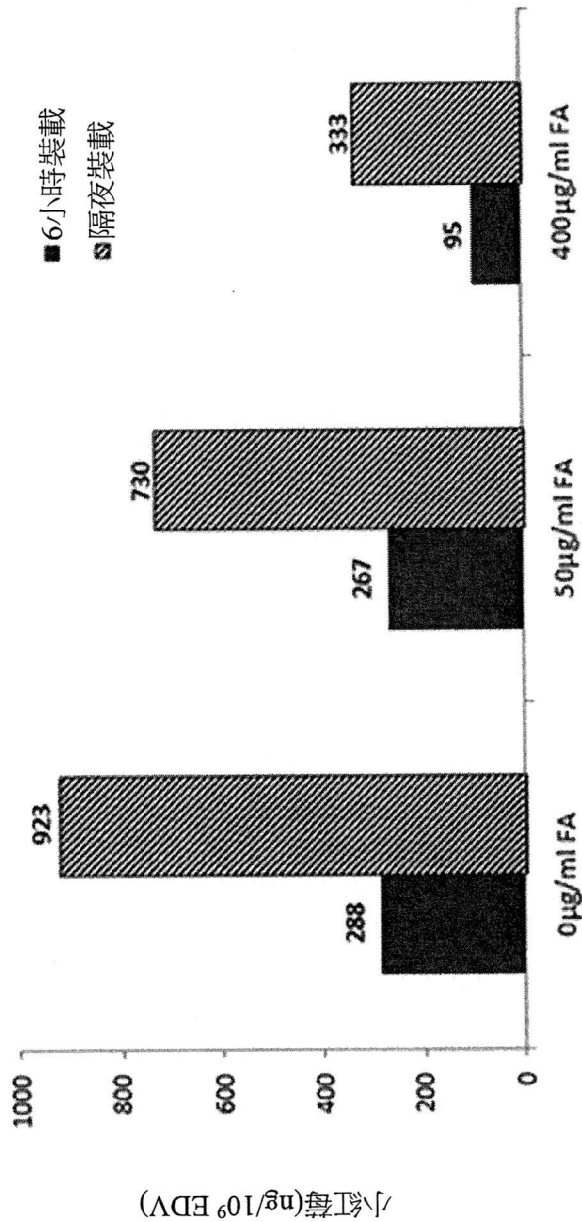


圖17

螢光淬滅劑葉酸對小紅莓裝載之影響



小紅莓裝載條件；100 μg/ml Dox + 葉酸(FA)

