

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091702 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.24

(51) Int. Cl. C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.31

(54) БИОКАТАЛИЗАТОР И СПОСОБЫ СИНТЕЗА СМЕШАННЫХ ДИСУЛЬФИДНЫХ
КОНЬЮГАТОВ ТИЕНОПИРИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(31) 62/624,494

(72) Изобретатель:
Чжан Хаомин (US)

(32) 2018.01.31

(33) US

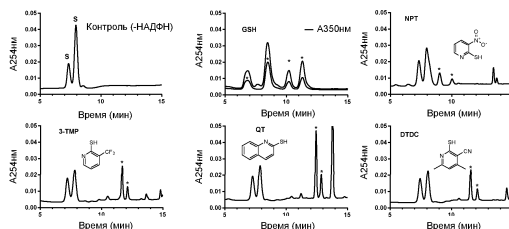
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(86) PCT/US2019/016099

(87) WO 2019/152679 2019.08.08

(71) Заявитель:
ЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способам синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений с генно-инженерным вариантом цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора и относится к области химического синтеза.



202091702

A1

A1

202091702

БИОКАТАЛИЗАТОР И СПОСОБЫ СИНТЕЗА СМЕШАННЫХ ДИСУЛЬФИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ ТИЕНОПИРИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ,

5 СПОНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

Настоящее изобретение было разработано при государственной поддержке под номером АА020090, присужденной Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

10 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

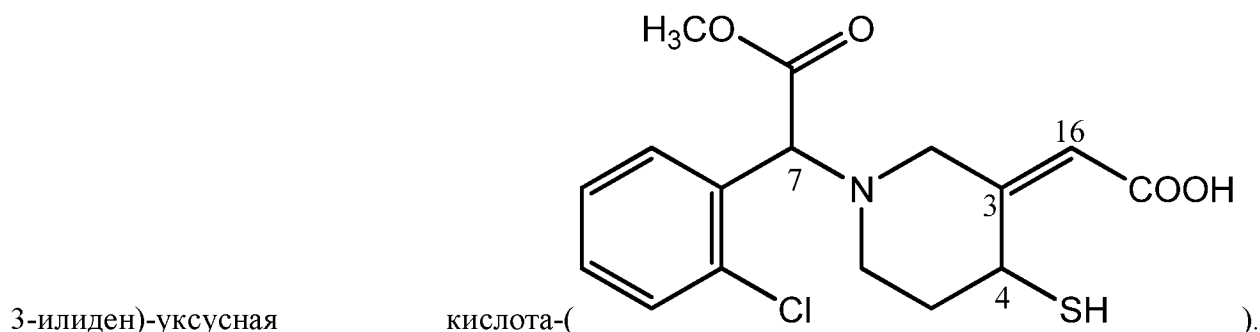
Настоящее изобретение относится к способам синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений с генно-инженерным вариантом цитохрома Р450 ВМ3 или СУР102А1 в качестве катализатора и относится к области химического синтеза.

15

ВВЕДЕНИЕ

Смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридинов представляют собой перспективные антитромбоцитарные агенты, как было продемонстрировано ранее (см., например, Zhang, H., et al., (2016) J Pharmacol Exp Ther 359, 11-17). Эти соединения представляют собой конъюгаты гетероциклических тиолов с активным антитромбоцитарным агентом тиенопиридинов. Одним из таких активных антитромбоцитарных агентов является фармакологически активный метаболит (АМ) клопидогрела, (Z)-2-(1-((S)-1-(2-хлорфенил)-2-метокси-2-оксоэтил)-4-меркаптопиперидин-

20



25 Образование дисульфидной связи между АМ и гетероциклическим тиолом приводит к образованию стабильного смешанного дисульфидного конъюгата, который может быть легко активирован *in vivo*, что приводит к быстрому и эффективному ингибированию агрегации тромбоцитов (см., например, Zhang, H., et al., (2016) J Pharmacol Exp Ther 359, 11-17; Zhang, H., et al., (2014) Thromb. Haemost. 112, 1304-1311).

Несмотря на превосходные антитромбоцитарные свойства, химический синтез активных метаболитов тиенопиридиновых соединений и их дисульфидных конъюгатов представляет собой сложную задачу (см., например, Asai, F., Sugidachi, K., Ikeda, T., Iwabuchi, H., Kuroki, Y., Inoue, T., Iwamura, R., and Shinbakawa, N. (2003) Cyclic amino compounds. (Office, U. P. a. T. ed., Sankyo Company, Limited, US; Shaw, S. A., et al., (2015) J Org Chem 80, 7019-7032). Химический синтез этих соединений включает несколько стадий с низким выходом. Частично это связано по меньшей мере с: 1) нестабильностью АМ при комнатной температуре; 2) наличием множества хиральных центров. В случае АМ клопидогрела он содержит два хиральных центра у С4 и С7 в дополнение к двойной связи у С3-16, что приводит к комбинации из восьми стереоизомеров. Только 7S и цис-двойная конфигурация АМ обладает антитромбоцитарной активностью. Однако эффективность преобразования транс в цис-конфигурацию очень низкая (см., например, Asai, F., Sugidachi, K., Ikeda, T., Iwabuchi, H., Kuroki, Y., Inoue, T., Iwamura, R., and Shinbakawa, N. (2003) Cyclic amino compounds. (Office, UP a. T. ed., Sankyo Company, Limited, США).

Ранее было показано, что в результате метаболизма тиенопиридиновых соединений в микросомах печени (МП) образуются АМ и его смешанные дисульфидные конъюгаты (см., например, Zhang, H., et al., (2014) Thromb. Haemost. 112, 1304-1311). Однако использование микросом печени для крупномасштабного синтеза является чрезмерно дорогостоящим из-за низкого выхода продукта и высокой стоимости МП. Фактически не существует эффективного способа получения больших количеств смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений для разработки лекарственных средств и других применений.

Соответственно, необходимы усовершенствованные способы получения больших количеств смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений для разработки лекарственных средств и других применений.

В настоящем изобретении раскрыта указанная потребность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Клопидогрел (Плавикс), тиклопидин (Тиклид) и прасугрел (Эффиент) относятся к классу тиенопиридинильных соединений, широко используемых в качестве антитромбоцитарных агентов для предотвращения сердечного приступа и инсульта. Однако с этими лекарственными средствами связано несколько серьезных недостатков, включая переменный ответ, токсичность и повышенный риск кровотечения. Эти недостатки тесно

связаны с тем фактом, что все они являются пролекарствами, требующими окислительной биоактивации полиморфными ферментами цитохромов P450 (P450).

Для преодоления недостатков, связанных с тиенопиридиновыми соединениями (клопидогрел (Плавикс), тиклопидин (Тиклид) и прасугрел (Эффидент)), в настоящем изобретении предложены смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений. Предполагают, что такие смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению способны продуцировать активные метаболиты тиенопиридина (например, активные метаболиты тиенопиридина, способные к антитромбоцитарной активности) в присутствии эндогенного глутатиона (GSH) без необходимости биоактивации с помощью P450. Данный подход позволяет не только обойти процесс окислительной биоактивации с помощью P450, но и позволяет обойти многие недостатки, связанные с тиенопиридиновыми лекарственными средствами. Например, предполагают, что смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению улучшают стабильность дозирования, поскольку продуцирование активного метаболита из конъюгатов предсказуемо. Кроме того, предполагают, что применение смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению в качестве антитромбоцитарных агентов снижает токсичность, поскольку токсичные реакционноспособные метаболиты не будут продуцироваться с помощью реакции обмена тиолами. Кроме того, время начала терапевтического действия смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению сокращено, что приносит большую пользу пациентам, испытывающим острые сердечно-сосудистые состояния. Например, стандартный режим приема клопидогрела требует непрерывного приема пациентами доз в течение 3-5 дней, так как только небольшой процент принимаемого внутрь лекарственного средства превращается в активный метаболит. Напротив, предполагают, что смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению будут высвобождать активные метаболиты с высоким выходом менее чем за 30 мин. Кроме того, предполагают, что смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению будут иметь более высокую стабильность по сравнению с активными метаболитами и, следовательно, могут быть использованы для количественного получения активных метаболитов для доклинических и клинических исследований *in vitro*.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу эффективного синтеза высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых

соединений с генно-инженерными биокатализаторами, то есть к одностадийному способу получения высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений путем смешивания 2-оксотииенопиридина и гетероциклических тиолов в присутствии восстанавливающего реагента НАДФН или НАДН и генно-инженерного варианта цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора. Осуществление способа является простым, сырье и реагенты легко доступны. Способы избирательно производят цис-стереоизомер конъюгатов с более высоким выходом, чем способы предшествующего уровня техники.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен мутантный фермент CYP102A1, способный катализировать конъюгацию между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего реагента. В некоторых вариантах реализации катализирование конъюгации между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего реагента приводит к образованию смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений. В некоторых вариантах реализации катализирование конъюгации между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего реагента селективно образует цис-стереоизомеры смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений. В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий реагент представляет собой НАДФН или НАДН.

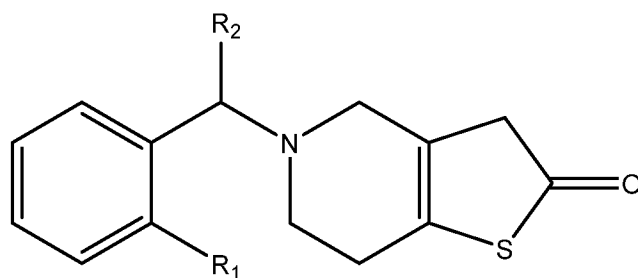
В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую одну или более из следующих аминокислотных мутаций в SEQ ID NO: 2: A82F, L188Q, R47L, F87V, T365N, H116Q, K31T, S56R, A135S, V299D, I458F, P481H и W1046A. В некоторых вариантах реализации

указанный фермент содержит аминокислотную последовательность, имеющую специфичный набор мутаций, перечисленных в Таблице 2.

В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 95% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А).

В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 95% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 100% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С).

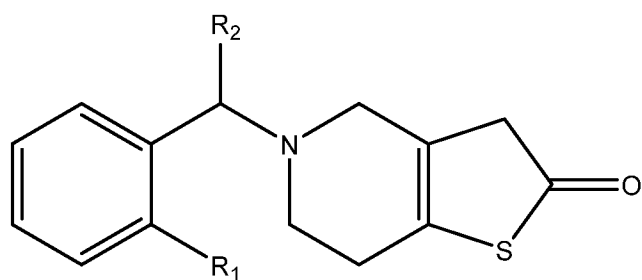
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы синтеза цис-стереоизомеров смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений, включающие смешивание 2-оксотииенопиридинового фрагмента, гетероциклического тиолового фрагмента и раскрытого в настоящей заявке мутантного фермента СУР102А1 в присутствии восстанавливающего реагента. В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий реагент представляет собой НАДФН или НАДН. В некоторых вариантах реализации указанный 2-оксотииенопиридиновый фрагмент представляет собой



; где R1 представляет собой хлор или фтор; где R2 представляет собой H, COOCH₃ или COCH₂CH₂. В некоторых вариантах реализации указанный гетероциклический тиоловый фрагмент представляет собой R₃-SH; где R₃ выбран из 3-нитропиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридина, 2-меркапто-6-метилпиридина, 5-хлорпиридин-2-тиола, 2-меркапто-5-трифторметилпиридина, 3-(трифторметил)пиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридин-3-карбонитрила, 4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила, 2-хинолинтиола, 1-амино-3-меркаптоизохинолина, 6-хлорпиридазин-3-тиола и 2,5-диметилфуран-3-тиола. В некоторых вариантах реализации смешивание осуществляют при температуре окружающей среды. В некоторых вариантах реализации смешивание осуществляют в течение периода времени от двадцати до шестидесяти минут. В некоторых вариантах реализации указанный мутантный фермент СУР102А1 содержится в цитозольной фракции бактерий. В некоторых вариантах реализации количество мутантного фермента СУР102А1 составляет приблизительно от 0,1 до 1 мкМ. В некоторых вариантах реализации смешивание приводит к образованию приблизительно 100 мг цис-стереоизомеров смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений на литр 2-оксотииенопиридинового фрагмента, гетероциклического тиолового фрагмента, мутантного фермента СУР102А1 и восстанавливающего реагента.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен набор, содержащий 2-оксотииенопиридиновый фрагмент, гетероциклический тиоловый фрагмент и один или более раскрытые в настоящей заявке мутантные ферменты СУР102А1.

