

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491122** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.09.11

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.28

(54) **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ**

(31) **63/273,638**

(32) **2021.10.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/048256**

(87) **WO 2023/076620 2023.05.04**

(71) Заявитель:
**САЙДЖИЛОН ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Барни Лорен Эмили, Бандуквала
Хозефа, Драпо Сьюзан Дж., Дженсен
Лорен Э. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе описаны композиции гидрогелевых капсул, которые содержат совокупность гидрогелевых капсул и фармацевтически приемлемый раствор. Гидрогелевые капсулы в совокупности содержат образующий гидрогель полимер и инкапсулируют множество клеток.

A1

202491122

202491122

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581173EA/032

КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ

ПРИТЯЗАНИЕ НА ПРИОРИТЕТ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/273678, поданной 29 октября 2021 г. Полное раскрытие вышеупомянутой заявки полностью включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лечение хронических и генетических заболеваний путем имплантации живых клеток, производящих терапевтическое вещество, способное лечить такие заболевания, имеет потрясающий потенциал для улучшения здоровья пациентов с такими заболеваниями. Чтобы полностью реализовать этот потенциал, имплантированные клетки должны быть защищены от иммунного ответа пациента, чтобы они оставались жизнеспособными, а также были способны продуцировать терапевтические уровни желаемого терапевтического вещества в течение нескольких недель, месяцев или даже дольше. Одним из исследовательских подходов к осуществлению такой клеточной терапии является инкапсуляция клеток, продуцирующих терапевтические вещества, в капсулы из альгинатного гидрогеля с целью, чтобы структура капсулы изолировала клетки, продуцирующие терапевтические вещества, от клеток иммунной системы, в то же время позволяя поступление питательных веществ для клеток, продуцирующих терапевтические вещества, и выход лечебного вещества из капсул. После производства таких гидрогелевых капсул их необходимо хранить таким образом, чтобы сохранить целостность структуры капсулы и жизнеспособность инкапсулированных клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию гидрогелевых капсул, которая включает совокупность гидрогелевых капсул и фармацевтически приемлемый раствор, причем каждая гидрогелевая капсула в совокупности содержит ионно поперечно сшитый альгинат и инкапсулирует множество живых клеток млекопитающих. В одном варианте осуществления раствор содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около 1,0 мМ до около 10 мМ. В одном варианте осуществления концентрация элементарного кальция составляет от около 1,2 мМ до около 3 мМ. В одном варианте осуществления соль кальция представляет собой хлорид кальция. В одном варианте осуществления раствор имеет осмоляльность от около 250 мОсм/кг до около 350 мОсм/кг и рН от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит по меньшей мере один буферный агент, способный поддерживать рН раствора в желаемом диапазоне (например, от 6,0 до 9,0), когда композиция хранится при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C). В одном варианте осуществления буферный агент содержит одну или более из ацетатной соли (например, ацетата натрия), глюконатной соли

(например, глюконата натрия), бикарбонатной соли (например, бикарбоната натрия), лактатной соли (например, лактата натрия) или 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES).

В одном варианте осуществления раствор дополнительно содержит источник углерода (например, сахар (например, декстроза, глюкоза, галактоза, гексоза, фруктоза, мальтоза), глицерин, глутамин, пируват), который поддерживает жизнеспособность инкапсулированных клеток. В одном варианте осуществления источником углерода является глюкоза. В одном варианте осуществления раствор содержит от около 1,5 до около 2,5 мМ хлорида кальция, от около 5 до около 25 мМ D-глюкозы и от около 40 до около 50 мМ бикарбоната натрия.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит минералы, аминокислоты и витамины, которые поддерживают жизнеспособность инкапсулированных клеток.

В одном варианте осуществления минералы включают соль магния (например, хлорид магния или сульфат магния) или соль калия (например, хлорид калия).

В одном варианте осуществления аминокислоты включают гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин.

В одном варианте осуществления витамины включают соединение витамина В1 (например, тиамин или соль тиамина, например, гидрохлорид тиамина), соединение витамина В3 (например, никотиновая кислота или ниацинамид) и соединение витамина В6 (например, пироксидин или соль пироксидина, например, пироксидина гидрохлорид).

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты включают L-аргинин, L-цистин, L-глицин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин и L-валин.

В некоторых вариантах осуществления витамины включают холин или соль холина (например, холина хлорид), соединение витамина В1 (например, тиамин или соль тиамина, например, гидрохлорид тиамина), соединение витамина В3 (например, никотиновую кислоту или ниацинамид), соединение витамина В5 (например, пантотеновую кислоту или пантотенат кальция), соединение витамина В6 (например, пироксидин или соль пироксидина, например, гидрохлорид пироксидина), соединение фолата (например, фолиевую кислоту), рибофлавин и инозитол.

В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы в совокупности гидрогелевых капсул имеют подобную сфере или сферическую форму. В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы имеют средний диаметр капсулы от около 500 мкм до около 5000 мкм (например, от около 500 мкм до около 4000 мкм, от около 500 мкм до около 3000 мкм, от около 500 мкм до около 2500 мкм, от около 500 мкм до около 2000 мкм, от около 500 мкм до около 1500 мкм, от около 500 мкм до около 1000 мкм, от около 1000 мкм до около 2500 мкм). В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы не имеют подобной сфере или сферической формы. В одном варианте осуществления каждая капсула содержит компартмент, содержащий клетки, окруженный барьерным компартментом,

который содержит ионно поперечно сшитый альгинат. В одном варианте осуществления поперечно-сшитый альгинат включает альгинат, ковалентно модифицированный по меньшей мере одним неволокнутистым соединением, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления сшивающий агент содержит ионы бария. В некоторых вариантах осуществления компармент, содержащий клетки, инкапсулирует живые клетки млекопитающих в первую полимерную композицию, содержащую альгинат, который необязательно ионно перекрестно сшит (например, ионами бария). В некоторых вариантах осуществления альгинат в первой полимерной композиции ковалентно модифицирован пептидом, контактирующим с клеткой, как определено в настоящем документе. В одном варианте осуществления средний диаметр гидрогелевых капсул составляет от 1400 до 2000 мкм.

В некоторых вариантах осуществления инкапсулированные живые клетки млекопитающих происходят из клетки человека, например, из клетки RPE (например, клетки ARPE-19). В одном варианте осуществления клетки генетически модифицированы для экспрессии и секреции экзогенного белка, например, любого из терапевтических белков, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает герметичный контейнер, содержащий любую из капсульных композиций, описанных в данном документе. Каждая внутренняя поверхность контейнера, контактирующая с композицией, состоит по существу из биосовместимого материала, например, пластика медицинского назначения (например, фторированного этиленпропилена (FEP) или полиэтилентерефталатгликоля (PETG)). В одном варианте осуществления нижняя внутренняя поверхность контейнера имеет прямоугольную или круглую форму.

В одном варианте осуществления практически все (например, по меньшей мере 90%, 95%, 98% или более) гидрогелевые капсулы в композиции распределены по существу равномерно по внутренней поверхности дна контейнера в слое капсулы и объем раствора (VS) располагается поверх слоя. В одном варианте осуществления слой капсул имеет глубину, равную от около 1,00 до около 1,25 среднего диаметра капсул в композиции.

В еще одном аспекте настоящее изобретение представляет способ получения герметичного контейнера, содержащего композицию гидрогелевой капсулы, описанную в настоящем документе. В одном варианте осуществления способ включает предоставление совокупности гидрогелевых капсул, инкапсулирующих живые клетки млекопитающих, объединение совокупности капсул с фармацевтически приемлемым водным раствором, описанным в настоящем документе, и помещение желаемого объема композиции в биосовместимый герметичный контейнер таким образом, чтобы обеспечить слой капсул, в котором практически все капсулы в объеме композиции распределены практически равномерно по дну контейнера на глубине, равной от около 1,00 до около 1,25 среднего диаметра капсул в композиции. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает добавление желаемого объема фармацевтически приемлемого раствора таким образом, чтобы образовался слой раствора поверх слоя капсулы, и герметизацию

контейнера. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает хранение герметичного контейнера в течение желаемого периода времени при температуре от 2°C до 30°C или от около 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) в течение желаемого периода времени и оценку жизнеспособности инкапсулированных клеток в композиции в один или несколько моментов времени в течение желаемого периода времени.

В еще одном аспекте настоящее изобретение описывает применение композиции гидрогелевой капсулы, описанной в настоящем документе, для лечения субъекта-млекопитающего (например, человека), нуждающегося в лечении веществом (например, белком), продуцируемым инкапсулированными клетками в композиции. В одном варианте осуществления субъекта лечат способом, включающим введение субъекту желаемого количества композиции, например, путем имплантации желаемого количества во внутрибрюшинную полость субъекта. В одном варианте осуществления способ включает предоставление композиции гидрогелевых капсул в герметичном контейнере, описанном в настоящем документе, вскрытие контейнера и удаление желаемого количества. В одном варианте осуществления инкапсулированные клетки в композиции гидрогелевых капсул генетически модифицированы для производства одного из экзогенных белков, описанных в настоящем документе.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан график жизнеспособности клеток, инкапсулированных в сферы альгинат-гидрогеля и хранившихся до трех дней в водном растворе, в котором отсутствовал кальций, или в том же растворе с добавлением кальция, при этом столбцы ошибок представляют собой стандартное отклонение (SD) между двумя повторами за каждый момент времени.

На фиг. 2 показан график уровней FVIII в плазме мышей, которым имплантировали сферы альгинатного гидрогеля, инкапсулирующие клетки, экспрессирующие FVIII, после хранения сфер в различных растворах для хранения, при этом столбцы ошибок представляют стандартное отклонение (SD) между четырьмя мышами для каждого условия хранения.

На фиг. 3А и 3В показаны графики уровней FVIII в плазме мышей, которым имплантировали сферы альгинатного гидрогеля, инкапсулирующие клетки, экспрессирующие FVIII, после того, как сферы хранились в различных растворах для хранения в течение указанного периода времени, при этом столбцы ошибок представляют стандартное отклонение (SD) между четырьмя мышами для каждого условия хранения.

На фиг. 4 показаны уровни FVIII, секретлируемые в кондиционированную среду из сфер альгинатного гидрогеля, инкапсулирующих клетки, экспрессирующие FVIII, после того, как сфера хранилась в течение периода до семи дней в виде монослоя, двойного слоя или тройного слоя, при этом среднее значение двух повторяющихся образцов обозначено на графике в виде одной точки.

На фиг. 5 показан график уровней FVIII в плазме мышей, которым имплантировали сферы альгинатного гидрогеля, инкапсулирующие клетки, экспрессирующие FVIII, после

хранения сфер в различных растворах для хранения, при этом столбцы ошибок представляют стандартное отклонение (SD) между четырьмя мышами для каждого условия хранения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлена композиция гидрогелевых капсул, содержащая совокупность живых клеток млекопитающих (например, клеток RPE человека) в фармацевтически приемлемом растворе, герметичный контейнер, содержащий композицию гидрогелевых капсул, и ее применение для лечения субъекта-млекопитающего, нуждающегося в лечении, причем вещество вырабатывается инкапсулированными клетками. Различные варианты осуществления будут описаны ниже.

Сокращения и определения

Во всем подробном описании и примерах раскрытия будут использоваться следующие сокращения.

CM-Alg химически модифицированный альгинат

CM-LMW-Alg химически модифицированный альгинат с низкой молекулярной массой

CM-LMW-Alg-101 альгинат с низкой молекулярной массой, химически модифицированный соединением 101, показанным в таблице 4

CM-HMW-Alg химически модифицированный альгинат с высокой молекулярной массой

CM-HMW-Alg-101 альгинат с высокой молекулярной массой, химически модифицированный соединением 101, показанным в таблице 4

CM-MMW-Alg химически модифицированный альгинат со средней молекулярной массой

CM-MMW-Alg-101 альгинат со средней молекулярной массой, химически модифицированный соединением 101, показанным в таблице 4

HMW-Alg альгинат с высокой молекулярной массой

MMW-Alg альгинат со средней молекулярной массой

U-Alg немодифицированный альгинат

U-HMW-Alg немодифицированный альгинат с высокой молекулярной массой

U-LMW-Alg немодифицированный альгинат с низкой молекулярной массой

U-MMW-Alg немодифицированный альгинат со средней молекулярной массой

70:30 CM-Alg:U-Alg 70:30 смесь (об.:об.) химически модифицированного альгината и немодифицированного альгината, например, как описано в WO2020069429

Определения

Для лучшего понимания изобретения ниже приведены конкретные определения некоторых технических и научных терминов, используемых в данном документе. Если в данном документе нет специальных определений, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, как правило, понимаемое человеком с обычными навыками в области техники, к которой относится настоящее

изобретение.

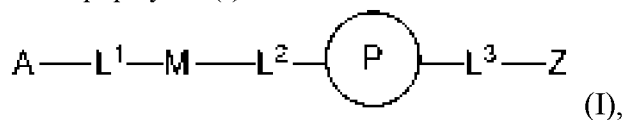
Используемые в данном документе, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа включают их соответствующие ссылки на множественные формы, если из контекста явно не следует иное.

«Около» или «приблизительно» при использовании в настоящем документе для модификации численно определенного параметра (например, физического описания гидрогелевой капсулы, такого как диаметр, сферичность, количество инкапсулированных в ней клеток, количество капсул в препарате) означает, что указанное числовое значение находится в пределах приемлемого функционального диапазона для определенного параметра, как это определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как числовое значение измеряется или определяется, например, от ограничений системы измерения, включая допустимый диапазон погрешностей для этой системы измерения. Например, «около» может означать диапазон на 20% выше и ниже указанного числового значения. В качестве неограничивающего примера гидрогелевая капсула, имеющая диаметр около 1,5 миллиметра (мм) и инкапсулирующая около 5 миллионов (М) клеток, может иметь диаметр от 1,2 до 1,8 мм и может инкапсулировать от 4 до 6 М клеток. В качестве еще одного неограничивающего примера препарат, содержащий около 100 гидрогелевых капсул, включает препараты, содержащие от 80 до 120 капсул. В некоторых вариантах осуществления термин «около» означает, что модифицированный параметр может варьироваться на целых 15%, 10% или 5% выше и ниже указанного числового значения для этого параметра.

«Приобрести» или «приобретение», , как используется в данном документе, относится к получению владения значением, например, числовым значением, или изображением, или физическим объектом (например, образцом), путем «прямого приобретения» или «косвенного приобретения» значения или физического объекта. «Непосредственное приобретение» означает выполнение способа (например, выполнение аналитического способа или протокола) с целью получения значения или физического объекта. «Косвенное приобретение» относится к получению значения или физического объекта от другой стороны или источника (например, независимой лаборатории, которая непосредственно приобрела физический объект или значение). Непосредственное приобретение значения или физического объекта включает выполнение способа, который включает физическое изменение физического вещества или применение механизма или устройства. Примеры непосредственного приобретения значения включают получение образца от человека. Непосредственное приобретение значения включает выполнение способа, в котором используется машина или устройство, например, использование флуоресцентного микроскопа для получения данных флуоресцентной микроскопии.

«Вводить», «вводимый» или «введение» в настоящем документе относятся к имплантации, абсорбции, проглатыванию, инъекции или иному введению субъекту объекта, описанного в настоящем документе (например, композиции гидрогелевой капсулы или ее аликвоты), или предоставление такого объекта субъекту для введения.

Термин «неволокнистый», используемый в данном документе по отношению к соединению, полимеру или другому веществу, означает, что вещество смягчает реакцию на инородное тело (FBR). Например, степень FBR в биологической ткани, которая индуцируется имплантацией в эту ткань гидрогелевой капсулы, содержащей неволокнистое соединение (например, полимер, ковалентно модифицированный соединением, перечисленным в таблице 4), ниже, чем FBR, индуцированное имплантацией эталонной капсулы с нулевым неволокнистым действием, в которой отсутствует какое-либо неволокнистое соединение, но которая имеет по существу тот же состав (например, тот же тип(-ы) клеток) и структуру (например, размер, форму, количество компартментов). В одном варианте осуществления степень FBR оценивают по иммунологическому ответу в ткани, содержащей имплантированную гидрогелевую капсулу, который может включать, например, адсорбцию белка, макрофаги, многоядерные гигантские клетки инородного тела, фибробласты и ангиогенез, используя известные анализы в данной области техники, например, как описано в WO 2017/075630, WO 2021/119522 или с использованием одного или нескольких анализов/методов, описанных Vegas, A., et al., *Nature Biotechnol* (см. выше). В одном варианте осуществления неволокнистое соединение представляет собой соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где переменные A, L¹, M, L², P, L³ и Z, а также связанные дополнительные переменные, определены в данном документе.

«Альфа-галактозидаза A», «α-Gal A», «альфа-D-галактозидаза-A», альфа-галактозидгалактогидролаза, «галактозидаза альфа» и «белок GLA» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо и относиться к белку, содержащему зрелую аминокислотную последовательность зрелого ARSB млекопитающего дикого типа или любого его фрагмента, мутанта, варианта или производного, который имеет ферментативную активность в пределах 80-120%, 85-115%, 90-110% или 95-105% соответствующего зрелого белка GLA млекопитающих дикого типа, измеренного с помощью любого известного в данной области анализа активности GLA. GLA гидролизует концевые остатки альфа-D-галактозы в гликофинголипидах, особенно в глоботриаозилцерамиде (Gb₃). Ген GLA человека дикого типа кодирует полипептид, состоящий из 429 аминокислот, из которых 31 N-концевая аминокислота составляют сигнальный пептид (номер доступа GenBank CAA29232.1). В одном варианте осуществления белок GBA является частью слитого белка, который дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей из одного или нескольких гетерологичных полипептидов. В одном варианте осуществления инкапсулированные клетки содержат экзогенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок GLA, показанный на фиг. 4A в WO 2020/198685.

Активность GLA можно измерить непосредственно путем получения лейкоцитов

крови от субъекта, лизиса лейкоцитов и определения ферментативной активности в лизате после добавления ферментного субстрата, такого как 4-метилумбеллиферальный альфа-D-галактозид. Иммуноанализы для измерения активности GLA и белка для определения концентраций альфа-галактозидазы в крови и плазме описаны в Fuller et al., *Clin Chem.* **2004**; 50(11):1979-85. Косвенные оценки активности GLA основаны на измерении субстрата, например, уровней Gb3 и биомаркера lysoGb3 в плазме крови и/или образце мочи, взятом у субъекта, или в биопсии интересующей ткани, например, печени, почек, сердца. Уровни Gb3 и lysoGb3 можно измерить с помощью любого признанного в данной области анализа. Например, метод измерения уровней Gb3 в плазме крови и моче людей, страдающих болезнью Фабри, описан, например, в Boscaro et al., *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002; 16(16):1507-14. Накопление Gb3 в биоптатах кожи, полученных с помощью «пресса», можно обнаружить с помощью метода иммуноэлектронной микроскопии, такого как описано в Kanekura et al., *Br J Dermatol.* **2005**, 153(3):544-8. Различные методы биопсии и анализы для обнаружения Gb3 и других суррогатных биомаркеров описаны в публикации заявки на патент США US 2010/0113517. Другие плазменные суррогатные биомаркеры активности GLA и/или прогрессирования болезни Фабри (например, различные биомаркеры воспаления и ремоделирования сердца) описаны в Yogasundaram, H. et al., *J Am Heart Assoc.* 2018; 7:e009098.

«Белок альфа-L-идуронидаза» и «белок IDUA» могут быть использованы в данном документе взаимозаменяемо и относятся к белку, который (i) способен гидролизовать невосстанавливающиеся концевые остатки альфа-L-идуронової кислоты в гликозаминогликанах (GAG) (например, дерматансульфат и гепарансульфат) и (ii) включает зрелую аминокислотную последовательность зрелого белка IDUA млекопитающих дикого типа или любого его фрагмента, мутанта, варианта или производного, который имеет ферментативную активность в пределах 80-120%, 85-115%, 90-110% или 95-105% соответствующего зрелого белка IDUA млекопитающих дикого типа, измеренного с помощью любого известного в данной области техники анализа активности IDUA (например, гидролиза субстрата 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронида (4MU-идуронида), см., например, Ou, L. et al., *Mol Genet Metab.* 2014 Feb: 111(2): 113-115). Ген IDUA человека дикого типа кодирует белок-предшественник, состоящий из 653 аминокислот, из которых 26 N-концевых аминокислот составляют сигнальный пептид (номер доступа в GenBank AAA81589.1, номер доступа в GenBank AAA51698.1). В одном варианте осуществления белок IDUA является частью слитого белка, который дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей из одного или нескольких гетерологичных полипептидов. «Белок арилсульфатаза В» и «белок ARSB» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо и относятся к белку (i), который способен гидролизовать 4-сульфатные группы N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфатных единиц хондроитинсульфата и дерматансульфата и (ii) содержит аминокислотную последовательность зрелого ARSB млекопитающего дикого типа или любого его фрагмента, мутанта, варианта или производного, который имеет

ферментативную активность в пределах 80-120%, 85-115%, 90-110% или 95-105% соответствующего зрелого белка ARSB млекопитающих дикого типа, измеренного с помощью любого анализа активности ARSB, известного в данной области техники. Ген ARSB человека дикого типа кодирует полипептид-предшественник из 533 аминокислот, из которых N-концевые 36 или 38 аминокислот составляют сигнальный пептид (UniProtKB - P15848). В одном варианте осуществления белок ARSB является частью слитого белка, который дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей из одного или нескольких гетерологичных полипептидов.

«Белок бета-глюкозидазы», «белок кислой бета-глюкоцереброзидазы», белок бета-глюкозилцерамидазы» и «белок GBA» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо для обозначения белка, который содержит зрелую аминокислотную последовательность, кодируемую геном GBA млекопитающих дикого типа или любым его фрагментом, мутантом, вариантом или производным, который имеет ферментативную активность, которая находится в пределах 80-120%, 85-115%, 90-110% или 95-105% соответствующего зрелого белка GBA млекопитающих дикого типа, как измерено с помощью любого анализа GBA, известного в данной области техники. GBA катализирует распад гликолипида глюкозилцерамида (GlcCer) до церамида и глюкозы. Ген GBA человека дикого типа кодирует полипептид-предшественник из 536 аминокислот (UniProtKB - P04062-1). В одном варианте осуществления белок GBA является частью слитого белка, который дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей из одного или нескольких гетерологичных полипептидов.

«Клетка» в контексте настоящего документа относится к генетически модифицированной клетке или клетке, которая не является генетически модифицированной. В одном варианте осуществления клетка представляет собой иммортализованную клетку или генетически модифицированную клетку, полученную из иммортализованной клетки. В одном варианте осуществления клетка представляет собой живую клетку, например, жизнеспособную, что определено с помощью любого метода, описанного в настоящем документе или известного в данной области техники.

«Клеточно-связывающий пептид (СВР)» в настоящем документе означает линейный или циклический пептид, который содержит аминокислотную последовательность, полученную из клеточно-связывающего домена лиганда молекулы клеточной адгезии (САМ) (например, опосредует клеточно-матричные соединения или межклеточные соединения). В одном варианте осуществления СВР представляет собой любой из СВР, описанных в международной патентной публикации WO 2020/069429. В одном варианте осуществления СВР представляет собой линейный пептид, содержащий RGD и имеющий длину менее 6 аминокислот. В одном варианте осуществления СВР представляет собой линейный пептид, который по существу состоит из RGD или RGDSP.

«СВР-полимер» в контексте настоящего документа означает полимер, содержащий по меньшей мере одну молекулу клеточно-связывающего пептида, ковалентно присоединенную к полимеру через линкер. В одном варианте осуществления полимер в

СВР-полимере представляет собой синтетический или природный полисахарид, например, альгинат, например, альгинат натрия. В одном варианте осуществления линкер представляет собой аминокислотный линкер (т.е. состоит по существу из одной аминокислоты или пептида, состоящего из нескольких одинаковых или разных аминокислот), который соединен посредством пептидной связи с N-концом или C-концом СВР. В одном варианте осуществления СВР-полимер представляет собой любой из СВР-альгинатов, определенных в WO 2020/069429.

«Клеточно-связывающее вещество (CBS)» в настоящем документе означает любой химический, биологический или другой тип вещества (например, небольшое органическое соединение, пептид, полипептид), которое способно имитировать по меньшей мере одну активность лиганда для молекулы клеточной адгезии (САМ) или другой молекулы клеточной поверхности, которая опосредует клеточно-матричные соединения или межклеточные соединения или другую передачу сигналов, опосредованную рецептором. В одном варианте осуществления CBS, присутствующий в полимерной композиции, инкапсулирующей живые клетки, способен образовывать временную или постоянную связь или контакт с одной или несколькими клетками. В одном варианте осуществления CBS облегчает взаимодействие между двумя или более живыми клетками, инкапсулированными в полимерную композицию. В одном варианте осуществления присутствие CBS в полимерной композиции, инкапсулирующей множество клеток (например, живых клеток), коррелирует с одним или обоими из повышенной продуктивности клеток (например, экспрессии терапевтического агента) и повышенной жизнеспособности клеток, когда инкапсулированные клетки имплантируют испытуемому, например, мыши. В одном варианте осуществления CBS физически присоединен к одной или нескольким молекулам полимера в полимерной композиции. В одном варианте осуществления CBS представляет собой клеточно-связывающий пептид, как определено в настоящем документе или в WO 2020/069429.

«Консервативно модифицированные варианты» или консервативная замена», как используется в настоящем документе, относится к варианту эталонного пептида или полипептида, который идентичен эталонной молекуле, за исключением наличия одной или нескольких консервативных аминокислотных замен в его аминокислотной последовательности. В одном варианте осуществления консервативно модифицированный вариант состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична эталонной аминокислотной последовательности. Консервативная аминокислотная замена относится к замене аминокислоты аминокислотой, имеющей сходные характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость основной цепи и т. д.) и которая оказывает минимальное влияние на биологическую активность полученного замещенного пептида или полипептида. Таблицы консервативных замен функционально сходных аминокислот хорошо известны в данной области техники, и типичные замены, сгруппированные по функциональным признакам, представлены в

таблице 1 ниже.

Таблица 1. Типичные группы консервативных аминокислотных замен.

Признак	Консервативная аминокислотная группа
Заряд/полярность	His, Arg, Lys
	Asp, Glu
	Cys, Thr, Ser, Gly, Asn, Gln, Tyr
	Ala, Pro, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Trp
Гидрофобность	Asp, Glu, Asn, Gln, Arg, Lys
	Cys, Ser, Thr, Pro, Gly, His, Tyr
	Ala, Met, Ile, Leu, Val, Phe, Trp
Структурное/поверхностное воздействие	Asp, Glu, Asn, Ala, His, Arg, Lys
	Cys, Ser, Tyr, Pro, Ala, Gly, Trp, Tyr
	Met, Ile, Leu, Val, Phe
Предрасположенность вторичной структуры	Ala, Glu, Ala, His, Lys, Met, Leu, Arg
	Cys, Thr, Ile, Val, Phe, Tyr, Trp
	Ser, Gly, Pro, Asp, Asn
Эволюционная консервативность	Asp, Glu
	His, Lys, Arg
	Asn, Gln
	Ser, Thr
	Leu, Ile, Val
	Phe, Tyr, Trp
	Ala, Gly
	Met, Cys

«Состоит по существу из» и такие варианты, как «состоят по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любых перечисленных элементов или группы элементов, а также необязательное включение других элементов, аналогичная или отличная от перечисленных элементов природа, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанной молекулы, композиции, гидрогелевой капсулы или способа. В качестве неограничивающего примера терапевтическое вещество, которое состоит по существу из указанной аминокислотной последовательности, может также включать одну или несколько аминокислот, включая замены в указанной аминокислотной последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков, которые существенно не влияют на соответствующую биологическую активность терапевтического вещества.

Термин «полученный из», используемый в данном документе в отношении клеток,

относится к клеткам, полученным из ткани, клеточных линий или клеток, которые необязательно затем культивируются, пассируются, дифференцируются, индуцируются и т.д. для получения производных клеток. Например, мезенхимальные стволовые клетки могут быть получены из мезенхимальной ткани, а затем дифференцированы в различные типы клеток.

«Экзогенная нуклеиновая кислота» в настоящем документе представляет собой нуклеиновую кислоту, которая не встречается в природе в рассматриваемой клетке.

«Экзогенный полипептид» в настоящем документе представляет собой полипептид, кодируемый экзогенной нуклеиновой кислотой, введенной в клетку. Ссылка на положение аминокислоты в конкретной последовательности означает положение указанной аминокислоты в эталонной аминокислотной последовательности, например, в последовательности полноразмерного зрелого (после расщепления сигнальным пептидом) белка дикого типа (если не указано иное), и не исключает наличие вариаций, например, делеций, вставок и/или замен в других положениях эталонной аминокислотной последовательности.

«Белок фактора VII» или «белок FVII» в настоящем документе означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка фактора VII или его варианта, который обладает биологической активностью FVII, например, способствует свертыванию крови, как определено с помощью признанного в данной области техники анализа, если не указано иное. Встречающийся в природе FVII существует в виде одноцепочечного зимогена, зимогеноподобного двухцепочечного полипептида и полностью активированной двухцепочечной формы (FVIIa). В некоторых вариантах осуществления ссылка на FVII включает его одноцепочечные и двухцепочечные формы, включая зимогеноподобный и FVIIa. Белки FVII, которые могут продуцироваться генетически модифицированными клетками, описанными в настоящем документе (например, полученными из линии эпителиальных клеток человека, например, клеточной линии ARPE-19), включают приматов дикого типа (например, человека), свиней, собак и мышьиные белки, а также варианты таких белков дикого типа, включая фрагменты, мутанты, варианты с одной или несколькими аминокислотными заменами и/или делециями. В некоторых вариантах осуществления вариант белка FVII способен активироваться до полностью активированной двухцепочечной формы (фактор VIIa), которая имеет по меньшей мере 50%, 75%, 90% или более (включая >100%) активности фактора VIIa дикого типа. Известны варианты FVII и FVIIa, например, марзептаког альфа (активированный) (MarzAA) и варианты, описанные в европейском патенте № 1373493, патенте США № 7771996, патенте США № 9476037 и опубликованной заявке США № US 2008/0058255.

Биологическая активность фактора VII может быть определена количественно с помощью признанного в данной области техники анализа, если не указано иное. Например, биологическая активность фактора FVII в образце биологической жидкости, например, плазмы, может быть определена количественно путем (i) измерения количества фактора Ха, продуцируемого в системе, содержащей тканевой фактор (TF), встроенный в липидную

мембрану, и фактор X (Persson et al., *J. Biol. Chem.* 272:19919-19924, 1997); (ii) измерения гидролиза фактора X в водной системе; (iii) измерения его физического связывания с TF с использованием прибора, основанного на поверхностном плазмонном резонансе (Persson, *FEBS Letts.* 413:359-363, 1997); или (iv) измерения гидролиза синтетического субстрата; и/или (v) измерения образования тромбина в TF-независимой системе *in vitro*. В одном варианте осуществления активность FVII оценивают с помощью коммерчески доступного хромогенного анализа (BIOPHEN FVII, HYPHEN BioMed Neuville sur Oise, Франция), в котором биологический образец, содержащий FVII, смешивают с кальцием тромбoplastина, фактором X и SХа-11 (хромогенным субстратом, специфичным для фактора Ха).

«Белок фактора VIII» или «белок FVIII» в настоящем документе означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность встречающегося в природе полипептида фактора VIII или его варианта, который обладает биологической активностью FVIII, например, коагуляционной активностью, как определено в признанном в данной области техники анализе, если не указано иное. Белки FVIII, которые могут экспрессироваться генетически модифицированными клетками, описанными в настоящем документе (например, полученными из линии эпителиальных клеток человека, например, линии клеток ARPE-19), включают белки приматов дикого типа (например, человека), свиней, собак и мышей, а также варианты таких белков дикого типа, включая фрагменты, мутанты, варианты с одной или несколькими аминокислотными заменами и/или делециями, варианты с делецией В-домена (BDD), одноцепочечные варианты и слияния любого из вышеуказанных полипептидов дикого типа или вариантов с полипептидом, удлиняющим период полувыведения. В одном варианте осуществления клетки содержат экзогенную последовательность, которая кодирует полипептид-предшественник фактора VIII (например, с сигнальной последовательностью) с полной или частичной делецией В-домена. В одном варианте осуществления клетки содержат экзогенную последовательность, которая кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII. В одном варианте осуществления экспрессируемый белок FVIII представляет собой вариант белка FVIII, который обладает по меньшей мере 50%, 75%, 90% или более (включая >100%) коагуляционной активности соответствующего фактора VIII дикого типа, например, FVIII человека дикого типа. Анализы для измерения коагуляционной активности белков FVIII включают одноэтапный или двухэтапный анализ коагуляции (Rizza et al., 1982, Coagulation assay of FVIII:C and FIXa в Bloom ed. *The Hemophelias*. NY Churchill Livingstone 1992) или анализ хромогенного субстрата FVIII:C (Rosen, S. 1984. *Scand J Haematol* 33:139-145, suppl.).

Известен ряд вариантов FVIII-BDD, которые включают, например, варианты с полной или частичной делецией В-домена, раскрытые в любом из следующих патентов США с номерами: 4868112 (например, столбец 2, строка 2 - столбец 19, строка 21 и таблица 2); 5112950 (например, столбец 2, строки 55-68, фиг. 2 и пример 1); 5171844 (например, столбец 4, строка 22 - столбец 5, строка 36); 5543502 (например, столбец 2, строки 17-46);

5595886; 5610278; 5789203 (например, столбец 2, строки 26-51 и примеры 5-8); 5972885 (например, столбец 1, строка 25 - столбец 2, строка 40); 6048720 (например, столбец 6, строки 1-22 и пример 1); 6060447; 6228620; 6316226 (например, столбец 4, строка 4 - столбец 5, строка 28 и примеры 1-5); 6346513; 6458563 (например, столбец 4, строки 25-53) и 7041635 (например, столбец 2, строка 1 - столбец 3, строка 19, столбец 3, строка 40 - столбец 4, строка 67, столбец 7, строка 43 - столбец 8, строка 26 и столбец 11, строка 5 - столбец 13, строка 39). В одном варианте осуществления инкапсулированные клетки содержат экзогенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует зрелую аминокислотную последовательность FVII-BDD, показанную на фиг. 3 WO 2019/067766.