圖18

在螢光淬滅劑葉酸(FA)存在下微細胞之小紅莓裝載
HPLC UV_{250nm} 量測

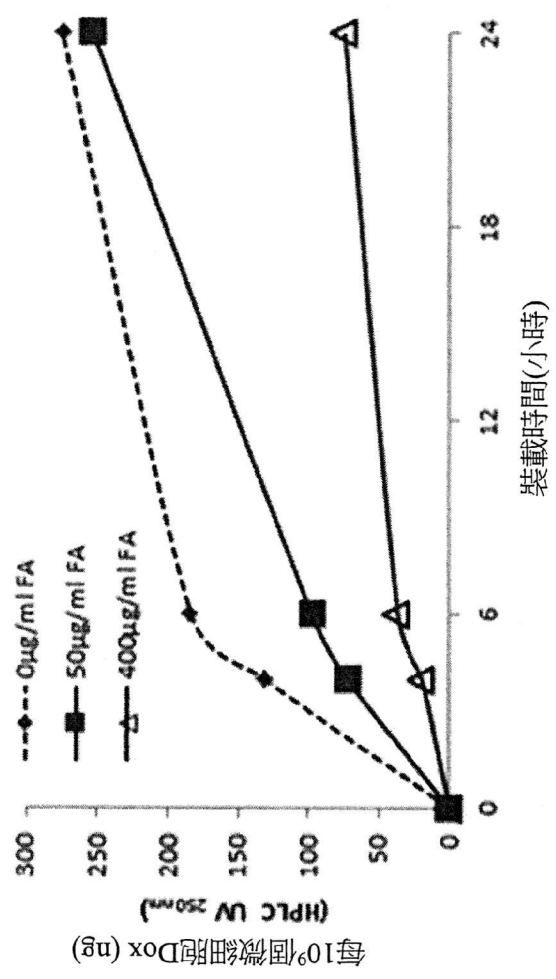


圖19