В некоторых вариантах реализации указанный набор дополнительно содержит восстанавливающий реагент. В некоторых вариантах реализации указанный восстанавливающий реагент представляет собой НАДФН или НАДН. В некоторых вариантах реализации указанный 2-оксотииенопиридиновый фрагмент представляет собой



; где R1 представляет собой хлор или фтор;

где R2 представляет собой H, COOCH₃ или COCH₂CH₂. В некоторых вариантах реализации указанный гетероциклический тиоловый фрагмент представляет собой R3-SH;

где R3 выбран из 3-нитропиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридина, 2-меркапто-6-метилпиридина, 5-хлорпиридин-2-тиола, 2-меркапто-5-трифторметилпиридина, 3-(трифторметил)пиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридин-3-карбонитрила, 4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила, 2-хинолинтиола, 1-амино-3-меркаптоизохинолина, 6-хлорпиридазин-3-тиола и 2,5-диметилфуран-3-тиола.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, полученное раскрытым в настоящей заявке способом, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации указанная фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного введения.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен способ лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистого заболевания у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества соединения, полученного раскрытым в настоящей заявке способом. В некоторых вариантах реализации указанное введение выбрано из группы, состоящей из перорального введения и внутривенного введения. В некоторых вариантах реализации указанное сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, заболевания периферических сосудов, атеротромбоза и цереброваскулярного заболевания. В некоторых вариантах реализации указанное соединение снижает агрегацию тромбоцитов. В некоторых вариантах реализации указанное снижение агрегации указанных тромбоцитов происходит за счет необратимого связывания с рецепторами P2Y₁₂. В некоторых вариантах реализации указанное снижение агрегации указанных тромбоцитов происходит за счет блокады рецепторов АДФ. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает совместное введение по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из ингибитора HMG-CoA редуктазы, ингибитора АПФ, блокатора кальциевых каналов, ингибитора агрегации тромбоцитов,

полиненасыщенной жирной кислоты, производного фибриновой кислоты, секвестранта желчной кислоты, антиоксиданта, тромболитического агента и антиангинального агента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

5 ФИГ. 1: ВЭЖХ-анализы продуктов смешанного дисульфидного конъюгата клопидогрела. Реакцию проводили путем смешивания 2-оксолопидогрела, гетероциклического тиола, ВМЗ и НАДФН при 25 °С в течение 20 мин. Затем реакцию гасили равным объемом ацетонитрила, содержащего 1% муравьиной кислоты. Анализировали аликвоты по 5 мкл реакционной смеси с помощью ВЭЖХ. Двойной пик, обозначенный как «S», представляет собой рацемическую смесь двух стереоизомеров 2-оксолопидогрела, тогда как пики, обозначенные звездочками, представляют ожидаемые продукты. Элюирование наблюдали при 254 нм.

15 ФИГ. 2: ВЭЖХ-анализы продуктов смешанного дисульфидного конъюгата клопидогрела. Реакцию проводили путем смешивания (±)-2-оксолопидогрела, гетероциклического тиола, МП крысы и НАДФН при 25 °С в течение 20 мин.

 ФИГ. 3: Выход для синтеза ClopNPT в присутствии ВМЗ. Реакцию проводили при 25 °С.

 ФИГ. 4А: кДНК дикого типа с 1541 по 4690 цитохрома P-450 *B.megaterium* дикого типа: ген редуктазы НАДФН-P-450 (см., например, номер доступа J04832) (SEQ ID NO: 1).

20 ФИГ. 4В: Аминокислотная последовательность дикого типа для цитохрома P-450 *B.megaterium*: ген редуктазы НАДФ-P-450 (см., например, номер доступа J04832) (SEQ ID NO: 2).

 ФИГ. 4С: Оптимизированная кДНК для генно-инженерного варианта цитохрома P450 ВМЗ или СYP102A1 (SEQ ID NO: 3).

25

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

 Настоящее изобретение относится к генетически модифицированному варианту цитохрома P450 ВМЗ или СYP102A1 в качестве катализатора, способам синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений с биокатализатором и родственными терапевтическим средствам для лечения, ослабления и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

30 Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящего изобретения, идентифицировали способы стереоселективного и эффективного синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений с использованием

сконструированных вариантов цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве биокатализатора.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу эффективного синтеза высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений с генно-инженерными биокатализаторами, то есть к одностадийному способу получения высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений путем смешивания 2-оксотиенопиридина и гетероциклических тиолов в присутствии восстанавливающего реагента (то есть НАДФН или НАДН) и генно-инженерного варианта цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора. Осуществление способа является простым, сырье и реагенты легко доступны. Указанные способы избирательно производят цис-стереоизомер конъюгатов с более высоким выходом, чем способы предшествующего уровня техники (например, производит цис-стереоизомер конъюгатов с выходом намного выше, чем при использовании микросом печени).

Биологические ферментные катализаторы, такие как ферменты P450_{BM-3}, находят все более широкое применение в различных видах промышленности, начиная от тонкого химического синтеза, промежуточных продуктов, фармацевтических препаратов и метаболитов лекарственных средств до разложения органических химических примесей и загрязнителей. Белковая инженерия с использованием направленного развития или сайт-направленного мутагенеза может быть использована для выделения вариантов известных ферментов, которые могут создать новые возможности и применения для их каталитической активности.

P450_{BM-3} из *Bacillus megaterium* (см., например, Miura, Y. и Fulco, A.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 305-317) принадлежит к суперсемейству ферментов цитохрома P450. В различных базах данных последовательностей генов имеется более 7700 генов, кодирующих ферменты P450. Номенклатура ферментов P450 систематизирована. Суперсемейство ферментов обозначается как CYP, за которым следует номер семейства ферментов (отсюда CYP1, CYP51, CYP102 и т. д.), которые поделены на подсемейства, обозначенные буквами алфавита (отсюда CYP1A, CYP101B и т. д.), и каждый член подсемейства обозначается числом (отсюда CYP1A1, CYP3A4, CYP101D3 и т. д.). Ген, кодирующий фермент CYP, выделен курсивом, например ген CYP101A1. P450_{BM-3} был обозначен как CYP102A1, то есть это первый член семейства CYP102. Отсюда для P450_{BM3} будет использовано систематическое название CYP102A1.

СУР102А1 (см., например, Miura, Y., and Fulco, A. J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 388, 305-317) представляет собой фермент, представляющий интерес для биотрансформации, поскольку он каталитически самодостаточен. В отличие от других ферментов Р450, в которых монооксигеназа Р450 и белки кофактора переноса электрона представляют собой отдельные объекты, СУР102А1 имеет домен гем-монооксигеназы, слитый с доменом переноса электрона дифлавин-редуктазы, который содержит простетические группы FAD и FMN в одном полипептиде. Природные субстраты СУР102А1 считаются линейными или разветвленными жирными кислотами со средней длиной цепи (см., например, Miura, Y., and Fulco, A. J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 388, 305-317; Cryle, M. J., et al., (2006) Chem Commun, 2353-2355). Кристаллическая структура домена гема СУР102А1 была открыта в 1993 году (см., например, Ravichandran, K. G., et al., (1993) Science 261, 731-736), при выявлении структуры активного сайта и наличия канала доступа к субстрату. Кристаллическая структура со связанным субстратом указывает на изменение конформации боковой цепи для F87 при связывании субстрата (см., например, Li, H., and Poulos, T. L. (1997) Nature Struct. Biol. 4, 140-146).

СУР102А1 из *Bacillus megaterium* представляет собой самодостаточный и высокоэффективный фермент для гидроксирования жирных кислот. Было обнаружено, что различные варианты СУР102А1 окисляют небольшие молекулы, отличные от жирных кислот, с повышенной активностью. Однако стерео-селективный синтез гетероциклических конъюгатов тиенопиридиновых соединений не применяется.

Эксперименты, проведенные в ходе разработки вариантов реализации настоящего изобретения, позволили разработать способ, который производит цис-стереоизомер конъюгатов с выходом, намного превосходящим использование микросом печени. Реакция включала смешивание бактериальной цитозольной фракции, содержащей варианты ВМЗ (0,1-1 мкМ), 2-оксотиенопиридина, гетероциклических тиолов и НАДФН или НАДН, с последующей инкубацией в течение 20-60 мин. В присутствии желаемых гетероциклических тиолов указанный способ производил конъюгат с цис-конфигурацией только с выходами до 100 мг на литр реакционной смеси.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены варианты СУР102А1. В некоторых вариантах реализации варианты СУР102А1 оптимизированы для применения в качестве биокатализаторов в способах синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений. Действительно, описанные в настоящей заявке эксперименты привели к оптимизированной экспрессии гена СУР102А1 посредством изменения конструкции кДНК СУР102А1. Обновленная кДНК

оптимизирует использование кодонов для сверхэкспрессии в бактериях и устраняет структурные барьеры для транскрипции. Оптимизированная кДНК представлена в SEQ ID NO: 3 и кодирует 1054 аминокислотных остатков, включая метку hexaHis на N-конце для аффинной очистки. В предпочтительных вариантах реализации указанная последовательность может быть по меньшей мере на 55%, 65%, 80% или 90% и более предпочтительно по меньшей мере на 95%, 97% или 99% гомологична ей, по меньшей мере на 20, предпочтительно по меньшей мере 30, например по меньшей мере 40, 60, 100, 200, 300, 400 или более смежных аминокислот или даже по всей последовательности гомолога. В некоторых вариантах реализации указанный биокатализатор CYP102A1 может иметь процент идентичности с SEQ ID NO: 3, который является таким же, как любое из конкретных значений процентов гомологии (то есть он может иметь по меньшей мере 40%, 55%, 80% или 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности) по любой из длин SEQ ID NO: 3.

Указанная гомологичная последовательность может представлять собой мутированную часть последовательности CYP102A1 (SEQ ID NO: 3) и/или может присутствовать в форме полноразмерного слитого полипептида биокатализатора.

В некоторых вариантах реализации указанный CYP102A1 или вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% гомологии с аминокислотной последовательностью дикого типа для BM3 (SEQ ID NO: 2; Фиг. 4B). В некоторых вариантах реализации указанный вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую одну или более из следующих аминокислотных мутаций в SEQ ID NO: 2: A82F, L188Q, R47L, F87V, T365N, H116Q, K31T, S56R, A135S, V299D, I458F, P481H и W1046A. В некоторых вариантах реализации указанный вариант BM3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую специфичный набор мутаций, перечисленных в Таблице 2.

В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 95% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 1 (кДНК дикого типа для ВМЗ; Фиг. 4А).

В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 85% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 90% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 95% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С). В некоторых вариантах реализации указанный вариант ВМЗ содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 100% гомологии с SEQ ID NO: 3 (вариантная кДНК ВМЗ; Фиг. 4С).

Любой из гомологичных белков (то есть описанных как гомологичных другому белку), упомянутых в настоящей заявке, обычно по меньшей мере на 40% гомологичен соответствующему белку. Гомология может быть измерена известными способами. Например, в пакете UWGCG предложена программа BESTFIT, которая может быть использована для вычисления гомологии (например, используемой в настройках по умолчанию) (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Алгоритмы PILEUP и BLAST могут быть использованы для вычисления гомологии или выстраивания последовательностей (обычно с настройками по умолчанию), например, как описано в Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10.

Биокаталитическую или ферментативную активность варианта фермента CYP102A1 согласно изобретению обычно измеряют *in vitro* с использованием любого из субстратов или условий, упомянутых в настоящей заявке, и выражают как скорость окисления НАДФН, скорость образования продукта и эффективность связывания. Скорости представляют собой частоту оборота и представлены в (нмоль НАДФН) (нмоль CYP102A1)

$^1(\text{мин})^{-1}$ или $(\text{нмоль продукта}) (\text{нмоль СУР102А1})^{-1}(\text{мин})^{-1}$. Эффективность связывания представляет собой процент израсходованного НАДФН, который был использован для образования продукта, то есть процент от теоретической максимальной эффективности. Согласно изобретению указанный фермент СУР102А1 (например, при использовании в способах синтеза согласно изобретению) обычно может иметь эффективность связывания по меньшей мере 1%, например по меньшей мере 2%, 4%, 6%, 10%, 20%, 40%, 80% или более. Указанный фермент СУР102А1 (например, при использовании в способах по настоящему изобретению) обычно имеет скорость образования продукта по меньшей мере 2 мин^{-1} , например, по меньшей мере 4, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000 мин^{-1} или более. При образовании более одного продукта (что является обычным случаем), скорости образования продукта представляют собой общее количество всех образовавшихся продуктов окисления. В некоторых вариантах реализации измеряют скорость образования продукта конкретного продукта окисления, то есть не все продукты окисления могут быть измерены.