В некоторых вариантах осуществления белок FVIII-BDD, продуцируемый генетически модифицированной клеткой, описанной в настоящем документе (например, полученной из линии эпителиальных клеток человека, например, клеточной линии ARPE-19), имеет одну или несколько из следующих делеций аминокислот в В-доме: (i) большую часть В-домена, за исключением аминоконцевых последовательностей В-домена, необходимых для внутриклеточной обработки первичного продукта трансляции в две полипептидные цепи (WO 91/09122); (ii) делецию аминокислот 747-1638 (Hoeber R.C., et al. *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990)); аминокислот 771-1666 или аминокислоты 868-1562 (Meulien P., et al. *Protein Eng.* 2(4):301-6 (1988); аминокислоты 982-1562 или 760-1639 (Toole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83:5939-5942 (1986)); аминокислот 797-1562 (Eaton et al., *Biochemistry* 25:8343-8347 (1986)); 741-1646 (Kaufman, WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver et al., *DNA* 6:553-564 (1987)); аминокислот 741-1648 (Pasek, WO 88/00831)), аминокислот 816-1598 или 741-1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597); делецию, которая включает один или несколько остатков в последовательности распознавания фуриновой протеазы, включая любую из конкретных делеций, перечисленных в патенте США № 9956269, столбец 10, строка 65 - столбец 11, строка 36.

В других вариантах осуществления белок FVIII-BDD сохраняет любую из следующих аминокислот или аминокислотных последовательностей В-домена: (i) один или несколько сайтов N-связанного гликозилирования в В-доме, например, остатки 757, 784, 828, 900, 963 или необязательно 943, первые 226 аминокислот или первые 163 аминокислоты (Miao, H. Z., et al., *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A., et al., *J. Thromb. Haemost.* 6: 1352-1359 (2008), and Pipe, S. W., et al., *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011).

В некоторых вариантах осуществления белок FVIII-BDD представляет собой одноцепочечный вариант, полученный путем замены или делеции одной или нескольких аминокислот в последовательности распознавания фуриновой протеазы LKRHQR, которая предотвращает протеолитическое расщепление в этом сайте, включая любые замены в положениях R1645 и/или R1648, описанные в патентах США №№ 10023628, 9394353 и 9670267.

В некоторых вариантах осуществления любой из вышеуказанных белков FVIII-BDD может дополнительно содержать один или несколько из следующих вариантов: замену F309S для улучшения экспрессии белка FVIII-BDD (Miao, H. Z., et al., *Blood* 103(a): 3412-

3419 (2004); слияния альбумина (WO 2011/020866) и слияния Fc (WO 04/101740).

Все положения аминокислот FVIII-BDD, упомянутые в настоящем документе, относятся к положениям полноразмерного человеческого FVIII, если не указано иное.

«Белок фактора IX» или «белок FIX» в настоящем документе означает полипептид, который содержит аминокислотную последовательность встречающегося в природе белка фактора IX или его варианта, который обладает биологической активностью FIX, например, коагуляционной активностью, как определено в признанном в данной области техники анализе, если не указано иное. FIX продуцируется в виде неактивного зимогена, который преобразуется в активную форму путем удаления фактором XIa активационного пептида с образованием тяжелой цепи и легкой цепи, удерживаемых вместе одной или несколькими дисульфидными связями. Белки FIX, которые могут продуцироваться генетически модифицированными клетками, описанными в настоящем документе (например, полученными из линии клеток RPE, например, линии клеток ARPE-19), включают белки приматов дикого типа (например, человека), свиней, собак и мышей, а также варианты таких белков дикого типа, включая фрагменты, мутанты, варианты с одной или несколькими аминокислотными заменами и/или делециями и слияния любого из вышеуказанных полипептидов дикого типа или вариантных белков с полипептидом, удлиняющим период полувыведения. В одном варианте осуществления клетки сконструированы так, чтобы кодировать полноразмерный полипептид человеческого фактора IX дикого типа (например, с сигнальной последовательностью) или его функциональный вариант. Вариант белка FIX предпочтительно имеет по меньшей мере 50%, 75%, 90% или более (включая >100%) коагуляционной активности фактора IX дикого типа. Анализы для измерения коагуляционной активности белков FIX включают анализ фактора IX Biophen (Hyphen BioMed) и одноэтапный анализ свертывания (активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), например, как описано в EP 2032607, анализ времени образования тромбина (TGA)) и ротационную тромбоэластометрию, например, как описано в WO 2012/006624.

Ряд функциональных вариантов FIX известен и может быть экспрессирован с помощью сконструированных клеток, инкапсулированных в описанном в данном документе устройстве, включая любой из функциональных вариантов FIX, описанных в следующих международных патентных публикациях: WO 02/040544 на стр. 4, строки 9-30 и стр. 15, строки 6-31; WO 03/020764 в таблицах 2 и 3 на стр. 14-24 и на стр. 12, строки 1-27; WO 2007/149406 со стр. 4, строка 1 по стр. 19, строка 11; WO 2007/149406 A2 со стр. 19, строка 12 по стр. 20, строка 9; WO 08/118507 со стр. 5, строка 14 по стр. 6, строка 5; WO 09/051717 со стр. 9, строка 11 по стр. 20, строка 2; WO 09/137254, стр. 2, абзац [006] - стр. 5, абзац [011] и стр. 16, абзац [044] - стр. 24, абзац [057]; WO 09/130198 A2 со стр. 4, строка 26 по стр. 12, строка 6; WO 09/140015 со стр. 11, абзац [0043] по стр. 13, абзац [0053]; WO 2012/006624; WO 2015/086406.

В определенных вариантах осуществления полипептид FIX содержит последовательность дикого типа или вариантную последовательность, слитую с

гетерологичным полипептидом или неполипептидным фрагментом, продлевающим период полувыведения белка FIX. Примеры фрагментов, увеличивающих период полувыведения, включают Fc, альбумин, последовательность PAS, трансферрин, СТР (С-концевой пептид из 28 аминокислот (СТР) хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) с его 4 О-гликанами), полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (НЕС), альбуминсвязывающий полипептид, альбуминсвязывающие малые молекулы или любую их комбинацию. Типичным полипептидом FIX является белок rFIXFc, описанный в WO 2012/006624, который представляет собой одноцепочечный FIXFc (FIXFc-sc) и одноцепочечный Fc (Fc-sc), связанные вместе посредством двух дисульфидных связей в шарнирной области Fc.

Варианты FIX также включают усиление и потерю функциональных вариантов. Примером усиления функционального варианта является вариант человеческого FIX «Padua», который имеет L (лейцин) в положении 338 зрелого белка вместо R (аргинин) (соответствует положению аминокислоты 384 SEQ ID NO:20) и обладает большей каталитической и коагулянтной активностью по сравнению с человеческим FIX дикого типа (Chang et al., J. Biol. Chem., 273:12089-94 (1998)). Примером потери функционального варианта является замена аланином лизина в пятом положении аминокислоты от начала зрелого белка, что приводит к образованию белка со сниженным связыванием с коллагеном IV (например, потерей функции).

«Островковая клетка» в настоящем документе означает любую клетку, которая встречается в природе, создана синтетически или модифицирована и предназначена для повторения, имитации или иного выражения, частично или полностью, функций, частично или полностью, клеток панкреатических островков Лангерганса. Термин «островковая клетка» включает реагирующую на глюкозу и продуцирующую инсулин клетку, полученную из стволовой клетки, например, из линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

«Генетически модифицированная клетка» в настоящем документе представляет собой клетку (например, клетку RPE), имеющую неприродное изменение, и обычно содержит последовательность нуклеиновой кислоты (например, экзогенную ДНК или РНК) или полипептид, отсутствующий (или отсутствующий на другом уровне) в сходной в остальном клетке в аналогичных условиях, которая не является генетически модифицированной (например, не имеет экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты). В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка содержит экзогенную нуклеиновую кислоту (например, вектор или измененную хромосомную последовательность). В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка содержит экзогенный полипептид. В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, например, последовательность, например, ДНК или РНК, не присутствующую в аналогичной клетке, которая не является генетически модифицированной. В одном варианте осуществления экзогенная последовательность

нуклеиновой кислоты является хромосомной, например, экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой экзогенную последовательность, расположенную в эндогенной хромосомной последовательности. В одном варианте осуществления последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты является хромосомной или внехромосомной, например, неинтегрированный вектор. В одном варианте осуществления экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность РНК, например, мРНК. В одном варианте осуществления экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит хромосомную или внехромосомную экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, которая экспрессируется в виде РНК, например, мРНК или регуляторной РНК. В одном варианте осуществления экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит хромосомную или внехромосомную последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, которая кодирует полипептид или которая экспрессируется как полипептид. В одном варианте осуществления экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит первую хромосомную или внехромосомную экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая модулирует конформацию или экспрессию второй последовательности нуклеиновой кислоты, причем вторая аминокислотная последовательность может быть экзогенной или эндогенной. Например, генетически модифицированная клетка может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая контролирует экспрессию эндогенной последовательности. В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка содержит полипептид, присутствующий на уровне или в распределении, который отличается от уровня, обнаруженного в аналогичной клетке, которая не была генетически модифицирована. В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка содержит RPE, генетически модифицированный для продуцирования РНК или полипептида. Например, генетически модифицированная клетка может содержать экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую хромосомную или внехромосомную экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, которая экспрессируется в виде РНК, например, мРНК или регуляторной РНК. В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка (например, клетка RPE) содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит хромосомную или внехромосомную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, которая кодирует полипептид или которая экспрессируется как полипептид. В одном варианте осуществления полипептид кодируется последовательностью, оптимизированной по кодонам, для достижения более высокой экспрессии полипептида, чем встречающаяся в природе кодирующая последовательность. Оптимизированная по кодонам последовательность может быть создана с использованием коммерчески доступного алгоритма, например, GeneOptimizer (ThermoFisher Scientific), OptimumGene™ (GenScript, Пискатауэй, Нью-Джерси, США), GeneGPS® (ATUM, Ньюарк,

Калифорния, США) или Java Codon Adaptation Tool (JCat, www.jcat.de, Grote, A. et al., Nucleic Acids Research, Vol 33, Issue suppl_2, pp. W526-W531 (2005)). В одном варианте осуществления генетически модифицированная клетка (например, клетка RPE) содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, которая модулирует конформацию или экспрессию эндогенной последовательности. В одном варианте осуществления генетически модифицированную клетку (например, клетку RPE) культивируют из популяции стабильно трансфицированных клеток или из моноклональной клеточной линии. «Пептид», используемый в настоящем документе, представляет собой полипептид, содержащий менее 50 аминокислот, обычно менее 25 аминокислот.

«Белок идуронат-2-сульфатаза», «белок IDS», «белок I2S» и «белок альфа-L-идуронатсульфатаза» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо для обозначения белка, который содержит зрелую аминокислотную последовательность, кодируемую геном IDS млекопитающего дикого типа (например, человека) или любым его фрагментом, мутантом, вариантом или производным, которые имеют активность фермента IDS, находящуюся в пределах 80-120%, 85-115%, 90-110% или 95-105% от соответствующего зрелого белка IDS млекопитающего дикого типа, как определено с помощью любого известного в данной области техники анализа IDS. IDS гидролизует 2-сульфатные группы L-идуронат-2-сульфатных единиц дерматансульфата, гепарансульфата и гепарана. Ген IDS человека дикого типа кодирует прополипептид-предшественник из 550 аминокислот, из которых 25 N-концевых аминокислот составляют сигнальный пептид, а остальные аминокислоты составляют про-полипептид, который процессируется в зрелый полипептид путем удаления пропептида из аминокислот 26-33 и затем расщепляется на две цепи, образованные аминокислотами 34-455 и аминокислотами 456-550. (UniProtKB - P22304). В одном варианте осуществления белок GBA является частью слитого белка, который дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей из одного или нескольких гетерологичных полипептидов.

«Осмоляльность» и «мОсм» используются в данном документе для обозначения меры осмотического давления растворенных частиц растворенного вещества в водном растворе. Частицы растворенного вещества включают как ионы, так и неионизированные молекулы. Осмоляльность обычно выражают как концентрацию осмотически активных частиц (т. е. осмолей), растворенных в 1 кг раствора. «Осмолярность», напротив, относится к числу частиц растворенного вещества, растворенных в 1 литре раствора. Для водного раствора осмолярность зависит от температуры, поскольку вода меняет свой объем с температурой. Следовательно, осмоляльность является предпочтительной мерой для водного раствора, поскольку она не зависит от температуры. Если концентрация растворенных веществ очень низкая, осмолярность и осмоляльность считаются эквивалентными. Используемое в данном документе сокращение «мОсм» означает «миллиосмоль/кг раствора».

«Пептид», используемый в настоящем документе, представляет собой полипептид, содержащий менее 50 аминокислот, обычно менее 25 аминокислот.

Сигнал «полиА», используемый в данном документе, относится к любой непрерывной последовательности адениловых кислот, которая завершает транскрипцию кодирующей последовательности в РНК и направляет добавление хвоста полиА к РНК. Длина последовательности полиА составляет от 10 до 200 нуклеотидов и может регулироваться по-разному в зависимости от допустимого размера основной цепи вектора экспрессии. Примерами сигналов полиА являются сигнал полиА кроличьего связывающего глобулина (rBG), поздний сигнал полиА SV40, сигнал полиА SV50, сигнал полиА бычьего гормона роста (BGH), сигнал полиА гормона роста человека (HGH) и синтетические сигналы полиА, известные в данной области техники.

«Полимерная композиция» в настоящем документе представляет собой композицию (например, раствор, смесь), содержащую один или несколько полимеров. Как класс «полимеры» включают гомополимеры, гетерополимеры, сополимеры, блок-полимеры, блок-сополимеры и могут быть как встречающимися в природе, так и синтетическими. Гомополимеры содержат один тип строительного блока или мономера, тогда как сополимеры содержат более одного типа мономера.

«Полипептид» в настоящем документе представляет собой полимер, содержащий аминокислотные остатки, связанные пептидными связями и имеющие по меньшей мере два, а в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 50, 75, 100, 150 или 200 аминокислотных остатков.

«Предотвращение», «предотвращать» и «предотвращающий» в контексте настоящего документа относятся к лечению, которое включает введение или применение терапии, например, введение композиции гидрогелевой капсулы, описанной в настоящем документе, до начала заболевания, нарушения или состояния, для исключения физического проявления указанного заболевания, нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления «предотвращение», «предотвращать» и «предотвращающий» подразумевают, что признаки или симптомы заболевания, расстройства или состояния еще не развились или еще не наблюдались. В некоторых вариантах осуществления лечение включает предотвращение, а в других вариантах осуществления не включает.

«Промоторная последовательность» в контексте настоящего документа относится к нуклеотидной последовательности, которая способна управлять экспрессией в клетке млекопитающего, например, клетке человека, например, клетке ARPE-19. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность происходит от сильного промотора млекопитающих, например, промоторной последовательности человека. Неограничивающие примеры сильных промоторов для использования в генетически модифицированных клетках, описанных в настоящем документе, включают промотор EF-1 альфа (EF1A), промотор CAG, промотор PGK (фосфолицераткиназы) и промотор АСТВ (бета-актина человека). В одном варианте осуществления промоторная последовательность может происходить из промотора средней силы, например, последовательности промотора EFS, которая представляет собой укороченную форму последовательности промотора EF1A.

«Белок» в настоящем документе включает одну или несколько полипептидных цепей длиной по меньшей мере 50 аминокислот. В одном варианте осуществления белок имеет две или более полипептидные цепи, имеющие идентичные или неидентичные аминокислотные последовательности длиной по меньшей мере 50 аминокислот. В одном варианте осуществления полипептидные цепи в белке нековалентно связаны или ковалентно соединены, например, через дисульфидную связь(-и).

«Клетка RPE» в контексте настоящего документа относится к клетке, имеющей одну или несколько из следующих характеристик: а) она содержит клетку пигментного эпителия сетчатки (RPE) (например, культивируемую с использованием клеточной линии ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™)) или клетку, полученную из нее, например, путем стабильной трансфекции клеток, культивируемых из клеточной линии ARPE-19, с экзогенной последовательностью, которая кодирует терапевтическое вещество, или иного конструирования таких культивируемых клеток ARPE-19 для экспрессии экзогенного белка или другого экзогенного вещества, клетку, полученную из первичной клеточной культуры клеток RPE, клетку, выделенную непосредственно (без длительного культивирования, например, менее 5 или 10 пассажей или циклов клеточного деления с момента выделения) из встречающихся в природе клеток RPE, например, от человека или другого млекопитающего, клетку, полученную из трансформированной, иммортализованной или долговременной (например, более 5 или 10 пассажей или циклов клеточного деления) культуры клеток RPE; б) клетка, которая была получена из менее дифференцированной клетки, например, клетка, разработанная, запрограммированная или перепрограммированная (например, *in vitro*) в клетку RPE, или клетка, которая, за исключением какой-либо генной инженерии, по существу подобна одной или более встречающимся в природе клеткам RPE или клеток из первичной или долгосрочной культуры клеток RPE (например, клетка может быть получена из клетки IPS); или с) клетка, которая обладает одной или несколькими из следующих характеристик: i) она экспрессирует один или несколько биомаркеров CRALBP, RPE-65, RLBP, BEST1 или α B-кристаллин; ii) она не экспрессирует один или несколько биомаркеров CRALBP, RPE-65, RLBP, BEST1 или α B-кристаллин; iii) она естественным образом обнаруживается в сетчатке и образует монослой над хориоидальными кровеносными сосудами в оболочке Бруха; iv) она отвечает за эпителиальный транспорт, поглощение света, секрецию и иммунную модуляцию в сетчатке; или v) она была создана синтетически или модифицирована из встречающейся в природе клетки и имеет такое же или по существу такое же генетическое содержание и необязательно такое же или по существу такое же эпигенетическое содержание, что и иммортализованная клеточная линия RPE (например, клеточная линия ARPE-19 (ATCC® CRL-2302®)). В одном варианте осуществления клетка RPE, описанная в настоящем документе, генетически модифицирована, например, для придания ей нового свойства, например, клетка генетически модифицирована для экспрессии и секреции одного или нескольких терапевтических веществ. В других вариантах осуществления клетка RPE генетически не модифицирована.

«Идентичность последовательности» или «процент идентичности», когда используются в данном документе для обозначения двух нуклеотидных последовательностей или двух аминокислотных последовательностей, означают, что две последовательности одинаковы в пределах определенной области или содержат одинаковые нуклеотиды или аминокислоты в определенном процентном соотношении положений нуклеотидов или аминокислот в пределах указанного, когда две последовательности сравниваются и выравниваются для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области. Идентичность последовательности можно определить с использованием стандартных методов, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, любой из алгоритмов, описанных в публикации заявки на патент США № 2017/02334455. В одном варианте осуществления указанный процент идентичных положений нуклеотидов или аминокислот составляет по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше.

Термин «сферический», используемый в данном документе, означает гидрогелевую капсулу, имеющую изогнутую поверхность, которая образует сферу (например, полностью круглый шар) или сфероподобную форму, которая может иметь волны и волнистость, например, на поверхности. Сферы и сфероподобные объекты могут быть математически определены путем вращения кругов, эллипсов или их комбинаций вокруг каждой из трех перпендикулярных осей: a, b и c. Для сферы три оси имеют одинаковую длину. Как правило, сфероподобная форма представляет собой эллипсоид (для его усредненной поверхности) с полуглавными осями, отстоящими друг от друга в пределах 10%, или 5%, или 2,5%. Диаметр сферы или сфероподобной формы - это средний диаметр, например среднее значение полуглавных осей.

«Сфероид», как этот термин используется в данном документе для обозначения гидрогелевой капсулы, означает, что капсула имеет (i) идеальную или классическую форму сплюснутого сфероида или вытянутого сфероида или (ii) имеет поверхность, которая приблизительно образует сфероид, например, может иметь волны и волнистость и/или может представлять собой эллипсоид (для его усредненной поверхности) с полуглавными осями, расположенными в пределах 100% друг от друга.

Термин «субъект», используемый в настоящем документе, относится к человеку или животному, отличному от человека. В одном варианте осуществления субъектом является человек (т.е. мужчина или женщина), например, любой возрастной группы, педиатрический пациент (например, младенец, ребенок, подросток) или взрослый субъект (например, молодой взрослый, взрослый человек среднего возраста или пожилой взрослый). В одном варианте осуществления субъектом является животное, отличное от человека, например, млекопитающее (например, мышь, собака, примат (например, яванский макак или макака-резус)). В одном варианте осуществления субъект представляет собой коммерчески значимое млекопитающее (например, крупный рогатый скот, свинью, лошадь, овцу, козу, кошку или собаку) или птицу (например, коммерчески значимую птицу, такую как курица, утка, гусь или индюшка). В определенных вариантах осуществления животное является

млекопитающим. Животное может быть самцом или самкой и может находиться на любой стадии развития. Отличное от человека животное может быть трансгенным животным.

«Единица транскрипции» означает последовательность ДНК, например, присутствующую в экзогенной нуклеиновой кислоте, которая содержит по меньшей мере промоторную последовательность, функционально связанную с кодирующей последовательностью, и может также содержать один или несколько дополнительных элементов, которые контролируют или усиливают транскрипцию кодирующей последовательности в молекулы РНК или трансляцию молекул РНК в полипептидные молекулы. В некоторых вариантах осуществления единица транскрипции также содержит последовательность сигнала полиаденилирования (полиА) и сайт полиА.

«Лечение», «лечить» и «лечащий» в контексте настоящего документа относятся к одному или нескольким из уменьшения, обращения вспять, облегчения, задержки возникновения или подавления прогрессирования одного или нескольких симптомов, проявлений или основной причины заболевания, нарушения или состояния. В одном варианте осуществления лечение включает уменьшение, обратное действие, облегчение, задержку появления или ингибирование прогрессирования симптома заболевания, расстройства или состояния. В одном варианте осуществления лечение включает уменьшение, обратное действие, облегчение, задержку появления или ингибирование прогрессирования проявления заболевания, расстройства или состояния. В одном варианте осуществления лечение включает уменьшение, обратное действие, облегчение, снижение или отсрочку начала основной причины заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления «лечение», «лечить» и «осуществление лечения» подразумевают, что развились или наблюдались признаки или симптомы заболевания, расстройства или состояния. В других вариантах осуществления лечение может быть назначено при отсутствии признаков или симптомов заболевания или состояния, например, при профилактическом лечении. Например, терапия (например, композиция гидрогелевой капсулы) может быть назначена восприимчивому индивидууму до появления симптомов (например, с учетом истории симптомов и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также можно продолжить после исчезновения симптомов, например, чтобы отсрочить или предотвратить рецидив. В некоторых вариантах осуществления лечение включает предотвращение, а в других вариантах осуществления не включает.

Выбранные химические определения

Определения конкретных функциональных групп и химические термины описаны более подробно ниже. Химические элементы идентифицируются в соответствии с Периодической таблицей элементов, версией CAS, *Handbook of Chemistry and Physics*, 75th Ed., внутри обложки, и конкретные функциональные группы обычно определяются, как описано в ней. Кроме того, общие принципы органической химии, а также конкретные функциональные группы и реакционная способность, описаны в Thomas Sorrell, *Organic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March, *March Advanced*

Organic Chemistry, 5-е изд., John Wiley и Sons, Inc., Нью-Йорк, 2001; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Inc., Нью-Йорк, 1989; и Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, 3-е изд., Cambridge University Press, Кембридж, 1987.

Используемые здесь аббревиатуры имеют общепринятое значение в химическом и биологическом уровне техники. Химические структуры и формулы, изложенные здесь, построены в соответствии со стандартными правилами химической валентности, известными в химических областях техники.

Когда указан диапазон значений, он должен охватывать каждое значение и поддиапазон в пределах диапазона. Например, “C₁-C₆ алкил” предназначен для охвата, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁-C₆, C₁-C₅, C₁-C₄, C₁-C₃, C₁-C₂, C₂-C₆, C₂-C₅, C₂-C₄, C₂-C₃, C₃-C₆, C₃-C₅, C₃-C₄, C₄-C₆, C₄-C₅ и C₅-C₆ алкила.

Как используется в данном документе, термин «алкил» относится к радикалу неразветвленной или разветвленной насыщенной углеводородной группы, которая имеет от 1 до 24 атомов углерода («C₁-C₂₄ алкил»). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет 1-12 атомов углерода (“C₁-C₁₂ алкил”), 1-10 атомов углерода (“C₁-C₁₂ алкил”), 1-8 атомов углерода (“C₁-C₈ алкил”), 1-6 атомов углерода (“C₁-C₆ алкил”), 1-5 атомов углерода (“C₁-C₅ алкил”), 1-4 атома углерода (“C₁-C₄ алкил”), 1-3 атома углерода (“C₁-C₃ алкил”), 1-2 атома углерода (“C₁-C₂ алкил”) или 1 атом углерода (“C₁ алкил”). В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 2 до 6 атомов углерода («C₂-C₆ алкил»). Примеры C₁-C₆ алкильных групп включают метил(C₁), этил (C₂), н-пропил (C₃), изопропил (C₃), н-бутил (C₄), трет-бутил (C₄), втор-бутил (C₄), изо-бутил (C₄), н-пентил (C₅), 3-пентанил(C₅), амил (C₅), неопентил (C₅), 3-метил-2-бутанил (C₅), третичный амил (C₅) и н-гексил (C₆). Дополнительные примеры алкильных групп включают н-гептил (C₇), н-октил (C₈) и тому подобные. Каждый пример алкильной группы может быть независимо необязательно замещенным, то есть, незамещенным («незамещенный алкил») или замещенным («замещенный алкил») одним или более заместителями; например, от 1 до 5 заместителями, от 1 до 3 заместителей или 1 заместителем.

Как используется в данном документе, «алкенил» относится к радикалу неразветвленной или разветвленной углеводородной группы, которая имеет от 2 до 24 атомов углерода, одну или более двойных углерод-углеродных связей и не имеет тройных связей («C₂-C₂₄ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкенильная группа имеет 2-10 атомов углерода (“C₂-C₁₀ алкенил”), 2-8 атомов углерода (“C₂-C₈ алкенил”), 2-6 атомов углерода (“C₂-C₆ алкенил”), 2-5 атомов углерода (“C₂-C₅ алкенил”), 2-4 атома углерода (“C₂-C₄ алкенил”), 2-3 атома углерода (“C₂-C₃ алкенил”) или 2 атома углерода (“C₂ алкенил”). Одна или несколько двойных связей углерод-углерод могут быть внутренними (например, в 2-бутениле) или концевыми (например, в 1-бутениле). Примеры C₂-C₄ алкенильных групп включают этенил (C₂), 1-пропенил (C₃), 2-пропенил (C₃), 1-бутенил (C₄), 2-бутенил (C₄), бутаденил (C₄) и тому подобные. Примеры C₂-C₆ алкенильных групп включают вышеупомянутые C₂₋₄ алкенильные группы, а также пентенил (C₅), пентаденил (C₅), гексенил (C₆) и тому подобные. Каждый пример алкенильной группы может быть

независимо необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный алкенил») или замещенным («замещенный алкенил») одним или более заместителями; например, от 1 до 5 заместителями, от 1 до 3 заместителей или 1 заместителем.

Как используется в данном документе, термин «алкинил» относится к радикалу неразветвленной или разветвленной углеводородной группы, которая имеет от 2 до 24 атомов углерода, одну или более тройных углерод-углеродных связей («C₂-C₂₄ алкенил»). В некоторых вариантах осуществления алкинильная группа имеет 2-10 атомов углерода («C₂-C₁₀ алкинил»), 2-8 атомов углерода («C₂-C₈ алкинил»), 2-6 атомов углерода («C₂-C₆ алкинил»), 2-5 атомов углерода («C₂-C₅ алкинил»), 2-4 атомов углерода («C₂-C₄ алкинил»), 2-3 атома углерода («C₂-C₃ алкинил») или 2 атома углерода («C₂ алкинил»). Одна или более тройных углерод-углеродных связей может быть внутренней (например, в 2-бутиниле) или концевой (например, в 1-бутиниле). Примеры C₂-C₄ алкинильных групп включают этинил (C₂), 1-пропинил (C₃), 2-пропинил (C₃), 1-бутинил (C₄), 2-бутинил (C₄) и т. п. Каждый пример алкинильной группы может быть независимо необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный алкинил») или замещенным («замещенный алкинил») одним или более заместителями; например, от 1 до 5 заместителями, от 1 до 3 заместителей или 1 заместителем.

Как используется в данном документе, термин «гетероалкил» относится к нециклической стабильной неразветвленной или разветвленной цепи или их комбинациям, включающим по меньшей мере один атом углерода и по меньшей мере один гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N, P, Si и S, и где атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизирован. Гетероатом(ы) O, N, P, S и Si может (могут) быть помещен(-ы) в любом положении гетероалкильной группы. Примеры гетероалкильных групп включают, помимо прочего: -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, -CH=CH-N(CH₃)-CH₃, -O-CH₃ и -O-CH₂-CH₃. До двух или трех атомов могут быть последовательными, такими как, например, -CH₂-NH-OCH₃ и -CH₂-O-Si(CH₃)₃. Если упоминается «гетероалкил», а затем упоминаются конкретные гетероалкильные группы, такие как -CH₂O, -NR^{CR^D} или т. п., следует понимать, что термины гетероалкил и -CH₂O или -NR^{CR^D} не являются избыточными или взаимоисключающими. Скорее, конкретные гетероалкильные группы перечислены, чтобы добавить ясность. Таким образом, термин «гетероалкил» не следует интерпретировать в данном документе как исключение конкретных гетероалкильных групп, таких как -CH₂O, -NR^{CR^D} или т. п. Каждый пример гетероалкильной группы может быть независимо необязательно замещенным, *т. е.* незамещенным («незамещенный гетероалкил») или замещенным («замещенный гетероалкил») одним или более заместителями, *например*, от 1 до 5 заместителями, от 1 до 3 заместителей или 1 заместителем.

Термины «алкилен», «алкенилен», «алкинилен» или «гетероалкилен», сами по себе или как часть другого заместителя, означают, если не указано иное, двухвалентный

радикал, полученный из алкила, алкенила, алкинила или гетероалкила соответственно. Группа алкилена, алкенилена, алкинилена или гетероалкилена может быть описана, например, как C_1-C_6 -членный алкилен, C_2-C_6 -членный алкенилен, C_2-C_6 -членный алкинилен или C_1-C_6 -членный гетероалкилен, где термин «членный» относится к неводородным атомам внутри фрагмента. В случае гетероалкиленовых групп гетероатомы также могут занимать один или оба конца цепи (например, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино и т.п.). Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп ориентация связывающей группы не подразумевается направлением, в котором записана формула связывающей группы. Например, формула $-C(O)_2R'$ может означать оба $-C(O)_2R'$ и $-R'C(O)_2$.

Как используется в данном документе, «арил» относится к радикалу моноциклической или полициклической (*например*, бициклической или трициклической) $4n+2$ ароматической кольцевой системе (*например*, которая имеет 6, 10 или 14 π электронов, разделенных в циклической системе), имеющей 6-14 кольцевых атомов углерода и ноль гетероатомов, обеспеченных в ароматической кольцевой системе (« C_6-C_{14} арил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения арильная группа имеет шесть кольцевых атомов углерода (« C_6 арил»; *например*, фенил). В некоторых вариантах осуществления изобретения арильная группа имеет десять кольцевых атомов углерода (« C_{10} арил»; *например*, нафтил, такой как 1-нафтил и 2-нафтил). В некоторых вариантах осуществления изобретения арильная группа имеет четырнадцать атомов углерода в кольце (« C_{14} арил»; *например*, антрацил). Арильная группа может быть описана как, например, C_6-C_{10} -членный арил, где термин «членный» относится к не-водородным атомам кольца внутри фрагмента. Арильные группы включают фенил, нафтил, инденил и тетрагидронафтил. Каждый пример арильной группы может быть независимо необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный алкенил») или замещенным («замещенный алкенил») одним или более заместителями.

Как используется в данном документе, «гетероарил» относится к радикалу 5-10-членной моноциклической или бициклической $4n+2$ ароматической кольцевой системы (*например*, которая имеет 6 или 10 π электронов, разделенных в циклической системе), имеющей кольцевые атомы углерода и 1-4 кольцевых гетероатома, представленные в ароматической кольцевой системе, где каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-10-членный гетероарил»). В гетероарильных группах, которые содержат один или более атомов азота, точкой присоединения может быть атом углерода или азот, если позволяет валентность. Гетероарильные бициклические кольцевые системы могут включать один или более гетероатомов в одном или обоих кольцах. «Гетероарил» также включает кольцевые системы, где гетероарильное кольцо, как определено выше, является конденсированным с одной или более арильными группами, где точка присоединения находится либо на арильном, либо на гетероарильном кольце, и в таких случаях, количество членов кольца обозначает количество членов кольца в конденсированной (арильной/гетероарильной) кольцевой системе. В бициклических

гетероарильных группах, в которых одно кольцо не содержит гетероатома (*например*, индолил, хинолинил, карбазолил и *тому подобное*), точка присоединения может находиться на любом кольце, то есть на кольце с гетероатомом (*например*, 2-индолил) или на кольце, которое не содержит гетероатом (*например*, 5-индолил). Гетероарильная группа может быть описана как, например 6-10-членный гетероарил, где термин «членный» относится к не-водородным атомам внутри фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероарильная группа представляет собой 5-10-членную ароматическую кольцевую систему, которая имеет кольцевые атомы углерода и 1-4 гетероатома кольца, представленные в ароматической кольцевой системе, где каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-10-членный гетероарил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероарильная группа представляет собой 5-8-членную ароматическую кольцевую систему, которая имеет кольцевые атомы углерода и 1-4 гетероатома кольца, представленные в ароматической кольцевой системе, где каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-8-членный гетероарил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероарильная группа представляет собой 5-6-членную ароматическую кольцевую систему, которая имеет кольцевые атомы углерода и 1-4 гетероатома кольца, представленные в ароматической кольцевой системе, где каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-6-членный гетероарил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероарил имеет 1-3 кольцевых гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероарил имеет 1-2 кольцевых гетероатома, выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероарил имеет 1 кольцевой гетероатом, выбранный из азота, кислорода и серы. Каждый пример гетероарильной группы может быть независимо необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный гетероарил») или замещенным («замещенный гетероарил») одним или более заместителями.