在螢光淬滅劑葉酸(FA)存在下微細胞之小紅莓裝載
HPLC RF量測

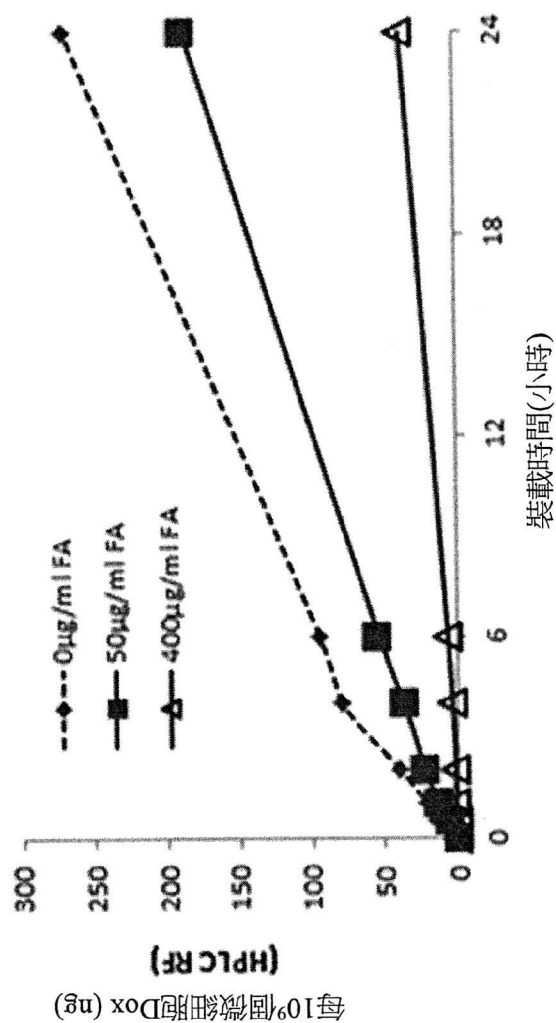


圖20

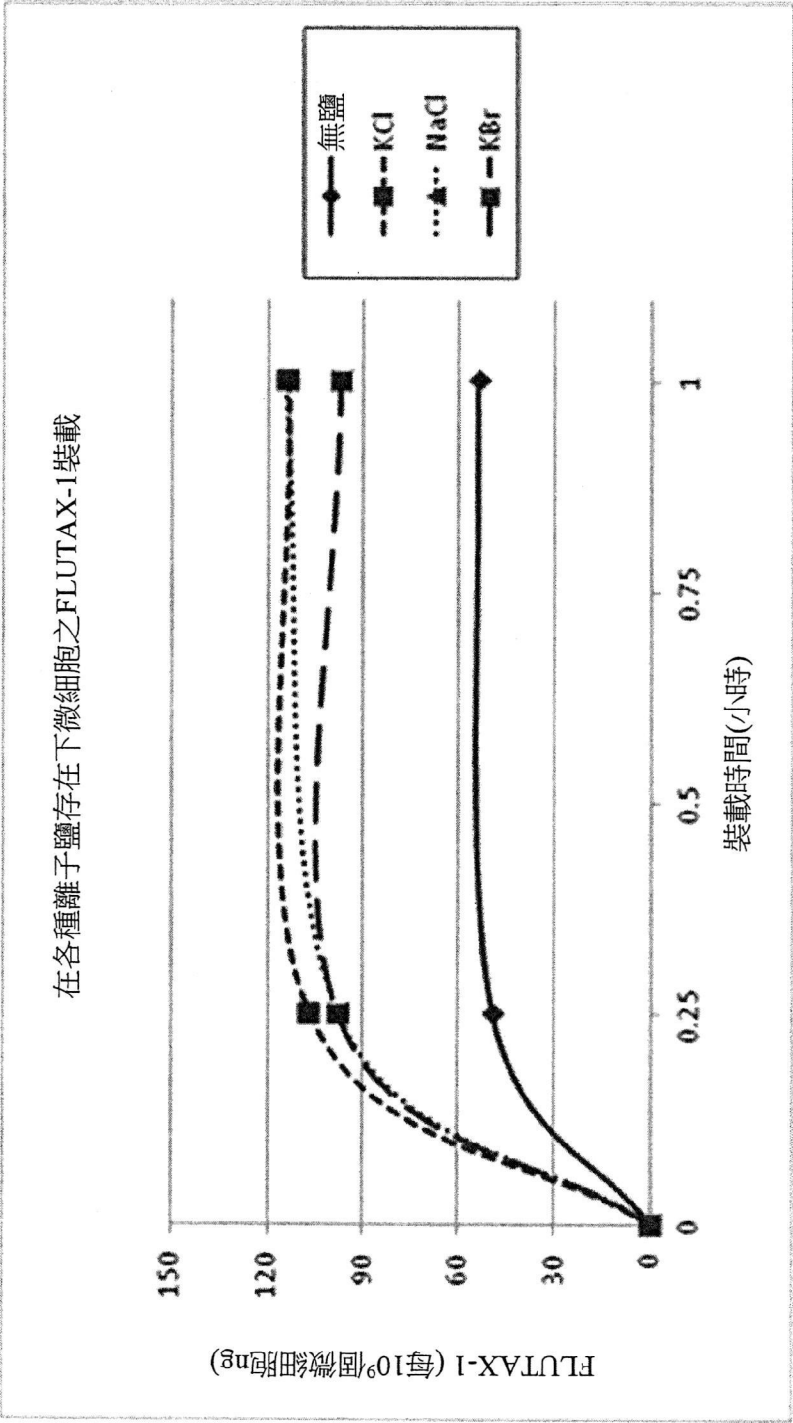