15 Вариант биокатализатора СУР102А1, описанный в настоящей заявке, (SEQ ID NO: 3 и его варианты; любой из мутантов, перечисленных в таблице 2), обычно вводят в фермент дикого типа с использованием способов, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез фермента, методы ПЦР и генной перетасовки или использование множественных мутагенных олигонуклеотидов в циклах сайт-направленного мутагенеза. Таким образом, мутации могут быть введены направленным или случайным образом. Таким образом, способ мутагенеза производит один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более различных мутантов. Обычно получают библиотеку мутантных генов, которая может быть использована для получения библиотеки мутантных ферментов.

25 Фермент может иметь 1, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-40 или более других мутаций в дополнение к одной или более мутациям, указанным в SEQ ID NO: 3 и таблице 2, таких как замены, вставки или удаления. Эти дополнительные мутации могут усиливать или не усиливать биокаталитическую активность в способах стереоселективного и эффективного синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений. Вставка обычно происходит на N- и/или C-конце. Таким образом, фермент может содержать короткий пептид, содержащий до 20 аминокислот, или полноразмерный белок, слитый с одним или обоими концами, например для облегчения очистки белка с помощью аффинной хроматографии или иммобилизации на твердой матрице. Делеция обычно включает делецию аминокислот, которые не участвуют в катализе, например аминокислот вне

активного сайта (таким образом, фермент представляет собой мутированный фрагмент встречающегося в природе фермента).

При использовании в способах синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений вариант биокатализатора СУР102А1 согласно настоящему изобретению приводит к стереоселективному и эффективному синтезу по сравнению со способами, в которых такой биокатализатор не используется. Субстратом для процесса окисления, катализируемого вариантом биокатализатора СУР102А1, является любое органическое соединение, чаще всего любое органическое соединение, способное окисляться ферментом монооксигеназой. Процесс окисления вызывает образование связи С-О в соединении, обычно спиртовой группы в результате окисления связи углерод-водород, но эпоксид может быть образован в результате окисления связи С=C. Таким образом, окисление может привести к появлению спиртовой, альдегидной, кетонной или эпоксидной группы. В качестве альтернативы окисление может вызвать дальнейшее окисление кислородсодержащей группы, такое как превращение спиртовой группы в альдегид или кетон. В одной и той же молекуле субстрата могут быть подвержены окислению 1, 2 или более атомов углерода. Окисление также может приводить к N- и O-деалкилированию молекулы субстрата.

Окисление обычно приводит к образованию 1, 2 или более продуктов окисления. Эти разные продукты могут быть результатом воздействия на разные атомы углерода и/или разной степени окисления, происходящего у данного атома углерода.

Окисление может происходить либо на кольцевом атоме углерода, либо на атоме углерода заместителя, либо на обоих. По меньшей мере, начальное окисление будет включать атаку связи С—Н, которая может быть активированной или неактивированной, или атаку двойной связи углерод-углерод (обычно с образованием эпоксида). Обычно активированная связь С-Н - это когда атом углерода находится в бензильном или аллильном положении. Ароматические кольца и олефиновые двойные связи активируют связи С-Н для атаки посредством стабилизации промежуточного радикала или любого накопления заряда, генерируемого во время реакции. Углерод в связи С-Н может быть первичным, вторичным или третичным. Окисление может приводить к дегидрированию, ведущему к образованию двойной связи С=C, а не к добавлению атома кислорода. Это наиболее вероятно, когда алкильный заместитель является разветвленным, или дегидрирование приводит к связи С=C, которая сопряжена с ароматической системой, или дегидрирование приводит к образованию ароматической системы. Реакцию обычно проводят в присутствии указанного

варианта фермента CYP102A1, указанного субстрата и указанных природных кофакторов фермента, которыми являются НАДФН или НАДН и дикислород.

В некоторых вариантах реализации указанный вариант фермента CYP102A1 (SEQ ID NO: 3 и его варианты; любой из мутантов, перечисленных в таблице 2) экспрессируется внутри клетки. Обычно клетка представляет собой клетку, в которой указанный вариант фермента CYP102A1 (SEQ ID NO: 3; Таблица 2) или CYP102A1 дикого типа не встречается в природе. В другом варианте реализации указанный вариант фермента CYP102A1 (SEQ ID NO: 3; Таблица 2) экспрессируется в клетке, в которой CYP102A1 дикого типа встречается в природе, но на более высоких уровнях, чем естественные уровни. Указанная клетка может продуцировать 1, 2, 3, 4 или более различных вариантов ферментов CYP102A1 согласно изобретению.

Указанная клетка может быть прокариотической или эукариотической и обычно представляет собой любую из клеток или любой из организмов, упомянутых в настоящей заявке. Предпочтительными клетками являются *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., флавобактерии или клетки грибов (например, *Aspergillus* и дрожжи, особенно *Pichia* sp.). Также для использования в соответствии с изобретением рассматриваются *Rhodococcus* sp. и *Bacillus* sp. Указанная клетка может быть или не быть такой, которая в своей естественной форме способна окислять любой из субстратов или образовывать любые из продуктов окисления, упомянутых в настоящей заявке. Обычно указанная клетка находится в по существу выделенной форме и/или по существу очищенной форме, и в этом случае она обычно составляет по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, 98% или 99% клеток или сухой массы препарата.

Указанную клетку обычно получают путем введения в клетку (т.е. трансформации клетки) вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий указанный вариант фермента CYP102A1 согласно настоящему изобретению. Следует понимать, что из-за вырожденности нуклеотидного кода более, чем один полинуклеотид может кодировать каждый из указанных вариантов ферментов CYP102A1 согласно настоящему изобретению. Также следует понимать, что указанная нуклеотидная последовательность может быть сконструирована таким образом, чтобы проявлять предпочтение кодонов, подходящих для конкретной клетки или организма. Указанный вектор может интегрироваться в геном указанной клетки или оставаться вне хромосомы. Указанная клетка может развиваться в животном или растении, обсуждаемых ниже. Обычно кодирующая последовательность полинуклеотида функционально связана с контрольной последовательностью, которая способна обеспечивать экспрессию кодирующей последовательности клеткой-хозяином.

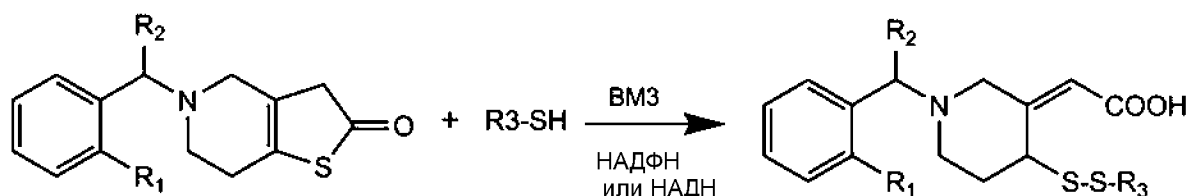
Указанная контрольная последовательность обычно представляет собой промотор как правило клетки, в которой экспрессируется монооксигеназа.

Термин «функционально связанный» относится к сопоставлению, при котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предпологаемым образом. Контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Вектор обычно представляет собой транспозон, плазмиду, вирус или фаговый вектор. Обычно он содержит начало репликации. Обычно он содержит один или более селективируемых маркерных генов, например ген устойчивости к ампициллину в случае бактериальной плазмиды. Указанный вектор обычно вводят в клетки-хозяев с использованием обычных методик, включая осаждение фосфатом кальция, трансфекцию DEAE-декстраном или электропорацию.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу эффективного синтеза высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений с генно-инженерными биокатализаторами, то есть к одностадийному способу получения высокооптически активных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений путем смешивания 2-оксотииенопиридина и гетероциклических тиолов в присутствии восстанавливающего реагента (например, НАДФН или НАДН) и описанного генно-инженерного варианта цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора.

В некоторых вариантах реализации в настоящем изобретении предложены способы стереоселективного и эффективного синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений с использованием варианта фермента CYP102A1 (BM3) (SEQ ID NO: 3; Таблица 2) в качестве биокатализатора. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает процесс, показанный на следующей схеме реакции:



R1 = Cl или F
R2 = H, -COOCH₃, -COOCH₂CH₂
R3 = гетероциклический тиол

Указанная реакция синтеза, как показано на приведенной выше схеме реакции, протекает путем смешивания реагентов 2-оксотииенопиридина и гетероциклических тиолов в присутствии восстанавливающего реагента НАДФН или НАДН и варианта фермента СУР102А1 (ВМЗ) (SEQ ID NO: 3; Таблица 2) в качестве биокатализатора. Для указанной реакции не требуются специальные реакторы и аппараты, а также высокая температура и давление, обычно необходимые для химического синтеза. Указанная реакция протекает до конца при температуре окружающей среды (например, при комнатной температуре) менее чем за 60 мин.

В некоторых вариантах реализации указанная реакция включает смешивание бактериальных цитозольных фракций, содержащих варианты ВМЗ (0,1-1 мкМ), 2-оксотииенопиридин, гетероциклические тиолы и НАДФН или НАДН, с последующей инкубацией в течение 20-60 минут. В присутствии желаемых гетероциклических тиолов указанный способ производит конъюгат с цис-конфигурацией только с выходами до 100 мг на литр реакционной смеси.

Такие способы приводят к синтезу по существу энантиомерно чистых композиций и фармацевтических композиций, содержащих смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений. Действительно, указанные способы позволяют получать цис-стереоизомерные формы конъюгатов с высоким выходом.

В схеме реакции указанный гетероциклический тиол не ограничен определенным химическим фрагментом для R3. В некоторых вариантах реализации R3 представляет собой любую химическую группировку, которая придает полученному соединению способность продуцировать активные метаболиты тиенопиридина при взаимодействии с эндогенным глутатионом (GSH) (например, активные метаболиты тиенопиридина, способные проявлять антитромбоцитарную активность). В некоторых вариантах реализации R3 представляет собой любую химическую группировку, которая придает полученному соединению способность лечить, ослаблять или предотвращать сердечно-сосудистые нарушения (например, ишемическая болезнь сердца, заболевание периферических сосудов и цереброваскулярное заболевание) у пациента, такого, как те, которые реагируют на антитромбоцитарные агенты (такие как клопидогрел, тиклопидин и прасугрел). В некоторых вариантах реализации R3 представляет собой любую химическую группировку, которая придает полученному соединению способность ингибировать агрегацию тромбоцитов, например, изменяя функцию мембран тромбоцитов путем блокады рецепторов аденозин-дифосфата (АДФ) (например, тем самым предотвращая конформационное изменение гликопротеина Пб/Ша, которое позволяет тромбоцитам

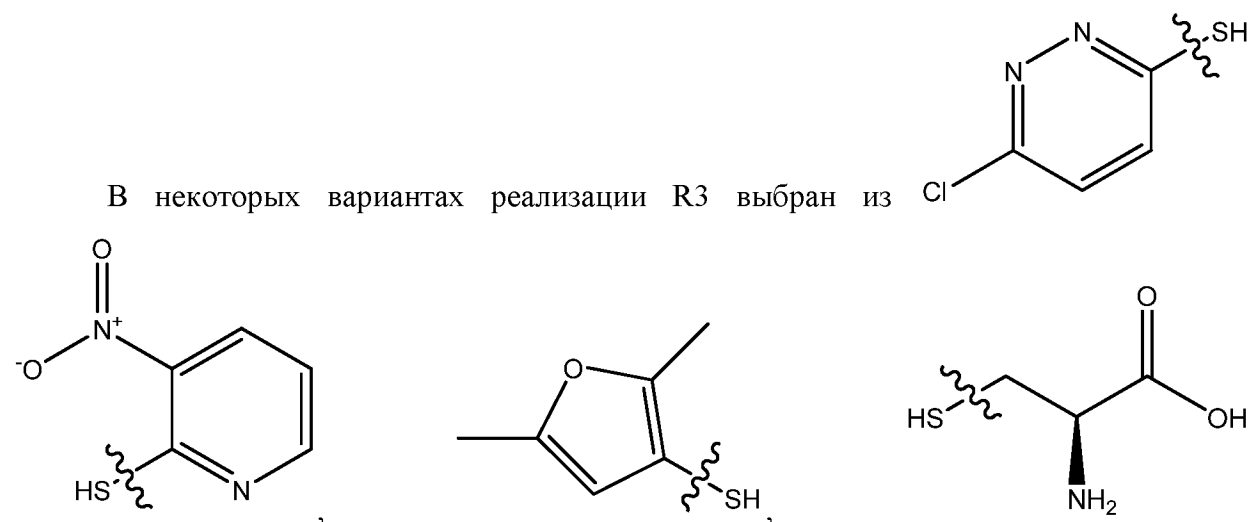
связываться с фибриногеном). В некоторых вариантах реализации R3 представляет собой любую химическую группировку, которая придает полученному соединению способность снижать агрегацию («агглютинацию») тромбоцитов за счет необратимого связывания с рецепторами P2Y12.