Иллюстративные примеры 5-членных гетероарильных групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, пирролил, фуранил и тиофенил. Иллюстративные примеры 5-членных гетероарильных групп, содержащих два гетероатома, включают, без ограничения, имидазолил, пиразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил и изотиазолил. Типичные 5-членные гетероарильные группы, содержащие три гетероатома, включают, без ограничения, триазолил, оксадиазолил и тиадиазолил. Типичные 5-членные гетероарильные группы, содержащие четыре гетероатома, включают, без ограничения, тетразолил. Типичные 6-членные гетероарильные группы, содержащие один гетероатом, включают, без ограничения, пиридилил. Типичные 6-членные гетероарильные группы, содержащие два гетероатома, включают, без ограничения, пиридазинил, пиримидинил и пиразинил. Типичные 6-членные гетероарильные группы, содержащие три или четыре гетероатома, включают, без ограничения, тиазинил и татразинил, соответственно. Типичные 7-членные гетероарильные группы, содержащие один гетероатом, включают, без

ограничения, азепинил, оксепинил и тиепинил. Типичные 5,6-бициклические гетероарильные группы включают, без ограничения индолил, изоиндолил, индазолил, бензотриазолил, бензотиофенил, изобензотиофенил, бензофуранил, бензоизофуранил, бензимидазолил, бензоксазолил, бензизоксазолил, бензоксадиазолил, бензтиазолил, бензизотиазолил, бензтиадиазолил, индолизинил и пуринил. Типичные 6,6-бициклические гетероарильные группы включают, без ограничения, нафтиридинил, птеридинил, хинолинил, изохинолинил, циннолинил, хиноксалинил, фталазинил и хиназолинил. Другие иллюстративные гетероарильные группы включают гем и производные гема.

Как используется в данном документе, термины «арилен» и «гетероарилен» один или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из арила и гетероарила, соответственно.

Как используется в данном документе, «циклоалкил» относится к радикалу неароматической циклической углеводородной группы, содержащей от 3 до 10 кольцевых атомов углерода («C₃-C₁₀ циклоалкил») и 0 гетероатомов в неароматической кольцевой системе. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильная группа имеет 3-8 атомов углерода в кольце («C₃-C₈циклоалкил»), 3-6 атомов углерода в кольце («C₃-C₆ циклоалкил») или 5-10 атомов углерода в кольце («C₅-C₁₀ циклоалкил»). Циклоалкильная группа может быть описана как, например C₄-C₇-членный арил, где термин «членный» относится к неводородным атомам кольца внутри фрагмента. Типичные C₃-C₆ циклоалкильные группы включают, без ограничения, циклопропил (C₃), циклопропенил(C₃), циклобутил (C₄), циклобутенил (C₄), циклопентил(C₅), циклопентенил (C₅), циклогексил(C₆), циклогексенил (C₆), циклогексаденил (C₆) и тому подобные. Типичные C₃-C₈ циклоалкильные группы включают, без ограничения, вышеупомянутые C₃-C₆ циклоалкильные группы, а также циклогептил (C₇), циклогептенил (C₇), циклошептаденил (C₇), циклогептатриенил (C₇), циклооктил (C₈), циклооктенил (C₈), кубанил (C₈), бицикло[1.1.1]пентанил (C₅), бицикло[2.2.2]октанил (C₈), бицикло[2.1.1]гексанил (C₆), бицикло[3.1.1]гептанил (C₇) и тому подобное. Типичные C₃-C₁₀ циклоалкильные группы включают, без ограничения, вышеупомянутые C₃-C₈ циклоалкильные группы, а также циклононил (C₉), циклононенил (C₉), циклодецил (C₁₀), циклодеценил (C₁₀), октагидро-1*H*-инденил (C₉), декагидронафтаденил (C₁₀), спиро[4.5]деканил (C₁₀) и тому подобное. Как следует из вышеприведенных примеров, в конкретных вариантах осуществления изобретения, циклоалкильная группа представляет собой либо моноциклическую («моноциклический циклоалкил»), либо содержит конденсированную, соединенную мостиковой связью или спирокольцевую систему, такую как бициклическая система («бициклический циклоалкил») и может быть насыщенной или может быть частично ненасыщенной. «Циклоалкил» также включает кольцевые системы, где циклоалкильное кольцо, как определено выше, является конденсированным с одной или более арильными группами, где точка присоединения находится на циклоалкильном кольце, и в таких случаях, количество атомов углерода по-прежнему указывает количество атомов углерода в циклоалкильной кольцевой системе. Каждый пример циклоалкильной группы может быть независимо

необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный гетероарил») или замещенным («замещенный гетероарил») одним или более заместителями.

«Гетероциклил», как используется в данном документе, относится к радикалу 3-10-членной неароматической кольцевой системы, имеющей кольцевые атомы углерода и от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, где каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода, серы, бора, фосфора и кремния («3-10-членный гетероциклил»). В гетероциклильных группах, которые содержат один или более атомов азота, точкой присоединения может быть атом углерода или азота, как позволяет валентность. Гетероциклическая группа может быть либо моноциклической («моноциклическая гетероциклическая»), либо конденсированной, соединенной мостиковой связью или спиро-кольцевой системой, такой как бициклическая система («бициклический гетероциклил») и может быть насыщенной или может быть частично ненасыщенной. Гетероциклические бициклические кольцевые системы могут включать один или более гетероатомов в одном или обоих кольцах. «Гетероциклил» также включает кольцевые системы, в которых гетероциклическое кольцо, как определено выше, конденсировано с одной или несколькими циклоалкильными группами, где точка присоединения находится либо на циклоалкильном, либо на гетероциклильном кольце, или кольцевые системы, где гетероциклическое кольцо, как определено выше, конденсировано с одной или несколькими арильными или гетероарильными группами, где точка присоединения находится на гетероциклическом кольце, и в таких случаях число членов кольца продолжает обозначать количество членов кольца в гетероциклической кольцевой системе. Гетероциклическая группа может быть описана как, например, 3-7-членный гетероциклил, где термин «членный» относится к не водородным кольцевым атомам, то есть к углероду, азоту, кислороду, сере, бору, фосфору и кремнию, внутри фрагмента. Каждый пример гетероциклической группы может быть независимо необязательно замещенным, то есть незамещенным («незамещенный гетероциклил») или замещенным («замещенный гетероциклил») одним или более заместителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклическая группа является незамещенным 3-10-членным гетероциклилом. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклическая группа является замещенным 3-10-членным гетероциклилом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклильная группа представляет собой 5-10-членную неароматическую кольцевую систему, имеющую кольцевые атомы углерода и 1-4 кольцевых гетероатомов, причем каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода, серы, бора, фосфора и кремния («5-10-членный гетероциклил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклильная группа представляет собой 5-8-членную неароматическую кольцевую систему, имеющую кольцевые атомы углерода и 1-4 кольцевые гетероатома, причем каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-8-членный гетероциклил»). В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклильная группа представляет собой 5-6-членную неароматическую кольцевую систему, имеющую кольцевые атомы углерода и 1-

4 кольцевые гетероатома, причем каждый гетероатом независимо выбран из азота, кислорода и серы («5-6-членный гетероцикл»). В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероцикл имеет 1-3 кольцевых гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероцикл имеет 1-2 кольцевых гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы. В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-6-членный гетероцикл имеет один кольцевой, атом выбранный из азота, кислорода и серы.

Типичные 3-членные гетероциклические группы, содержащие один гетероатом, включают, без ограничения, азирдинил, оксиранил, тиоренил. Иллюстративный пример 4-членных гетероциклических групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, азетидинил, оксетанил и тиетанил. Иллюстративные примеры 5-членных гетероциклических групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиофенил, дигидротиофенил, пирролидинил, дигидропирролил и пирролил-2,5-дион. Типичные 5-членные гетероциклические группы, содержащие два гетероатома, включают, без ограничения, диоксоланил, оксасульфуранил, дисульфуранил и оксазолидин-2-он. Типичные 5-членные гетероарильные группы, содержащие три гетероатома, включают, без ограничения, триазолинил, оксадиазолинил и тиадиазолинил. Иллюстративные примеры 6-членных гетероциклических групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, дигидропиридинил и тианил. Типичные 6-членные гетероциклические группы, содержащие два гетероатома, включают, без ограничения, пиперазинил, морфолинил, дитианил, диоксанил. Типичные 6-членные гетероциклические группы, содержащие два гетероатома, включают, без ограничения, триазинанил тиоморфолинил-1,1-диоксид.

Иллюстративные примеры 7-членных гетероциклических групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, азепанил, оксепанил и тиепанил. Иллюстративные примеры 8-членных гетероциклических групп, содержащих один гетероатом, включают, без ограничения, азоканил, оксеканил и тиоканил. Типичные 5-членные гетероциклические группы, конденсированные с C_6 арильным кольцом (также называемым здесь 5,6-бициклическое гетероциклическое кольцо), включает, без ограничения, индолинил, изоиндолинил, дигидробензофуранил, дигидробензотиенил, бензоксазолинонил и тому подобное. Типичные 6-членные гетероциклические группы, конденсированные с арильным кольцом (также называемым здесь 6,6-бициклическое гетероциклическое кольцо), включает, без ограничения, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил и тому подобное.

«Амино» в контексте настоящего документа относится к радикалу $-NR^{70}R^{71}$, где каждый из R^{70} и R^{71} представляет собой независимо водород, C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_{10} циклоалкил, C_4 - C_{10} гетероцикл, C_6 - C_{10} арил и C_5 - C_{10} гетероарил. В некоторых вариантах осуществления амино относится к NH_2 .

В настоящем документе «циано» относится к радикалу $-CN$.

Как используется в данном документе, «галоген» независимо или как часть другого заместителя означает, если не указано иное, атом фтора (F), хлора (Cl), брома (Br) или йода (I).

Используемый в данном документе термин «гидроксид» относится к радикалу -ОН.

Алкильная, алкенильная, алкинильная, гетероалкил, циклоалкильная, гетероциклическая, арильная и гетероарильная группы, как определено в данном документе, необязательно замещены (*например*, «замещенная» или «незамещенная» алкильная, «замещенная» или «незамещенная» алкенильная, «замещенная» или «незамещенная» алкинильная, «замещенная» или «незамещенная» гетероалкильная, «замещенная» или «незамещенная» циклоалкильная, «замещенная» или «незамещенная» гетероциклическая, «замещенная» или «незамещенная» арильная или «замещенная» или «незамещенная» гетероарильная группа). Как правило, термин «замещенный», предшествует ли ему термин «необязательно» или нет, означает, что по меньшей мере один водород, присутствующий в группе (*например*, атом углерода или азота), заменен допустимым заместителем, *например*, заместителем который после замещения приводит к образованию стабильного соединения, *например*, соединения, которое самопроизвольно не подвергается превращению, такому как перегруппировка, циклизация, отщепление или другая реакция. Если не указано иное, «замещенная» группа имеет заместитель в одном или нескольких замещаемых положениях группы и когда замещено более одного положения в любой данной структуре, заместитель является либо одинаковым, либо различным в каждой позиции. Предполагается, что термин «замещенный» включает замещение всеми допустимыми заместителями органических соединений, такими как любой из заместителей, описанных здесь, что приводит к образованию стабильного соединения. В настоящем изобретении рассматриваются любые и все такие комбинации, чтобы получить стабильное соединение. Для целей данного изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любой подходящий заместитель, как описано здесь, которые удовлетворяют валентности гетероатомов и приводят к образованию стабильного фрагмента.

Два или более заместителей необязательно могут быть присоединены с образованием арильных, гетероарильных, циклоалкильных или гетероциклических групп. Такие так называемые кольцеобразующие заместители обычно, хотя и не обязательно, обнаруживаются в циклической базовой структуре. В одном варианте осуществления изобретения, кольцеобразующие заместители присоединены к смежным элементам базовой структуры. Например, два кольцеобразующих заместителя, присоединенные к смежным элементам циклической базовой структуры, создают конденсированную кольцевую структуру. В другом варианте осуществления изобретения, кольцеобразующие заместители присоединены к одному члену базовой структуры. Например, два кольцеобразующих заместителя, присоединенные к одному члену базовой структуры, создают конденсированную кольцевую структуру. В еще одном варианте осуществления изобретения кольцеобразующие заместители присоединены к несмежным членам базовой структуры.

Соединения формулы (I), описанные в данном документе, могут содержать один или несколько асимметричных центров и, следовательно, могут существовать в различных изомерных формах, например энантиомерах и/или диастереомерах. Например, описанные в данном документе соединения могут быть в форме индивидуального энантиомера, диастереомера или геометрического изомера или могут быть в форме смеси стереоизомеров, включая рацемические смеси и смеси, обогащенные одним или несколькими стереоизомерами. Изомеры могут быть выделены из смесей способами, известными специалистам в данной области, включая хиральную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и образование и кристаллизацию хиральных солей; или предпочтительные изомеры могут быть получены асимметричным синтезом. См., например, Jacques *et al.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen *et al.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); и Wilen, *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). Данное описание дополнительно охватывает соединения, описанные в данном документе, в виде индивидуальных изомеров, по существу, свободных от других изомеров, и, альтернативно, в виде смесей разнообразных изомеров.

Как используется в данном документе, чистое энантиомерное соединение по существу не содержит других энантиомеров или стереоизомеров соединения (то есть, в энантиомерном избытке). Другими словами, форма «S» соединения по существу свободна от формы «R» соединения и, таким образом, находится в энантиомерном избытке формы «R». Термин «энантиомерно чистый» или «чистый энантиомер» означает, что соединение содержит более чем 75 мас.%, более чем 80 мас.%, более чем 85 мас.%, более чем 90 мас.%, более чем 91 мас.%, более чем 92 мас.%, более чем 93 мас.%, более чем 94 мас.%, более чем 95 мас.%, более чем 96 мас.%, более чем 97 мас.%, более чем 98 мас.%, более чем 99 мас.%, более чем 99,5 мас.%, или более чем 99,9 мас.% энантиомера. В некоторых вариантах осуществления массы основаны на общей массе всех энантиомеров или стереоизомеров соединения.

Соединения формулы (I), описанное в данном документе, может также включать одну или несколько изотопных замен. Например, Н может находиться в любой изотопной форме, включая ^1H , ^2H (D или дейтерий) и ^3H (T или тритий); С может быть в любой изотопной форме, включая ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; О может быть в любой изотопной форме, включая ^{16}O и ^{18}O , и тому подобное.

Подразумевается, что термин «фармацевтически приемлемая соль» включает соли активных соединений, которые получают с относительно нетоксичными кислотами или основаниями, в зависимости от конкретных заместителей, обнаруженных в описанных в данном документе соединениях. Когда соединения формулы (I), используемые для получения гидрогелевых капсул, по настоящему изобретению содержат относительно кислотные функциональные группы, соли присоединения оснований могут быть получены путем приведения в контакт нейтральной формы таких соединений с достаточным

количеством желаемого основания, как в чистом виде, так и в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения оснований включают натрий, калий, кальций, аммоний, органическую аминогруппу или магниевую соль или аналогичную соль. Когда соединения, использованные в данном изобретении, содержат относительно основные функциональные группы, соли присоединения кислот могут быть получены путем приведения в контакт нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемой кислоты, как чистой, так и в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, азотная, угольная, моногидрокарбоновая, фосфорная, моногидрофосфорная, дигидрофосфорная, серная, моногидросерная, йодистоводородная или фосфорная кислоты и т. п., а также соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомаляновая, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, молочная, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толилсульфоновая, лимонная, винная, метансульфоновая и т. п. Также включены соли аминокислот, таких как аргинат и тому подобное, и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуриновая кислоты и тому подобное (смотри, например, *Berge et al, Journal of Pharmaceutical Science* 66: 1-19 (1977)). Некоторые конкретные соединения, используемые в гидрогелевых капсулах, по данному изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, которые позволяют превращать соединения в соли основания или кислоты. Эти соли могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. Другие фармацевтически приемлемые носители, известные специалистам в данной области техники, подходят для применения в настоящем изобретении.



Гидрогелевые капсулы в композиции по настоящему изобретению, например, в совокупности гидрогелевых капсул в композиции, могут содержать соединение формулы (I) в форме пролекарства. Пролекарства представляют собой те соединения, которые легко претерпевают химические изменения в физиологических условиях с образованием соединений, полезных для приготовления капсул по настоящему изобретению. Кроме того, пролекарства могут быть превращены в используемые соединения формулы (I) химическими или биохимическими способами в среде *ex vivo*.

Некоторые соединения формулы (I), описанные в данном документе, могут существовать в несольватированных формах, а также в сольватированных формах, включая гидратированные формы. В общем, сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и включены в объем данного изобретения. Некоторые соединения формулы (I), описанные в данном документе, могут существовать в различных кристаллических или аморфных формах. В общем, все физические формы эквивалентны для применения, предусмотренного данным изобретением, и предназначены для того, чтобы находиться в пределах объема данного изобретения.

Термин «сольват» относится к формам соединения, которые связаны с

растворителем, обычно в результате реакции сольволиза. Эта физическая ассоциация может включать водородное связывание. Традиционные растворители включают воду, метанол, этанол, уксусную кислоту, ДМСО, ТГФ, диэтиловый эфир и т. д. Описанные в данном документе соединения могут быть получены, например, в кристаллической форме и могут быть сольватированы. Подходящие сольваты включают фармацевтически приемлемые сольваты и дополнительно включают как стехиометрические сольваты, так и нестехиометрические сольваты.

Термин «гидрат» относится к соединению, которое связано с водой. Как правило, число молекул воды, содержащихся в гидрате соединения, составляет определенное соотношение с числом молекул соединения в гидрате. Следовательно, гидрат соединения может быть представлен, например, общей формулой $R \cdot xH_2O$, где R представляет собой соединение, а x представляет собой число больше 0.

Символ «  », используемый в данном документе, относится к соединению с объектом, например, полимером (например, образующим гидрогель полимером, таким как альгинат) или поверхностью гидрогелевой капсулы. Соединение, представленное знаком «  », может относиться к прямому присоединению к объекту, например, к поверхности полимера или капсулы, может относиться к соединению с объектом через группу присоединения. «Группа присоединения», как описано в настоящем документе, относится к фрагменту, предназначенному для связывания соединения формулы (I) с объектом (например, полимером или гидрогелевой капсулой, как описано в настоящем документе), и может включать любую химию присоединения, известную в данной области техники. Перечень типичных групп присоединения приведен в *Bioconjugate Techniques* (3-е изд., Greg T. Hermanson, Waltham, MA: Elsevier, Inc, 2013), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения включает алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-N(R^C)-$, $-N(R^C)C(O)-$, $-C(O)N(R^C)-$, $-N(R^C)N(R^D)-$, $-NCN-$, $-C(=N(R^C)(R^D))O-$, $-S-$, $-S(O)_x-$, $-OS(O)_x-$, $-N(R^C)S(O)_x-$, $-S(O)_xN(R^C)-$, $-P(R^F)_y-$, $-Si(OR^A)_2-$, $-Si(R^G)(OR^A)-$, $-B(OR^A)-$ или металл, где каждый из R^A , R^C , R^D , R^F , R^G , x и y независимо определен в данном документе. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения включает амин, кетон, сложный эфир, амид, алкил. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой кросс-линкер. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)(C_1-C_6)^1$ и R^1 описан в данном документе. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкилен})-$, где алкилен замещен 1-2 алкильными группами (например, 1-2 метильными группами). В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)C(CH_3)_2-$. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)(\text{метилен})-$, где алкилен замещен 1-2

алкильными группами (например, 1-2 метильными группами). В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)CH(CH_3)-$. В некоторых вариантах осуществления группа присоединения представляет собой $-C(O)C(CH_3)-$.

Особенности композиций гидрогелевых капсул

Композиция гидрогелевых капсул по настоящему изобретению включает совокупность гидрогелевых капсул, расположенных в фармацевтически приемлемом водном растворе. Гидрогелевые капсулы в совокупности инкапсулируют клетки (например, клетки млекопитающих) и содержат полимер, образующий гидрогель, например, природный или синтетический полисахарид. Типичные полисахариды включают, например, альгинат, агар, агарозу, каррагинаны, целлюлозу и амилозу, хитин, хитозан и гиалуронат. Полимер, образующий гидрогель, может быть перекрестно-сшит, например, перекрестно-сшит диакрилатами, или может содержать полисахарид или его производное/модификацию, описанные, например, Laurienzo (2010), *Mar. Drugs*. 8.9:2435-65. В одном варианте осуществления капсулы содержат смесь двух или более полимеров, образующих гидрогель, например, смесь двух альгинатов, имеющих различное содержание G:M и/или различную среднюю молекулярную массу. В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы содержат ионно перекрестно-сшитый альгинат(-ы) (например, перекрестно-сшитый двухвалентными катионами, например, барием, кальцием, магнием или стронцием. В одном варианте осуществления капсулы в совокупности содержат альгинат, сшитый ионами.

Гидрогелевые капсулы в композиции могут иметь любую из множества форм: цилиндр, цилиндр с полусферическими концами (также известный как сфероцилиндр), диск, лента (например, как описано в WO 2015/191547), сфера (например, как определено в данном документе) или сфероид (например, как определено в настоящем документе). В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы представляют собой сферы, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления композиция включает одну или несколько дополнительных капсул, которые не обладают всеми характеристиками совокупности капсул, например, дополнительные капсулы без совокупности могут состоять из другого гидрогеля, могут иметь другую форму или размер, могут инкапсулировать различные типы клеток и/или среднее количество клеток или могут не инкапсулировать какие-либо клетки.

Водный раствор

В некоторых вариантах осуществления раствор в композиции гидрогелевой капсулы содержит элементарный кальций в концентрации по меньшей мере около 1,0 мМ, но не более около 10 мМ. В одном варианте осуществления концентрация элементарного кальция составляет менее около 6 мМ. В одном варианте осуществления концентрация элементарного кальция составляет от около 1,2 мМ до около 2,0 мМ. В одном варианте осуществления концентрация элементарного кальция составляет от около 1,5 мМ до около 2,5 мМ. В одном варианте осуществления концентрация элементарного кальция составляет около 2,0 мМ. Источником кальция может быть одна или несколько фармацевтически

приемлемых солей кальция, например, ацетат кальция, карбонат кальция, цитрат кальция, хлорид кальция или глюконат кальция. В одном варианте осуществления соль кальция представляет собой хлорид кальция.

Кальций можно измерить по количеству соли кальция (мг катиона плюс анион или мл указанной концентрации) или количеству элементарного кальция в миллиграммах (мг), миллиэквивалентах (мэкв.) или миллимолях (ммоль). Поскольку кальций имеет валентность +2, мэкв. в два раза превышает количество мМ. Калькулятор эквивалентов кальция находится в открытом доступе на веб-сайте Медицинского колледжа Корнелльского университета по адресу <http://www-users.med.cornell.edu/~spon/picu/calc/cacalc.htm>. Количества элементарного кальция в 1 г обычных солей кальция показаны в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Элементарный кальций в солях кальция.

<i>Соль</i>	<i>Элементарный кальций</i>			
	1 г	мэкв.	мг	ммоль
Ацетат кальция	1 г	12,6 мэкв.	253 мг	6,30 ммоль
Карбонат кальция	1 г	19,9 мэкв.	400 мг	9,96 ммоль
Цитрат кальция	1 г	10,5 мэкв.	211 мг	5,26 ммоль
Хлорид кальция	1 г	13,6 мэкв.	273 мг	6,80 ммоль
Глубионат кальция	1 г	3,29 мэкв.	66 мг	1,64 ммоль
Глуцептат кальция	1 г	4,08 мэкв.	82 мг	2,04 ммоль
Глюконат кальция	1 г	4,65 мэкв.	93 мг	2,32 ммоль

В некоторых вариантах осуществления водный раствор имеет осмоляльность от около 250 мОсм до около 350 мОсм, pH от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) (например, от 6,5 до 9,0) и содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около по меньшей мере 1,0 миллимоля (мМ) до около 10 мМ. Компоненты раствора должны быть фармацевтически приемлемыми для введения млекопитающему (например, человеку). Кроме того, компоненты раствора способны поддерживать жизнеспособность инкапсулированных клеток.

На жизнеспособность клеток может влиять осмоляльность водного раствора. Осмоляльность раствора можно поддерживать в желаемом диапазоне путем включения в раствор соответствующих количеств одного или нескольких осмотически активных агентов, известных в данной области техники, таких как ионы (например, натрий, калий, хлорид, бикарбонат, кальций, фосфат), моносахариды (например, глюкоза, фруктоза), олигосахариды (например, сахароза, лактоза, декстроза, маннит), аминокислоты и тому подобное. Осмоляльность раствора можно определить способами, известными в данной области техники, с использованием осмометра, например, осмометра понижения температуры замерзания. В одном варианте осуществления осмоляльность раствора может составлять, например, 250, 260, 265, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 или 350 мОсм/кг или любое числовое значение от около 250 до 350 мОсм/кг.

Поскольку рН водного раствора также может влиять на жизнеспособность и/или продуктивность клеток, рН обычно контролируют в пределах от 6,5 до 9,0 в диапазоне температур от 12°C до 30°C путем включения одного или нескольких фармацевтически приемлемых буферных агентов, обладающих соответствующим рКа и совместимых с жизнеспособностью клеток. Типичные буферы, которые подходят для включения в водный раствор, включают, помимо прочего, бикарбонатные соли, ацетатные соли, фосфатные соли, глюконатные соли и лактатные соли. В одном варианте осуществления буферный агент не является HEPES. В одном варианте осуществления буферный агент содержит ацетат натрия и глюконат натрия. В одном варианте осуществления буферный агент содержит бикарбонат натрия и фосфат натрия.

В некоторых вариантах осуществления водный раствор в композиции гидрогелевой капсулы также может включать по меньшей мере один источник углерода, способствующий поддержанию жизнеспособности клеток. В одном варианте осуществления источник углерода может представлять собой осмотически активный агент или буферный агент в растворе. В другом варианте осуществления каждый источник углерода отличается от других компонентов раствора. Типичные источники углерода включают соли глюконата, сахара (например, декстрозу, глюкозу, галактозу, гексозу, фруктозу, мальтозу), глицерин, глютамин и пируват (и фармацевтически приемлемые соли пирувата). В одном варианте осуществления глюконат натрия присутствует в растворе в качестве источника углерода, а также может действовать как буферный агент. В одном варианте осуществления раствор содержит глюкозу в качестве источника углерода. В одном варианте осуществления раствор содержит от около 5 до около 25 мМ D-глюкозы.

В одном варианте осуществления водный раствор в композиции гидрогелевой капсулы содержит, состоит по существу или состоит из хлорида кальция, хлорида натрия, ацетата натрия, глюконата натрия, хлорида калия и хлорида магния. В одном варианте осуществления раствор состоит по существу из компонентов, перечисленных в таблице 3А или 3В ниже.

Таблица 3А. Типичный водный раствор композиции гидрогелевой капсулы

Компонент	Концентрация (г/л)
Дигидрат хлорида кальция	Около 0,298
Хлорид натрия	Около 5,252
Ацетат натрия	Около 2,291
Глюконат натрия	Около 5,175
Хлорид калия	Около 0,3703
Хлорид магния гексагидрат	Около 0,302
Вода	Не применимо

Таблица 3В. Типичный водный раствор композиции гидрогелевой капсулы

Компонент	Концентрация (мМ)
------------------	--------------------------

Глицин	Около 0,400
Гидрохлорид L-аргинина	Около 0,398
Дигидрохлорид L-цистеина	Около 0,201
Моногидрат моногидрохлорида L-гистидина	Около 0,200
L-изолейцин	Около 0,802
L-лейцин	Около 0,802
Гидрохлорид L-лизина	Около 0,798
L-метионин	Около 0,201
L-фенилаланин	Около 0,400
L-серин	Около 0,400
L-треонин	Около 0,798
L-триптофан	Около 0,078
Дигидрат динатриевой соли L-тирозина	Около 0,398
L-валин	Около 0,803
Хлорид холина	Около 0,029
Пантотенат D-кальция	Около 0,008
Фолиевая кислота	Около 0,009
Ниацинамид	Около 0,038
Гидрохлорид пиридоксина	Около 0,018
Рибофлавин	Около 0,001
Гидрохлорид тиамин	Около 0,012

Изоинозитол	Около 0,040
Хлорид кальция (безводн.)	Около 1,802
Нонагидрат нитрата железа	Около $2,475 \times 10^{-4}$
Сульфат магния (безводн.)	Около 0,814
Хлорид калия	Около 5,333
Бикарбонат натрия	Около 44,048
Хлорид натрия	Около 110,345
Натрия фосфат моноосновный	Около 0,906
Вода	Не применимо

В одном варианте осуществления раствор из таблицы 3В дополнительно содержит D-глюкозу в количестве, выбранном из групп, состоящих из: от около 1 мМ до около 50 мМ; от около 2 мМ до около 40 мМ; от около 3 мМ до около 30 мМ; от около 4 мМ до около 20 мМ; от около 5 мМ до около 10 мМ; от около 10 мМ до около 40 мМ; от около 15 мМ до около 35 мМ; от около 20 мМ до около 30 мМ и около 25 мМ.

Гидрогелевые капсулы

Композиция содержит совокупность гидрогелевых капсул, инкапсулирующих клетки. Все гидрогелевые капсулы в совокупности имеют по существу схожий состав (например, альгинат(-ы) и любые другие полимеры, используемые в гидрогеле) и конфигурацию (например, форму, проницаемость, количество компартментов, содержащих клетки), что позволяет сохранять клетки внутри капсул и предотвращает проникновение иммунных клеток, одновременно позволяя питательным веществам проникать в капсулы и выходить из капсул клеточным отходам и терапевтическому веществу(-ам), продуцируемому клетками. Типичные капсулы, инкапсулирующие клетки, описаны в патентах США №№: 9867781; 10292936; 10786446; 10898443; и международных публикациях PCT: WO 2019/169245; WO 2019/195055; WO 2021/113751 и WO2021/113751.

В одном варианте осуществления каждая капсула в совокупности гидрогелевых капсул выполнена в виде гидрогелевой капсулы с двумя компартментами, в которой внутренний компартмент содержит первый альгинатный гидрогель, который инкапсулирует клетки, и внешний барьерный гидрогелевый компартмент (также называемый в данном документе внешним слоем), который полностью окружает внутренний компартмент и по существу не содержит инкапсулированные клетки. Барьерный компартмент содержит ионно перекрестно-сшитый альгинатный гидрогель,

который необязательно содержит смесь двух или более альгинатов, имеющих разные средние молекулярные массы.

В одном варианте осуществления внутренняя граница барьерного компартмента образует границу раздела с внешней границей внутреннего компартмента. В таких вариантах осуществления толщина барьерного компартмента означает среднее расстояние между внешней границей барьерного компартмента и границей раздела между двумя компартментами, например, среднее значение расстояний, измеренных в каждой из самых тонких и самых толстых точек, визуально наблюдаемых в барьерном компартменте. В некоторых вариантах осуществления (например, диаметр гидрогелевой капсулы составляет около 1,5 мм) самые меньшие и самые большие расстояния для барьерного компартмента составляют от 25 до 110 мкм и от 270 до 480 мкм соответственно. В некоторых вариантах осуществления толщина барьерного компартмента составляет более около 10 нм, предпочтительно 100 нм или более, и может достигать 1 мм. Например, толщина (например, среднее расстояние) барьерного компартмента в гидрогелевых капсулах, описанных в настоящем документе, может составлять от 10 нм до 1 мм, от 100 нм до 1 мм, от 500 нм до 1 мм, от 1 мкм до 1 мм, от 1 мкм до 1 мм, от 1 мкм до 500 мкм, от 1 мкм до 250 мкм, от 1 мкм до 1 мм, от 5 мкм до 500 мкм, от 5 мкм до 250 мкм, от 10 мкм до 1 мм, от 10 мкм до 500 мкм или от 10 мкм до 250 мкм. В некоторых вариантах осуществления толщина (например, среднее расстояние) барьерного компартмента составляет от 100 нм до 1 мм, от 1 мкм до 1 мм, от 1 мкм до 500 мкм или от 5 мкм до 1 мм. В некоторых вариантах осуществления толщина (например, среднее расстояние) барьерного компартмента составляет от около 50 мкм до около 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления (например, диаметр капсулы составляет около 1,5 мм) толщина барьерного компартмента (например, среднее расстояние) составляет от около 180 мкм до 260 мкм или от около 310 мкм до 440 мкм.

В некоторых вариантах осуществления средний размер пор внутреннего компартмента, содержащего клетки, и бесклеточного барьерного компартмента по существу одинаков. В некоторых вариантах осуществления средний размер пор внутреннего компартмента и барьерного компартмента различаются на около 1,5%, 2%, 5%, 7,5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или более. В некоторых вариантах осуществления средний размер пор капсулы (например, средний размер пор внутреннего компартмента и/или средний размер пор барьерного компартмента) зависит от ряда факторов, таких как материал(-ы) внутри каждого компартмента, а также наличие и плотность соединения формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления средний диаметр капсулы или размер двухкомпарментных гидрогелевых капсул в совокупности находится в любом из следующих диапазонов: от около 0,5 мм до около 8 мм, от около 0,5 мм до около 4 мм, от около 0,5 мм до около 2 мм, от около 0,7 до около 1,3 мм или от около 1,2 мм до около 1,8 мм.