圖21

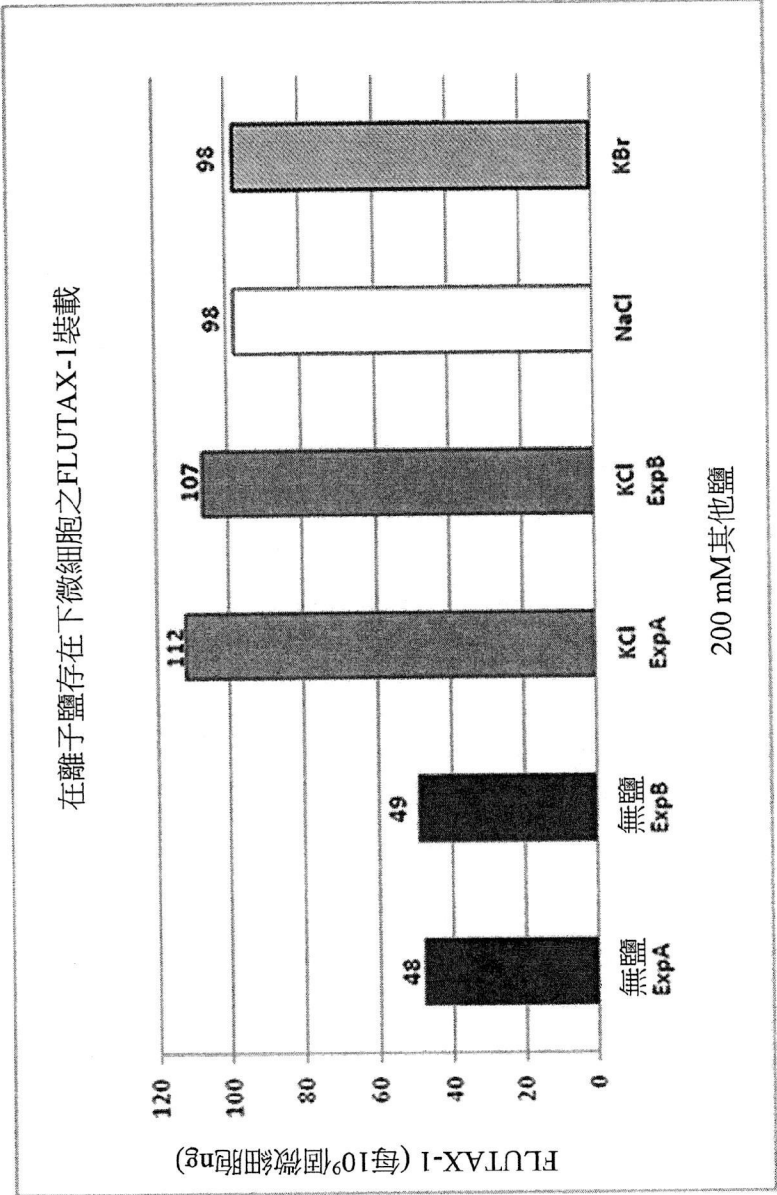


圖22

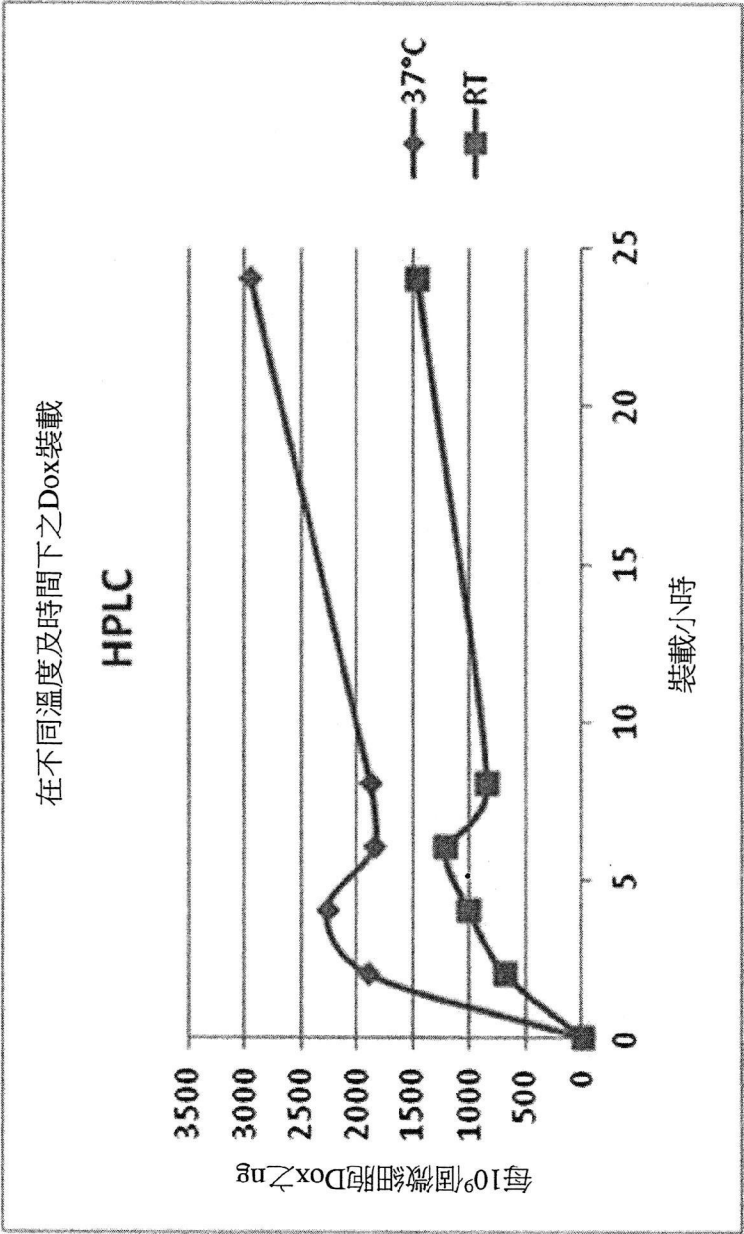


圖23