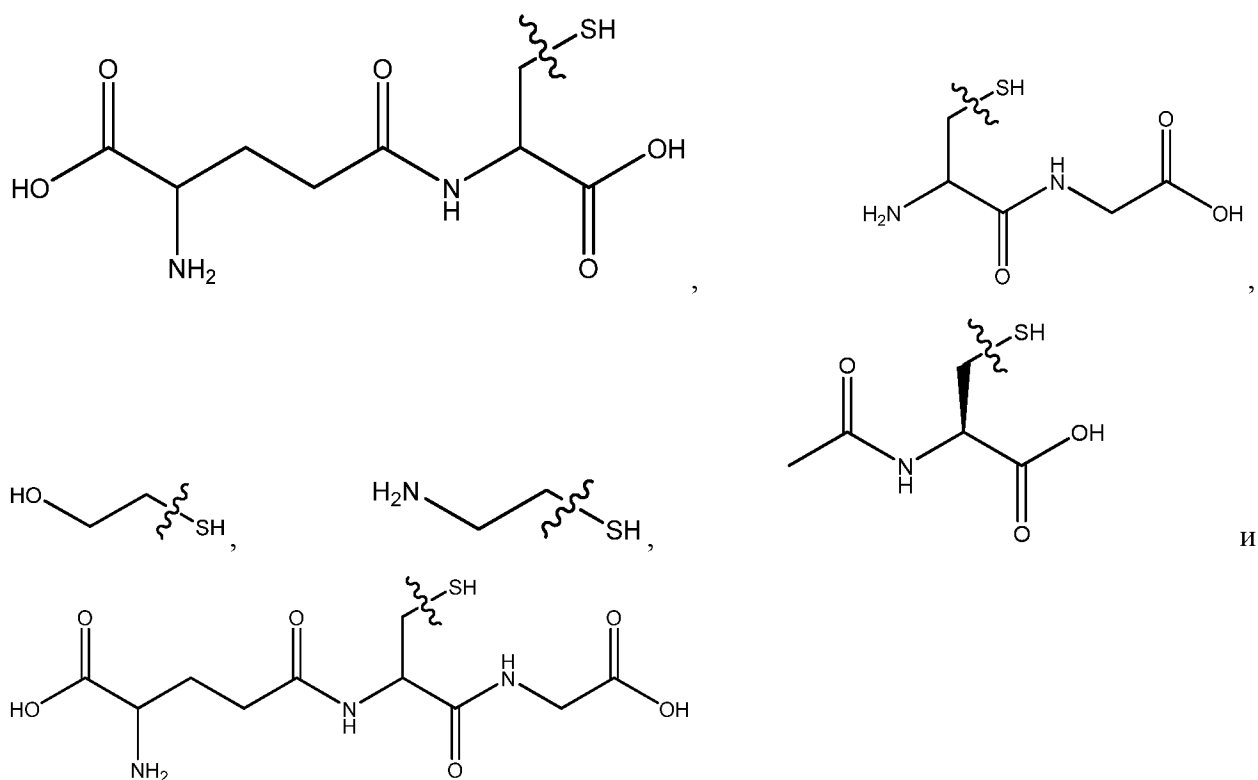
5 Примеры гетероциклических тиоловых фрагментов (R3) включают те, что показаны в Таблице 1, но не ограничиваются указанными.

Таблица 1 Список гетероциклических тиолов, используемых для реакции с 2-оксочлопидогрелом

Химическое Наименование	Аббревиатура
3-нитропиридин-2-тиол	NPT
2-меркаптопиридин	MP
2-меркапто-6-метилпиридин	MMP
5-хлорпиридин-2-тиол	5-CPT
2-меркапто-5-трифторметилпиридин	5-TMP
3-(трифторметил)пиридин-2-тиол	3-TMP
2-меркаптопиридин-3-карбонитрил	MPC
4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил	DTDC
2-хинолинтиол	QT
1-амино-3-меркаптоизохинолин	AMP
6-хлорпиридазин-3-тиол	CPT
2,5-диметилфуран-3-тиол	DFT

10





Предполагают, что смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений, полученные такими способами с использованием генно-инженерного варианта цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора, будут достаточными для крупномасштабного синтеза конъюгатов для разработки и производства лекарственных средств, поскольку продуцирование цис-стереоизомера конъюгатов предсказуемо образуется с более высоким выходом, чем способами предшествующего уровня техники.

Кроме того, указанную реакцию проводят при температуре окружающей среды и атмосферном давлении с коротким временем реакции. Учитывая легкую доступность синтезированных конъюгатов, предполагают, что использование смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению в качестве антитромбоцитарных агентов снизит токсичность, поскольку токсичные реакционно-способные метаболиты не образуются в результате реакции обмена тиола. Кроме того, предполагают, что время начала терапевтического действия для смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению будет сокращено, что принесет большую пользу пациентам, которые испытывают острые сердечно-сосудистые состояния. Стандартный режим приема клопидогрела требует непрерывного приема пациентами доз в течение 3-5 дней, поскольку только небольшой процент принимаемого внутрь клопидогрела превращается в активный метаболит. Напротив, предполагают, что указанные смешанные дисульфидные конъюгаты

тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению могут высвобождать активные метаболиты с высоким выходом менее чем за 30 мин. Кроме того, предполагают, что указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению будут иметь более высокую стабильность по сравнению с активными метаболитами и, следовательно, их можно использовать для количественного получения активных метаболитов для доклинических и клинических исследований *in vitro*.

Изобретение также относится к способам лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у пациента, таких как те, которые чувствительны к антитромбоцитарным агентам (таким как клопидогрел, тиклопидин и прасугрел), включающим введение пациенту таких смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений (например, полученных способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора). Такие нарушения включают ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических сосудов и цереброваскулярное заболевание, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для ингибирования агрегации тромбоцитов, например, путем изменения функции мембран тромбоцитов путем блокады рецепторов АДФ (например, тем самым предотвращая конформационное изменение гликопротеина Пб/Ша, которое позволяет тромбоцитам связываться с фибриногеном). В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений снижают агрегацию («агглютинацию») тромбоцитов за счет необратимого связывания с рецепторами P2Y₁₂. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют в фармацевтических композициях, предназначенных для внутривенного (IV) введения (например, в медицинских ситуациях, требующих внутривенного введения антитромбоцитарных агентов (например, коронарная ангиопластика)).

В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений (например, полученные способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора) используют для лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у животных (например, пациент-млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, людей и ветеринарных животных), таких как те, которые чувствительны к антитромбоцитарным агентам (таким как клопидогрел, тиклопидин и прасугрел), включающий введение пациенту смешанного дисульфидного конъюгата

тиенопиридина согласно настоящему изобретению. Такие нарушения включают ишемическую болезнь сердца, заболевание периферических сосудов, атеротромбоз и цереброваскулярное заболевание, но не ограничиваются ими. Действительно, в некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений (например, полученные способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора) используют для снижения агрегации тромбоцитов и/или ингибирования образования тромба. В связи с этим такие заболевания и патологии поддаются лечению или профилактике с использованием настоящих способов и смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений.

В некоторых вариантах реализации смешанные указанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений (например, полученные способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора) используют для профилактики ишемических состояний сосудов у пациентов с симптоматическим атеросклерозом. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для лечения или профилактики острого коронарного синдрома без подъема сегмента ST. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для профилактики тромбоза после установки интракоронарного стента. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для ингибирования агрегации тромбоцитов, например, путем изменения функции мембран тромбоцитов путем блокады рецепторов АДФ (например, тем самым предотвращая конформационное изменение гликопротеина IIb/IIIa, которое позволяет тромбоцитам связываться с фибриногеном). В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений снижают агрегацию («агглютинацию») тромбоцитов за счет необратимого связывания с рецепторами P2Y₁₂. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для продления времени кровотечения. В некоторых вариантах реализации указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений используют для снижения частоты инсульта у пациентов с высоким риском.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие смешанные дисульфидные конъюгаты

тиенопиридиновых соединений (например, полученные способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора), предназначенные для внутривенного (IV) введения В некоторых вариантах реализации такие фармацевтические композиции, содержащие смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений, предназначены для внутривенного (IV) введения, используют для лечения, ослабления и профилактики атеротромбоза. В некоторых вариантах реализации такие фармацевтические композиции, содержащие смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений, предназначены для внутривенного (IV) введения, используют для быстрого ингибирования агрегации тромбоцитов. В некоторых вариантах реализации такие фармацевтические композиции, содержащие смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений, предназначены для внутривенного (IV) введения, используют во время процедур чрескожного коронарного вмешательства (например, коронарной ангиопластики) для быстрого ингибирования агрегации тромбоцитов. Действительно, антитромбоцитарная терапия лежит в основе профилактики и лечения атеротромбоза. Активация тромбоцитов агонистами, такими как разрыв бляшки и прямое давление со стороны стентов, играет важную роль в развитии атеротромбоза. В определенных клинических ситуациях, когда пациенты страдают острыми сердечно-сосудистыми синдромами или подвергаются чрескожному сердечно-сосудистому вмешательству, необходимо быстрое и полное ингибирование агрегации тромбоцитов для предотвращения смерти от сердечно-сосудистых заболеваний и ишемических осложнений. Такие медицинские сценарии требуют внутривенного введения антитромбоцитарных агентов с коротким временем начала действия. Однако это все еще неудовлетворенная медицинская потребность, поскольку используемые в настоящее время антитромбоцитарные агенты либо имеют медленное время начала действия, либо не могут вводиться внутривенно (см., например, Silvain, J., and Montalescot, G., (2012) *Circ. Cardiovasc. Interv.* 5:328-331). Смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению удовлетворяют эту медицинскую потребность, поскольку такие соединения могут быть введены как перорально, так и внутривенно, и они обладают коротким временем начала действия.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы введения эффективного количества смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридинового соединения согласно настоящему изобретению (например, полученного способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3

или СУР102А1 в качестве катализатора) и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента (включая, но не ограничиваясь указанными, известное терапевтическое средство для лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний) и/или терапевтической техники (например, хирургическое вмешательство).

5 Ряд терапевтических агентов, известных для лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, предложены для применения в способах согласно настоящему изобретению. Действительно, настоящее изобретение предусматривает введение множества терапевтических агентов, известных для лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, но не ограничивается этим. Примеры
10 включают ингибиторы HMG-CoA редуктазы (например, аторвастатин (липитор), правастатин (правахол), симвастатин (зокор), розувастатин (крестор), питавастатин (ливало), ловастатин (мевакор, альтокор), флувастатин (лескол)), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) (например, Рамиприл (Altace), квинаприл (Accupril), каптоприл (капотен), эналаприл (Vasotec), лизиноприл (зестрил)), блокаторы кальциевых
15 каналов (например, амлодипин (норваск), нифедипин (прокардия), верапамил (калан), фелодипин (плендил), дилтиазем (кардизем)), ингибиторы агрегации тромбоцитов (кроме тиклопидина, клопидогрела и прасугрела) (например, абциксимаб (reoПро), аспирин, варфарин (кумадин), гепарин), полиненасыщенные жирные кислоты (например, полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 (рыбий жир)), производные фибриновой
20 кислоты (например, фенофибрат (трикор), гемфиброзил (лопид)), секвестранты желчных кислот (например, колестипол (колестид), холестирамин (квестран)), антиоксиданты (например, витамин Е), производные никотиновой кислоты (например, ниацин (ниаспан), тромболитические агенты (например, альтеплаза (активаза)) и антиангинальные агенты (например, ранолазин (ранекса), но не ограничиваются указанными.