В некоторых вариантах осуществления внешняя поверхность каждой гидрогелевой

капсулы в совокупности содержит соединение, способное ослаблять FBR, например, неволокнистое соединение формулы (I), как описано в настоящем документе ниже, например, соединение 101. Для капсул, содержащих барьерный компартмент, окружающий компартмент, содержащий клетки, неволокнистое соединение может быть ковалентно присоединено к полимеру (например, альгинату), расположенному по всему барьерному компартменту. В одном варианте осуществления некоторые или все мономеры полимера модифицированы одним и тем же соединением формулы (I). В некоторых вариантах осуществления некоторые или все мономеры полимера модифицированы различными соединениями формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления альгинатный гидрогель в барьерном компартменте содержит неволокнистый альгинат, например, альгинат, химически модифицированный соединением формулы (I). Альгинат в модифицированном альгинате может быть таким же или отличаться от любого немодифицированного альгината, присутствующего в капсуле. В одном варианте осуществления плотность соединения формулы (I) в модифицированном альгинате (например, степень конъюгации) составляет от около 4,0% до около 8,0%, от около 5,0% до около 7,0% или от около 6,0% и около 7,0% азота (например, как определено методом сжигания для процентного содержания азота). В одном варианте осуществления количество соединения 101 приводит к увеличению % N (по сравнению с немодифицированным альгинатом) от около 0,5% до 2%, от 2% до 4% N, от около 4% до 6% N, от около 6% до 8% или от около 8% до 10% N), где % N определяется методом сжигания и соответствует количеству соединения 101 в модифицированном альгинате.

В других вариантах осуществления плотность (например, концентрация) соединения формулы (I) (например, соединения 101) в неволокнистом альгинате определяется как % масс./масс., например, % массы амина/массы неволокнистого альгината в растворе (например, физиологическом растворе), как определено с помощью подходящего количественного анализа конъюгации аминов (например, с помощью анализа, описанного в WO 2020069429), и в некоторых вариантах осуществления плотность соединения формулы (I) (например, соединения 101) составляет от около 1,0% по массе до около 3,0% по массе, от около 1,3% по массе до около 2,5% по массе или от около 1,5% по массе до 2,2% по массе.

Альгинат в неволокнистом полимере может быть химически модифицирован соединением формулы (I) с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники. Например, альгинат-карбоновую кислотную группу можно активировать для связывания с одним или несколькими соединениями, функционализированными амином, с получением альгината, модифицированного соединением формулы (I). Альгинатный полимер можно растворить в воде (30 мл/грамм полимера) и обработать 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазином (0,5 экв.) и N-метилморфолином (1 экв.). К этой смеси можно добавить раствор соединения формулы (I) в ацетонитриле (0,3 M). Реакционную смесь можно нагреть до 55°C в течение 16 часов,

затем охладить до комнатной температуры и осторожно сконцентрировать посредством роторного испарения, затем остаток можно растворить, например, в воде. Затем смесь можно фильтровать, например, через слой цианомодифицированного силикагеля (Silicycle), а осадок на фильтре промывать водой. Полученный раствор затем можно подвергнуть диализу (мембрана с 10000 MWCO) против воды в течение 24 часов, например, дважды заменяя воду. Полученный раствор можно концентрировать, например, путем лиофилизации, чтобы получить желаемый химически модифицированный альгинат.

Альгинатный гидрогель в барьерном компартменте также может содержать немодифицированный альгинат. В некоторых вариантах осуществления альгинат представляет собой альгинат с высоким содержанием гулурановой кислоты (G) и содержит более около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более гулурановой кислоты (G). В некоторых вариантах осуществления альгинат представляет собой альгинат с высоким содержанием маннурановой кислоты (M) и содержит более около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более маннурановой кислоты (G). В некоторых вариантах осуществления соотношение M:G составляет около 1. В некоторых вариантах осуществления соотношение M:G составляет менее 1. В некоторых вариантах осуществления соотношение M:G больше 1 или соотношение G:M больше 1. В одном варианте осуществления немодифицированный альгинат в барьерном компартменте имеет молекулярную массу 150-250 кДа и соотношение G:M $\geq 1,5$.

В некоторых вариантах осуществления альгинатный гидрогель во внутреннем компартменте содержит альгинат, в котором соотношение G:M превышает 1, например, альгинат с низкой молекулярной массой (например, приблизительная молекулярная масса < 75 кДа) и соотношение G:M $\geq 1,5$, (ii) альгинат со средней молекулярной массой, например, имеет приблизительную молекулярную массу 75-150 кДа и соотношение G:M $\geq 1,5$, (iii) альгинат с высокой молекулярной массой, например, имеет приблизительную MW 150 кДа - 250 кДа и соотношение G:M $\geq 1,5$, (iv) или смесь двух или нескольких из этих альгинатов. В некоторых вариантах осуществления внутренний компартмент дополнительно содержит по меньшей мере одно клеточно-связывающее вещество (CBS), например, клеточно-связывающий пептид (CBP) или клеточно-связывающий полипептид (CBPP), описанный в WO 2020069429.

В некоторых вариантах осуществления внутренний компартмент содержит альгинат, ковалентно модифицированный пептидным фрагментом, связывающимся с линкерной клеткой, например, GRGD или GRGDSP. В одном варианте осуществления плотность клеточно-связывающего пептида во внутреннем компартменте (% азота, как определено методом сжигания, например, как описано в WO 2020198695) должна составлять по меньшей мере 0,05%, 0,1%, 0,2% или 0,3%, но менее 4%, 3%, 2% или 1%. В одном варианте осуществления общая плотность линкера-CBP во внутреннем компартменте составляет от около 0,1 до около 1,0 микромоляр CBP на г CBP-альгината (например, MMW-альгината, ковалентно модифицированного GRGD или GRGDSP в растворе, как определено методом количественной пептидной конъюгации, например,

метод, описанный в WO 2020198695. В одном варианте осуществления линкер-СВР представляет собой GRGDSP, а альгинат имеет молекулярную массу от 75 кДа до 150 кДа и соотношение G:M больше или равно 1,5. В одном варианте осуществления внутренний компартмент также содержит немодифицированный альгинат с молекулярной массой от 75 кДа до 150 кДа и соотношением G:M больше или равным 1,5.

В дополнение к альгинатному гидрогелю один или оба из внутреннего и внешнего компартментов могут дополнительно содержать неальгинатный полимер, который может представлять собой линейный, разветвленный или сшитый полимер, или полимер с выбранными диапазонами молекулярной массы, степенью полимеризации, вязкостью или скоростью потока расплава. Разветвленные полимеры могут включать один или несколько следующих типов: звездообразные полимеры, гребенчатые полимеры, щеточные полимеры, дендронизированные полимеры, лестничные полимеры и дендримеры. Неальгинатный полимер может представлять собой термочувствительный полимер, например, гель (например, становится твердым или жидким под воздействием тепла или определенной температуры) или фотоперекрестно-сшиваемый полимер. Примеры полимеров включают полистирол, полиэтилен, полипропилен, полиацетилен, поли(винилхлорид) (ПВХ), сополимеры полиолефинов, поли(уретаны), полиакрилаты и полиметакрилаты, полиакриламиды и полиметакриламиды, поли(метилметакрилат), поли(2-гидроксиэтилметакрилат), полиэферы, полисилоксаны, полидиметилсилоксан (PDMS), простые полиэферы, такие как полиэфиркетон (PEEK), поли(ортоэфир), поли(карбонаты), поли(гидроксиалканоаты), полифторуглероды, политетрафторэтилен (PTFE), силиконы, эпоксидные смолы, полиэтиленгликоль, нейлон, полиалкены, фенольные смолы, природные и синтетические эластомеры, клеи и герметики, полиолефины, полисульфоны, полиакрилонитрил, биополимеры, такие как полисахариды и природный латекс, коллаген, целлюлозные полимеры (например, алкилцеллюлозы и т. д.), полиэтиленгликоль и 2-гидроксиэтилметакрилат (HEMA), полисахариды, поли(гликолевая кислота), поли(L-молочная кислота) (PLLA), поли(молочная гликолевая кислота) (PLGA), полидиоксанон (PDA) или рацемическая поли(молочная кислота), поликарбонаты, (например, полиамиды (например, нейлон)), фторопласты, углеродное волокно, агароза, хитозан и их смеси или сополимеры.

В некоторых вариантах осуществления каждая капсула в совокупности гидрогелевых капсул содержит множество клеток (например, живых клеток), которые способны экспрессировать и секретировать по меньшей мере одно терапевтическое вещество (например, пептид или белок), когда гидрогелевую капсулу вводят субъекту, например, как часть всего объема капсульной композиции или ее аликвоты. В некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют два или более терапевтических вещества, например, белки с дополняющей активностью, полезные для лечения конкретного интересующего заболевания.

В одном варианте осуществления каждая гидрогелевая капсула совокупности содержит клетки (например, во внутреннем компартменте), которые происходят из одного

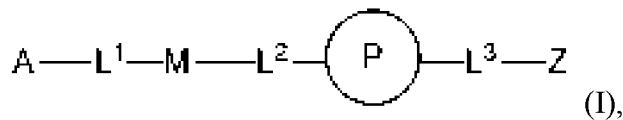
типа родительских клеток или смеси по меньшей мере двух разных типов родительских клеток. В одном варианте осуществления все клетки происходят из одного и того же типа родительских клеток, но первое множество производных клеток генетически модифицировано для экспрессии первого терапевтического вещества, а второе множество производных клеток генетически модифицировано для экспрессии второго терапевтического вещества. В композициях гидрогелевых капсул, которые содержат две или более совокупности гидрогелевых капсул, клетки и продуцируемое ими терапевтическое вещество(-а) могут быть одинаковыми или разными для каждой совокупности капсул.

В одном варианте осуществления клетки, подлежащие включению в описанную в данном документе гидрогелевую капсулу, перед инкапсулированием получают в форме клеточной суспензии. Клетки в суспензии могут иметь форму отдельных клеток (например, из однослойной культуры клеток) или присутствовать в другой форме, например, расположенной на микроносителе (например, шарике или матрице) или в виде трехмерного агрегата клетки (например, кластер клеток или сфероид). Клеточная суспензия может содержать множество кластеров клеток (например, в виде сфероидов) или микроносителей.

В дополнение к терапевтическому веществу(-ам), экспрессируемому инкапсулированными клетками, каждая гидрогелевая капсула совокупности капсул может содержать один или несколько экзогенных агентов, которые не экспрессируются клетками, и может включать, например, нуклеиновую кислоту (например, молекулу РНК или ДНК), белок (например, гормон, фермент (например, глюкозооксидаза, киназа, фосфатаза, оксигеназа, гидрогеназа, редуктаза), антитело, фрагмент антитела, антиген или эпителий)), активный или неактивный фрагмент белка или полипептида, небольшая молекула или лекарственное средство. В одном варианте осуществления капсула предназначена для высвобождения такого экзогенного агента.

Неволокнистые соединения

В некоторых вариантах осуществления гидрогелевые капсулы в совокупности гидрогелевых капсул, описанной в настоящем документе, содержат соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

A представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероцикл, арил, гетероарил, -O-, -C(O)O-, -C(O)-, -OC(O)-, -N(R^C)-, -N(R^C)C(O)-, -C(O)N(R^C)-, -N(R^C)C(O)(C₁-C₆- алкилен)-, -N(R^C)C(O)(C₂-C₆-алкенилен)-, -N(R^C)N(R^D)-, -NCN-, -C(=N(R^C)(R^D))O-, -S-, -S(O)_x-, -OS(O)_x-, -N(R^C)S(O)_x-, -S(O)_xN(R^C)-, -P(R^F)_y-, -Si(OR^A)₂ -, -Si(R^G)(OR^A)-, -B(OR^A)- или металл, каждый из которых необязательно связан с группой присоединения (например, группой присоединения, описанной в настоящем документе) и необязательно замещен одним или несколькими R¹;

каждый из L^1 и L^3 независимо представляет собой связь, алкил или гетероалкил, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещены одним или несколькими R^2 ;

L^2 представляет собой связь;

M отсутствует, представляет собой алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R^3 ;

P отсутствует, представляет собой циклоалкил, гетероциклил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R^4 ;

Z представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, $-OR^A$, $-C(O)R^A$, $-C(O)OR^A$, $-C(O)N(R^C)(R^D)$, $-N(R^C)C(O)R^A$, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^5 ;

каждый R^A , R^B , R^C , R^D , R^E , R^F и R^G независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, азидо, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^6 ;

или R^C и R^D , взятые вместе с атомом азота к которому они присоединены, образуют кольцо (например, 5-7-членное кольцо), необязательно замещены одним или несколькими R^6 ;

каждый R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, азидо, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-OC(O)R^{B1}$, $-N(R^{C1})(R^{D1})$, $-N(R^{C1})C(O)R^{B1}$, $-C(O)N(R^{C1})$, SR^{E1} , $S(O)_xR^{E1}$, $-OS(O)_xR^{E1}$, $-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}$, $S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})$, $-P(R^{F1})_y$, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^7 ;

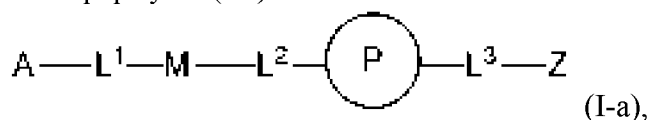
каждый R^{A1} , R^{B1} , R^{C1} , R^{D1} , R^{E1} и R^{F1} независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^7 ;

каждый R^7 независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, оксо, гидроксил, циклоалкил или гетероциклил;

x представляет собой 1 или 2; и

y представляет собой 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-a):



или его соль, где:

A представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил,

гетероциклил, арил, гетероарил, $-O-$, $-C(O)O-$, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-N(R^C)-$, $-N(R^C)C(O)-$, $-C(O)N(R^C)-$, $-N(R^C)N(R^D)-$, $-NCN-$, $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6-$ алкилен)-, $-N(R^C)C(O)(C_2-C_6-$ алкенилен)-, $-C(=N(R^C)(R^D))O-$, $-S-$, $-S(O)_x-$, $-OS(O)_x-$, $-N(R^C)S(O)_x-$, $-S(O)_xN(R^C)-$, $-P(R^F)_y-$, $-Si(OR^A)_2-$, $-Si(R^G)(OR^A)-$, $-B(OR^A)-$ или металл, каждый из которых необязательно связан с группой присоединения (например, группой присоединения, описанной в настоящем документе) и необязательно замещен одним или несколькими R^1 ;

каждый из L^1 и L^3 независимо представляет собой связь, алкил или гетероалкил, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещены одним или несколькими R^2 ;

L^2 представляет собой связь;

M отсутствует, представляет собой алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R^3 ;

P представляет собой гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими R^4 ;

Z представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R^5 ;

каждый R^A , R^B , R^C , R^D , R^E , R^F и R^G независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, азидо, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^6 ;

или R^C и R^D , взятые вместе с атомом азота к которому они присоединены, образуют кольцо (например, 5-7-членное кольцо), необязательно замещены одним или несколькими R^6 ;

каждый R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, азидо, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-OC(O)R^{B1}$, $-N(R^{C1})(R^{D1})$, $-N(R^{C1})C(O)R^{B1}$, $-C(O)N(R^{C1})$, SR^{E1} , $S(O)_xR^{E1}$, $-OS(O)_xR^{E1}$, $-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}$, $S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})$, $-P(R^{F1})_y$, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^7 ;

каждый R^{A1} , R^{B1} , R^{C1} , R^{D1} , R^{E1} и R^{F1} независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^7 ;

каждый R^7 независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, оксо, гидроксил, циклоалкил или гетероциклил;

x представляет собой 1 или 2; и

y представляет собой 2, 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) A представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил,


-O-, -C(O)O-, -C(O)-, -OC(O)-, -N(R^C)C(O)-, -N(R^C)C(O)(C₁-C₆-алкилен)-, -N(R^C)C(O)(C₂-C₆-алкенилен)- или -N(R^C)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероцикл, арил, гетероарил, -O-, -C(O)O-, -C(O)-, -OC(O) - или -N(R^C)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, -O-, -C(O)O-, -C(O)-, -OC(O) - или -N(R^C)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой алкил, -O-, -C(O)O-, -C(O)-, -OC(O) или -N(R^C)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)C(O)-, -N(R^C)C(O)(C₁-C₆-алкилен)- или -N(R^C)C(O)(C₁-C₆-алкенилен)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)-, и R^C и R^D независимо представляет собой водород или алкил. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -NH-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)C(O)(C₁-C₆-алкилен)-, где алкилен замещен R¹. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)C(O)(C₁-C₆-алкилен)-, и R¹ представляет собой алкил (например, метил). В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -NHC(O)C(CH₃)₂-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -N(R^C)C(O)(метил)-, и R¹ представляет собой алкил (например, метил). В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -NHC(O)CH(CH₃)-. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой -NHC(O)C(CH₃)₂-.

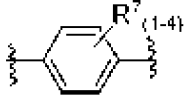
В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) L¹ представляет собой связь, алкил или гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой связь или алкил. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой C₁-C₆ алкил. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂CH₂CH₂ или -CH₂CH₂-. В некоторых вариантах осуществления L¹ представляет собой -CH₂- или -CH₂CH₂-.

В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) L³ представляет собой связь, алкил или гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой C₁-C₁₂ алкил. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой C₁-C₆ алкил. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой C₁-C₁₂ гетероалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R² (например, оксо). В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R² (например, оксо). В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой -C(O)OCH₂-, -CH₂(OCH₂CH₂)₂-, -CH₂(OCH₂CH₂)₃-, CH₂CH₂O- или -CH₂O-. В некоторых вариантах осуществления L³ представляет собой -CH₂O-.

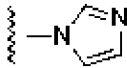
В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) М отсутствует,

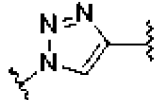
представляет собой алкил, гетероалкил, арил или гетероарил. В некоторых вариантах осуществления М представляет собой гетероалкил, арил или гетероарил. В некоторых вариантах осуществления М отсутствует. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой алкил (например, C₁-C₆ алкил). В некоторых вариантах осуществления m представляет собой -CH₂-. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой гетероалкил (например, C₁-C₆ гетероалкил). В некоторых вариантах осуществления m представляет собой (-OCH₂CH₂-)_z, где Z представляет собой целое число, выбранное из 1-10. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой целое число, выбранное из 1-5. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой -OCH₂CH₂-, (-OCH₂CH₂)₂, (-OCH₂CH₂)₃, (-OCH₂CH₂)₄ или (-OCH₂CH₂)₅. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой -OCH₂CH₂-, (-OCH₂CH₂)₂, (-OCH₂CH₂)₃ или (-OCH₂CH₂)₄. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой (-OCH₂CH₂)₃. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой арил. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой незамещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления m

представляет собой . В некоторых вариантах осуществления m представляет собой фенил, замещенный R⁷ (например, 1 R⁷). В некоторых вариантах осуществления m

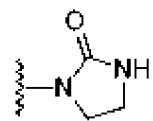
представляет собой . В некоторых вариантах осуществления R⁷ представляет собой CF₃.

В некоторых вариантах осуществления для формулы (I) или (I-a) р отсутствует, представляет собой гетероциклил или гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р отсутствует. В некоторых вариантах осуществления для формул (I) и (I-a) р представляет собой трициклический, бициклический или моноциклический гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой моноциклический гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой азот-содержащий гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой моноциклический, азот-содержащий гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 5-членный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 5-членный азот-содержащий гетероарил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой тетразолил, имидазолил, пиразолил или триазолил, пирролил, оксазолил или тиазолил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой тетразолил, имидазолил, пиразолил или триазолил или пирролил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой имидазолил. В некоторых вариантах осуществления р представляет

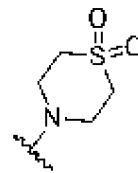
с собой . В некоторых вариантах осуществления р представляет собой триазалил. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 1,2,3-триазалил. В некоторых

вариантах осуществления р представляет собой .

В некоторых вариантах осуществления р представляет собой гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 5-членный гетероцикл или 6-членный гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой имидазолидинон. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой

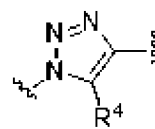


. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой тиоморфолин-1,1-диоксид.



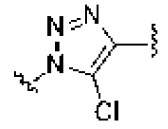
В некоторых вариантах осуществления р представляет собой

В некоторых вариантах осуществления р представляет собой триазалил, замещенный одним или несколькими R^4 . В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой дейтерий, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, азидо, $-N(R^{C1})(R^{D1})$, $-N(R^{C1})C(O)R^{B1}$, $-C(O)N(R^{C1})$, $-S(O)_xR^{E1}$, $-N(R^{C1})S(O)_xR^{E1}$, $-S(O)_xN(R^{C1})(R^{D1})$, $-P(R^{F1})_y$, циклоалкил, гетероцикл, арил, гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероцикл, арил и гетероарил необязательно замещен одним или несколькими R^7 . В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой дейтерий, алкил, гетероалкил, галоген, циано или азидо, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещен одним или несколькими R^7 (например, галоген). В некоторых



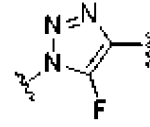
вариантах осуществления р представляет собой . В некоторых вариантах осуществления р представляет собой триазалил, замещенный R^4 (например, галоген). В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой дейтерий, алкил или галоген. В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой галоген (например, фтор, хлор, бром). В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой алкил (например, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CF_3$, $-CH_2F$, $-CHF_2$). В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет

собой хлор. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой



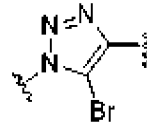
. В

некоторых вариантах осуществления R представляет собой



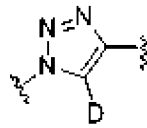
. В некоторых

вариантах осуществления R представляет собой



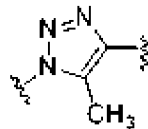
. В некоторых вариантах

осуществления R представляет собой



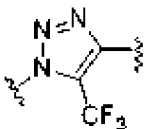
. В некоторых вариантах осуществления R

представляет собой

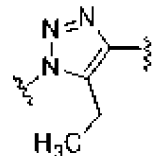


. В некоторых вариантах осуществления R представляет

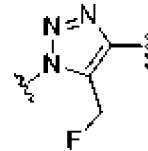
собой



. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой

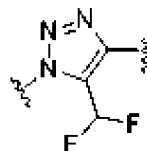


. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой

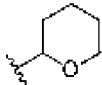


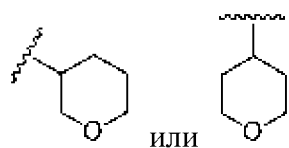
. В некоторых

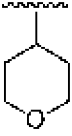
вариантах осуществления R представляет собой




В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) Z представляет собой алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероцикл, арил или гетероарил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой моноциклический или бициклический гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой кислород-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 4-членный гетероцикл, 5-членный гетероцикл или 6-членный гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 6-членный гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 6-членный кислород-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой

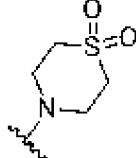
тетрагидропиранил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ,

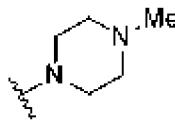


или . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 4-


членный кислород-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой .

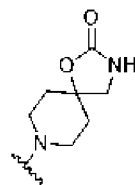
В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой бициклический кислород-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой фталевый ангидрид. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой серо-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 6-членный серо-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 6-членный гетероцикл, содержащий атом азота и атом серы. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой тиоморфолин-1,1-диоксид. В некоторых вариантах осуществления Z

представляет собой . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой азот-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z

представляет собой 6-членный азот-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой .

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой бициклический гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой бициклический азот-содержащий гетероцикл, необязательно замещенный одним или несколькими R⁵. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 2-окса-7-азаспиро[3.5]нонанил.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой 1-окса-3,8-диазаспиро[4.5]декан-2-он. В



некоторых вариантах осуществления Z представляет собой

В некоторых вариантах осуществления для формула (I) или (I-a), Z представляет собой арил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой моноциклический арил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил (например, $1 R^5$). В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ представляет собой азот-содержащую группу. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ представляет собой NH_2 . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ представляет собой кислород-содержащую группу. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ представляет собой кислород-содержащий гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ представляет собой OCH_3 . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ находится в орто-положении. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ находится в мета-положении. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой монозамещенный фенил, где $1 R^5$ находится в пара-положении.

В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) Z представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_{12} алкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_{10} алкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил, замещенный $1-5 R^5$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил, замещенный $1 R^5$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил, замещенный $1 R^5$, где R^5 представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-OC(O)R^{B1}$ или $-N(R^{C1})(R^{D1})$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил, замещенный $1 R^5$, где R^5 представляет собой $-OR^{A1}$ или $-C(O)OR^{A1}$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 алкил, замещенный $1 R^5$, где R^5 представляет собой $-OR^{A1}$ или $-C(O)OH$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-CH_3$.

В некоторых вариантах осуществления для формул (I) или (I-a) Z представляет собой гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_{12} гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_{10} гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_8 гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой C_1-C_6 гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой азот-содержащий гетероалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R^5 . В

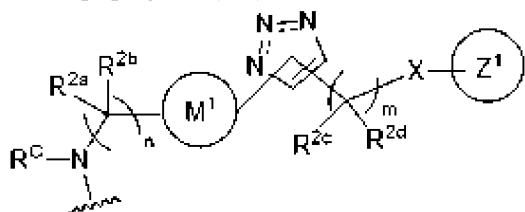
некоторых вариантах осуществления Z представляет собой азот- и серо-содержащий гетероалкил, замещенный 1-5 R^5 . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой N -метил-2-(метилсульфонил)этан-1-аминил.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-OR^A$ или $-C(O)OR^A$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-OR^A$ (например, $-OH$ или $-OCH_3$). В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-OCH_3$. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой $-C(O)OR^A$ (например, $-C(O)OH$).

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой связь и P и L^3 независимо отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой связь, P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой связь и Z представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой гетероалкил и Z представляет собой алкил.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-b):

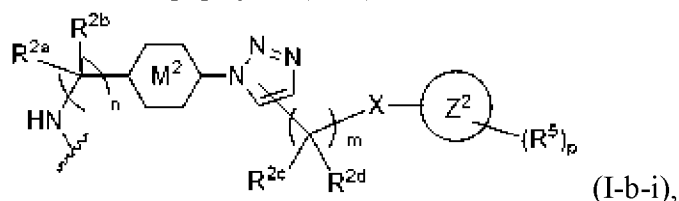


(I-b),

или его соль, где кольцо M^1 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен 1-5 R^3 ; кольцо Z^1 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, необязательно замещенный 1-5 R^5 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, нитро, amino, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил или каждый из R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; X отсутствует, представляет собой $N(R^{10})$, O или S ; R^C представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый R^3 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, азидо, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-OC(O)R^{B1}$, $-N(R^{C1})(R^{D1})$, $-N(R^{C1})C(O)R^{B1}$, $-C(O)N(R^{C1})$, SR^{E1} , циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; R^{10} представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-OC(O)R^{B1}$, $-C(O)N(R^{C1})$, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; каждый R^{A1} , R^{B1} , R^{C1} , R^{D1} и R^{E1} независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил, где каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил необязательно замещен 1-6 R^7 ; каждый R^7

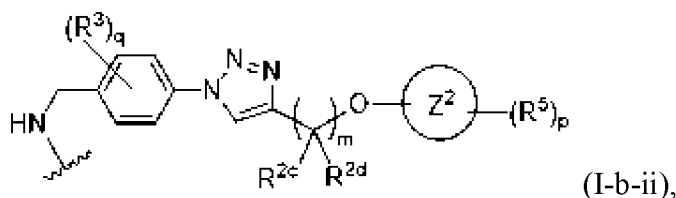
независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, оксо, гидроксил, циклоалкил или гетероциклил; каждый m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления для каждого R^3 и R^5 каждый алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил необязательно и независимо замещен галогеном, оксо, циано, циклоалкилом или гетероциклилом.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b) представляет собой соединение формулы (I-b-i):



или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо M^2 представляет собой арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими R^3 ; кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или каждый из R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; X отсутствует, представляет собой O или S ; каждый R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещен галогеном; или два R^5 взяты вместе с образованием 5-6-членного кольца, слитого с кольцом Z^2 ; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; p представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

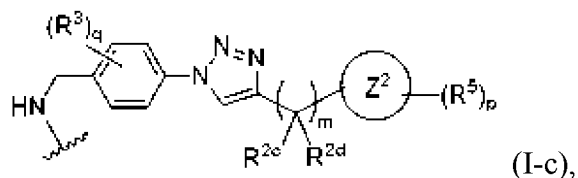
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b-i) представляет собой соединение формулы (I-b-ii):



или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; каждый из R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$, где каждый алкил и

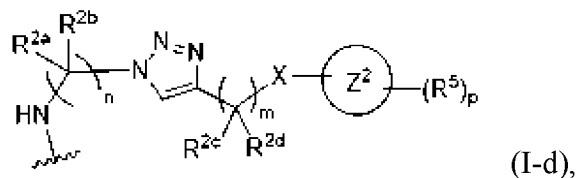
гетероалкил необязательно замещен галогеном; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из p и q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; m представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-c):



или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклический, арил или гетероарил; каждый из R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещен галогеном; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; m представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; каждый из p и q независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

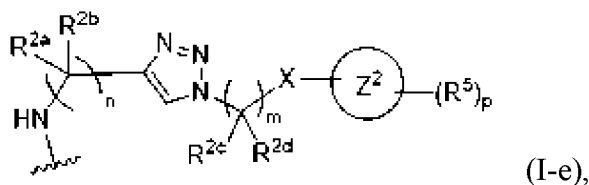
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-d):



или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклический, арил или гетероарил; X отсутствует, представляет собой O или S ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или каждый из R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещен галогеном; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; p представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

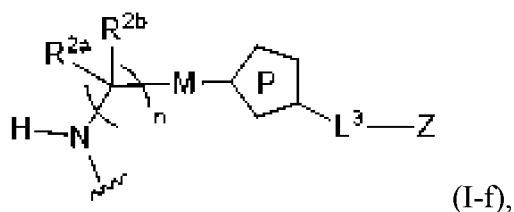
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой

соединение формулы (I-e):



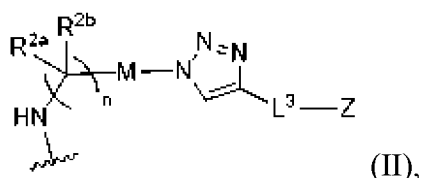
или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; X отсутствует, представляет собой O или S ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или каждый из R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; p представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-f):



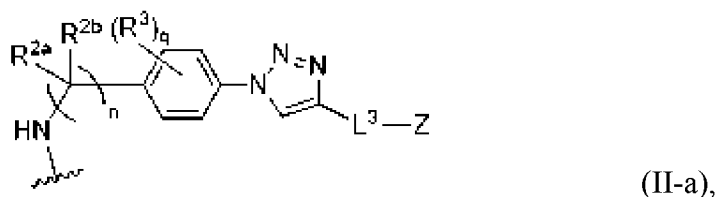
или его фармацевтически приемлемая соль, где M представляет собой алкил, необязательно замещенный одним или несколькими R^3 ; кольцо P представляет собой гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими R^4 ; L^3 представляет собой алкил или гетероалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R^2 ; Z представляет собой алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R^5 ; каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или R^{2a} и R^{2b} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (II):



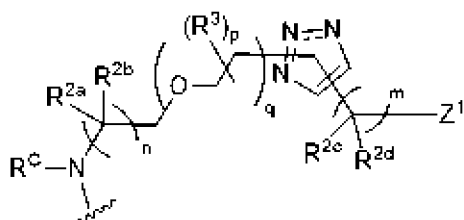
или его фармацевтически приемлемая соль, где M представляет собой связь, алкил или арил, где алкил и арил необязательно замещен одним или несколькими R³; L³ представляет собой алкил или гетероалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R²; Z представляет собой водород, алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил, гетероарил или -OR^A, где алкил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил и гетероарил необязательно замещены одним или несколькими R⁵; R^A представляет собой водород; каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или R^{2a} и R^{2b} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R², R³, и R⁵ независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, -OR^{A1}, -C(O)OR^{A1} или -C(O)R^{B1}; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (II-a):



или его фармацевтически приемлемая соль, где L³ представляет собой алкил или гетероалкил, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими R²; Z представляет собой водород, алкил, гетероалкил или -OR^A, где алкил и гетероалкил необязательно замещены одним или несколькими R⁵; каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил или R^{2a} и R^{2b} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый R², R³ и R⁵ независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, -OR^{A1}, -C(O)OR^{A1} или -C(O)R^{B1}; R^A представляет собой водород; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и “ ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

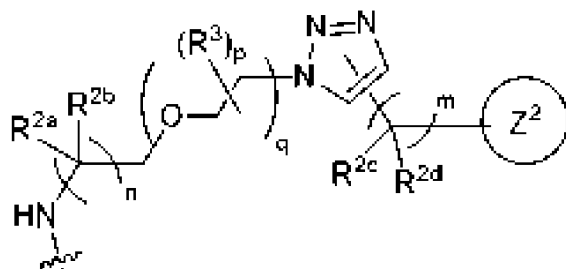
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (III):



(III),

или его фармацевтически приемлемая соль, где Z^1 представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен 1-5 R^5 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, нитро, amino, циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; R^C представляет собой водород, алкил, алкенил, алкинил или гетероалкил, где каждый алкил, алкенил, алкинил или гетероалкил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый из R^3 , R^5 , и R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; q представляет собой целое число от 0 до 25; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

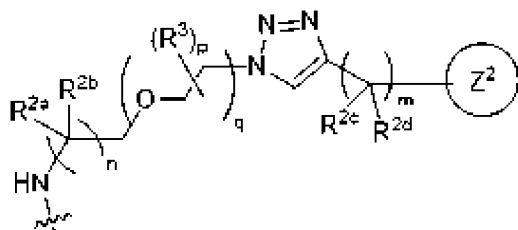
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) представляет собой соединение формулы (III-a):



(III-a),

или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен 1-5 R^5 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил, галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; o и p каждый независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; q представляет собой целое число от 0 до 25; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

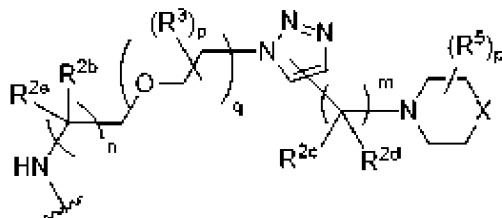
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III-a) представляет собой соединение формулы (III-b):



(III-b),

или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^2 представляет собой циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил, каждый из которых необязательно замещен 1-5 R^5 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил, галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; o и p каждый независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; q представляет собой целое число от 0 до 25; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

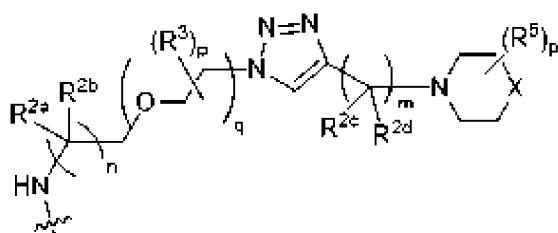
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III-a) представляет собой соединение формулы (III-c):



(III-c),

или его фармацевтически приемлемая соль, где X представляет собой $C(R')(R'')$, $N(R')$ или $S(O)_x$; каждый из R' и R'' независимо представляет собой водород, алкил, галоген или циклоалкил; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил или галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; p представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; q представляет собой целое число от 0 до 25; x представляет собой 0, 1 или 2; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

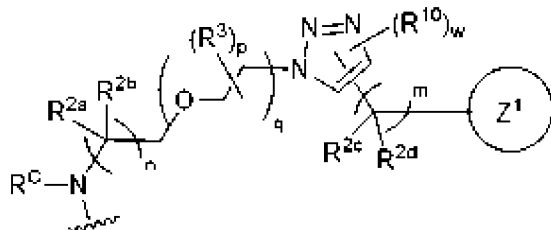
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III-c) представляет собой соединение формулы (III-d):



(III-d),

или его фармацевтически приемлемая соль, где X представляет собой $C(R')(R'')$, $N(R')$ или $S(O)_x$; каждый из R' и R'' независимо представляет собой водород, алкил, галоген или циклоалкил; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил или галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^3 и R^5 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$ или $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; p представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; q представляет собой целое число от 0 до 25; x представляет собой 0, 1 или 2; и “ \sim ” относится к соединению с группой присоединения или полимером, описанным в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IV-a):



(IV-a),

или его фармацевтически приемлемая соль, где кольцо Z^1 представляет собой гетероцикл или необязательно замещенный 1-5 R^5 ; R^C представляет собой водород, алкил, алкенил, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$, где каждый алкил и алкенил необязательно замещены 1-6 R^6 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил, галоген или амино; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^3 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-SR^{E1}$, $-S(O)_xR^{E1}$ или $-OS(O)_xR^{E1}$; каждый R^{10} независимо представляет собой дейтерий, алкил, галогеналкил, гетероалкил, галоген, циано, нитро или амино; каждый R^{A1} , R^{B1} и R^{E1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; w представляет собой 0, 1 или 2; каждый из q и p независимо представляет собой целое число от 0 до 25; и x представляет собой 0, 1 или 2.

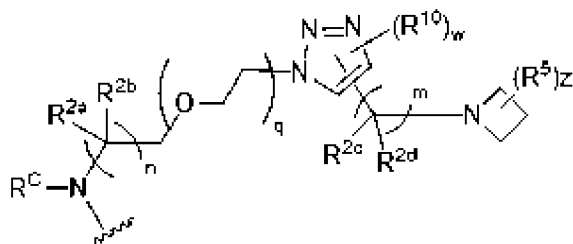
В некоторых вариантах осуществления кольцо Z^1 представляет собой гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления кольцо Z^1 представляет собой азот-содержащий гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления кольцо Z^1 представляет собой 4-членный гетероцикл или 6-членный гетероцикл. В некоторых вариантах

осуществления кольцо Z^1 представляет собой гетероцикл, замещенный 1 R^5 . В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой $-S(O)_xR^{E1}$. В некоторых вариантах осуществления R^{E1} представляет собой алкил (например, $-CH_3$). В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой $-S(O)_2(CH_3)$.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 3. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления w представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления w представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой галоген (например, Cl).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IV-b):



(IV-b),

или его фармацевтически приемлемая соль, где R^C представляет собой водород, алкил, $-N(R^C)C(O)R^B$, $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$, где каждый алкил и алкенил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород или алкил; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; каждый из R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-S(O)_xR^{E1}$ или $-OS(O)_xR^{E1}$; каждый R^{10} независимо представляет собой дейтерий, алкил, галогеналкил, гетероалкил, галоген, циано, нитро или амино; R^{E1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; w представляет собой 0, 1 или 2; q представляет собой целое число от 0 до 25; x представляет собой 0, 1 или 2; и Z представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

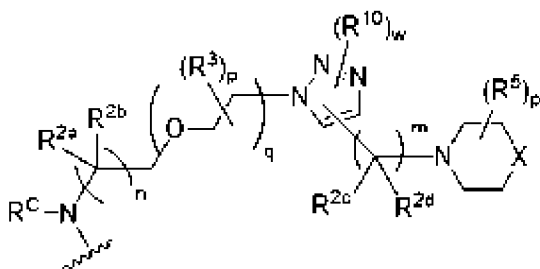
В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой $-S(O)_xR^{E1}$. В некоторых вариантах осуществления R^{E1} представляет собой алкил (например, $-CH_3$). В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления R^5 представляет собой $-S(O)_2(CH_3)$. В некоторых вариантах осуществления z представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d}

независимо представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 3. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления w представляет собой 0.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IV-c):



(IV-c),

или его фармацевтически приемлемая соль, где X представляет собой $C(R')(R'')$, $N(R')$ или $S(O)_x$; каждый из R' и R'' независимо представляет собой водород, алкил или галоген; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил или галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; R^C представляет собой водород, алкил, $-N(R^C)C(O)R^B$, $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$, где каждый алкил и алкенил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый из R^3 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-SR^{E1}$, $-S(O)_xR^{E1}$ или $-OS(O)_xR^{E1}$; каждый R^{10} независимо представляет собой дейтерий, алкил, галогеналкил, гетероалкил, галоген, циано, нитро или amino; каждый R^{A1} , R^{B1} , и R^{E1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; w представляет собой 1; каждый из q и p независимо представляет собой целое число от 0 до 25; и x представляет собой 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_x$. В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_2$.

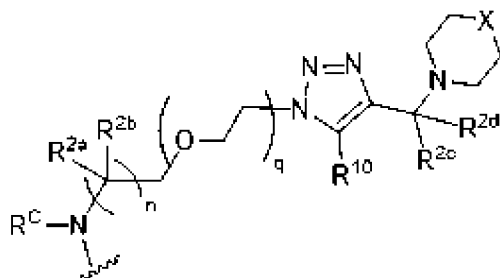
В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R^C независимо представляет собой, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 3. В некоторых вариантах осуществления m

представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой галоген (например, Cl).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IV-d):



(IV-d),

или его фармацевтически приемлемая соль, где X представляет собой $C(R')(R'')$, $N(R')$ или $S(O)_x$; каждый из R' и R'' независимо представляет собой водород, алкил или галоген; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил или галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; R^C представляет собой водород, алкил, $-N(R^C)C(O)R^B$, $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$, где каждый алкил и алкенил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый из R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо-, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$; каждый R^{10} независимо представляет собой дейтерий, алкил, галогеналкил, гетероалкил, галоген, циано, нитро или амино; каждый R^{A1} и R^{B1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; q представляет собой целое число от 0 до 25; и x представляет собой 0, 1 или 2.

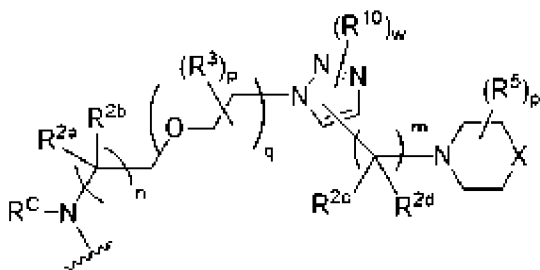
В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_x$. В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_2$.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 3. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой галоген (например, Cl).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IV-e):



(IV-e),

или его фармацевтически приемлемая соль, где X представляет собой $C(R')(R'')$, $N(R')$ или $S(O)_x$; каждый из R' и R'' независимо представляет собой водород, алкил или галоген; каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, алкил, гетероалкил или галоген; или R^{2a} и R^{2b} или R^{2c} и R^{2d} взяты вместе с образованием оксогруппы; R^C независимо представляет собой водород, алкил, $-N(R^C)C(O)R^B$, $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-N(R^C)C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$, где каждый алкил и алкенил необязательно замещен 1-6 R^6 ; каждый из R^3 , R^5 и R^6 независимо представляет собой алкил, гетероалкил, галоген, оксо, $-OR^{A1}$, $-C(O)OR^{A1}$, $-C(O)R^{B1}$, $-SR^{E1}$, $-S(O)_xR^{E1}$ или $-OS(O)_xR^{E1}$; каждый R^{10} независимо представляет собой дейтерий, алкил, галогеналкил, гетероалкил, галоген, циано, нитро или amino, где каждый алкил или гетероалкил необязательно замещен одним или несколькими R^{11} ; каждый R^{11} независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, галоген, циано, оксо, гидроксил, циклоалкил или гетероциклил; каждый R^{A1} , R^{B1} и R^{E1} независимо представляет собой водород, алкил или гетероалкил; каждый из m и n независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6; w представляет собой 1; каждый из q и p независимо представляет собой целое число от 0 до 25; и x представляет собой 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_x$. В некоторых вариантах осуществления x представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $S(O)_2$.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой дейтерий, алкил, гетероалкил, галоген, циано или азидо, где каждый алкил и гетероалкил необязательно замещен одним или несколькими R^{11} (например, галоген). В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой дейтерий, алкил или галоген. В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой галоген (например, фтор, хлор, бром). В некоторых вариантах осуществления R^{10} представляет собой алкил (например, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, $-CF_3$, $-CH_2F$, $-CHF_2$).

В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород, $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкил})$ или $-C(O)(C_1-C_6\text{-алкенил})$. В некоторых вариантах осуществления R^C представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления n представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q представляет собой 3. В некоторых вариантах осуществления m

представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 0.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I). В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой связь и P и L^3 независимо отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-a). В некоторых вариантах осуществления формулы (II-a) L^2 представляет собой связь, P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой связь и Z представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой гетероалкил и Z представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой связь и P и L^3 независимо отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления L^2 представляет собой связь, P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой связь и Z представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления P представляет собой гетероарил, L^3 представляет собой гетероалкил и Z представляет собой алкил.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b). В некоторых вариантах осуществления P отсутствует, L^1 представляет собой $-NHCH_2$, L^2 представляет собой связь, m представляет собой арил (например, фенил), L^3 представляет собой $-CH_2O$, и Z представляет собой гетероциклил (например, азотсодержащий гетероциклил, например, тиоморфолинил-1,1-диоксид). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b) представляет собой соединение 116.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I-b) P отсутствует, L^1 представляет собой $-NHCH_2$, L^2 представляет собой связь, M отсутствует, L^3 представляет собой связь и Z представляет собой гетероциклил (например, кислородсодержащий гетероциклил, например, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, оксетанил или оксиранил). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b) представляет собой соединение 105.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b-i). В некоторых вариантах осуществления формулы (I-b-i) каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород или CH_3 , каждый из R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1 или 2, n представляет собой 1, X представляет собой O , p представляет собой 0, M^2 представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими R^3 , R^3 представляет собой $-CF_3$ и Z^2 представляет собой гетероциклил (например, кислородсодержащий гетероциклил, например, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, оксетанил или оксиранил). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b-i) представляет собой соединение 100, соединение 106, соединение 107, соединение 108, соединение 109 или соединение 111.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b-ii). В некоторых вариантах осуществления формулы (I-b-ii) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, q представляет собой 0, p представляет собой 0, m представляет собой 1 и Z^2 представляет собой гетероциклил

(например, кислород-содержащий гетероциклил, например, тетрагидропиранил). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-b-ii) представляет собой соединение 100.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-c). В некоторых вариантах осуществления формулы (I-c) каждый из R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, p представляет собой 1, q представляет собой 0, R^5 представляет собой $-CH_3$ и Z представляет собой гетероциклил (например, азот-содержащий гетероциклил, например, пиперазинил). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-c) представляет собой соединение 113.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-d). В некоторых вариантах осуществления формулы (I-d) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 3, X представляет собой O , p представляет собой 0 и Z представляет собой гетероциклил (например, кислород-содержащий гетероциклил, например, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, оксетанил или оксирианил). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-d) представляет собой соединение 110 или соединение 114.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-f). В некоторых вариантах осуществления формулы (I-f) каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, n представляет собой 1, M представляет собой $-CH_2-$, P представляет собой азот-содержащий гетероарил (например, имидазолил), L^3 представляет собой $-C(O)OCH_2-$ и Z представляет собой CH_3 . В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I-f) представляет собой соединение 115.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (II-a). В некоторых вариантах осуществления формулы (II-a) каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, n представляет собой 1, q представляет собой 0, L^3 представляет собой $-CH_2(OCH_2CH_2)_2$ и Z представляет собой $-OCH_3$. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II-a) представляет собой соединение 112.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II-a) каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, n представляет собой 1, L^3 представляет собой связь или $-CH_2$ и Z представляет собой водород или $-OH$. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II-a) представляет собой соединение 103 или соединение 104.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (III). В некоторых вариантах осуществления формулы (III) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 2, q представляет собой 3, p представляет собой 0, R^C представляет собой водород и Z^1 представляет собой гетероалкил, необязательно замещенный R^5 (например, $-N(CH_3)(CH_2CH_2)S(O)_2CH_3$). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) представляет собой соединение 120.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (III-b). В некоторых вариантах осуществления формулы (III-b) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 0, n представляет собой 2, q представляет собой 3, r представляет собой 0 и Z^2 представляет собой арил (например, фенил), замещенный 1 R^5 (например, $-NH_2$). В некоторых вариантах осуществления формулы (III-b) представляет собой соединение 102.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (III-b). В некоторых вариантах осуществления формулы (III-b) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 2, q представляет собой 3, r представляет собой 0, R^c представляет собой водород и Z^2 представляет собой гетероцикл (например, азот-содержащий гетероцикл, например, азот-содержащий спирогетероцикл, например, 2-окса-7-азаспиро[3.5]нонанил). В некоторых вариантах осуществления формулы (III-a) представляет собой соединение 121.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (III-d). В некоторых вариантах осуществления формулы (III-d) каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 2, q представляет собой 1, 2, 3 или 4, r представляет собой 0 и X представляет собой $S(O)_2$. В некоторых вариантах осуществления формулы (III-d) каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 2, q представляет собой 1, 2, 3 или 4, r представляет собой 0 и X представляет собой $S(O)_2$. В некоторых вариантах осуществления формулы (III-d) представляет собой соединение 101, соединение 117, соединение 118 или соединение 119.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b), (I-d) или (I-e). В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b), (I-d) или (II). В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b), (I-d) или (I-f). В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I-b), (I-d) или (III).

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (IV-a) или (IV-b). В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (IV-a), (IV-c), (IV-d) или (IV-e). В некоторых вариантах осуществления каждый из R^{2a} , R^{2b} , R^{2c} и R^{2d} независимо представляет собой водород, m представляет собой 1, n представляет собой 1, q представляет собой 1, 2, 3 или 4, w представляет собой 1 и X представляет собой $S(O)_2$. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой любое из соединений 122-154. В некоторых вариантах осуществления формулы (I) содержит дейтерий (например, R^4 или R^{10} представляет собой дейтерий). В некоторых вариантах осуществления формулы (I) не содержит дейтерий (например, R^4 или R^{10} не представляет собой дейтерий).

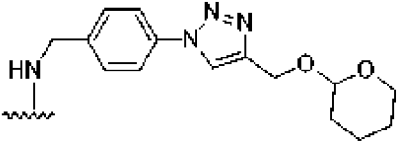
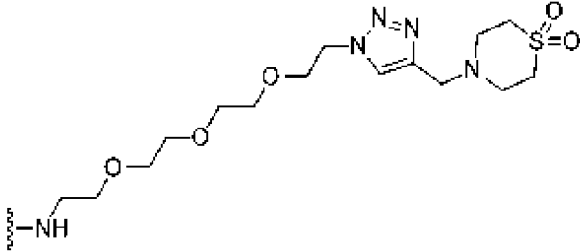
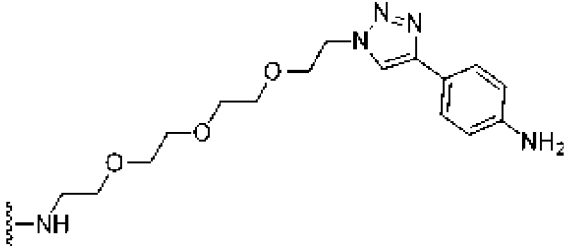
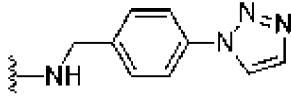
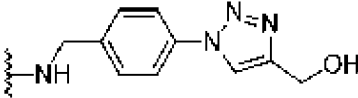
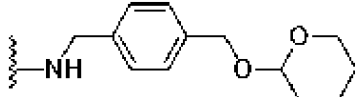
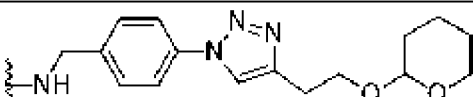
Типичные соединения формулы (I) могут быть получены, как описано в WO

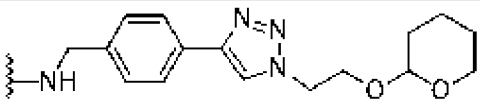
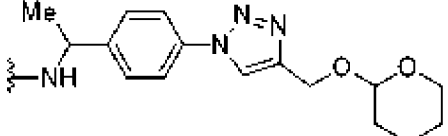
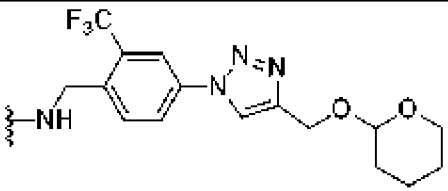
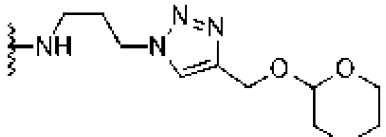
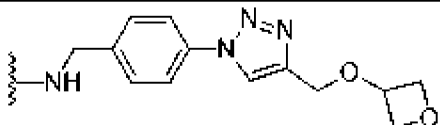
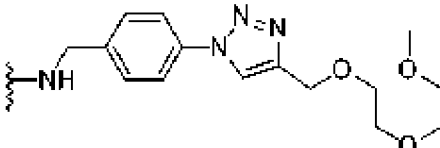
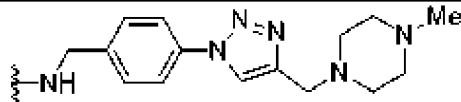
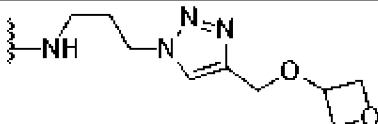
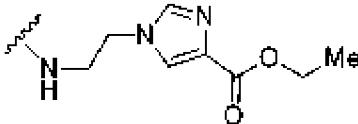
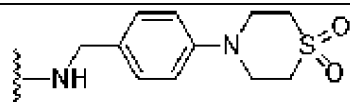
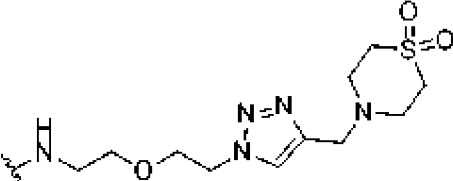
2019/169333, WO 2021/119522, или любым другим способом, известным специалистам в данной области техники.

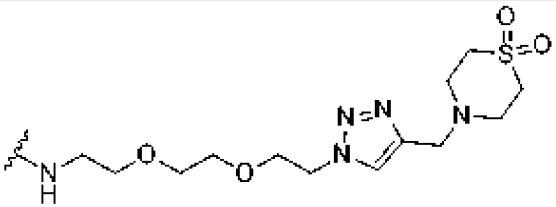
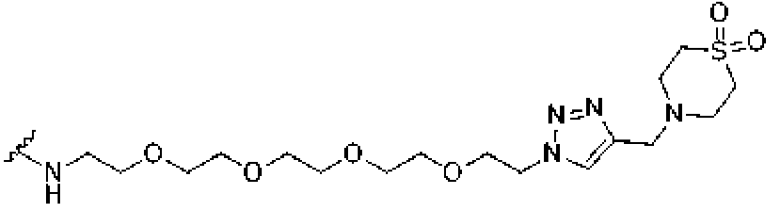
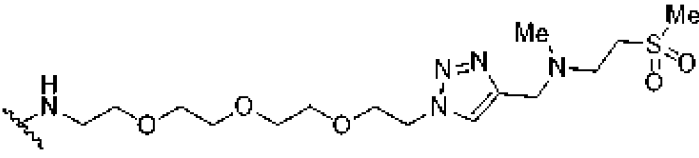
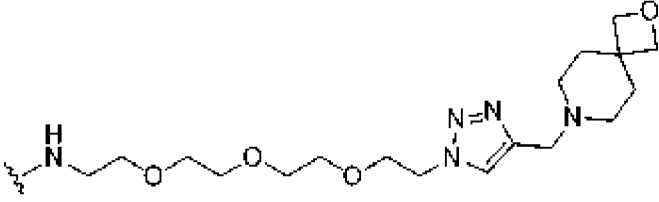
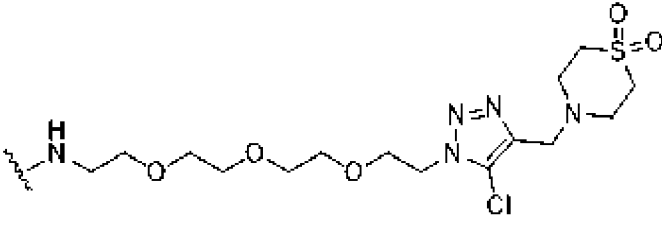
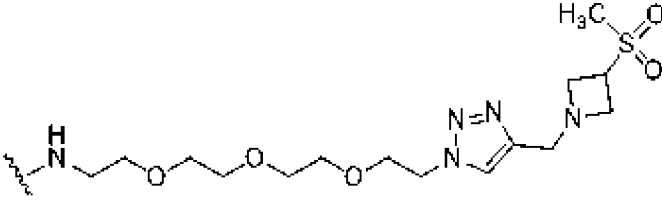
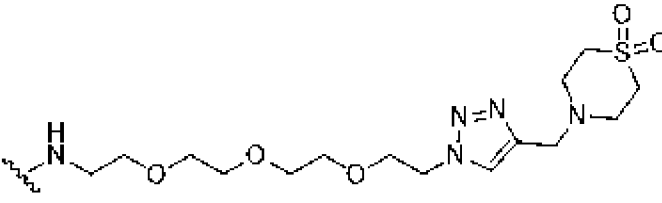
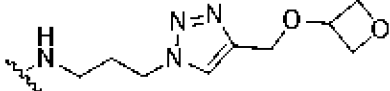
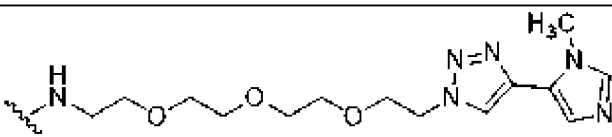
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) не представляет собой соединение, раскрытое в WO 2012/112982, WO 2012/167223, WO 2014/153126, WO 2016/019391, WO 2017/075630, US 2012/0213708, US 2016/0030359 или US 2016/0030360.

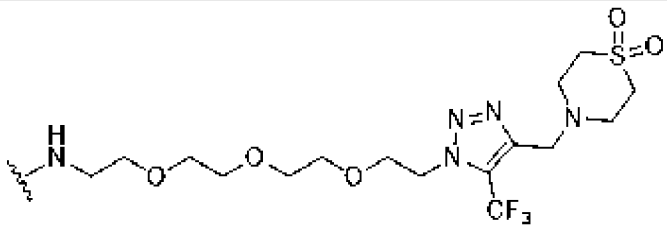
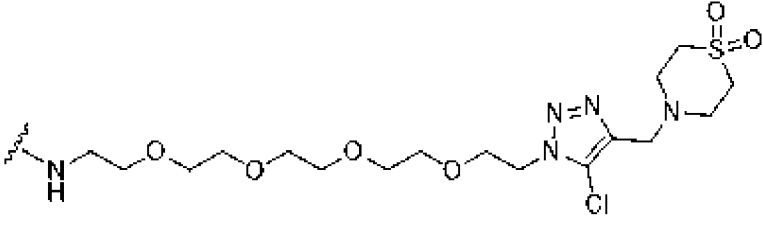
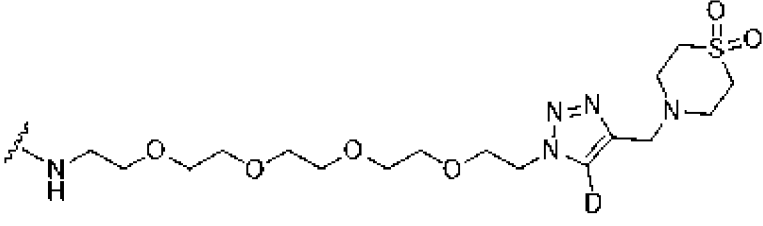
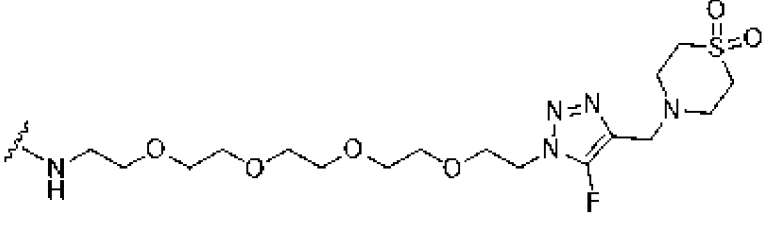
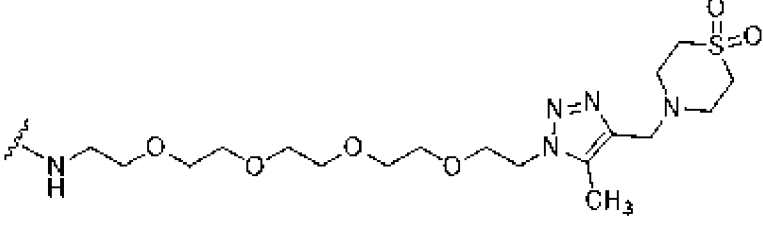
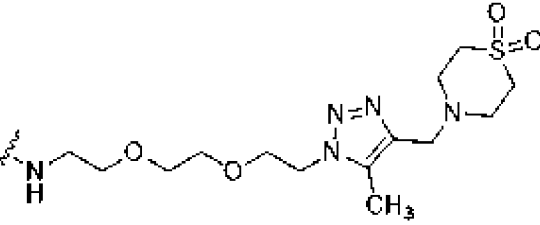
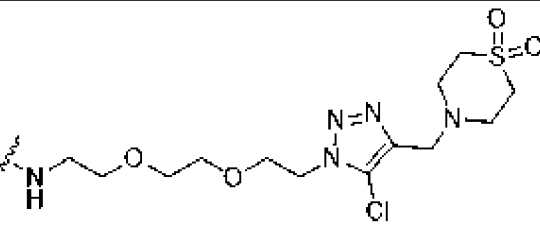
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) предусматривает соединение, показанное в таблице 3, или его фармацевтически приемлемая соль. В некоторых вариантах осуществления устройство, описанное в настоящем документе, содержит соединение, представленное в таблице 4, или его фармацевтически приемлемую соль.

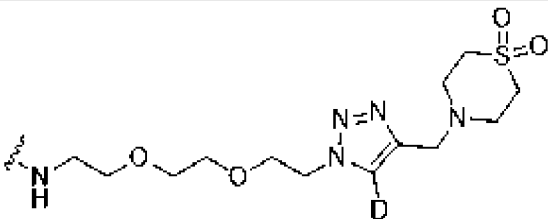
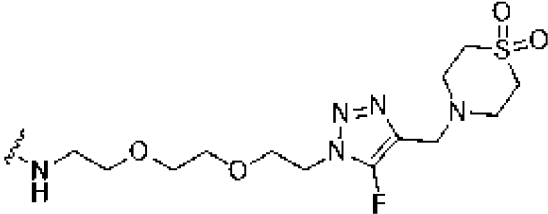
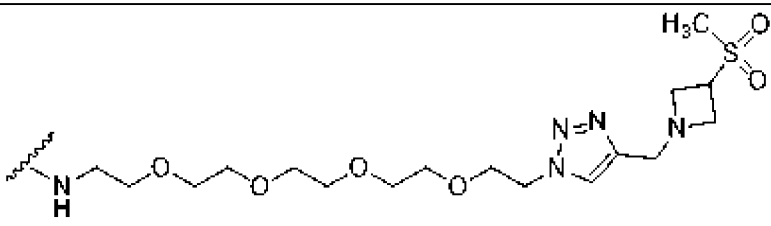
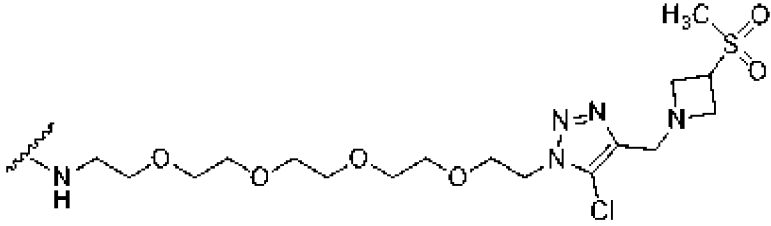
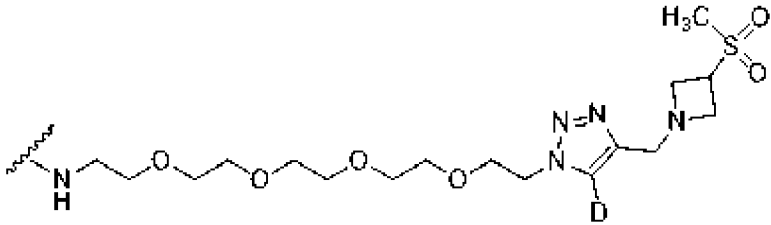
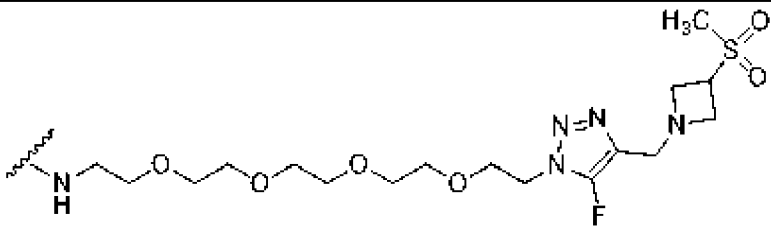
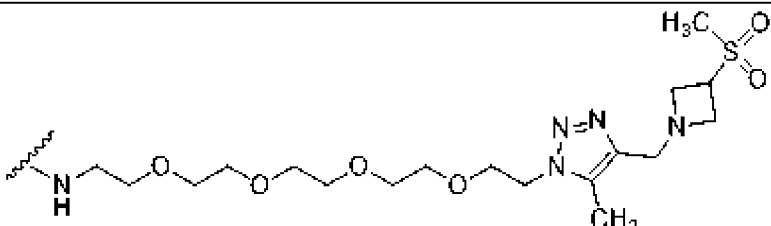
Таблица 4. Иллюстративные соединения формулы (I)

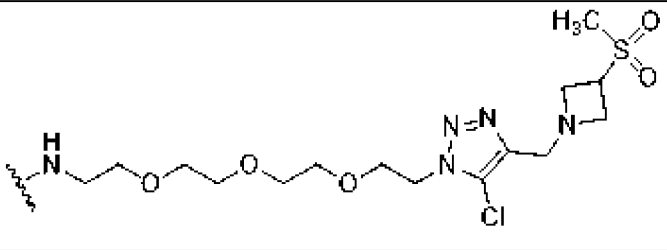
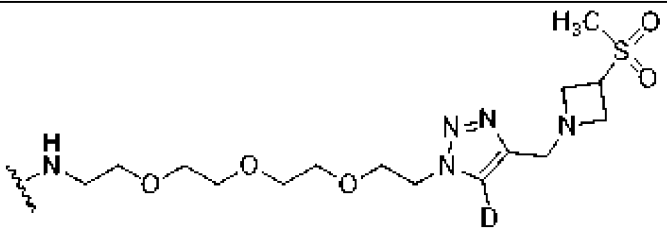
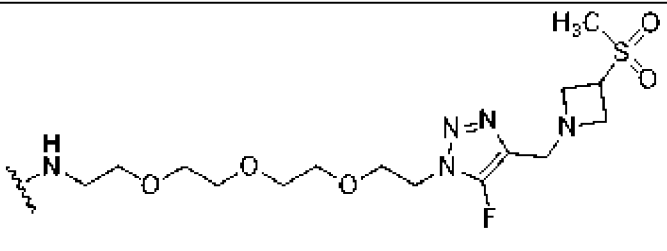
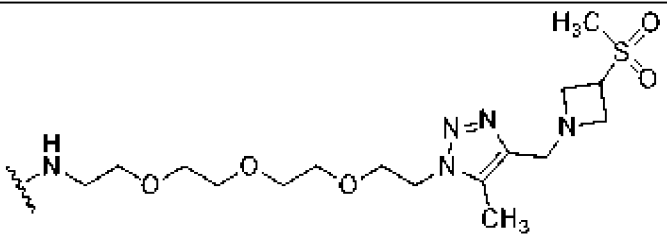
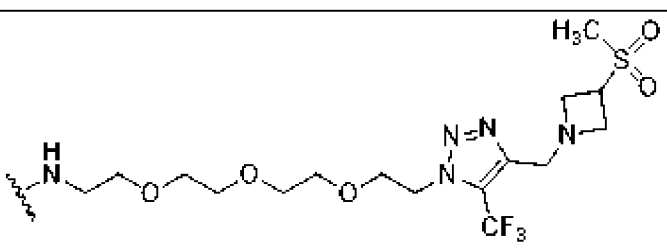
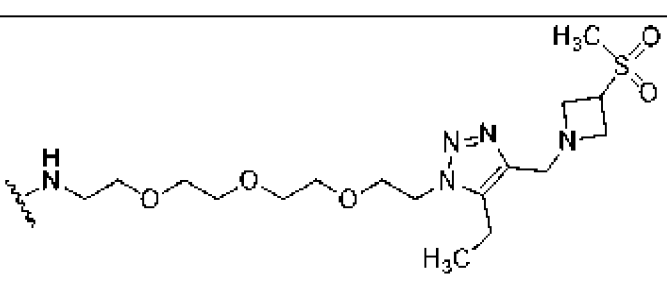
Соединение №	Структура
100	
101	
102	
103	
104	
105	
106	