25 В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридинового соединения согласно настоящему изобретению (например, полученный способами, использующими генно-инженерный вариант цитохрома P450 BM3 или СУР102А1 в качестве катализатора) и один или несколько дополнительных терапевтических агентов вводят пациенту при одном или более
30 из следующих условий: с разной периодичностью, с разной продолжительностью, с разными концентрациями, разными путями введения и т. д. В некоторых вариантах реализации указанный смешанный дисульфидный конъюгат соединения тиенопиридина вводят перед дополнительным терапевтическим агентом, например, за 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 или 18 часов, 1, 2, 3, 4, 5, или 6 дней, или за 1, 2, 3 или 4 недели до введения

дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации указанный смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридина вводят после дополнительного терапевтического агента, например, через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 или 18 часов, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней или через 1, 2, 3 или 4 недели после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации указанный смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридинового соединения и дополнительный терапевтический агент вводят одновременно, но по разным схемам, например указанный смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридинового соединения вводят ежедневно, а дополнительный терапевтический агент вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. В других вариантах реализации указанный смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридинового соединения вводят один раз в неделю, тогда как дополнительное терапевтическое вещество вводят ежедневно, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

Композиции в объеме настоящего изобретения включают все композиции, в которых указанные смешанные дисульфидные конъюгаты тиенопиридиновых соединений согласно настоящему изобретению (например, полученные способами с использованием генно-инженерного варианта цитохрома P450 BM3 или CYP102A1 в качестве катализатора) содержатся в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. В зависимости от индивидуальных потребностей определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента находится в компетенции специалистов в данной области. Обычно указанные соединения могут быть введены млекопитающим, например людям, перорально в дозе от 0,0025 до 50 мг/кг или эквивалентном количестве его фармацевтически приемлемой соли в сутки в перерасчете на вес тела млекопитающего, подвергаемого лечению заболеваний, чувствительных к индукции апоптоза. В одном варианте реализации приблизительно от 0,01 до приблизительно 25 мг/кг вводят перорально для лечения, ослабления или профилактики таких нарушений. Доза для внутримышечной инъекции обычно составляет приблизительно половину пероральной дозы. Например, подходящая доза для внутримышечного введения будет составлять приблизительно от 0,0025 до приблизительно 25 мг/кг или приблизительно от 0,01 до приблизительно 5 мг/кг.

Стандартная пероральная доза может содержать приблизительно от 0,01 до приблизительно 1000 мг, например приблизительно от 0,1 до приблизительно 100 мг указанного смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридинового соединения. Стандартная доза может быть введена один или более раз в сутки в виде одной или более таблеток или капсул, каждая из которых содержит приблизительно от 0,1 до

приблизительно 10 мг, обычно приблизительно от 0,25 до 50 мг указанного соединения или его сольватов.

В составе для наружного применения указанное соединение может присутствовать в концентрации приблизительно от 0,01 до 100 мг на грамм носителя. В одном варианте реализации указанный смешанный дисульфидный конъюгат тиенопиридинового соединения присутствует в концентрации приблизительно 0,07-1,0 мг/мл, например, приблизительно 0,1-0,5 мг/мл, и в одном варианте реализации приблизительно 0,4 мг/мл.

В дополнение к введению указанного смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридинового соединения в виде неочищенного химического вещества, указанные соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены как часть фармацевтического препарата, содержащего подходящие фармацевтически приемлемые носители, содержащие наполнители и вспомогательные вещества, которые облегчают переработку соединений в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически. Препараты, особенно те препараты, которые могут быть введены перорально или местно и которые могут быть использованы для одного типа введения, такие как таблетки, драже, пастилки и капсулы с медленным высвобождением, ополаскиватели для рта и промывания для рта, гели, жидкие суспензии, ополаскиватели для волос, гели для волос, шампуни, а также препараты, которые могут быть введены ректально, такие как суппозитории, а также подходящие растворы для введения путем внутривенной инфузии, инъекции, местного или перорального применения, содержат приблизительно от 0,01 до 99 процентов, в одном варианте реализации приблизительно от 0,25 до 75 процентов активного(ых) соединения(й) вместе с наполнителем.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть введены любому пациенту, который может испытывать положительные эффекты указанных смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений согласно изобретению. В первую очередь среди таких пациентов - млекопитающие, например люди, хотя изобретение не ограничивается этим. К другим пациентам относятся ветеринарные животные (коровы, овцы, свиньи, лошади, собаки, кошки и т.п.).

Указанные соединения и их фармацевтические композиции могут быть введены любыми способами, которые достигают их предполагаемой цели. Например, введение может осуществляться парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутривентральным, трансдермальным, буккальным, интратекальным, внутричерепным, интраназальным или местным путями. Альтернативно или одновременно введение может осуществляться пероральным путем. Вводимая доза будет зависеть от возраста, состояния

здоровья и веса реципиента, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется, частоты лечения и характера желаемого эффекта.

5 Фармацевтические препараты согласно настоящему изобретению получают известным способом, например, с помощью обычных процессов смешивания, гранулирования, изготовления драже, растворения или лиофилизации. Таким образом, фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем объединения активных соединений с твердыми наполнителями, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, при желании или необходимости, для получения таблеток или 10 ядер драже.

Подходящие наполнители представляют собой, в частности, наполнители, такие как сахараиды, например, лактоза или сахароза, маннит или сорбит, препараты целлюлозы и/или фосфаты кальция, например кальция ортофосфат или кальция гидрофосфат, а также связующие вещества, такие как крахмальная паста, с использованием, например, 15 кукурузного крахмала, пшеничного крахмала, рисового крахмала, картофельного крахмала, желатина, трагаканта, метилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы натрия и/или поливинилпирролидона. При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как вышеупомянутые крахмалы, а также карбоксиметилкрахмал, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая 20 кислота или ее соль, такая как натрия альгинат. Вспомогательные вещества представляют собой, прежде всего, вещества, регулирующие текучесть, и смазывающие вещества, например кремния диоксид, тальк, стеариновую кислоту или ее соли, такие как магния стеарат или кальция стеарат, и/или полиэтиленгликоль. Ядра драже имеют подходящие покрытия, которые при желании устойчивы к желудочному соку. Для этой цели могут быть 25 использованы концентрированные растворы сахараидов, которые могут необязательно содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лаков и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Для получения покрытий, устойчивых к желудочному соку, используют растворы подходящих препаратов целлюлозы, таких как фталат ацетилцеллюлозы или фталат 30 гидроксипропилметилцеллюлозы. Красящие вещества или пигменты могут быть добавлены к покрытиям таблеток или драже, например, для идентификации или для характеристики комбинаций доз активного соединения.

Другие фармацевтические препараты, которые могут быть использованы для перорального применения, включают твердые капсулы, изготовленные из желатина, а

также мягкие герметичные капсулы из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Указанные твердые капсулы могут содержать активные соединения в форме гранул, которые могут быть смешаны с наполнителями, такими как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторами. В одном варианте реализации активные соединения в мягких капсулах растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла или жидкий парафин. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы.

Возможные фармацевтические препараты, которые могут быть использованы ректально, включают, например, суппозитории, которые состоят из комбинации одного или более указанных активных соединений с основой суппозитория. Подходящие основы для суппозиториев представляют собой, например, природные или синтетические триглицериды или парафиновые углеводороды. Кроме того, также можно использовать желатиновые ректальные капсулы, которые состоят из комбинации активных соединений с основой. Возможные основные материалы включают, например, жидкие триглицериды, полиэтиленгликоли или парафиновые углеводороды.

Подходящие составы для парентерального введения включают водные растворы указанных активных соединений в водорастворимой форме, например водорастворимые соли и щелочные растворы. Кроме того, могут быть введены суспензии указанных активных соединений в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, например, кунжутное масло, или сложные эфиры синтетических жирных кислот, например, этилолеат или триглицериды, или полиэтиленгликоль-400. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включая, например, натрия карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Необязательно указанная суспензия может также содержать стабилизаторы.

Композиции для наружного применения согласно настоящему изобретению составлены в одном варианте реализации в виде масел, кремов, лосьонов, мазей и т.п. путем выбора подходящих носителей. Подходящие носители включают растительные или минеральные масла, белый вазелин (белый мягкий парафин), жиры или масла с разветвленной цепью, животные жиры и высокомолекулярный спирт (более C_{12}). Носители могут быть такими, в которых указанный активный ингредиент растворим. Также могут быть включены эмульгаторы, стабилизаторы, увлажнители и антиоксиданты, а также вещества, придающие цвет или аромат, если желательно. Кроме того, в этих составах для

наружного применения можно использовать усилители трансдермального проникновения. Примеры таких усилителей можно найти в патентах США No. 3989816 и 4444762.

Мази могут быть приготовлены путем смешивания раствора указанного активного ингредиента в растительном масле, таком как миндальное масло, с теплым мягким парафином и дать смеси остыть. Типичным примером такой мази является мазь, которая включает около 30% миндального масла и около 70% белого мягкого парафина по массе. Лосьоны обычно могут быть приготовлены растворением указанного активного ингредиента в подходящем высокомолекулярном спирте, таком как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Специалист в данной области техники легко поймет, что вышеизложенное представляет собой подробное описание лишь некоторых предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Различные модификации и изменения описанных выше композиций и способов могут быть легко достигнуты с использованием опыта, доступного в данной области техники, и находятся в пределах объема изобретения.

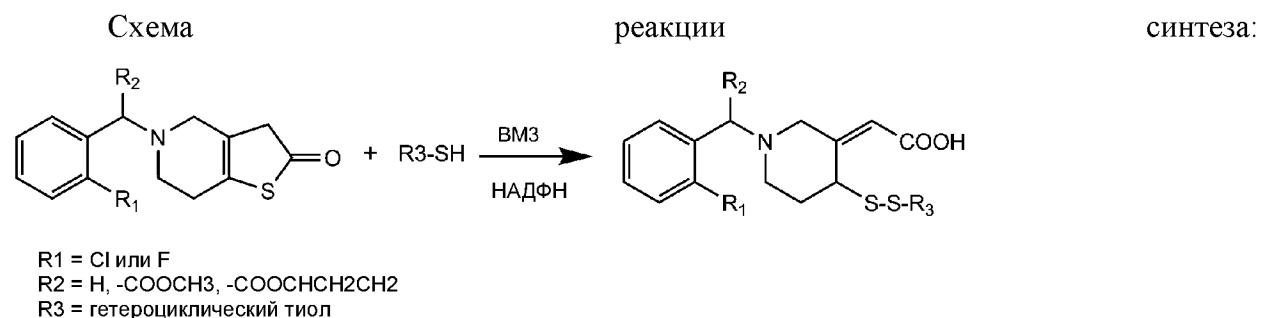
15

ПРИМЕРЫ

Пример I

В этом примере описан стереоселективный синтез гетероциклических конъюгатов тиенопиридиновых соединений.

20



осуществляют путем смешивания реагентов 2-оксотииенопиридина и гетероциклических тиолов в присутствии восстанавливающего реагента НАДФН или НАДН и BM3 в качестве катализатора. Для реакции не требовались специальные реакторы и аппараты, а также высокая температура и давление, обычно необходимые для химического синтеза. Реакция протекала при температуре окружающей среды менее чем за 60 мин. Был протестирован ряд гетероциклических тиолов, включая, но не ограничиваясь указанными, следующие, представленные в Таблице 1.

30

Химическое Наименование	Аббревиатура
3-нитропиридин-2-тиол	NPT
2-меркаптопиридин	MP
2-меркапто-6-метилпиридин	MMP
5-хлорпиридин-2-тиол	5-CPT
2-меркапто-5-трифторметилпиридин	5-TMP
3-(трифторметил)пиридин-2-тиол	3-TMP
2-меркаптопиридин-3-карбонитрил	MPC
4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрил	DTDC
2-хинолинтиол	QT
1-амино-3-меркаптоизохинолин	AMP
6-хлорпиридазин-3-тиол	CPT
2,5-диметилфуран-3-тиол	DFT

На фиг. 1 показаны результаты анализа ВЭЖХ для образования смешанного дисульфидного конъюгата клопидогрела с пятью типичными соединениями. Последняя буква «S» обозначает пик элюирования реагента (\pm)-2-оксоклопидогрела, а звездочка обозначает наблюдаемые стереоизомерные продукты с соответствующими тиолами. Как и ожидалось, только 2-оксоклопидогрел был обнаружен при 254 нм в контрольном образце, в котором отсутствует НАДФН. В присутствии НАДФН наблюдают пики продукта, отмеченные звездочками, что указывает на образование продукта, как показано на приведенной выше схеме реакции синтеза. Ранее сообщалось, что метаболизм (\pm)-2-оксоклопидогрела в присутствии нециклических тиолов дает две пары пиков продуктов, включая как транс-, так и цис-пары (см., например, Zhang, H., Lauer, D. A., and Hollenberg, P. F. (2014) *Thromb. Haemost.* 112, 1304-1311). Как показано на приведенной выше схеме реакции синтеза, наблюдали четыре стереоизомера при 350 нм, где 2-оксоклопидогрел не абсорбируется, в присутствии глутатиона (GSH). Два из четырех стереоизомеров совместно элюировали 2-оксоклопидогрелом. В тестовом наборе гетероциклических тиолов наблюдали только один или пару пиков продукта, что указывает на стереоселективность реакции в отношении цис-продуктов, как было продемонстрировано ранее (см., например, Zhang, H., Lauer, D. A., and Hollenberg, P. F. (2014) *Thromb. Haemost.* 112, 1304-1311).

Структурный анализ с помощью рентгеновской кристаллографии также подтвердил цис-конформацию. Стереоселективность была также продемонстрирована в случае 3-ТМТ и 5-ТМР. Два гетероциклических тиола идентичны, за исключением положения группы –CF₃. Однако в присутствии 3-ТМТ количество продукта было более чем в десять раз больше, чем в присутствии 5-ТМР.

На Фиг. 2 показаны ВЭЖХ-анализы продуктов смешанного дисульфидного конъюгата клопидогрела. Реакцию проводили путем смешивания (±)-2-оксолопидогрела, гетероциклического тиола, МП крысы и НАДФН при 25 °С в течение 20 мин.

Для сравнения, выходы синтеза в микросомах печени крысы (МП) значительно меньше, чем в ВМЗ для всех тестируемых соединений, перечисленных в Таблице 1. Например, в случае NPT и QT количество продукта более чем в десять раз меньше в МП крысы по сравнению с ВМЗ, как показано на Фиг. 1. Ясно, что синтез в ВМЗ превосходит МП крысы в отношении выхода и стереоселективности. Количественный анализ показывает, что приблизительно 80 мг конъюгата NPT может быть получено из одного литра реакционной смеси, как показано на Фиг. 3.

Пример II

В этом примере описано применение генной инженерии для вариантов ВМЗ для повышения продуктивности синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений.

Повышение сверхэкспрессии ВМЗ в бактериальных клетках

Были проведены эксперименты, которые оптимизировали экспрессию гена ВМЗ путем изменения конструкции кДНК ВМЗ. Обновленная кДНК оптимизирует использование кодонов для сверхэкспрессии в бактериях и устраняет структурные барьеры для транскрипции. Оптимизированная кДНК для генно-инженерного варианта цитохрома P450 ВМЗ или CYP102A1 показана на Фиг. 4 и кодирует 1054 аминокислотных остатка, включая метку hexaHis на N-конце для аффинной очистки, если это необходимо.

Сверхэкспрессия ВМЗ в бактериальных клетках

После клонирования кДНК ВМЗ в различные векторы, такие как pCWo71, pET28 и pLW01, проводили эксперименты, в которых сверхэкспрессировали ВМЗ из сконструированной плазмиды в различных бактериальных клетках, включая BL21 (DE3), C41 (DE3), Toppr3 и DH5 α . Указанные плазмиды трансформировали в эти клетки и

экспрессировали в среде Terric Broth в присутствии ампициллина в течение 16 часов при 30 °С после индукции посредством 0,6 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом. Высокий уровень экспрессии достигали при 0,5–1 г белка VM3 на литр клеточной культуры. Для синтеза указанных конъюгатов требовалась только цитозольная фракция бактериальных клеток, и не было необходимости очищать VM3 с помощью хроматографии.

Мутанты VM3 с повышенной активностью для синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридинов с гетероциклическими тиолами

Природный субстрат VM3 представляет собой длинноцепочечную жирную кислоту, поэтому он проявляет небольшую активность в отношении низкомолекулярных лекарственных средств. Таким образом, VM3 конструировали путем сайт-направленного мутагенеза и прямой эволюции для выбора вариантов VM3 для синтеза смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений.

После скрининга библиотеки мутантов VM3 проводили эксперименты, в ходе которых выявляли «s» количество вариантов VM3, проявляющих активность для синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений. Эти мутанты перечислены в Таблице 2 (варианты аминокислотной последовательности дикого типа показаны на Фиг. 4В). Активность приводили в соответствие активности варианта M1. Семь

из этих вариантов демонстрируют активность в отношении синтеза смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений, как показано в Таблице 3.

Таблица 3 Реакции проводили в присутствии 0,25 мкМ ВМЗ.

Таблица 2 Мутанты ВМЗ, обладающие активностью для получения смешанного дисульфидного конъюгата тиенопиридиновых соединений. Мутанты получали либо случайным мутагенезом, либо направленной модификацией.

Мутанты ВМЗ	Мутации
M1	A82F
M2	A82F/L188Q
M3	A82F/L188Q/R47L
M4	A82F/L188Q/R47L/F87V
M5	A82F/F87V
M6	A82F/F87V/R47L
M7	A82F/F87V/L188Q
M8	A82F/R47L
M9	R47L/F87V/L188Q
M18	A82F/T365N
M27	A82F/F87V/L188Q/H116Q
M29	A82F/F87V/L188Q/K31T
M31	A82F/F87V/L188Q/S56R/A135S
M32	A82F/F87V/L188Q/V299D/I458F/P481H
M34	A82F/W1046A
M35	A82F/L188Q/R47L/F87V/W1046A
M36	A82F/F87V/L188Q/W1046A
M37	A82F/F87V/L188Q/W1046L
M40	A82F/F87V/L188Q/K31T/W1046A

Вариант	Выход (мг/л)
M1	18
M4	9,2
M7	33,1
M9	21,4
M13	14,1
M16	8,8
M37	16,7

Пример III

В этом примере описана конструкция, сверхэкспрессия и очистка различных форм СУР102А1.

Последовательность кДНК, кодирующая полноразмерный мутантный ген СУР102А1 А82F, синтезировали посредством Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA). Затем кодирующую область клонировали в вектор рСWог1 с использованием пары сайтов рестрикции NdeI/NotI. Для облегчения очистки последовательность hexa-His-метки (6×His₆) присоединяли к N-концу после стартового кодона АТG для конструирования плазмиды рСW-СУР102А1А82F6×His. Усеченный и помеченный FLAG СУР102А1 конструировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием рСW-СУР102А1А82F6×His в качестве ДНК-матрицы и пары праймеров.

Все формы конструкций СУР102А1 были сверхэкспрессированы в клетках С41(DE3) в присутствии 0,1 мг/мл ампициллина. Вкратце, отдельную колонию из клеток С41(DE3), трансформированных плазмидой рСWог1, содержащей желаемый ген, инокулировали в 50 мл среды Лурия-Бертани (LB), и культуру выращивали при 30 °C/180 об/мин в течение ночи. Аликвоту 10 мл культуры LB использовали для инокуляции 1 л среды Terric Broth (TB). Среду TB растили в течение 6 часов, и индуцировали сверхэкспрессию СУР102А1 добавлением 0,6 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) и 0,5 мМ даминолевулиновой кислоты. Индуцированные клетки продолжали расти в течение 16 часов при 30 °C, а затем собирали центрифугированием при 2500 g в течение 25 минут. Все белки очищали на колонке His₆rap HP (5 мл, GE Health Sciences), как сообщалось ранее (см., например, Zhang, H., et al., (2013) Biochemistry 52, 355-364). Очищенные белки обессоливали до 0,1 М КPi/15% глицеринового буфера (pH 7,4) с использованием колонок PD-10 (GE Health Sciences) и хранили в аликвотах при -80 °C до использования.

После полного описания настоящего изобретения специалистам в данной области техники будет понятно, что тоже самое можно осуществить в широком и эквивалентном диапазоне условий, составов и других параметров, не влияя на объем изобретения или любой его вариант осуществления. Все патенты, заявки на патенты и публикации, цитируемые в данном документе, включены в полном объеме в настоящий документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ СВЕДЕНИЙ ПУТЕМ ССЫЛКИ

Полное описание каждого из указанных патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено в качестве ссылки для всех целей.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

5 Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных характеристик. Следовательно, вышеизложенные варианты реализации следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в настоящей заявке. Объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения,
10 которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

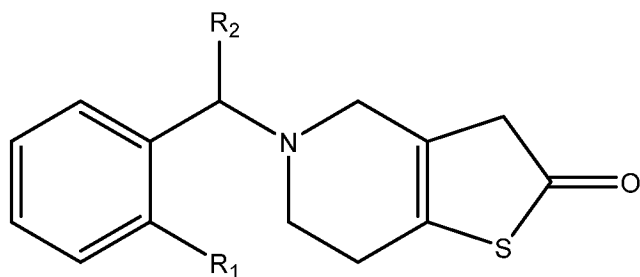
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутантный фермент СУР102А1, способный катализировать конъюгацию между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего
5 реагента.
2. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что катализирование конъюгации между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего реагента приводит к образованию смешанных дисульфидных
10 конъюгатов тиенопиридиновых соединений.
3. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что катализирование конъюгации между 2-оксотииенопиридином и гетероциклическими тиолами в присутствии восстанавливающего реагента селективно образует цис-стереоизомеры указанных
15 смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений.
4. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что восстанавливающий агент представляет собой НАДФН или НАДН.
- 20 5. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что указанный фермент содержит одну или более из следующих аминокислотных мутаций в SEQ ID NO: 2: A82F, L188Q, R47L, F87V, T365N, H116Q, K31T, S56R, A135S, V299D, I458F, P481H и W1046A.
6. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что указанный фермент
25 содержит аминокислотную последовательность, имеющую специфичный набор мутаций, перечисленных в Таблице 2.
7. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 99% гомологии с SEQ ID NO:
30 1.
8. Мутантный фермент СУР102А1 по п. 1, отличающийся тем, что указанный фермент содержит нуклеиновую кислоту, имеющую по меньшей мере 100% гомологии с SEQ ID NO:
3.

9. Способ синтеза цис-стереоизомеров смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений, включающий смешивание 2-оксотиенопиридинового фрагмента, гетероциклического тиолового фрагмента и указанного мутантного фермента СУР102А1 по п. 1 в присутствии восстанавливающего реагента.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный восстанавливающий агент представляет собой НАДФН или НАДН.

10 11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный 2-оксотиенопиридиновый фрагмент представляет собой



; где R1 представляет собой хлор или фтор; где R2 представляет собой H, COOCH3 или COCHCH2CH2.

15 12. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный гетероциклический тиоловый фрагмент представляет собой R3-SH; где R3 выбран из 3-нитропиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридина, 2-меркапто-6-метилпиридина, 5-хлорпиридин-2-тиола, 2-меркапто-5-трифторметилпиридина, 3-(трифторметил)пиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридин-3-карбонитрила, 4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила, 2-хинолинтиола, 1-амино-3-меркаптоизохинолина, 6-хлорпиридазин-3-тиола и 2,5-диметилфуран-3-тиола.

25 13. Способ по п. 9, отличающийся тем, что смешивание осуществляют при температуре окружающей среды.

14. Способ по п. 9, отличающийся тем, что смешивание осуществляют в течение периода времени от двадцати до шестидесяти минут.

15. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный мутантный фермент СУР102А1 содержится в цитозольной фракции бактерий.

16. Способ по п. 9, отличающийся тем, что количество мутантного фермента СУР102А1 составляет приблизительно от 0,1 до 1 мкМ.