107	
108	
109	
110	
111	
112	
113	
114	
115	
116	
117	

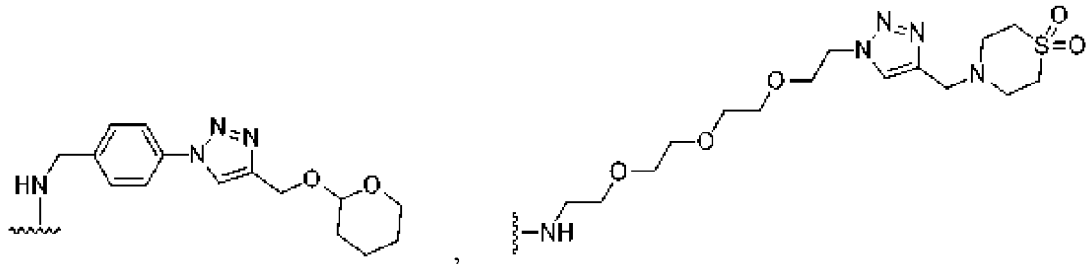
118	
119	
120	
121	
122	
123	
124	
125	
126	

135	
136	
137	
138	
139	
140	
141	

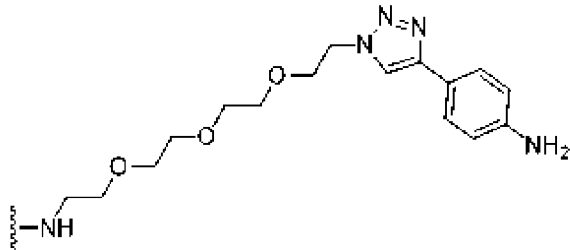
142	
143	
144	
145	
146	
147	
148	

149	
150	
151	
152	
153	
154	

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение формулы (I) (например, формул (I-a), (I-b), (I-b-i), (I-b-ii), (I-c), (I-d), (I-e), (I-f), (II), (II-a), (III), (III-a), (III-b), (III-c), (III-d), (IV-a), (IV-b), (IV-c), (IV-d) или (IV-e)), или его фармацевтически приемлемая соль, и выбрано из:

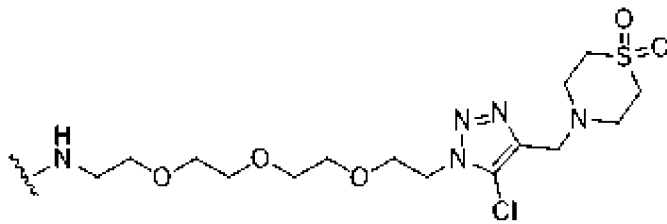
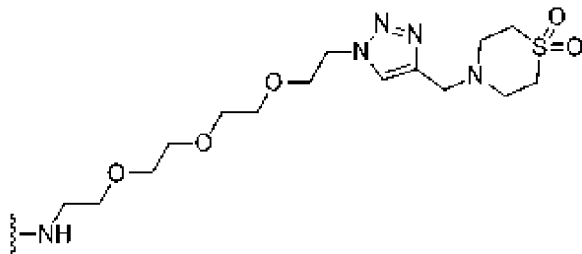


и

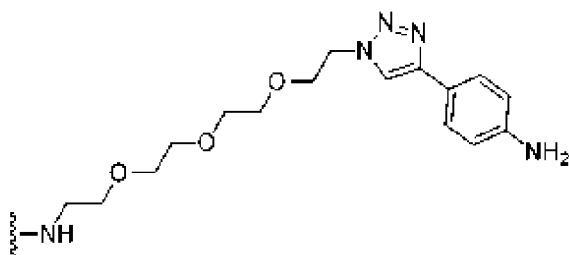


, или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления гидрогелевые капсулы в совокупности гидрогелевых капсул, описанной в настоящем документе, содержат соединение



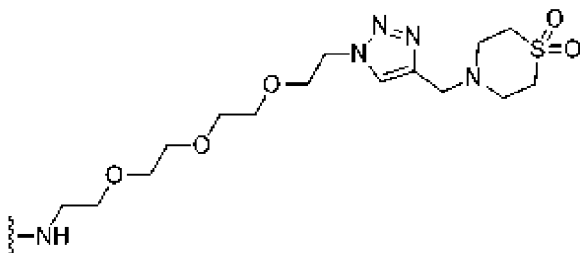
, или



, или фармацевтически приемлемую соль

любого из этих соединений.

В некоторых вариантах осуществления гидрогелевые капсулы в совокупности гидрогелевых капсул, описанной в настоящем документе, содержат соединение



В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) (например, соединение 101 в таблице 4) ковалентно присоединено к альгинату (например, альгинату с приблизительной MW <75 кДа, соотношением G:M \geq 1,5) при плотности конъюгации по меньшей мере 2,0% и менее 9,0%, или от 3,0% до 8,0%, от 4,0 до 7,0, от 5,0 до 7,0 или от 6,0 до 7,0 или около 6,8, как определено методом сжигания процентного содержания азота, как описано в WO 2020/069429. В одном варианте осуществления плотность конъюгации соединения 101 в модифицированном альгинате определяют количественным анализом свободных аминов, например, как описано в WO2020198695, где определенная плотность конъюгации составляет от 1,0% по массе до 3,0% по массе, от 1,3% по массе до 2,8% по массе, от 1,3% по массе до 2,6% по массе, от 1,5% по массе до 2,4% по массе, от 1,5% по массе до 2,2% по массе или от 1,7% по массе до 2,2% по массе.

В одном варианте осуществления гидрогелевые капсулы в совокупности гидрогелевых капсул, описанной в настоящем документе, содержат соединение формулы (I) (например, соединение, представленное в таблице 4), ковалентно связанное с альгинатным полимером. Альгинатный полимер можно химически модифицировать соединением формулы (I) с использованием любого подходящего метода, известного в данной области техники, например, как описано в WO 2019/195055.

Клетки и терапевтические вещества

Клетки, содержащиеся в гидрогелевых капсулах, описанных в настоящем документе, например, в совокупности гидрогелевых капсул, могут происходить из множества различных типов клеток (например, клеток человека), включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки фибробластов, островковые клетки (как определено здесь), мезенхимальные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) и клетки кератиноцитов. Типичные типы клеток включают типы клеток, описанные в WO 2017/075631. В одном варианте осуществления клетки не являются островковыми клетками (как определено в настоящем документе). В одном варианте осуществления клетки представляют собой островковые клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из клеточной линии, показанной в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Иллюстративные клеточные линии

Клеточная линия	Тип клеток	Зародышевый слой	Коммерческий источник
ARPE-19	Эпителий (сетчатки)	Эктодерма	ATCC (CRL-2302)
VJ	Фибробласт (крайняя плоть)	Эктодерма	ATCC (CRL-2522)
CCD-841-CoN	Эпителий (толстая кишка)	Эндодерма	ATCC (CRL-1790)
HaCat	Кератиноцит	Эктодерма	Addexbio (T0020001)

HHSEC	Эндотелий (печеночный синусоидальный)	Эндодерма	Sciencellonline.com (#5000)
Huv-EC-C	Эндотелий (эмбрионный пуповинный)	Мезодерма	ATCC (CRL-1730)
MCF-10A	Эпителий (молочная железа)	Эктодерма	ATCC (CRL-10317)
MRC-5	Фибробласт (легкое)	Мезодерма	ATCC (CCL-171)
MSC, человек	Мезенхима (костный мозг)	Мезодерма	ATCC (PCS-500-012)
MSC, мышь	Мезенхима (костный мозг)	Мезодерма	Cyagen (MU BMX-01001)
WS-1	Фибробласт (кожа)	Эктодерма	ATCC (CRL-1502)
293F	Эпителий (эмбрионная почка)	Мезодерма	Thermo Fisher (R790007)

Клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии и секреции интересующего терапевтического вещества с использованием любого из множества методов геной инженерии, известных в данной области техники. Например, клетка может быть трансфицирована вектором экспрессии, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую желаемый полипептид, функционально связанный с контрольными элементами, необходимыми или полезными для экспрессии гена, например, промотором, сайтом связывания рибосомы, энхансером, сигналом полиА и т.п.

В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии кодирует полипептид, предназначенный для обеспечения терапевтического эффекта при введении гидрогелевых капсул субъекту, нуждающемуся в этом, такой как фактор свертывания крови, фактор роста, гормон, фермент, цитокин (например, провоспалительный цитокин или противовоспалительный цитокин), цитокиновый рецептор, химерный белок, слитый белок или липопротеин. Полипептид, кодируемый вектором экспрессии, может иметь встречающуюся в природе аминокислотную последовательность или может содержать вариант встречающейся в природе последовательности. Вариант может представлять собой неприродную или встречающуюся в природе аминокислотную замену, мутацию, делецию или добавление относительно эталонной (например, встречающейся в природе) последовательности. Встречающаяся в природе аминокислотная последовательность может представлять собой полиморфный вариант. Встречающаяся в природе аминокислотная последовательность может быть аминокислотной последовательностью человека или нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления встречающаяся в природе аминокислотная последовательность является человеческой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления терапевтический полипептид

содержит около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или менее 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет среднюю молекулярную массу 5 кДа, 10 кДа, 25 кДа, 50 кДа, 100 кДа, 150 кДа, 200 кДа, 250 кДа, 500 кДа или более.

В некоторых вариантах осуществления полипептид является гормоном. Примеры гормонов включают антидиуретический гормон (ADH), окситоцин, гормон роста (GH), пролактин, гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), тиреотропный гормон (TSH), тиреотропин-высвобождающий гормон (TRH), аденокортикотропный гормон (ACTH), фолликулостимулирующий гормон (FSH), лютеинизирующий гормон (LH), гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон (LHRH), тироксин, кальцитонин, паратиреоидный гормон (PTH), альдостерон, кортизол, адреналин, глюкагон, инсулин (INS), эстроген, прогестерон и тестостерон. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой INS (например, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина или проинсулин). В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой гормон роста, такой как гормон роста человека (hGH), рекомбинантный гормон роста человека (rhGH), бычий гормон роста, метионин-человеческий гормон роста, дез-фенилаланиновый гормон роста человека и гормон роста свиньи.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой фактор роста, например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста нервов (NGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста (TGF) и инсулиноподобные факторы роста-I и -II (IGF-I и IGF-II).

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой фактор свертывания или фактор коагуляции, например, фактор свертывания крови или фактор коагуляции крови. В некоторых вариантах осуществления полипептид участвует в коагуляции, т.е. процессе, посредством которого кровь превращается из жидкости в твердое вещество или гель. Типичные факторы свертывания и факторы коагуляции включают фактор I (например, фибриноген), фактор II (например, протромбин), фактор III (например, тканевой фактор), фактор V (например, проакселерин, лабильный фактор), фактор VI, фактор VII (например, стабильный фактор, проконвертин), фактор VIII (например, антигемофильный фактор А), фактор VIIIС, фактор IX (например, антигемофильный фактор В), фактор X (например, фактор Стюарта-Пауэра), фактор XI (например, предшественник плазменного тромбопластина), фактор XII (например, фактор Хагермана), фактор XIII (например, фактор, стабилизирующий фибрин), фактор фон Виллебранда (vWF), прекалликреин, кофактор гепарина II, высокомолекулярный кининоген (например, фактор Фицджеральда), антитромбин III и фибронектин. В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой фактор, препятствующий свертыванию крови, такой как белок С.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой цепь иммуноглобулина (тяжелую или легкую цепь) или ее фрагмент, содержащий по меньшей

мере одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина и необязательно содержащий Fc-область иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полипептид представляет собой полноразмерную цепь иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой цитокин или рецептор цитокина, или химерный белок, включающий цитокины или их рецепторы, включая, например, фактор некроза опухоли альфа и бета, их рецепторы и их производные, ренин; липопротеины; колхицин; кортикотропин; вазопрессин; соматостатин; липрессин; панкреозимин; лейпролид; альфа-1-антитрипсин; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активатор плазминогена, отличный от активатора плазминогена тканевого типа (t-PA), например, урокиназа; бомбезин; тромбин; энкефалиназа; RANTES (регулируется при активации обычно экспрессируемых и секретируемых Т-клеток); воспалительный белок макрофагов человека (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как сывороточный альбумин человека; мюллерин-ингибирующее вещество; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; хорионический гонадотропин; микробный белок, такой как бета-лактамаза; ДНКаза; ингибин; активин; рецепторы гормонов или факторов роста; интегрин; белок А или D; ревматоидные факторы; фактор роста тромбоцитов (PDGF); эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF- α и TGF- β , включая TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5; инсулиноподобный фактор роста-I и -II (IGF-I и IGF-II); дез(1-3)-IGF-I (мозговой IGF-I), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; белки CD, такие как CD-3, CD-4, CD-8 и CD-19; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; интерферон, такой как интерферон-альфа (например, интерферон.альфа.2A), -бета, -гамма, -лямбда и консенсусный интерферон; колониестимулирующие факторы (CSF), например, M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (IL), например, IL-1, от IL-2 до IL-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; белки поверхностных мембран; фактор, ускоряющий распад; транспортные белки; рецепторы самонаведения; адресины; ингибиторы фертильности, такие как простагландины; стимуляторы фертильности; регуляторные белки; антитела (включая их фрагменты) и химерные белки, такие как иммуноадгезины. Подходящие полипептиды могут быть нативными или рекомбинантными и включают, например, слитые белки.

Примеры полипептида, который может кодироваться экзогенной единицей транскрипции, также включают CCL1, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL6, CCL7, CCL8, CCL9 (CCL10), CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CXCL1 (KC), CXCL2 (SDF1a), CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 (IL8), CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CX3CL1, XCL1, XCL2, TNFA, TNFB (LTA), TNFC (LTB), TNFSF4, TNFSF5 (CD40LG), TNFSF6, TNFSF7, TNFSF8, TNFSF9, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF13B, EDA, IL2, IL15, IL4, IL13, IL7, IL9, IL21, IL3, IL5, IL6, IL11, IL27, IL30, IL31, OSM, LIF, CNTF, CTF1, IL12a, IL12b, IL23, IL27, IL35, IL14, IL16, IL32, IL34, IL10, IL22, IL19, IL20,

IL24, IL26, IL29, IFNL1, IFNL2, IFNL3, IL28, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17, IFNA21, IFNB1, IFNK, IFNW1, IFNG, IL1A (IL1F1), IL1B (IL1F2), IL1Ra (IL1F3), IL1F5 (IL36RN), IL1F6 (IL36A), IL1F7 (IL37), IL1F8 (IL36B), IL1F9 (IL36G), IL1F10 (IL38), IL33 (IL1F11), IL18 (IL1G), IL17, KITLG, IL25 (IL17E), CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), SPP1, TGFB1, TGFB2, TGFB3, CCL3L1, CCL3L2, CCL3L3, CCL4L1, CCL4L2, IL17B, IL17C, IL17D, IL17F, AIMP1 (SCYE1), MIF, Areg, BC096441, Bmp1, Bmp10, Bmp15, Bmp2, Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Bmp8a, Bmp8b, C1qtnf4, Ccl21a, Ccl27a, Cd70, Cer1, Cklf, Clcf1, Cmtm2a, Cmtm2b, Cmtm3, Cmtm4, Cmtm5, Cmtm6, Cmtm7, Cmtm8, Crlf1, Ctf2, Ebi3, Edn1, Fam3b, Fasl, Fgf2, Flt3l, Gdf10, Gdf11, Gdf15, Gdf2, Gdf3, Gdf5, Gdf6, Gdf7, Gdf9, Gm12597, Gm13271, Gm13275, Gm13276, Gm13280, Gm13283, Gm2564, Gpi1, Grem1, Grem2, Grn, Hmgb1, Ifna11, Ifna12, Ifna9, Ifnab, Ifne, Il17a, Il23a, Il25, Il31, Iltifb, Inhba, Lefty1, Lefty2, Mstn, Nampt, Ndp, Nodal, Pf4, Pglyrp1, Pri7d1, Scg2, Scgb3a1, Slurp1, Spp1, Thpo, Tnfsf10, Tnfsf11, Tnfsf12, Tnfsf13, Tnfsf13b, Tnfsf14, Tnfsf15, Tnfsf18, Tnfsf4, Tnfsf8, Tnfsf9, Tslp, Vegfa, Wnt1, Wnt2, Wnt5a, Wnt7a, Xcl1, адреналин, мелатонин, трийодтиронин, простагландин, лейкотриен, простациклин, тромбоксан, островковый амилоидный полипептид, мюллеровский ингибирующий фактор или гормон, адипонектин, кортикотропин, ангиотензин, вазопрессин, аргинин вазопрессин, атриопептин, мозговой натрийуретический пептид, кальцитонин, холецистокинин, кортистатин, энкефалин, эндотелин, эритропоэтин, фолликулостимулирующий гормон, галанин, желудочный ингибирующий полипептид, гастрин, грелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид-1, гонадотропин-рилизинг гормон, гепсидин, хорионический гонадотропин человека, плацентарный лактоген человека, ингибин, соматомедин, лептин, липотропин, меланоцитстимулирующий гормон, мотилин, орексин, окситоцин, полипептид поджелудочной железы, пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза, релаксин, ренин, секретин, соматостатин, тромбопоэтин, тиротропин, тиреотропин-рилизинг гормон, вазоактивный интестинальный пептид, андроген, альфа-глюкозидазу (также известную как кислая мальтаза), гликогенфосфорилазу, фермент разветвления гликогена, фосфофруктокиназу, фосфоглицераткиназу, фосфоглицератмутазу, лактатдегидрогеназу, карнитинпалмитилтрансферазу, карнитин и миоаденилатдезаминазу.

В некоторых вариантах осуществления полипептид представляет собой заместительную терапию или замещающий белок.

В некоторых вариантах осуществления заместительная терапия или замещающий белок представляет собой фермент, например, альфа-галактозидазу А (GLA), альфа-L-идуронидазу (IDUA), арилсульфатазу В (ARSB), глюкоцереброзидазу или N-сульфоглюкозаминсульфогидролазу (SGSH).

В некоторых вариантах осуществления заместительная терапия или замещающий белок представляет собой фактор свертывания или фактор коагуляции, например, фактор VII, фактор VIII (например, содержит встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человеческого фактора VIII или его вариант) или фактор IX (например,

включает встречающуюся в природе аминокислотную последовательность человеческого фактора IX или ее вариант).

В одном варианте осуществления генетически модифицированные клетки обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (i) не способны продуцировать INS (например, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина или проинсулин) в количестве, эффективном для лечения диабета или другого заболевания или состояния, которое можно лечить с помощью INS; (ii) не способны продуцировать INS, реагируя на глюкозу; или (iii) не происходят из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые были сконструированы или дифференцированы в INS-продуцирующие бета-клетки поджелудочной железы.

В одном варианте осуществления генетически модифицированные клетки обладают одной или несколькими из следующих характеристик: (i) способны продуцировать INS (например, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина или проинсулин) в количестве, эффективном для лечения диабета или другого заболевания или состояния, которое можно лечить с помощью INS; (ii) способны продуцировать INS, реагируя на глюкозу; или (iii) получены из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые были сконструированы или дифференцированы в INS-продуцирующие бета-клетки поджелудочной железы.

Хранение и доставка

Композиция гидрогелевых капсул может быть предоставлена в герметичном контейнере. В некоторых вариантах осуществления все внутренние поверхности контейнера, контактирующие с композицией, состоят по существу или состоят из химически и биологически инертного материала. Подходящие материалы включают пластик фармацевтического или медицинского качества, например, поликарбонат, полиэфиримид (PEI), полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид, PEEK, полисульфон, полиуретан, фторированный этиленпропилен (FEP) или полиэтилентерефталатгликоль (PETG).

В одном варианте осуществления контейнер может иметь любой размер и форму, которые позволяют хранить его таким образом, который позволяет сформировать по существу однородный слой капсул, содержащий по существу все гидрогелевые капсулы в композиции, с образованием по нижней внутренней поверхности хранимого контейнера и слою капсулы слоя водного раствора, который по существу не содержит гидрогелевых капсул. В некоторых вариантах осуществления слой капсул имеет глубину, равную от около 1,00 до около 1,25 среднего диаметра капсул в композиции. В некоторых вариантах осуществления общий объем водного раствора (VS) в контейнере (например, количество остаточного раствора в слое капсулы плюс количество в слое раствора) равен или превышает объем гидрогелевых капсул в контейнере. В некоторых вариантах осуществления соотношение общего объема водного раствора к общему объему гидрогелевых капсул в контейнере составляет от около любого из 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 до около 100, от около 2 до около 75, от около 3 до около 50, от около 4 до около 40, от около 5 до около 30 и от около 10 до около 20. В одном варианте осуществления средний

диаметр гидрогелевых капсул в контейнере составляет около 1500 мкм, а соотношение VHC и VS составляет по меньшей мере около 1:1, около 1:2 или около 1:3 и менее около 1:40, например, примерно любое из 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 и 1:35.

В некоторых вариантах осуществления конфигурация (размер/форма) контейнера и объем композиции, помещенной в контейнер, выбирают так, чтобы обеспечить воздушное пространство между верхним слоем раствора и верхней внутренней поверхностью хранимого контейнера. В некоторых вариантах осуществления воздушное пространство составляет по меньшей мере от около 0,5 до 2,5 дюйма, от около 1,0 до 2,0 дюйма или от около 1,5 до 2,0 дюйма.

В одном варианте осуществления контейнер для хранения представляет собой гибкий прямоугольный пакет из FEP с одним или несколькими отверстиями, выполненными с возможностью добавления композиции или другого материала(-ов) в мешок (например, с помощью шприца) и одним или несколькими отверстиями, выполненными для удаления раствора с гидрогелевыми капсулами или без них из пакета (например, с помощью шприца). Типовой мешок из FEP имеет площадь внутренней поверхности (2 x лицевая сторона мешка) от около 400 см² до около 600 см² с максимальным объемом наполнения от около 400 миллилитров (мл) до около 700 мл. В одном варианте осуществления количество гидрогелевой капсульной композиции в FEP-мешке составляет от около 200 до 500 мл, например, от около 300 до 500 мл, от 400 до 500 мл, от 200 до 400 мл, от 200 до 300 мл, от 300 до 400 мл. Другие типичные контейнеры для хранения композиции гидрогелевых капсул, описанные в настоящем документе, включают бутылку с круглым дном, изготовленную из PETG, закрытую крышкой, и прямоугольный лоток, изготовленный из PETG и закрытый крышкой из фольги.

Выбор количества гидрогелевых капсул и водного раствора для добавления в контейнер конкретного размера будет зависеть от размера капсул, количества капсул на мл капсульной композиции, желаемого соотношения VHC и VS, а также любого желаемого воздушного пространства над слоем раствора. Эти количества могут быть определены специалистом с использованием математических формул, известных в данной области техники. Ниже показан примерный подход к определению объема капсул сферической формы («сфер»), добавляемых в контейнер.

Рассчитайте площадь поверхности, покрытую сферами, умножив площадь поверхности основания контейнера на ожидаемую целевую упаковку сферы, например, от 0,64 для произвольной упаковки до 0,74 для идеальной упаковки;

Рассчитайте площадь поверхности сферы по следующей формуле: (Средний диаметр сферы/2)² * Пи

Рассчитайте количество сфер, которые нужно добавить в контейнер, разделив результат этапа а (площадь поверхности, покрытая сферами) на результат этапа b (площадь поверхности сферы); и

Разделите результат этапа с на количество сфер на мл композиции.

В таблице ниже приведены примерные объемы препаратов сфер, которые можно

было бы добавить в типовой мешок из FEP с площадью внутренней поверхности около 500 см² и произвольной целевой упаковкой (0,64) для трех различных средних диаметров сферы (1000 микрометров (мкм), 1400 микрометров (мкм) и 2000 мкм) и двух разных концентраций сфер для каждого диаметра.

Диаметр сферы (мкм)	Сферы/мл	мл препарата сферы в контейнере
1000	200	204
1000	400	102
1400	200	104
1400	400	52
2000	200	51
2000	400	25

В некоторых вариантах осуществления капсульной композиции, в которой совокупность гидрогелевых капсул состоит по существу из капсул сферической формы («сфер»), средний диаметр сфер в совокупности представляет собой среднее значение диаметров по меньшей мере 10 сфер. В одном варианте осуществления диаметры по меньшей мере десяти сфер получают путем анализа микроскопического изображения аликвоты гидрогелевой капсульной композиции.

В одном варианте осуществления после добавления капсульной композиции в контейнер герметизируют, а затем хранят при температуре от около 2°C до комнатной температуры (от 15°C до 25°C; от 59°F до 77°F) в течение желаемого периода времени, причем этот период времени может включать время, необходимое для доставки контейнера к месту имплантации пациента, например, в операционную в больнице. В варианте осуществления желаемый период времени составляет любой из 12 часов, 24 часов, 36 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В одном варианте осуществления в конце желаемого периода времени инкапсулированные клетки в герметизированном контейнере сохраняют по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или до 100% их исходной жизнеспособности и/или продуктивности, что может быть оценено с использованием любого метода, известного в данной области техники или описанного в настоящем документе.

Способы лечения

Описанная в данном документе композиция гидрогелевой капсулы может быть введена пациенту, нуждающемуся в лечении терапевтическим веществом, секретлируемым инкапсулированными клетками. В одном варианте осуществления капсульную композицию или ее терапевтически эффективное количество вводят, имплантируют или иным образом размещают в брюшной полости (например, сальнике), при этом место введения может включать один или несколько малых мешочков, также известный как сальниковая сумка или сальниковые сумки. Малый мешок относится к полости, расположенной в брюшной полости, образованной сальником, и находится в непосредственной близости, например, от большого сальника, малого сальника, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, печени, селезенки, желудочно-селезеночной связки,

надпочечников и поджелудочной железы. Обычно меньший мешок соединяется с большим через сальниковое отверстие (т. е. отверстие Уинслоу). Терапевтически эффективное количество гидрогелевой капсульной композиции может быть имплантировано в брюшную полость (например, сальник, например, малый мешок) или размещено на поверхности внутри брюшной полости (например, сальник, например, малый мешок) посредством инъекции или катетера. Дополнительные рекомендации по имплантации в сальник (например, в малый мешок) представлены у M. Pellicciaro et al. (2017) *CellR4* 5(3):e2410, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Композиция, содержащая совокупность гидрогелевых капсул, находящихся в фармацевтически приемлемом водном растворе, при этом каждая гидрогелевая капсула в совокупности инкапсулирует множество живых клеток млекопитающих, причем раствор имеет рН от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) и содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около 1,0 миллимоля (мМ) до около 10 мМ.

2. Композиция по варианту осуществления 1, где раствор имеет осмоляльность от около 250 миллиосмоль/кг раствора до около 350 миллиосмоль/кг раствора.

3. Композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждая гидрогелевая капсула в совокупности содержит ионно перекрестно-сшитый альгинат.

4. Композиция по любому из вариантов осуществления, где рН раствора составляет от 6,5 до 9,0 при температуре от 15°C до 25°C.

5. Композиция по любому из вариантов осуществления, где концентрация элементарного кальция находится между значением x и значением y , причем значения x и y выбраны из группы, состоящей из:

x =около 1,1 мМ и y =около 8,0 мМ, 6,0 мМ, 4,0 мМ или 2,0 мМ;

x =около 1,2 мМ и y =около 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ или 2,0 мМ;

x =около 1,2 мМ и y =около 2,0 мМ или 1,5 мМ;

x =около 1,3 мМ и y =около 1,4 мМ;

x =около 1,4 мМ и y =около 4,0 мМ, 3,0 мМ или 2,0 мМ; и

x =около 1,5 мМ и y =около 2,5 мМ.

6. Композиция по любому из вариантов осуществления, при этом раствор дополнительно содержит по меньшей мере один источник углерода (например, сахар (например, декстроза, глюкоза, галактоза, гексоза, фруктоза, мальтоза), глицерин, глютамин, пируват или их соль).

7. Композиция по любому из вариантов осуществления, где раствор дополнительно содержит буферный агент, который содержит одну или более из ацетатной соли (например, ацетата натрия), глюконатной соли (например, глюконата натрия), фосфатной соли (например, одноосновного фосфата натрия), бикарбонатной соли (например, бикарбоната натрия) и лактатной соли (например, лактата натрия).

8. Композиция по варианту осуществления 7, где буферный агент содержит ацетат

натрия и глюконат натрия.

9. Композиция по варианту осуществления 8, где буферный агент состоит по существу из около 0,5-5 г/л ацетата натрия (например, 2 г/л, например, 2,29 г/л ацетата натрия) и около 0,5-10 г/л глюконата натрия (например, 5 г/л, например, 5,18 г/л) глюконата натрия.

10. Композиция по варианту осуществления 6, где источником углерода является глюкоза, а раствор не содержит добавленного глутамина или фенолового красного.

11. Композиция по варианту осуществления 7, где буферный агент содержит бикарбонат натрия и фосфат натрия, а раствор не содержит добавленных HEPES или пирувата натрия.

12. Композиция по любому из вариантов осуществления, где соль кальция представляет собой хлорид кальция.

13. Композиция по любому из вариантов осуществления, где раствор содержит от около 1,5 до около 2,5 мМ хлорида кальция, от около 5 до около 25 мМ D-глюкозы и от около 40 до около 50 мМ бикарбоната натрия.

14. Композиция по любому из вариантов осуществления, где раствор дополнительно содержит:

соединение магния (например, хлорид магния или сульфат магния);

соединение калия (например, хлорид калия);

хлорид натрия; и

набор аминокислот, который содержит гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин; и

набор витаминов, который содержит соединение витамина В1 (например, тиамин или соль тиамина, например, гидрохлорид тиамина), соединение витамина В3 (например, никотиновую кислоту или ниацинамид) и соединение витамина В6 (например, пиридоксин или соль пиридоксина, например, пиридоксина гидрохлорид).

15. Композиция по п. 14, причем набор аминокислот также содержит аргинин, глицин, цистин, серин и тирозин, а набор витаминов также содержит холин или соль холина (например, хлорид холина), соединение витамина В5 (например, пантотеновую кислоту или пантотенат кальция), фолатное соединение (например, фолиевую кислоту), рибофлавин и инозит.

16. Композиция по любому из вариантов осуществления, где некоторые или все аминокислоты в наборе являются L-аминокислотами.

17. Композиция по любому из вариантов осуществления, где раствор содержит или по существу состоит из компонентов и концентраций, указанных непосредственно ниже:

Компонент	Концентрация (г/л)
Дигидрат хлорида кальция	Около 0,298
Хлорид натрия	Около 5,252
Ацетат натрия	Около 2,291

Глюконат натрия	Около 5,175
Хлорид калия	Около 0,3703
Хлорид магния гексагидрат	Около 0,302
Вода	Не применимо

18. Композиция по любому из вариантов осуществления, где раствор содержит или по существу состоит из компонентов и концентраций, указанных непосредственно ниже:

Компонент	Концентрация (мМ)
Глицин	Около 0,400
Гидрохлорид L-аргинина	Около 0,398
Дигидрохлорид L-цистеина	Около 0,201
Моногидрат моногидрохлорида L-гистидина	Около 0,200
L-изолейцин	Около 0,802
L-лейцин	Около 0,802
Гидрохлорид L-лизина	Около 0,798
L-метионин	Около 0,201
L-фенилаланин	Около 0,400
L-серин	Около 0,400
L-треонин	Около 0,798
L-триптофан	Около 0,078
Дигидрат динатриевой соли L-тирозина	Около 0,398
L-валин	Около 0,803
Хлорид холина	Около 0,029

Компонент	Концентрация (мМ)
Пантотенат D-кальция	Около 0,008
Фолиевая кислота	Около 0,009
Ниацинамид	Около 0,038
Гидрохлорид пиридоксина	Около 0,018
Рибофлавин	Около 0,001
Гидрохлорид тиамина	Около 0,012
Изоинозитол	Около 0,040
Хлорид кальция (безводн.)	Около 1,802
Нонагидрат нитрата железа	Около 2,475 x 10 ⁻⁴
Сульфат магния (безводн.)	Около 0,814
Хлорид калия	Около 5,333
Бикарбонат натрия	Около 44,048
Хлорид натрия	Около 110,345
Натрия фосфат моноосновный	Около 0,906
Вода	Не применимо

необязательно где раствор дополнительно содержит D-глюкозу в количестве, выбранном из групп, состоящих из:

от около 1 мМ до около 50 мМ;
от около 2 мМ до около 40 мМ;
от около 3 мМ до около 30 мМ;
от около 4 мМ до около 20 мМ;
от около 5 мМ до около 10 мМ;
от около 10 мМ до около 40 мМ;
от около 15 мМ до около 35 мМ;
от около 20 мМ до около 30 мМ и
около 25 мМ.

19. Композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где каждая гидрогелевая капсула в совокупности имеет сфероподобную или сферическую форму и содержит:

компармент, содержащий клетки, который содержит множество живых клеток, инкапсулированных в первой полимерной композиции; и

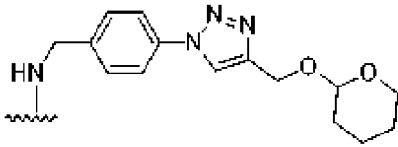
барьерный компармент, окружающий компармент, содержащий клетки, и содержащий вторую полимерную композицию, которая содержит ионно перекрестно-сшитый альгинат;

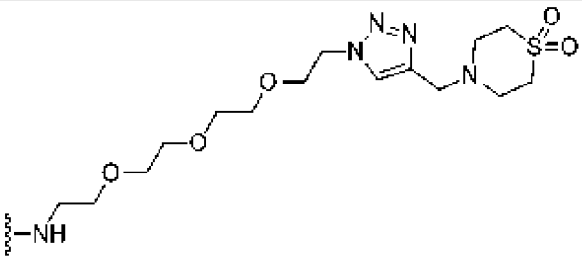
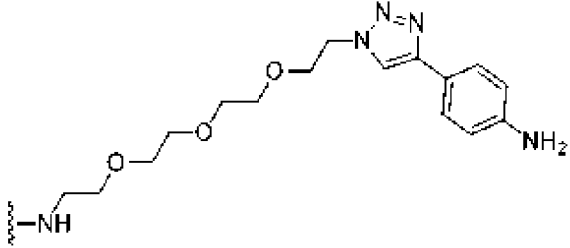
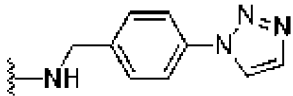
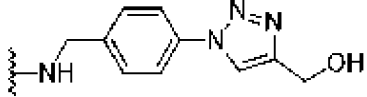
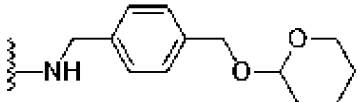
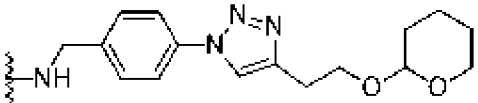
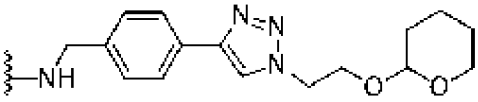
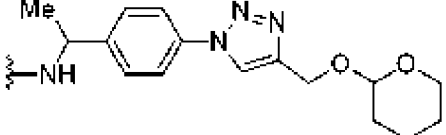
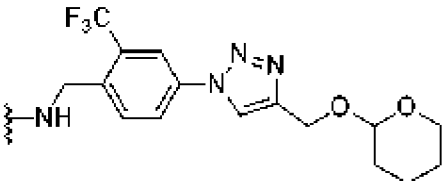
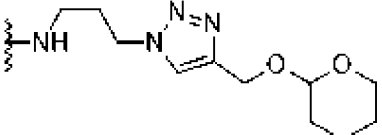
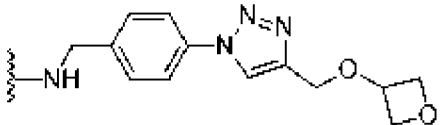
при этом средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от около 500 микрометров (мкм) до около 5000 мкм, от около 1000 мкм до около 3000 мкм, от около 1100 мкм до около 2500 мкм, от около 1200 мкм до около 2300 мкм, от около 1300 мкм до около 2100 мкм, от около 1400 мкм до около 2000 мкм, от около 1400 мкм до около 1900 мкм, от около 1400 мкм до около 1800 мкм.

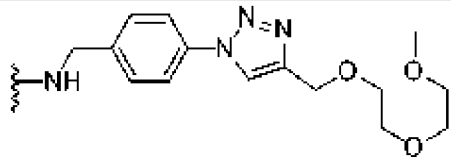
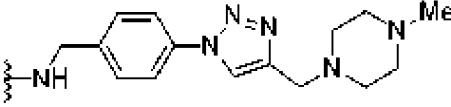
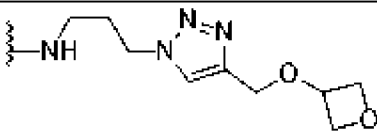
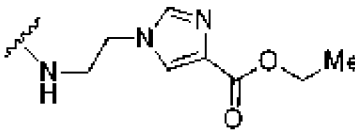
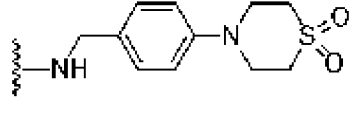
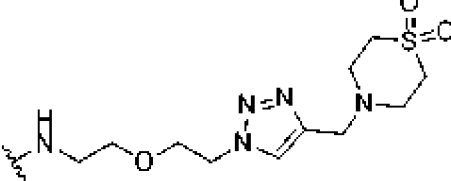
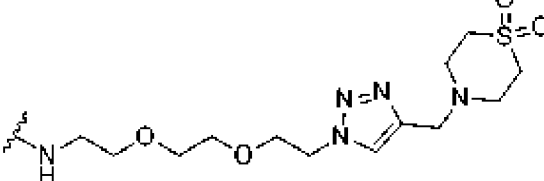
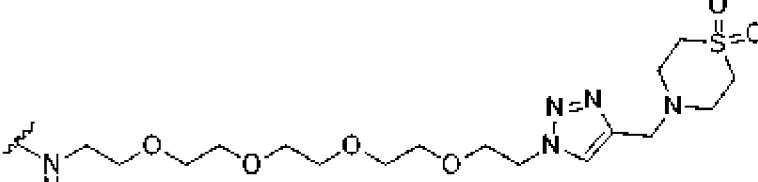
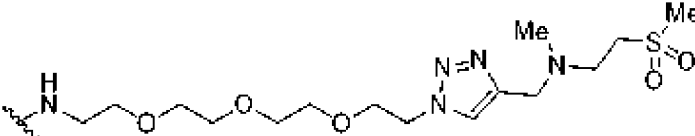
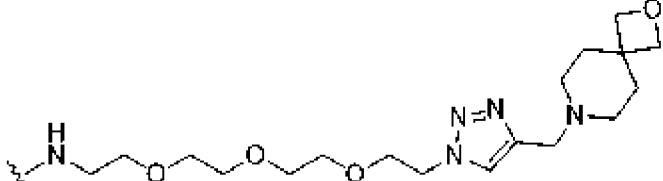
20. Композиция по варианту осуществления 19, где средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от 1400 до 2000 мкм.

21. Композиция по любому из вариантов осуществления, где средняя толщина барьерного компармента составляет от около 10 до около 300 микрон, от около 20 до около 150 микрон или от около 40 до около 75 микрон.

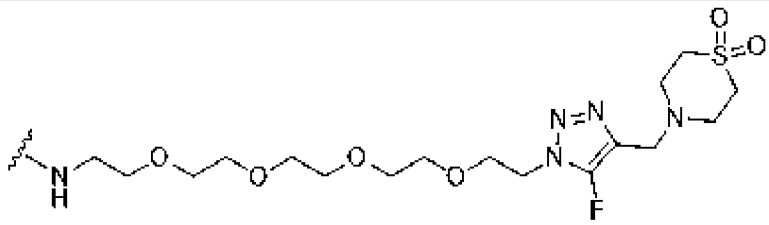
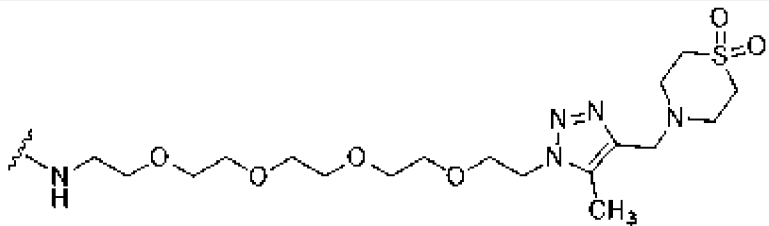
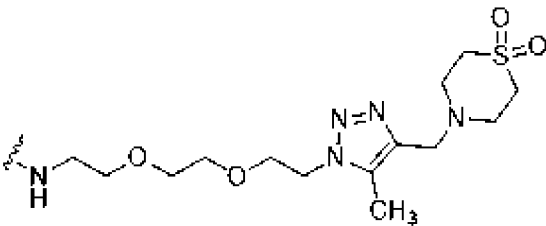
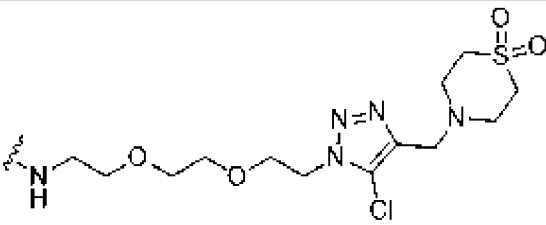
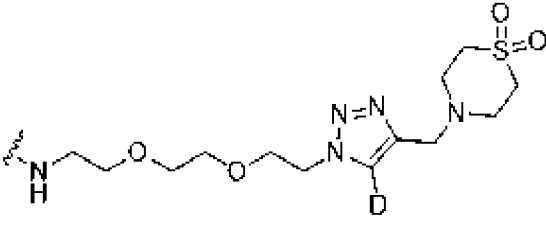
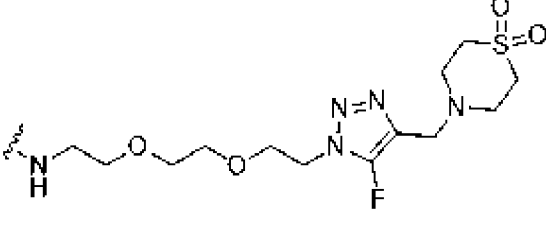
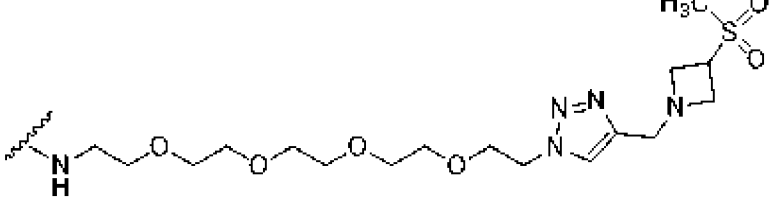
22. Композиция по любому из предыдущих вариантов осуществления, где первая полимерная композиция содержит альгинат, ковалентно модифицированный пептидом, контактирующим с клеткой через линкер, и при этом поперечно-сшитый альгинат в барьерном компарменте содержит альгинат, ковалентно модифицированный по меньшей мере одним неволокнистым соединением, необязательно соединением, выбранным из соединений, показанных в таблице ниже:

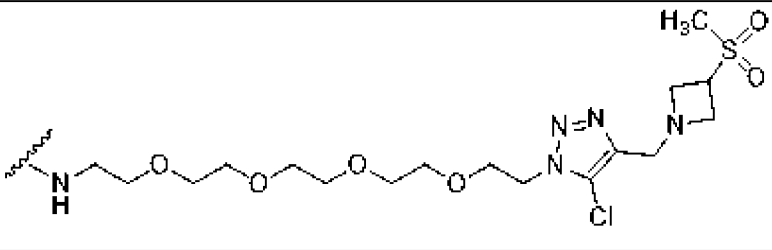
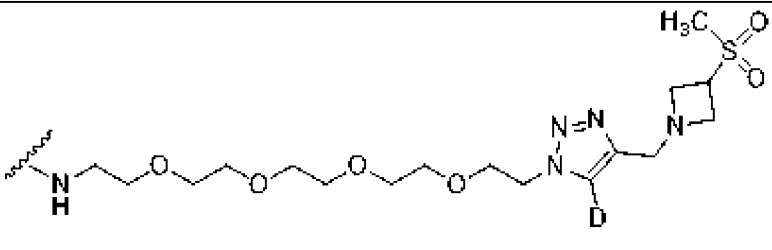
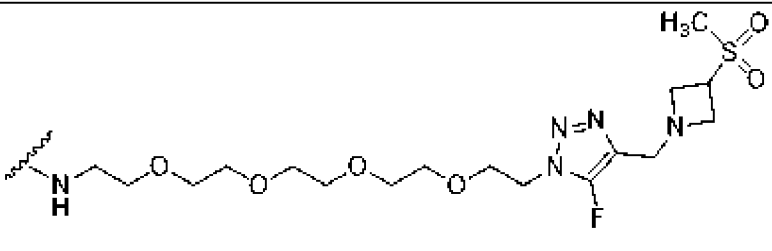
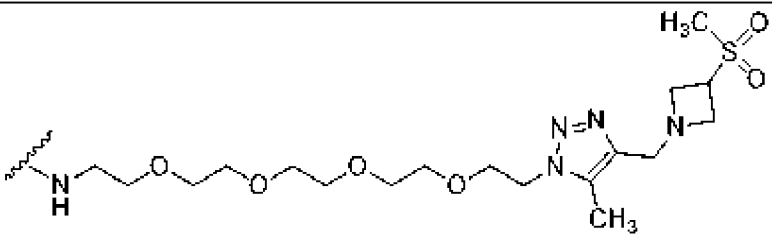
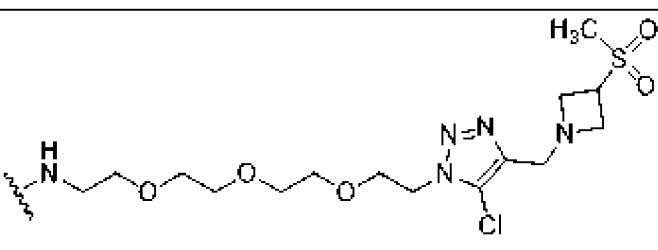
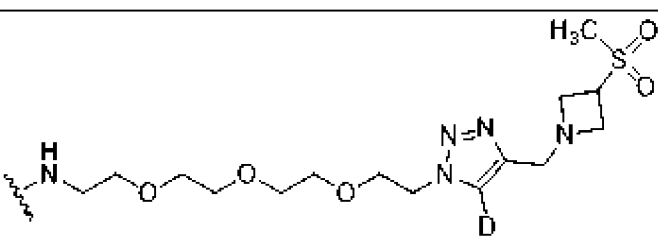
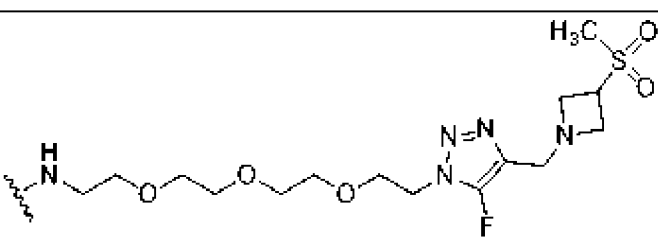
Соединение №	Структура
100	

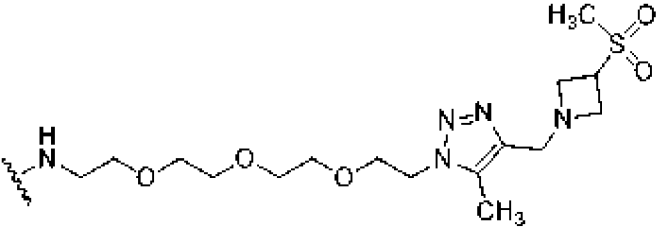
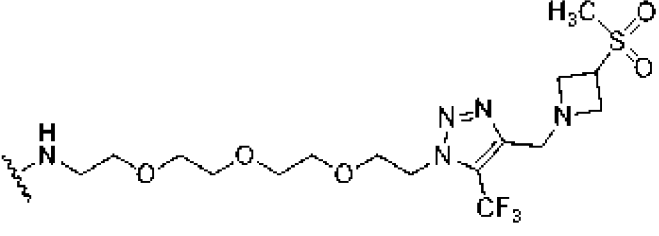
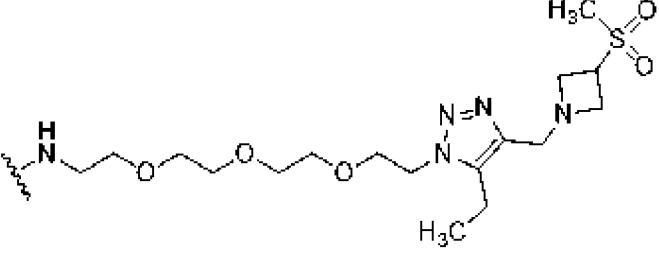
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	
108	
109	
110	
111	

112	
113	
114	
115	
116	
117	
118	
119	
120	
121	

122	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(CS(=O)(=O)C2)Cl</chem>
123	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(C2)S(=O)(=O)C</chem>
124	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(CS(=O)(=O)C2)</chem>
125	<chem>*NCCCN1C=NC=N1COc2ccoc2</chem>
126	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1c2ncn(C)c2</chem>
127	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1c2ccc(N)cc2</chem>
128	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(CS(=O)(=O)C2)D</chem>
129	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(CS(=O)(=O)C2)F</chem>
130	<chem>*NCCOCCOCCOCCOCCN1C=NC=N1C2CCN(CS(=O)(=O)C2)C</chem>

138	
139	
140	
141	
142	
143	
144	

145	
146	
147	
148	
149	
150	
151	

152	
153	
154	

23. Композиция по варианту осуществления 21, где ионно перекрестно-сшитый альгинат в барьерном компартменте содержит ионы бария в качестве по меньшей мере одного перекрестно-сшивающего агента.

24. Композиция по любому из вариантов осуществления, где ионно перекрестно-сшитый альгинат в барьерном компартменте содержит смесь ковалентно модифицированного альгината и немодифицированного альгината.

25. Композиция по любому из вариантов осуществления, где ковалентно модифицированный альгинат в компартменте, содержащем клетки, ионно перекрестно-сшит ионами бария в качестве по меньшей мере одного перекрестно-сшивающего агента.

26. Композиция по любому из вариантов осуществления, где:

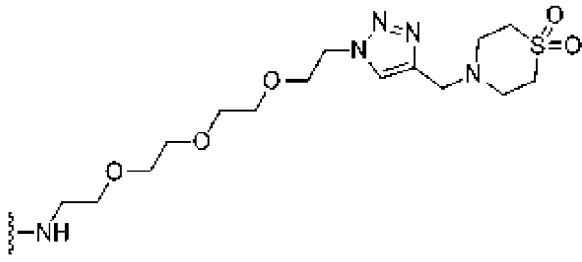
средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от 1400 мкм до 2000 мкм, или от 1400 мкм до 1600 мкм, или от 1000 мкм до 1200 мкм;

альгинат в первой полимерной композиции имеет молекулярную массу от 150 до 250 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5;

пептид, контактирующий с клеткой, состоит из RGDSP, а линкер представляет собой одиночный остаток глицина, присоединенный к N-концу пептида, контактирующего с клеткой;

альгинат в ковалентно-модифицированном альгинате в барьерном компартменте имеет молекулярную массу <75 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5;

антифибротическое соединение представляет собой



; и

немодифицированный альгинат в барьерном компартменте имеет молекулярную массу от 150 кДа до 250 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5.

27. Композиция по любому из вариантов осуществления, где живые клетки млекопитающих представляют собой клетки человека.

28. Композиция по любому из вариантов осуществления, где клетки происходят из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки.

29. Композиция по любому из вариантов осуществления, где клетки получены из клетки RPE, необязательно полученной из клетки ARPE-19.

30. Композиция по любому из вариантов осуществления, где инкапсулированные клетки содержат отдельные клетки.

31. Композиция по любому из вариантов осуществления, где инкапсулированные клетки содержат один или несколько кластеров клеток.

32. Композиция по любому из вариантов осуществления, где инкапсулированные клетки включают клетки, расположенные на микрогранулах.

33. Композиция по любому из вариантов осуществления, где живые клетки млекопитающих генетически модифицированы для экспрессии и секреции терапевтического вещества, например, терапевтического полипептида.

34. Композиция по любому из вариантов осуществления, где клетки млекопитающих содержат экзогенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует терапевтический полипептид, необязательно при этом терапевтический полипептид представляет собой фактор роста, фактор свертывания крови, фермент, цитокин, цитокиновый рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

35. Композиция по варианту осуществления 34, где терапевтический полипептид представляет собой белок FVIII (например, белок FVIII BDD), белок FIX или белок FVII.

36. Композиция по варианту осуществления 34, где терапевтический полипептид представляет собой белок GLA, белок IDUA, белок IDS, белок ARSB или белок GBA.

37. Композиция по любому из вариантов осуществления 19-36, где количество живых клеток млекопитающих составляет от около 5000 до около 250000 клеток, от около 10000 до около 125000 клеток, от около 20000 до около 75000 клеток, от около 12500 до около 40000 клеток или от около 15000 до около 30000 клеток.

38. Композиция по любому из вариантов осуществления, которая содержит от около 200 до около 400 гидрогелевых капсул на миллилитр фармацевтически приемлемого раствора.

39. Герметичный контейнер, содержащий композицию по любому из пунктов выше.

40. Герметичный контейнер по п. 39, где объем водного раствора (VS) в контейнере примерно равен или превышает объем гидрогелевых капсул (VHC) в контейнере.

41. Герметичный контейнер по варианту осуществления 39, где соотношение VS и VHC выбрано из группы, состоящей из:

от около 1,5 до около 100,

от около 2 до около 75,

от около 3 до около 50,

от около 4 до около 40,

от около 5 до около 30 и

от около 10 до около 20.

42. Герметичный контейнер по любому из вариантов осуществления 39-41, который выполнен с возможностью хранения таким образом, чтобы обеспечить по существу равномерное распределение всех гидрогелевых капсул в композиции по внутренней поверхности дна хранимого контейнера в слое капсулы, причем глубина равна от около 1,00 до около 1,25 от среднего диаметра капсул в композиции.

43. Герметичный контейнер по любому из вариантов осуществления 39-42, в котором все внутренние поверхности контейнера состоят по существу из фторированного этиленпропилена (FEP) или полиэтилентерефталатгликоля (PETG).

44. Герметичный контейнер по любому из вариантов осуществления 39-43, который представляет собой гибкий прямоугольный пакет, который содержит первое отверстие, выполненное с возможностью добавления композиции в пакет, и второе отверстие, выполненное с возможностью удаления желаемого объема композиции из пакета.

45. Герметичный контейнер по варианту осуществления 44, в котором средний диаметр гидрогелевых капсул в контейнере составляет около 1500 мкм, площадь внутренней поверхности составляет около 500 см², а общий объем композиции в контейнере составляет от около 200 мл до около 500 мл.

46. Герметичный контейнер по любому из вариантов осуществления 39-45, где средний диаметр гидрогелевых капсул в контейнере составляет около 1500 мкм, а соотношение VHC и VS составляет по меньшей мере около 1:1, 1:2, 1:3 и менее около 1:40, например, примерно любое из 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 и 1:35.

47. Способ лечения субъекта, нуждающегося в терапевтическом веществе, включающий предоставление композиции по любому из вариантов осуществления 33-38 и введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции.

48. Способ по варианту осуществления 47, где введение включает введение эффективного количества во внутрибрюшинную полость субъекта.

49. Способ по вариантам осуществления 47 или 48, где субъектом является человек.

50. Способ изготовления герметичного контейнера, содержащего композицию гидрогелевых капсул, включающий:

(i) предоставление совокупности гидрогелевых капсул, инкапсулирующих живые клетки млекопитающих, необязательно при этом клетки млекопитающих генетически

модифицированы для экспрессии и секреции терапевтического вещества, например, терапевтического полипептида;

(ii) объединение совокупности гидрогелевых капсул с фармацевтически приемлемым водным раствором;

(iii) помещение желаемого объема композиции капсул в биосовместимый герметичный контейнер таким образом, чтобы образовался слой капсул, в котором практически все капсулы в объеме композиции распределены практически равномерно по дну контейнера на глубине, которая составляет от около 1,00 до около 1,25 от среднего диаметра капсул в композиции; и

(iv) герметизацию контейнера.

51. Способ по варианту осуществления 50, где водный раствор имеет рН от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) и содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около 1,0 миллимоль (мМ) до около 10 мМ.

52. Способ по вариантам осуществления 50 или 51, который перед стадией герметизации включает добавление в контейнер желаемого объема фармацевтически приемлемого водного раствора для образования слоя раствора поверх слоя капсулы.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 50-52, который дополнительно включает хранение герметичного контейнера в течение желаемого периода времени при температуре от 2°C до 30°C или от около 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) в течение желаемого периода времени и оценки жизнеспособности инкапсулированных клеток в композиции в один или несколько моментов времени в течение желаемого периода времени.

Примеры

Следующие примеры приведены для более полного понимания описанного в данном документе изобретения. Примеры, описанные в этой заявке, предлагаются для иллюстрации генетически модифицированных клеток, композиций и имплантируемых устройств и способов, представленных в настоящем документе, и не должны быть истолкованы каким-либо образом как ограничивающие их объем.

Пример 1. Культивирование типичных генетически модифицированных клеток ARPE-19 для инкапсуляции

Генетически модифицированные клетки ARPE-19, экспрессирующие одно или несколько терапевтических веществ, описанных в настоящем документе, можно культивировать для получения композиции клеток, подходящей для инкапсуляции в двухкомpartmentные гидрогелевые капсулы. Генетически модифицированные клетки выращивают в полной питательной среде (DMEM:F12 с 10% FBS) в колбах для культивирования клеток площадью 150 см² или в камерах для культивирования CellSTACK® (Corning Inc., Corning, Нью-Йорк). Для пассажа клеток среду в культуральной колбе аспирируют и клеточный слой кратковременно промывают фосфатно-солевым буфером (рН 7,4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄ и 2 мМ KH₂PO₄, Gibco). В колбу добавляют 5-10 мл 0,05% (масс./об.) раствора трипсина/0,53 мМ ЭДТА («ТрипсинЭДТА»)

и наблюдают за клетками под инвертированным микроскопом до тех пор, пока слой клеток не диспергируется, обычно 3-5 минут. Чтобы избежать слипания, с клетками обращаются осторожно, а удары или встряхивание колбы во время периода диспергирования сводятся к минимуму. Если клетки не отделяются, колбы помещают при 37°C для облегчения расселения. После того как клетки рассеются, добавляют 10 мл полной ростовой среды и аккуратно отсасывают клетки с помощью пипетки. Клеточную суспензию переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при ускорении примерно 125 g в течение 5-10 минут для удаления трипсинЭДТА. Супернатант отбрасывают, а клетки ресуспендируют в свежей питательной среде. Соответствующие аликвоты клеточной суспензии добавляют в новые культуральные сосуды и инкубируют при 37°C. Среда обновляется еженедельно.

Пример 2. Получение типичных модифицированных полимеров

Химически модифицированный полимер. Полимерный материал может быть химически модифицирован соединением формулы (I) (или его фармацевтически приемлемой солью) перед образованием описанного в данном документе устройства (например, гидрогелевой капсулы). Например, в случае альгината альгинат-карбоновую кислоту активируют для связывания с одним или несколькими соединениями с функциональными аминогруппами для получения альгината, модифицированного неволокнистым соединением, например, соединением формулы (I). Альгинатный полимер растворяют в воде (30 мл/грамм полимера) и обрабатывают 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазином (0,5 экв.) и N-метилморфолином (1 экв.). К этой смеси добавляют раствор интересующего соединения (например, соединения 101, показанного в таблице 4) в ацетонитриле (0,3 M).

Количества добавляемого соединения и связывающего реагента зависят от желаемой концентрации соединения, связанного с альгинатом, например, плотности конъюгации. Средняя плотность конъюгации соединения 101 обычно составляет от 2% до 5% N, тогда как высокая плотность конъюгации соединения 101 обычно составляет от 5,1% до 8% N. Для получения раствора альгината с низкой молекулярной массой, химически модифицированного средней плотностью конъюгации соединения 101 (CM-LMW-Alg-101-средний полимер), растворенный немодифицированный альгинат с низкой молекулярной массой (приблизительно MW < 75 кДа, соотношение G:M \geq 1,5) обрабатывают с помощью 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (5,1 ммоль/г альгината) и N-метилморфолина (10,2 ммоль/г альгината) и соединения 101 (5,4 ммоль/ г альгината). Для получения раствора альгината с низкой молекулярной массой, химически модифицированного высокой плотностью конъюгации соединения 101 (CM-LMW-Alg-101-высокий полимер), растворенный немодифицированный альгинат с низкой молекулярной массой (приблизительно MW < 75 кДа, соотношение G:M \geq 1,5) обрабатывают с помощью 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (5,1 ммоль/г альгината) и N-метилморфолина (10,2 ммоль/г альгината) и соединения 101 (10,5 ммоль/ г альгината).

Реакционную смесь нагревают до 55°C в течение 16 часов, затем охлаждают до комнатной температуры и осторожно концентрируют на роторном испарителе, затем

остаток растворяют в воде. Смесь фильтруют через слой цианомодифицированного силикагеля (Silicycle) и осадок на фильтре промывают водой. Полученный раствор затем подвергают интенсивному диализу (мембрана с молекулярной массой 10 000 MWCO) и раствор альгината концентрируют посредством лиофилизации для получения желаемого химически модифицированного альгината в виде твердого вещества или концентрируют с использованием любого метода, подходящего для получения химически модифицированного раствора альгината с вязкостью от 25 сП до 35 сП.

Плотность конъюгации химически модифицированного альгината определяют методом сжигания по процентному содержанию азота. Образец получают путем диализа раствора химически модифицированного альгината против воды (мембрана 10000 MWCO) в течение 24 часов, дважды заменяя воду с последующей лиофилизацией до постоянного веса.

CBP-альгинаты. Полимерный материал может быть ковалентно модифицирован клеточно-связывающим пептидом перед формированием описанного в данном документе устройства (например, описанной в данном документе гидрогелевой капсулы) с использованием способов, известных в данной области техники, см., например, Jeon O, et al., *Tissue Eng Part A*. 16:2915-2925 (2010) and Rowley, J.A. et al., *Biomaterials* 20:45-53 (1999).

Например, в случае альгината раствор альгината (1%, масс./об.) готовят с использованием 50 мМ буферного раствора гидрата 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, содержащего 0,5 М NaCl при pH 6,5, и последовательно смешивают с N-гидроксисукцинимидом и 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодиимидом (EDC). Молярное соотношение N-гидроксисукцинимиды и EDC составляет 0,5:1,0. Интересующий пептид добавляют к раствору альгината. Количество добавленного пептида и связывающего реагента зависит от желаемой концентрации пептида, связанного с альгинатом, например, плотности конъюгации пептида. Увеличивая количество пептида и связывающего реагента, можно получить более высокую плотность конъюгации. После реакции в течение 24 часов реакционную смесь очищают диализом против сверхчистой деионизированной воды (diH₂O) (MWCO 3500) в течение 3 дней, обрабатывают активированным углем в течение 30 минут, фильтруют (фильтр 0,22 мм) и концентрируют до желаемой вязкости.

Плотность конъюгации модифицированного пептидом альгината определяют методом сжигания по процентному содержанию азота. Образец получают путем диализа раствора химически модифицированного альгината против воды (мембрана 10000 MWCO) в течение 24 часов, дважды заменяя воду с последующей лиофилизацией до постоянного веса.

Пример 3. Получение типичных растворов альгината для изготовления гидрогелевых капсул

Смесь химически модифицированного и немодифицированного альгината в соотношении 70:30. Альгинат с низкой молекулярной массой (альгинат PRONOVA™

VLVG, NovaMatrix, Sandvika, Норвегия, кат. № 4200506, приблизительная молекулярная масса < 75 кДа; соотношение G:M \geq 1,5) химически модифицируется соединением 101 с получением раствора химически модифицированного альгината с низкой молекулярной массой (CM-LMW-Alg-101) с вязкостью от 25 сП до 35 сП и плотностью конъюгации от 5,1% до 8% N, как определено методом сжигания на процентное содержание азота. Раствор высокомолекулярного немодифицированного альгината (U-HMW-Alg) получают путем растворения немодифицированного альгината (PRONOVA™ SLG100, NovaMatrix, Sandvika, Норвегия, кат. номер 4202106, примерная молекулярная масса 150 кДа - 250 кДа) при 3% масс. к объему в 0,9% физиологическом растворе. Раствор CM-LMW-Alg смешивают с раствором U-HMW-Alg в объемном соотношении от 70% CM-LMW-Alg и 30% U-HMW-Alg (называемого в данном документе раствор 70:30 CM-Alg:UM-Alg).

Немодифицированный раствор альгината. Немодифицированный альгинат со средней молекулярной массой (SLG20, NovaMatrix, Sandvika, Норвегия, кат. № 4202006, приблизительная молекулярная масса 75-150 кДа) растворяют в соотношении 1,4% по массе к объему в 0,9% физиологическом растворе для получения раствора U-MMW-Alg.

Немодифицированный раствор альгината. Немодифицированный альгинат со средней молекулярной массой (SLG20, NovaMatrix, Sandvika, Норвегия, кат. № 4202006, приблизительная молекулярная масса 75-150 кДа) растворяют в соотношении 1,4% по массе к объему в 0,9% физиологическом растворе для получения раствора U-MMW-Alg.

Раствор альгината, содержащий сайты связывания с клетками. Раствор альгината SLG20 модифицируют пептидом, состоящим из GRGDSP, как описано выше, и концентрируют до вязкости около 100 сП. Количество используемого пептида и связывающего реагента выбирают таким образом, чтобы достичь целевой плотности конъюгации пептида от около 0,2 до 0,3, определенной методом сжигания.

Пример 4. Образование иллюстративных двухкомpartmentных гидрогелевых капсул

Генетически модифицированные клетки могут быть инкапсулированы в двухкомpartmentные гидрогелевые капсулы в соответствии с известными в данной области техники способами, например, как описано в WO2021/113751. Иллюстративный протокол описан ниже.

Перед изготовлением гидрогелевых капсул буферы и растворы альгината стерилизуют фильтрацией через фильтр с размером пор 0,2 мкм в асептических условиях.