17. Способ по п. 9, отличающийся тем, что смешивание приводит к образованию приблизительно 100 мг цис-стереоизомеров смешанных дисульфидных конъюгатов тиенопиридиновых соединений на литр 2-оксотииенопиридинового фрагмента, гетероциклического тиолового фрагмента, мутантного фермента СУР102А1 и восстанавливающего агента.

18. Набор, содержащий 2-оксотииенопиридиновый фрагмент, гетероциклический тиоловый фрагмент и указанный мутантный фермент СУР102А1 по п. 1.

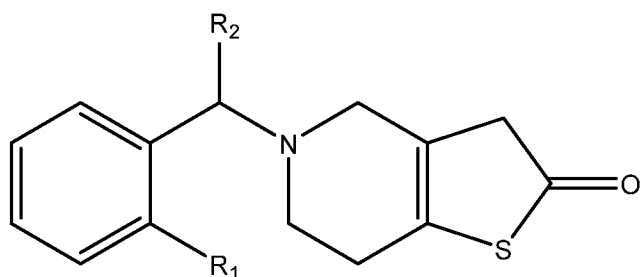
15

19. Набор по п. 18, дополнительно содержащий восстанавливающий реагент.

20. Набор по п. 19, отличающийся тем, что указанный восстанавливающий агент представляет собой НАДФН или НАДН.

20

21. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный 2-оксотииенопиридиновый фрагмент представляет собой



25 ; где R1 представляет собой хлор или фтор; где R2 представляет собой H, COOCH3 или COCH2CH2.

22. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный гетероциклический тиоловый фрагмент представляет собой R3-SH; где R3 выбран из 3-нитропиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридина, 2-меркапто-6-метилпиридина, 5-хлорпиридин-2-тиола, 2-меркапто-5-

трифторметилпиридина, 3-(трифторметил)пиридин-2-тиола, 2-меркаптопиридин-3-карбонитрила, 4,6-диметил-2-тиоксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила, 2-хинолинтиола, 1-амино-3-меркаптоизохинолина, 6-хлорпиридазин-3-тиола и 2,5-диметилфуран-3-тиола.

5

23. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, полученное способом по п. 9, и фармацевтически приемлемый носитель.

10 24. Фармацевтическая композиция по п. 23, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного введения.

25. Способ лечения, ослабления или профилактики сердечно-сосудистого заболевания у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества соединения, полученного способом по п. 9.

15

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанное введение выбрано из группы, состоящей из перорального введения и внутривенного введения.

20 27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанное сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из ишемической болезни сердца, заболевания периферических сосудов, атеротромбоза и цереброваскулярного заболевания.

28. Способ по п. 25, отличающийся тем, что указанное соединение снижает агрегацию тромбоцитов.

25

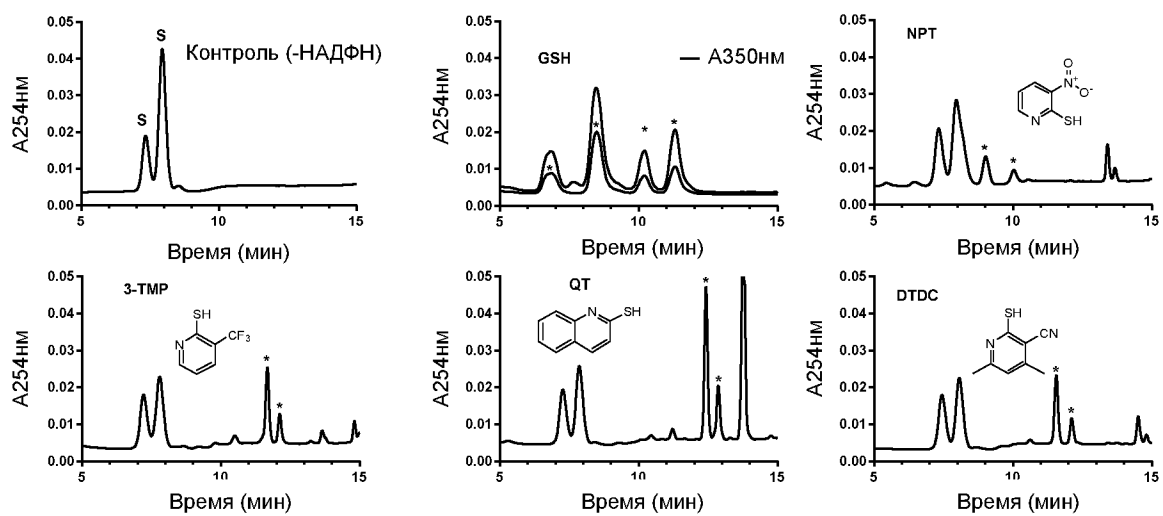
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что указанное снижение агрегации указанных тромбоцитов происходит за счет необратимого связывания с рецепторами P2Y₁₂.

30 30. Способ по п. 28, отличающийся тем, что указанное снижение агрегации указанных тромбоцитов происходит за счет блокады рецепторов АДФ.

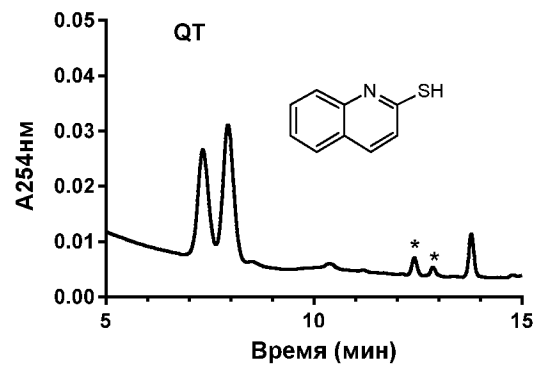
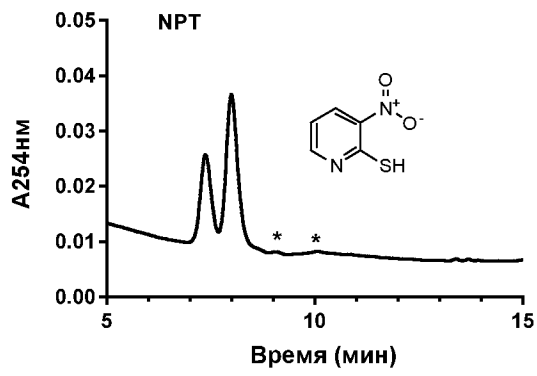
31. Способ по п. 25, дополнительно включающий совместное введение по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из ингибитора HMG-CoA редуктазы, ингибитора АПФ, блокатора кальциевых каналов, ингибитора агрегации тромбоцитов,

полиненасыщенной жирной кислоты, производного фибриновой кислоты, секвестранта желчной кислоты, антиоксиданта, тромболитического агента и антиангинального агента.

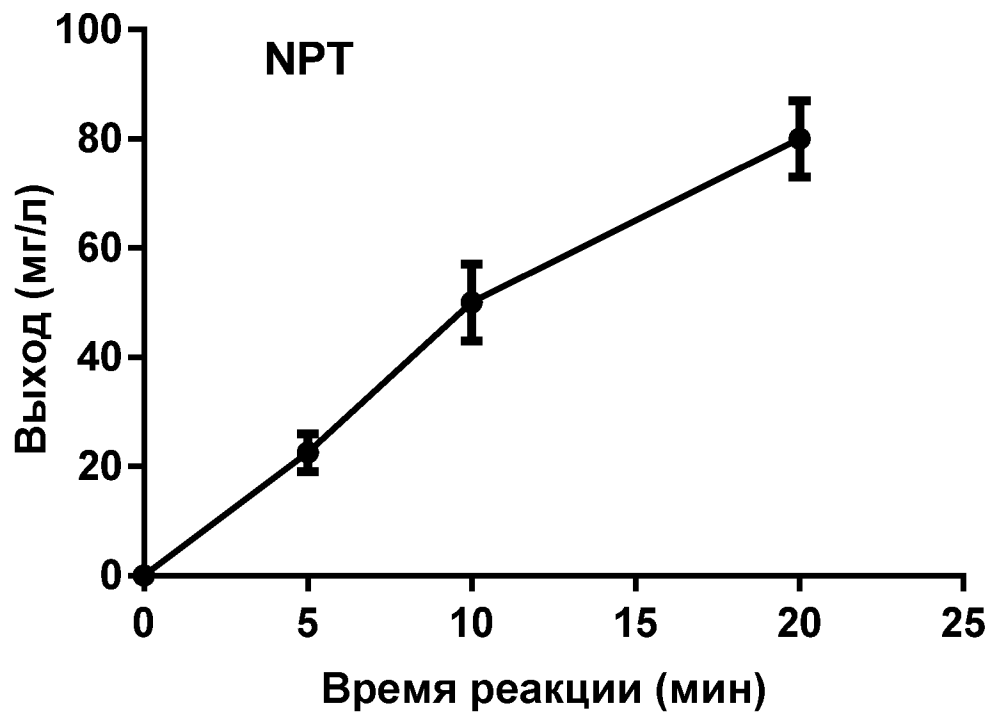
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4А

кДНК дикого типа от 1541 до 4690 цитохрома P-450 *B.megaterium* дикого типа: ген редуктазы НАДФН-P-450 (см., например, номер доступа J04832)

```

1501                                     atgacaatta aagaaatgcc
1561 tcagccaaaa acgtttggag agcttaaaaa tttaccgtta ttaaacaacag ataaaccggt
1621 tcaagctttg atgaaaattg cggatgaatt aggagaaatc tttaaattcg aggcgcctgg
1681 tcgtgtaacg cgctacttat caagtccagcg tctaattaaa gaagcatgcg atgaatcacg
1741 ctttgataaa aacttaagtc aagcgcttaa atttgtacgt gattttgcag gagacgggtt
1801 atttacaagc tggacgcatg aaaaaaattg gaaaaaagcg cataatatct tactttccaag
1861 cttcagtcag caggcaatga aaggctatca tgcgatgatg gtcgatatcg ccgtgcagct
1921 tgttcaaaaag tgggagcgtc taaatgcaga tgagcatatt gaagtaccgg aagacatgac
1981 acgtttaacg cttgatacaa ttggctcttg cggctttaac tatcgcttta acagctttta
2041 ccgagatcag cctcatccat ttattacaag tatgggccgt gcaactggatg aagcaatgaa
2101 caagctgcag cgagcaaate cagacgaccc agcttatgat gaaaaacaag gccagtttca
2161 agaagatatc aaggtgatga acgacctagt agataaaatt attgcagatc gcaaagcaag
2221 cgggtgaaca agcgatgatt tattaacgca tatgctaaac ggaaagatc cagaaacggg
2281 tgagccgctt gatgacgaga acattcgcta tcaaattatt acattcttaa ttgctgggaca
2341 cgaacaaca agtggtcttt tatcatttgc gctgtatttc ttagtgaaaa atccacatgt
2401 attacaaaaa gcagcagaag aagcagcacg agttctagta gatcctgttc caagctacaa
2461 acaagtcaaa cagcttaaat atgtcggcat ggtcttaaac gaagcgcctgc gcttatggcc
2521 aactgctcct gcgttttccc tatatgcaaa agaagatacg gtgcttgagg gagaatatcc
2581 tttagaaaaa ggcgacgaac taatggttct gattcctcag cttcacctg ataaaaaat
2641 ttggggagac gatgtggaag agttccgctc agagcgtttt gaaaatccaa gtgcgattcc
2701 gcagcatgcg tttaaaccgt ttggaaacgg tcagcgtgcg tgtatcggtc agcagttcgc
2761 tcttcatgaa gcaacgctgg tacttggtat gatgctaaaa cactttgact ttgaagatca
2821 tacaactac gagctggata ttaaagaaac tttaacgtta aaacctgaag gctttgtggt
2881 aaaagcaaaa tcgaaaaaaa ttccgcttgg cggtattcct tcacctagca ctgaacagtc
2941 tgctaaaaaa gtacgcaaaa aggcagaaaa cgctcataat acgccgctgc ttgtgctata
3001 cggttcaaat atgggaacag ctgaaggaac ggcgcgtgat ttagcagata ttgcaatgag
3061 caaaggattt gcaccgcagg tcgcaacgct tgattcacac gccggaaatc ttccgcgcga
3121 aggagctgta ttaattgtaa cggcgtctta taacggtcat ccgcctgata acgcaaagca
3181 atttgtcgac tggttagacc aagcgtctgc tgatgaagta aaaggcgttc gctactccgt
3241 atttggatgc ggcgataaaa actgggctac tacgtatcaa aaagtgcctg cttttatcga
3301 tgaacgctt gccgctaaag gggcagaaaa catcgctgac cgcggtgaag cagatgcaag
3361 cgacgacttt gaaggccat atgaagaatg gcgtgaacat atgtggagtg acgtagcagc
3421 ctactttaac ctcgacattg aaaacagtga agataataaa tctactcttt cacttcaatt
3481 tgtcgacagc gccgcggata tgccgcttgc gaaaatgcac ggtgcgtttt caacgaacgt
3541 cgtagcaagc aaagaacttc aacagccagg cagtgcacga agcacgcgac atcttgaaat

```

3601 tgaacttcca aaagaagctt cttatcaaga aggagatcat ttaggtggtta ttccctcgcaa
 3661 ctatgaagga atagtaaacc gtgtaacagc aaggttcggc ctagatgcat cacagcaaat
 3721 ccgtctggaa gcagaagaag aaaaattagc tcatttgcca ctcgctaaaa cagtatccgt
 3781 agaagagctt ctgcaatacg tggagcttca agatcctggt acgcgcacgc agcttcgctc
 3841 aatggctgct aaaacggctt gcccgccgca taaagtagag cttgaagcct tgcttgaaaa
 3901 gcaagcctac aaagaacaag tgctggcaaa acgtttaaca atgcttgaac tgcttgaaaa
 3961 ataccggcg tgtgaaatga aattcagcga atttatcgcc cttctgccaa gcatacgccc
 4021 gcgctattac tcgatttctt catcacctcg tgtcgatgaa aaacaagcaa gcatacgctt
 4081 cagcgttgct tcaggagaag cgtggagcgg atatggagaa tataaaggaa ttgcgtcgaa
 4141 ctatcttgcc gagctgcaag aaggagatac gattacgtgc tttatttcca caccgcagtc
 4201 agaatttacg ctgccaaaag accctgaaac gccgcttatt atggctcggc cgggaacagg
 4261 cgtcgcgccc ttagaggct ttgtgcaggc gcgcaaacag ctaaaagaac aaggacagtc
 4321 acttgagaaa gcacatttat acttcggctg ccgttcacct catgaagact atctgtatca
 4381 agaagagctt gaaaacgccc aaagcgaagg catcattacg cttcataccg ctttttctcg
 4441 catgcaaat cagccgaaaa catacgttca gcacgtaatg gaacaagacg gcaagaaatt
 4501 gattgaactt cttgatcaag gagcgcactt ctatatttgc ggagacggaa gccaaatggc
 4561 acctgccgtt gaagcaacgc ttatgaaaag ctatgctgac gttaccaag tgagtgaagc
 4621 agacgctcgc ttatggctgc agcagctaga agaaaaaggc cgatacgcaa aagacgtgtg
 4681 ggctgggtaa

ФИГ. 4В - Аминокислотная последовательность дикого типа для цитохрома P-450

***B. megaterium*: ген редуктазы НАДФН-Р-450 (см., например, номер доступа J04832) (SED**

ID NO: 2)

tikempqpkt fgelknlpll ntdkpvqalm kiadelgeif kfeapgrvtr ylssqrlike	60
acdesrfdkn lsqalkfvrd fagdgflftsw theknwkkah nillpsfsqq amkgyhammv	120
diavqlvqkw erlnadehie vpedmtrltl dtiglcgfnf rfnsfyrdqp hpfitsmvra	180
ldeamnkqlr anpddpayde nkrqfgedik vmndlvdkii adrkasgeqs ddllthmlng	240
kdpetgepld deniryqiit fliaghetts gllsfalyfl vknphvlqka aeeaarvlvd	300
pvpsykqvqk lkyvgmvlne alrlwptapa fslyakedtv lggeyplekg delmvlipql	360
hrdktiwgdd veefrperfe npsaipqhaf kpfngqgrac igqqfalhea tlvlgmmlkh	420
fdfedhtnye ldiketltlk pegfvvkaks kkiplggips psteqsakkv rkkaenahnt	480
pllvlygsnm gtaegtardl adiamskgfa pqvatldsha gnlpregavl ivtasynghp	540
pdnakqfvdw ldqasadevk gvrysvfgcg dknwattyqk vpafidetla akgaeniadr	600
geadasddfe gtyeewrehm wsdvaayfnl diensednks tllslqfvdsa admplakmhg	660
afstnvvask elqqpgsars trhleielpk easyqegdhl gviprnyegi vnrvtarfgl	720
dasqqirlea eeeklahlpl aktvsveell qyvelqdpvt rtqlramaak tvcpphkvel	780
eallekqayk eqvlakrltm lellekypac emkfsefial lpsirpryys isssprvdek	840
qasitvsvvs geawsgygey kgiasnylae lqegdtitcf istpqseftl pkdpetplim	900
vpgpgtvapf rgfvqarkql keqqslgea hlyfgcrsph edylyqeele naqsegiitl	960
htafsrmpnq pktyvqhyme qdgkkliehl dqgahfyicg dgsqmapave atlmksyadv	1020
hqvseadarl wlqqleekgr yakdvwag	1048

ФИГ. 4С

Оптимизированная последовательность κДНК ВМЗ (подчеркивание указывает на hexaHis-метку) (SEQ ID NO: 3)

ATGCACCATCATCATCATCATATTAAGGAGATGCCGCAGCCAAAAACATTCGGCGAACT
CAAAAACTTACCATTACTGAATACCGACAAACCGGTCCAAGCACTGATGAAAATTGCGG
ACGAATTAGGTGAAATCTTCAAATTCGAGGGCGCCCGGTCCGCTAACACGTTATTTATCC
AGTCAGCGCCTTATCAAAGAAGCGTGTGATGAAAGTCGTTTTGATAAAAATCTGTCCCA
GGCACTTAAATTTGTTTCGTGACTTTTTTCGGTGATGGCCTGTTTACCTCTTGGACTCATG
AAAAAACTGGAAAAAGCGCATAATATCTTGCTTCCGTCGTTTTTCGCAGCAGGCAATG
AAAGGTTACCATGCCATGATGGTCGATATTGCCGTCCAGCTGGTGCAAAAATGGGAACG
TCTTAACGCTGATGAACATATTGAAGTGCCCGAAGACATGACCCGTCTGACGCTGGATA
CTATTGGA CTGTGCGGGTTCAACTATCGTTTTCAACTCCTTCTACCGTGATCAGCCACAT
CCGTTTTATTACTTCTATGGTCCGCGCCTTAGACGAAGCCATGAACAAACTGCAGCGCGC
CAACCCAGACGACCCAGCTTATGATGAGAATAAACGTCAGTTTTCAAGAAGACATCAAAG
TCATGAACGACTTAGTGGATAAAATATTGCAGACCGTAAAGCGAGCGGCGAACAGAGT
GATGACCTGCTTACCCACATGCTGAATGGTAAAGATCCAGAGACCGGCGAGCCGTTAGA
TGATGAAAATATTGCTACCAGATCATTACCTTTTTAATCGCAGGACACGAAACAACAA
GTGGA CTGCTCAGCTTTGCACTCTACTTTCTGGTTAAAAACCCGCATGTTCTGCAAAAA
GCAGCGGAAGAGGCCCGCCCGTGTGCTGGTTCGATCCGCTTCCCAGCTATAAACAGGTCAA
ACAGTTAAATACGTGGGCATGGTCTTAAACGAGGCTCTGCGCTTATGGCCAACAGCAC
CAGCATTTTTCGTTATATGCAAAAGAAGATACCGTTCTGGGAGGAGAATACCCGTTAGAA
AAAGGCGACGAGCTTATGGTGTGATCCCACAGTTACACCGTGATAAAAACCATTTGGGG
CGACGATGTGGAAGAATTTGCGCCAGAACGTTTTCGAGAACCCTAGCGCAATTCACACAGC
ATGCCTTCAAACCTTCGGGAACGGTCAGCGCGCGTGCATTGGGCAGCAGTTCGCGCTG
CATGAAGCAACTTTGGTGTTAGGCATGATGCTGAAACACTTTGATTTTGAAGACCACAC
GAATTATGAACTGGATATTAAGAAACCTGCACTGAAACCAGAAGGATTCGTAGTTA
AAGCGAAAAGCAAAAAGATTCGCTGGGTGGCATTCGAGCCCATCCACCGAACAGAGC
GCGAAAAAAGTTGCGAAAAAGGCGGAAAATGCGCACAATACCCCTTGTTAGTCCTTTA
CGGCTCAAATATGGGCACAGCAGAAGGCACCGCACGTGACTTAGCCGATATTGCAATGA
GCAAGGGTTTTGCGCGCCCAAGTCGCGACCTTGGATTACACGCTGGAAACCTGCCGCGG
GAAGGCGCCGTCCTTATCGTTACTGCCTCATATAACGGTCACCCCTCCGGACAATGCGAA
ACAATTTGTGGA CTGGTTAGATCAAGCCTCGGCCGACGAAGTGAAGGCGTTTCGTTATT
CTGTTTTTGGATGTGGGGATAAAAACCTGGGCGACGACGTACCAAAAAGTCCCTGCTTTT
ATTGATGAAACGTTGGCTGCAAAAGGTGCAGAAAACATTCAGACCGTGGCGAAGCAGA
CGCGAGCGACGACTTTGAAGGTACCTATGAGGAATGGCGTGAACACATGTGGAGTGATG
TCGCCGCTTACTTCAACTTAGATATTGAAAATTCGGAAGATAATAAAAGTACCCCTGAGC
TTGCAATTCGTGGACTCGGCTGCCGACATGCCGCTCGCTAAAATGCACGGGGCGTTTAG
TACGAATGTAGTGGCTTCCAAAGAGTTGCAACAACCCGGTAGCGCACGCTCGACCCGGC
ACCTGGAAATTGAATTACCGAAGGAAGCGTCTTATCAGGAAGGA

ФИГ. 4С (продолжение)

GATCATCTGGGTGTAATCCCACGCAATTACGAAGGTATTGTTAATCGCGTTACCGCGCG
TTTTGGTTTAGATGCCTCCCAACAAATCCGTTTAGAAGCAGAAGAAGAAAAACTCGCGC
ATTTACCSTTAGCCAAAACCGTTTTCGGTGGAAGAACTGCTGCAATATGTTGAACTTCAG
GACCCTGTGACCCGTACCCAGCTCCGTGCCATGGCCGCGAAAACAGTATGCCACCCCA
CAAAGTTGAATTAGAGGCGCTGTTAGAGAAACAAGCATACAAAGAACAAGTGTAGCTA
AGCGTCTGACCATGTTAGAGTACTGGAGAAATATCCGGCGTGCGAGATGAAATTCTCA
GAATTCATTGCATTGTTGCCGAGCATTTCGTCCGCGGTATTACAGTATCTCGAGCTCACC
GCGCGTTGATGAAAAACAGGCCTCTATTACGGTCTCCGTAGTTTTCCGGCGAAGCCTGGA
GCGGGTATGGAGAATATAAAGGAATTGCTAGCAACTATCTCGCGGAGCTGCAAGAGGGC
GACACTATTACATGCTTCATTTCTACGCCGCAATCCGAATTTACACTGCCGAAAGACCC
GGAAACGCCACTCATTATGGTAGGCCAGGTAAGTGGCGTAGCGCCATTTCCGCGGATTCG
TTCAGGCTCGTAAACAGTTGAAAGAACAAGGTCAAAGTCTTGGCGAAGCACATTTATAC
TTCGGCTGCCGCTCGCCGCATGAGGACTATCTCTATCAGGAAGAATTGGAGAACGCACA
GAGTGAGGGCATTATCACCTTGCATACGGCTTTTTCTCGCATGCCTAATCAACCTAAAA
CCTATGTCCAACATGTGATGGAGCAGGATGGAAAAAATTGATCGAGCTGTTGGATCAG
GGCGCGCATTTTTACATTTGCGGGGATGGTTTCGCAGATGGCACCCGCCGTGGAGGCCAC
CCTTATGAAAAGCTATGCAGATGTGCACCAGGTAAGCGAAGCGGATGCCCCGTCTGTGGC
TGCAACAGTTGGAAGAAAAGGTTCGCTATGCAAAAGACGTGTGGGCAGGT