Непосредственно перед инкапсуляцией желаемый объем композиции, содержащей клетки (например, из культуры клеток, как описано в примере 1), центрифугируют при 1400 об./мин. в течение 1 мин. и промывают безкальциевым буфером Кребса-Хенселейта (KH) (4,7 мМ KCl, 25 мМ HEPES, 1,2 мМ KH_2PO_4 , 1,2 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 135 мМ NaCl, pH \approx 7,4, \approx 290 мОсм). После промывки клетки снова центрифугируют и отсасывают весь супернатант. Осадок клеток ресуспендируют в растворе альгината, модифицированном GRGDSP, как описано в примере 3, при желаемой плотности клеток (например, от около 50 до 150 миллионов суспендированных одиночных клеток на мл раствора альгината).

Для приготовления двухкомпарментных гидрогелевых микрокапсул диаметром около 1,5 мм электростатический водокапельный генератор настраивают следующим образом: высоковольтный генератор мощностью 20 Вт серии ES 0-100 кВ (серия EQ, Мацусида, Северная Каролина, США) соединен с верхней и нижней частью коаксиальной иглы. Для капсул без иммунодепрессанта подходящая игла имеет внутренний просвет 22G, внешний просвет 18G, Ramé-Hart Instrument Co., Суккасунна, Нью-Джерси, США. Для приготовления капсул, которые совместно инкапсулируют частицы иммунодепрессанта во внутреннем компартменте, внутренний просвет коаксиальной иглы, возможно, должен иметь больший диаметр, чтобы избежать засорения иглы частицами иммунодепрессанта, например, подходящая коаксиальная игла имеет внутренний просвет 21G и внешний просвет 17G, Ramé-Hart Instrument Co., Суккасунна, Нью-Джерси, США).

Внутренний просвет прикрепляется к первому шприцу Люэра объемом 5 мл (BD, Нью-Джерси, США), который соединен со шприцевым насосом (Pump 11 Pico Plus, Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс, США), ориентированным вертикально. Наружный просвет соединен через соединение Люэра со вторым шприцем Люэра объемом 5 мл, который соединен со вторым шприцевым насосом (Pump 11 Pico Plus), ориентированным горизонтально. Первый раствор альгината, содержащий генетически модифицированные клетки (в виде отдельных клеток), суспендированные в растворе альгината, модифицированного GRGDSP, помещают в первый шприц, а бесклеточный раствор альгината, содержащий смесь химически модифицированного альгината и немодифицированного альгината (например, смесь 70:30, описанную в примере 3), помещают во второй шприц. Два шприцевых насоса перемещают первый и второй растворы альгината из шприцев через оба просвета коаксиальной иглы, и отдельные капли, содержащие оба раствора альгината, выдавливаются из иглы в стеклянную чашку, содержащую перекрестно-сшивающий раствор. Настройки каждого шприцевого насоса Pico Plus имеют диаметр 12,06 мм, а скорость потока каждого насоса регулируется для достижения соотношения скоростей потока 1:1 для двух растворов альгината. Таким образом, при общей скорости потока, установленной на уровне 10 мл/ч, скорость потока для каждого раствора альгината составляла около 5 мл/ч. Контрольные (пустые) капсулы получают таким же образом, за исключением того, что раствор альгината, используемый для внутреннего отделения, представляет собой бесклеточный раствор.

После экструзии желаемых объемов растворов альгината капли альгината перекрестно сшиваются в течение пяти минут в перекрестно-сшивающем растворе, который содержит 25 мМ буфера HEPES, 20 мМ BaCl_2 , 0,2 М маннита и 0,01% полоксамера 188. Капсулы, падающие на дно перекрестно-сшивающего сосуда, собираются пипеткой в коническую пробирку. После того как капсулы осядут в пробирке, перекрестно-сшивающий буфер удаляют, капсулы несколько раз промывают водным раствором и хранят при желаемой температуре, например, комнатной температуре.

Пример 5. Состав водных растворов для хранения, использованных в примерах с 6 по 10.

Таблица А. Неорганические соли и источники углерода

Компонент	Раствор А	Раствор В	Раствор С	Раствор D	Раствор E*
CaCl ₂	Нет	0,30 г/л (дигидрат)	0,20 г/л (дигидрат)	0,20 г/л (дигидрат)	0,20 г/л (безводн.)
NaCl	5,25 г/л	5,25 г/л	6,00 г/л	6,00 г/л	6,40 г/л
NaOAc	2,29 г/л	2,29 г/л	Нет	Нет	Нет
KCl	0,37 г/л	0,37 г/л	0,30 г/л	0,30 г/л	0,40 г/л
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,30 г/л	0,30 г/л	Нет	Нет	Нет
Fe(NO ₃) ₃ (H ₂ O) ₉	Нет	Нет	Нет	Нет	0,001 г/л
MgSO ₄ (безводн.)	Нет	Нет	Нет	Нет	0,10 г/л
KCl	Нет	Нет	Нет	Нет	0,40 г/л
NaHCO ₃	Нет	Нет	Нет	Нет	3,70 г/л
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	Нет	Нет	Нет	Нет	0,13 г/л
Глюконат натрия	5,18 г/л	5,18 г/л	Нет	Нет	Нет
Лактат натрия	Нет	Нет	0,31 г/л	0,31 г/л	Нет
D-глюкоза	Нет	Нет	Нет	0,05 г/л	4,50 г/л
Стерильная вода	П	П	П	П	П
Осмоляльность/ осмолярность	255-340 Осм/кг	255-340 Осм/кг	273 мОсм/л (рассч.)	525 мОсм/л (рассч.)	320-350 мОсм/кг
pH	6,5-7,6	6,5-7,6	6,5 (6,0-7,5)	5,0 (4,0-6,5)	7,0-9,0

*Раствор E включает дополнительные компоненты, перечисленные в таблице B ниже.

Таблица B. Аминокислоты и витамины в растворе E

Компонент	Концентрация (г/л)	Компонент	Концентрация (г/л)
Глицин	0,030	L-триптофан	0,016
HCl L-аргинина	0,084	Na ₂ (H ₂ O) ₂ L-тирозина	0,104
2HCl L-цистеина	0,063	L-валин	0,094
HCl-H ₂ O L-гистидина	0,042	Хлорид холина	0,004
L-изолейцин	0,105	Ca D-пантотенат	0,004
L-лейцин	0,105	Фолиевая кислота	0,004
HCl L-лизина	0,146	Ниацинамид	0,004
L-метионин	0,030	HCl пиридоксина	0,004
L-фенилаланин	0,660	Рибофлавин	0,0004
L-серин	0,042	HCl тиамин	0,004
L-треонин	0,095	Изоинозитол	0,007

Пример 6. Жизнеспособность инкапсулированных клеток повышается за счет присутствия кальция в растворе для хранения капсул.

Двухкомpartmentные гидрогелевые капсулы, инкапсулирующие клетки ARPE-19, генетически модифицированные для секреции белка FVIII («сферы FVIII»), получали по существу, как описано в примере 4. Пять миллилитров (мл) сфер суспендировали в 63 мл раствора А или раствора В и полученные суспензии помещали в квадратный стерильный флакон Nalgene™ PETG объемом 125 мл (№ по каталогу ThermoFisher Scientific 342020-0125), уложенный горизонтально, и сферам давали осесть слоем толщиной 1,25х поперек дна флакона с оставшимся раствором для хранения образует слой раствора поверх слоя сферы. Содержащие сферы флаконы хранили в горизонтальном положении при комнатной температуре (например, около 25°C) в течение трех дней и жизнеспособность клеток оценивали в несколько моментов времени. Жизнеспособность клеток оценивали путем удаления аликвоты композиции сфер из каждого флакона, объединения аликвоты с раствором альгинатлиазы для переваривания альгинатного гидрогеля и высвобождения клеток из сфер, инкубации высвободившихся клеток с красителем трипановым синим и подсчета количества мертвых клеток (т. е. окрашенных трипановым синим) и живых клеток с использованием автоматического счетчика клеток.

Как показано на фиг. 1, жизнеспособность клеток в сферах, хранящихся в растворе А, постоянно снижалась в течение 3 дней хранения, тогда как жизнеспособность клеток в капсулах, хранившихся в растворе В, оставалась практически постоянной в течение 3 дней хранения. Поскольку единственной разницей между этими двумя растворами является присутствие 2 мМ хлорида кальция в растворе В, авторы настоящего изобретения предположили, что кальций важен для поддержания жизнеспособности клеток ARPE-19, инкапсулированных в гидрогелевые капсулы.

Основываясь на результатах дополнительных экспериментов, в которых FVIII-сферы хранились в водных растворах, содержащих различные количества хлорида кальция (данные не показаны), авторы настоящего документа полагают, что повышенная жизнеспособность *in vitro* инкапсулированных клеток ARPE-19 может быть достигнута, когда сферы, содержащие клетки хранят в водном растворе, содержащем концентрацию элементарного кальция от по меньшей мере около 1,0 миллимоль (мМ) до около 10 мМ, по сравнению с хранением тех же сфер в том же растворе, в котором отсутствует кальций.

Пример 7. Осмоляльность и pH раствора для хранения влияют на продуктивность инкапсулированных клеток.

Сферы FVIII получали практически так же, как описано в примере 4. Суспензию 1 миллилитра (мл) сфер в 30 мл раствора А, содержащего 2-5 мМ кальция (Ca-Sol А)) помещали в квадратные стерильные флаконы Nalgene™ PETG объемом 30 мл (ThermoFisher Scientific, кат. номер 342020-030), уложенные горизонтально, и суспензию из 5 миллилитров (мл) сфер в 63 мл водного раствора для хранения (раствор С или раствор D) помещали в стерильные квадратные флаконы Nalgene™ PETG объемом 125 мл (ThermoFisher Scientific, кат. номер 342020-0125), уложенные горизонтально. Сферам во

флаконах обоих размеров давали возможность осесть в виде монослоя на дне флакона, при этом оставшийся раствор для хранения образовывал слой раствора поверх слоя сфер. После хранения флаконов, содержащих сферы, в горизонтальном положении при комнатной температуре (например, около 25°C) в течение четырех дней, 0,25 мл сфер извлекали из каждого флакона и имплантировали во внутрибрюшинное (IP) пространство мышам NSG™ (The Jackson Laboratory, Эллсворт, Мэн, США). Четырем мышам имплантировали раствор для хранения. В качестве контроля 0,25 мл сфер FVIII, суспендированных в растворе А, содержащем 2-5 мМ кальция (Ca-Sol А), имплантировали в IP-пространство каждой из 4 мышей NSG через 20-30 часов после получения сфер. Через 7 дней после имплантации количество FVIII в плазме определяли для каждой группы с использованием иммуноферментного анализа (ELISA), и результаты показаны на фиг. 2.

Подобные уровни FVIII были секретированы из имплантированных сфер, которые хранились в Ca-Sol А или растворе С, в то время как плазменный FVIII не был обнаружен в сферах, хранящихся в растворе D. Поскольку осмоляльность и pH растворов А и С аналогичны, и раствор D имеет значительно более высокую осмоляльность и значительно более низкий pH. Авторы настоящего изобретения предположили, что осмоляльность и pH водного раствора для хранения являются факторами, которые могут влиять на продуктивность клеток, инкапсулированных в гидрогелевые капсулы.

Пример 8. Продуктивность инкапсулированных клеток можно повысить путем включения аминокислот и витаминов в раствор для хранения.

Сферы FVIII получали практически так же, как описано в примере 4. Суспензию 20 миллилитров (мл) сфер в 400 мл водного раствора для хранения (раствор В или раствор Е) помещали в прямоугольный лоток из PETG и сферам давали возможность осесть монослоем на дне лотка, а оставшийся раствор для хранения образует слой раствора поверх слоя сферы. После хранения лотков, содержащих сферы, при комнатной температуре (например, около 25°C) в течение до 120 часов, 0,5 мл сфер удаляли из каждого лотка и имплантировали во внутрибрюшинное (IP) пространство мышам NSG. Трех мышам имплантировали раствор для хранения и время хранения: сферы, хранившиеся в растворе В, имплантировали через 96 часов (t₉₆), а сферы, хранившиеся в растворе Е, имплантировали через 96 или 120 часов. В качестве контроля 0,5 мл сфер FVIII, суспендированных в том же растворе для хранения (раствор Е или раствор В), имплантировали в IP-пространство каждой из 3 мышей NSG в течение 4 часов после получения сфер. Через 6 дней после имплантации количество FVIII в плазме определяли для каждой группы с использованием иммуноферментного анализа (ELISA), и результаты показаны на фиг. 3.

Пример 9. Глубина слоя сферы в контейнере для хранения может влиять на продуктивность инкапсулированных клеток.

Сферы FVIII получали практически так же, как описано в примере 4. Три суспензии сфер, содержащие разные объемы сфер в одном и том же объеме Ca-Sol А, помещали в прямоугольные лотки из PETG. Объемы сфер в каждой суспензии были выбраны таким

образом, чтобы обеспечить соотношение сфера:раствор 1:20, 1:10 и 1:5 и осаждение сфер на дне лотка в виде монослоя, двойного слоя или тройного слоя соответственно. Лотки хранили в течение семи дней при комнатной температуре (например, около 25°C). По истечении 1, 5 и 7 дней из каждого лотка извлекали по пять сфер и инкубировали в 100 микролитрах культуральной среды при 37°C в течение 4-20 часов, а затем методом ELISA определяли количество FVIII, секретированного в культуральную среду. Результаты показаны на фиг. 4, где каждый столбец представляет собой среднее количество дубликатов образцов для каждой конфигурации лотка и времени хранения.

Результаты, показанные на фиг. 4 показывают, что толщина слоя сфер на дне контейнера для хранения может влиять на продуктивность инкапсулированных клеток *in vitro* во время хранения, при этом продуктивность сохраняется для сфер, хранящихся в виде монослоя в течение семи дней, тогда как продуктивность снижается для сфер, хранящихся в виде двух или трех слоев.

Пример 10: Соотношение сферы и раствора для хранения в контейнере для хранения оказывает минимальное влияние на продуктивность инкапсулированных клеток.

Сферы FVIII получали практически так же, как описано в примере 4. Четыре суспензии сфер, содержащие разные объемы сфер и объемы Ca-Sol A, помещали в квадратные стерильные флаконы Nalgene™ PETG объемом 125 мл (ThermoFisher Scientific кат. номер 342020-0125). Объемы сферы и раствора для хранения в каждой суспензии были выбраны для получения четырех различных конфигураций хранения при осаждении сферы: (1) монослой сферы с соотношением сфера:раствор 1:18; (2) монослой сферы с соотношением сфера:раствор 1:38; (3) слой сферы 1,25x с соотношением сфера:раствор 1:6 и (4) слой сферы 1,25x с соотношением сфера:раствор 1:30. Затем флаконы хранили при комнатной температуре (например, около 25°C) до 4 дней.

По истечении желаемого периода хранения (1 день для конфигурации хранения 1; 4 дня для конфигурации хранения 2-4) сферы объемом 0,5 мл извлекали из флаконов и имплантировали в IP-пространство мышей NSG, причем на каждую конфигурацию хранения имплантировали четырем мышам. Через 7 дней после имплантации количество FVIII в плазме определяли для каждой группы мышей с использованием иммуноферментного анализа (ELISA), и результаты показаны на фиг. 5. Результаты показывают, что практически одинаковые количества FVIII секретировались из имплантированных сфер, которые хранились в виде монослоя или слоя 1,25 в различных количествах раствора для хранения.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

Данная заявка относится к различным выданным патентам, опубликованным патентным заявкам, журнальным статьям и другим публикациям, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Если есть конфликт между любыми включенными ссылками и настоящим описанием, описание должно быть главным. Кроме того, любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения, который

относится к известному уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение явно здесь не указано. Любой конкретный вариант осуществления изобретения может быть исключен из любого пункта по любой причине, независимо от того, связано ли это с наличием известного уровня техники.

Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Объем вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, не ограничивается приведенным выше описанием, графическими материалами или примерами, а скорее соответствует прилагаемой формуле изобретения. Специалистам в данной области техники понятно, что можно осуществлять различные изменения и модификации этого описания без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения, определенных в нижеприведенной формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая совокупность гидрогелевых капсул, находящихся в фармацевтически приемлемом водном растворе, при этом каждая гидрогелевая капсула в совокупности инкапсулирует множество живых клеток млекопитающих, причем раствор имеет рН от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) и содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около 1,0 миллимоля (мМ) до около 10 мМ.

2. Композиция по п. 1, причем раствор имеет осмоляльность от около 250 миллиосмоль/кг раствора до около 350 миллиосмоль/кг раствора.

3. Композиция по п. 1, причем каждая гидрогелевая капсула в совокупности содержит ионно перекрестно-сшитый альгинат.

4. Композиция по п. 1, причем рН раствора составляет от 6,5 до 9,0 при температуре от 15°C до 25°C.

5. Композиция по п. 1, причем концентрация элементарного кальция находится между значением x и значением y , причем значения x и y выбраны из группы, состоящей из:

x =около 1,1 мМ и y =около 8,0 мМ, 6,0 мМ, 4,0 мМ или 2,0 мМ;

x =около 1,2 мМ и y =около 5 мМ, 4 мМ, 3 мМ или 2,0 мМ;

x =около 1,2 мМ и y =около 2,0 мМ или 1,5 мМ;

x =около 1,3 мМ и y =около 1,4 мМ;

x =около 1,4 мМ и y =около 4,0 мМ, 3,0 мМ или 2,0 мМ; и

x =около 1,5 мМ и y =около 2,5 мМ.

6. Композиция по п. 1, причем раствор дополнительно содержит по меньшей мере один источник углерода (например, сахар (например, декстроза, глюкоза, галактоза, гексоза, фруктоза, мальтоза), глицерин, глутамин, пируват или их соль).

7. Композиция по п. 1, причем раствор дополнительно содержит буферный агент, который содержит одну или более из ацетатной соли (например, ацетат натрия), глюконатной соли (например, глюконат натрия), фосфатной соли (например, одноосновный фосфат натрия), бикарбонатной соли (например, бикарбонат натрия) и лактатной соли (например, лактат натрия).

8. Композиция по п. 7, причем буферный агент содержит ацетат натрия и глюконат натрия.

9. Композиция по п. 8, причем буферный агент состоит по существу из около 0,5-5 г/л ацетата натрия (например 2 г/л, например 2,29 г/л ацетата натрия) и около 0,5-10 г/л глюконата натрия (например 5 г/л, например 5,18 г/л глюконата натрия).

10. Композиция по п. 6, причем источником углерода является глюкоза, а раствор не содержит добавленного глутамина или фенолового красного.

11. Композиция по п. 7, причем буферный агент содержит бикарбонат натрия и фосфат натрия, а раствор не содержит добавленных HEPES или пирувата натрия.

12. Композиция по п. 1, причем соль кальция представляет собой хлорид кальция.

13. Композиция по п. 1, причем раствор содержит от около 1,5 мМ до около 2,5 мМ хлорида кальция, от около 5 мМ до около 25 мМ D-глюкозы и от около 40 мМ до около 50 мМ бикарбоната натрия.

14. Композиция по п. 1, причем раствор дополнительно содержит:
соединение магния (например, хлорид магния или сульфат магния);
соединение калия (например, хлорид калия);

хлорид натрия; и

набор аминокислот, который содержит гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин; и

набор витаминов, который содержит соединение витамина В1 (например, тиамин или соль тиамина, например, гидрохлорид тиамина), соединение витамина В3 (например, никотиновую кислоту или ниацинамид) и соединение витамина В6 (например, пироксидин или соль пироксидина, например, пироксидина гидрохлорид).

15. Композиция по п. 14, причем набор аминокислот также содержит аргинин, глицин, цистин, серин и тирозин, а набор витаминов также содержит холин или соль холина (например, хлорид холина), соединение витамина В5 (например, пантотеновую кислоту или пантотенат кальция), фолатное соединение (например, фолиевую кислоту), рибофлавин и изоинозит.

16. Композиция по п. 1, причем каждая гидрогелевая капсула в совокупности имеет сфероподобную или сферическую форму и содержит:

компаратмент, содержащий клетки, который содержит множество живых клеток, инкапсулированных в первой полимерной композиции; и

барьерный компартмент, окружающий компартмент, содержащий клетки, и содержащий вторую полимерную композицию, которая содержит ионно перекрестно-сшитый альгинат;

при этом средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от около 500 микрометров (мкм) до около 5000 мкм, от около 1000 мкм до около 3000 мкм, от около 1100 мкм до около 2500 мкм, от около 1200 мкм до около 2300 мкм, от около 1300 мкм до около 2100 мкм, от около 1400 мкм до около 2000 мкм, от около 1400 мкм до около 1900 мкм, от около 1400 мкм до около 1800 мкм.

17. Композиция по п. 16, причем средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от 1400 до 2000 мкм.

18. Композиция по п. 16, причем средняя толщина барьерного компартмента составляет от около 10 до около 300 микрон, от около 20 до около 150 микрон или от около 40 до около 75 микрон.

19. Композиция по п. 16, причем первая полимерная композиция содержит альгинат, ковалентно модифицированный пептидом, контактирующим с клеткой, через линкер, и при этом поперечно-сшитый альгинат в барьерном компартменте содержит альгинат, ковалентно модифицированный по меньшей мере одним антифибротическим соединением, необязательно соединением, показанным в таблице 1.

20. Композиция по п. 19, причем ионно перекрестно-сшитый альгинат в барьерном компартменте содержит ионы бария в качестве по меньшей мере одного перекрестно-сшивающего агента.

21. Композиция по п. 19, причем ионно перекрестно-сшитый альгинат в барьерном компартменте содержит смесь ковалентно модифицированного альгината и немодифицированного альгината.

22. Композиция по п. 20, причем ковалентно модифицированный альгинат в компартменте, содержащем клетки, ионно перекрестно-сшит ионами бария в качестве по меньшей мере одного перекрестно-сшивающего агента.

23. Композиция по п. 21, причем:

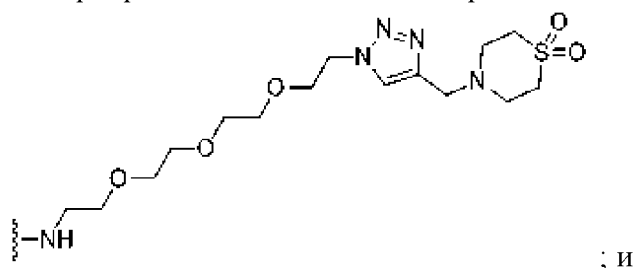
средний диаметр гидрогелевых капсул в совокупности составляет от 1400 мкм до 2000 мкм, или от 1400 мкм до 1600 мкм, или от 1000 мкм до 1200 мкм;

альгинат в первой полимерной композиции имеет молекулярную массу от 150 до 250 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5;

пептид, контактирующий с клеткой, состоит из RGDSP, а линкер представляет собой одиночный остаток глицина, присоединенный к N-концу пептида, контактирующего с клеткой;

альгинат в ковалентно-модифицированном альгинате в барьерном компартменте имеет молекулярную массу <75 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5;

антифибротическое соединение представляет собой



немодифицированный альгинат в барьерном компартменте имеет молекулярную массу от 150 кДа до 250 кДа и соотношение G:M, которое больше или равно 1,5.

24. Композиция по п. 1, причем живые клетки млекопитающих представляют собой клетки человека.

25. Композиция по п. 1, причем клетки получены из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки.

26. Композиция по п. 1, причем клетки получены из клетки RPE, необязательно полученной из клетки ARPE-19.

27. Композиция по п. 1, причем инкапсулированные клетки содержат отдельные клетки.

28. Композиция по п. 1, причем инкапсулированные клетки содержат один или более кластеров клеток.

29. Композиция по п. 1, причем инкапсулированные клетки содержат клетки, находящиеся на микрогранулах.

30. Композиция по п. 1, причем живые клетки млекопитающих генетически модифицированы для экспрессии и секреции терапевтического вещества, например, терапевтического полипептида.

31. Композиция по п. 1, причем клетки млекопитающих содержат экзогенную нуклеотидную последовательность, которая кодирует терапевтический полипептид, необязательно при этом терапевтический полипептид представляет собой фактор роста, фактор свертывания крови, фермент, цитокин, цитокиновый рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

32. Композиция по п. 31, причем терапевтический полипептид представляет собой белок FVIII (например, белок FVIII BDD), белок FIX или белок FVII.

33. Композиция по п. 31, причем терапевтический полипептид представляет собой белок GLA, белок IDUA, белок IDS, белок ARSB или белок GBA.

34. Композиция по п. 17, причем множество живых клеток млекопитающих составляет от около 5000 до около 250000 клеток, от около 10000 до около 125000 клеток, от около 20000 до около 75000 клеток, от около 12500 до около 40000 клеток или от около 15000 до около 30000 клеток.

35. Композиция по п. 1, которая содержит от около 200 до около 400 гидрогелевых капсул на миллилитр фармацевтически приемлемого раствора.

36. Герметичный контейнер, содержащий композицию по любому из пунктов выше.

37. Герметичный контейнер по п. 36, причем объем водного раствора (VS) в контейнере примерно равен или превышает объем гидрогелевых капсул (VHC) в контейнере.

38. Герметичный контейнер по п. 37, причем соотношение VS и VHC выбрано из группы, состоящей из:

от около 1,5 до около 100,

от около 2 до около 75,

от около 3 до около 50,

от около 4 до около 40,

от около 5 до около 30 и

от около 10 до около 20.

39. Герметичный контейнер по п. 37, который выполнен с возможностью хранения таким образом, чтобы обеспечить по существу равномерное распределение всех гидрогелевых капсул в композиции по нижней внутренней поверхности хранимого контейнера в слое капсул, причем глубина составляет от около 1,00 до около 1,25 от среднего диаметра капсул в композиции.

40. Герметичный контейнер по п. 37, причем все внутренние поверхности контейнера состоят по существу из фторированного этиленпропилена (FEP) или полиэтилентерефталатгликоля (PETG).

41. Герметичный контейнер по п. 37, который представляет собой гибкий прямоугольный пакет, который содержит первое отверстие, выполненное с возможностью

добавления композиции в пакет, и второе отверстие, выполненное с возможностью удаления желаемого объема композиции из пакета.

42. Герметичный контейнер по п. 41, причем средний диаметр гидрогелевых капсул в контейнере составляет около 1500 мкм, площадь внутренней поверхности составляет около 500 см², а общий объем композиции в контейнере составляет от около 200 мл до около 500 мл.

43. Герметичный контейнер по п. 37, причем средний диаметр гидрогелевых капсул в контейнере составляет около 1500 мкм, а соотношение VHC и VS составляет по меньшей мере около 1:1, 1:2, 1:3 и менее чем около 1:40, например, около 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 и 1:35.

44. Способ лечения субъекта, нуждающегося в терапевтическом веществе, включающий предоставление композиции по п. 1 и введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции.

45. Способ по п. 44, причем введение включает введение эффективного количества во внутрибрюшинную полость субъекта.

46. Способ по п. 44, причем субъектом является человек.

47. Способ изготовления герметичного контейнера, содержащего композицию гидрогелевых капсул, включающий:

(i) предоставление совокупности гидрогелевых капсул, инкапсулирующих живые клетки млекопитающих, необязательно при этом клетки млекопитающих генетически модифицированы для экспрессии и секреции терапевтического вещества, например, терапевтического полипептида;

(ii) объединение совокупности гидрогелевых капсул с фармацевтически приемлемым водным раствором;

(iii) помещение желаемого объема композиции капсул в биосовместимый герметичный контейнер таким образом, чтобы образовался слой капсул, в котором практически все капсулы в объеме композиции распределены практически равномерно по дну контейнера на глубине, которая составляет от около 1,00 до около 1,25 от среднего диаметра капсул в композиции; и

(iv) герметизацию контейнера.

48. Способ по п. 47, причем водный раствор имеет pH от 6,0 до 9,0 при температуре от 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) и содержит соль кальция с концентрацией элементарного кальция от около 1,0 миллимоля (мМ) до около 10 мМ.

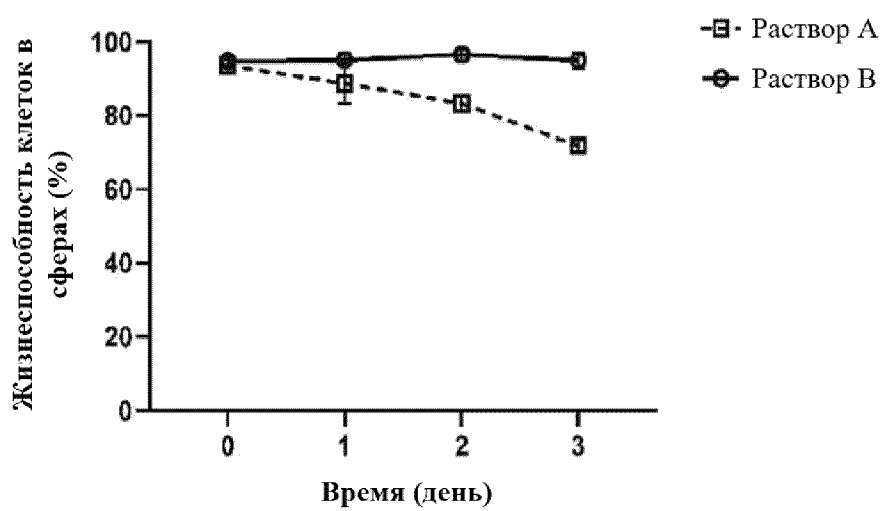
49. Способ по п. 47, который перед стадией герметизации включает добавление в контейнер желаемого объема фармацевтически приемлемого водного раствора для образования слоя раствора поверх слоя капсулы.

50. Способ по п. 49, который дополнительно включает хранение герметичного контейнера в течение желаемого периода времени при температуре от 2°C до 30°C или от около 12°C до 30°C (например, около 15-25°C) и оценку жизнеспособности инкапсулированных клеток в композиции в один или более моментов времени в течение

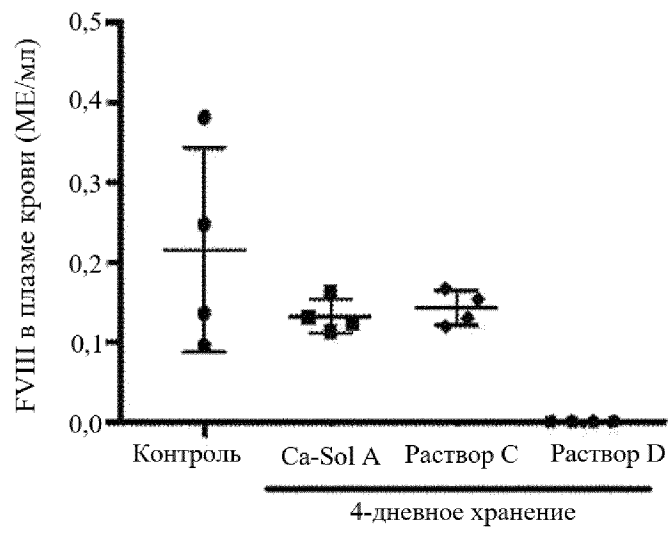
желаемого периода времени.

По доверенности

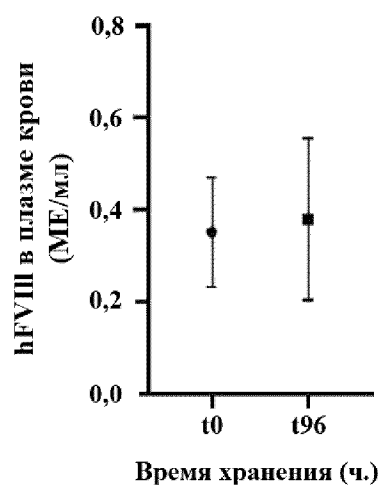
ФИГ. 1



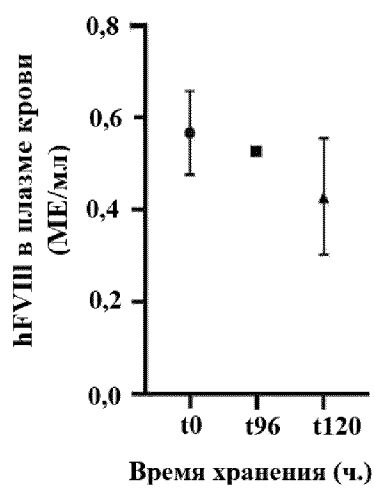
ФИГ. 2



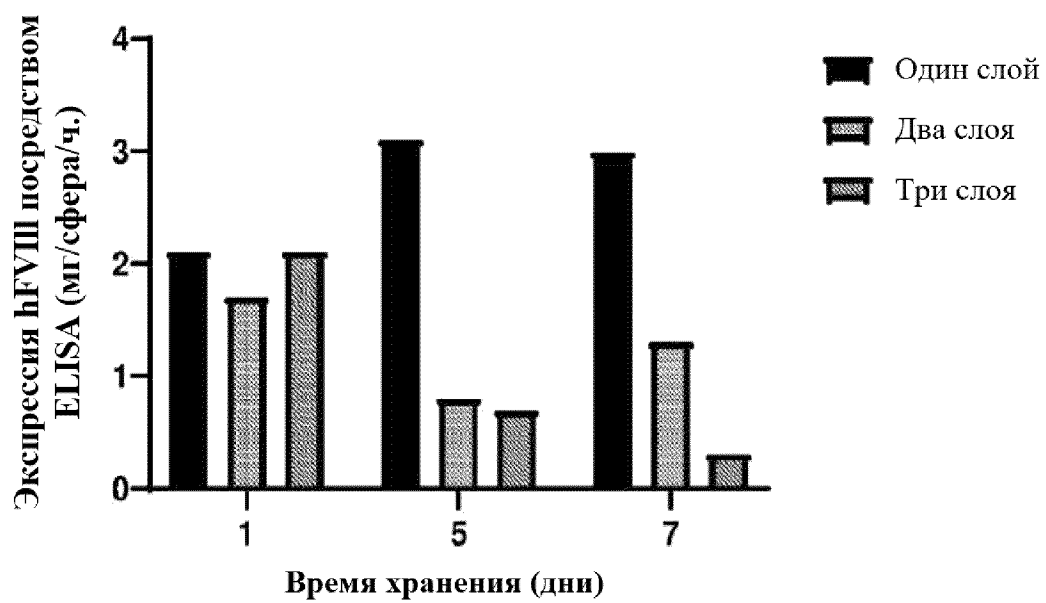
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 4



ФИГ. 5

