

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292213 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.11

(51) Int. Cl. C12N 9/02 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.01

(54) ВАРИАНТЫ P450 ВМ3 МОНООКСИГЕНАЗЫ ДЛЯ C19-ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ
СТЕРОИДОВ

(31) 20155122.3

(32) 2020.02.03

(33) EP

(86) PCT/EP2021/052295

(87) WO 2021/156200 2021.08.12

(71) Заявитель:

БАЙЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ;
БАЙЕР ФАРМА
АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(72) Изобретатель:

Кенш Оливер, Теде Кай, Хельфрих
Петра, Скальден Лилли, Цорн
Людвиг, Треннер Забине, Бурмайстер
Йенс, Кречман Нильс, Рихтер
Флориан, Коко Уэйн, Людвиг
Маркус, Булут Далия, Берендес
Франк, Пиллинг Йенс, Вагнер Якоб,
Линнхофф Рубен (DE)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к новым рекомбинантным вариантам цитохром P450 монооксигеназы (P450-ВМ3) *Bacillus megaterium* для C19-гидроксилирования стероидов и их производных или для улучшенной экспрессии белка ВМ3. В частности, настоящее изобретение также относится к способам и процессам, которые используют варианты P450-ВМ3 для получения эстрогена и эстрадиола. Изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, конструкциям и векторам для экспрессии этих вариантов P450-ВМ3.

A1

202292213

202292213

A1

ВАРИАНТЫ P450 ВМЗ МОНООКСИГЕНАЗЫ ДЛЯ C19-
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ СТЕРОИДОВ

5

ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к новым рекомбинантным вариантам цитохром P450 монооксигеназы (P450-ВМЗ) *Bacillus megaterium* для C19-гидроксилирования стероидов и их производных или для улучшенной экспрессии белка ВМЗ. В частности, настоящее изобретение также относится к способам и процессам, которые используют варианты P450-ВМЗ для получения эстрона и эстрадиола. Изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, конструкциям и векторам для экспрессии этих вариантов P450-ВМЗ.

15

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Стероидные гормоны эстрон и эстрадиол и их производные используются как лекарственные средства, например, в гормональной терапии менопаузы, контрацепции и онкологии, или являются важными промежуточными продуктами для синтеза последующих стероидных продуктов. Эстрон и эстрадиол могут быть получены в несколько этапов, начиная с фитостеролов. Различные продукты распада фитостеролов содержат метильную группу в положении C19 стероидной кольцевой системы, которую необходимо удалить для того, чтобы синтезировать эстрон и эстрадиол и их производные при ароматизации кольца А стероидной кольцевой системы. Inhoffen описывает эту ароматизацию посредством термолиза для синтеза эстрадиола (Inhoffen, 1947), а Hershberg и другие описывают указанную ароматизацию путем термолиза для синтеза эстрона (Hershberg, 1950). Однако выход продукта не является оптимальным, и при этом образуются различные побочные продукты. Templeton и другие, а также Numazawa и другие описывают эту ароматизацию через стероидные продукты, окисленные в положении C19 (F. Templeton, 1997), (Mitsuteru Numazawa, 2009). Следовательно, процессы гидроксилирования метильной группы в положении C19 и, таким образом, возможность дальнейшей дериватизации и, наконец, удаления заместителя в положении 19, могут

проложить путь для новых и усовершенствованных способов синтеза эстрона и эстрадиола и их производных.

Ферменты как катализаторы обычно характеризуются превосходной регио- и/или стереоселективностью для природных субстратов, но могут демонстрировать низкую термическую стабильность и стабильность в растворителе. Из-за узкого спектра субстрата ферменты часто являются очень специализированными по сравнению с химическим катализатором, что ограничивает их широкое применение. Поэтому найти или создать фермент, который катализирует определенную реакцию с коммерчески подходящим выходом и достаточной чистотой, является сложной задачей.

Цитохром P450 монооксигеназы (P450) составляют обширную группу гемовых ферментов, которые являются убиквитарными в природном мире. Ранее было описано, что цитохром P450 BM3 (P450-BM3, BM3), полученный из *Bacillus megaterium*, катализирует NADPH-зависимое гидроксирование длинноцепочечных жирных кислот, спиртов и амидов, а также эпоксидирование ненасыщенных жирных кислот (смотри, например, (Narhi, 1986) и (Capdevila, 1996)). Для P450-BM3 редуктазный (65 кДа) и монооксигеназный (55 кДа) домены фермента слиты и производятся как каталитически самодостаточный фермент размером 120 кДа. Как следствие, ферменты P450-BM3 демонстрируют высокую скорость катализа среди монооксигеназ P450 благодаря эффективному переносу электронов между доменами слитой редуктазы и гема, см., например, (Noble MA, 1999) и (Munro, 1996).

Варианты BM3 были описаны для различных биотрансформационных процессов. Дикий тип и мутант P450 BM3 применялись как биокатализаторы в производстве химических соединений, в том числе фармацевтических (Hazel M Girvan, 2016). Например, (WO200107630A1) раскрывает процессы микробиологического окисления различных органических субстратов, таких как N-гетероциклические ароматические соединения, в частности, способы получения индиго и индийского рубина с использованием специальных цитохром P450 монооксигеназ с измененной специфичностью субстрата. В EP1196603A1 заявлен вариант P450 BM3 с измененным профилем в отношении ферментативного гидроксирования алифатических карбоновых кислот вследствие сайт-специфического мутагенеза его участка связывания субстрата, где F87 заменен на Val, Ala или Leu, а L188 заменен на Asn, Gln, Arg, Lys, Ala,

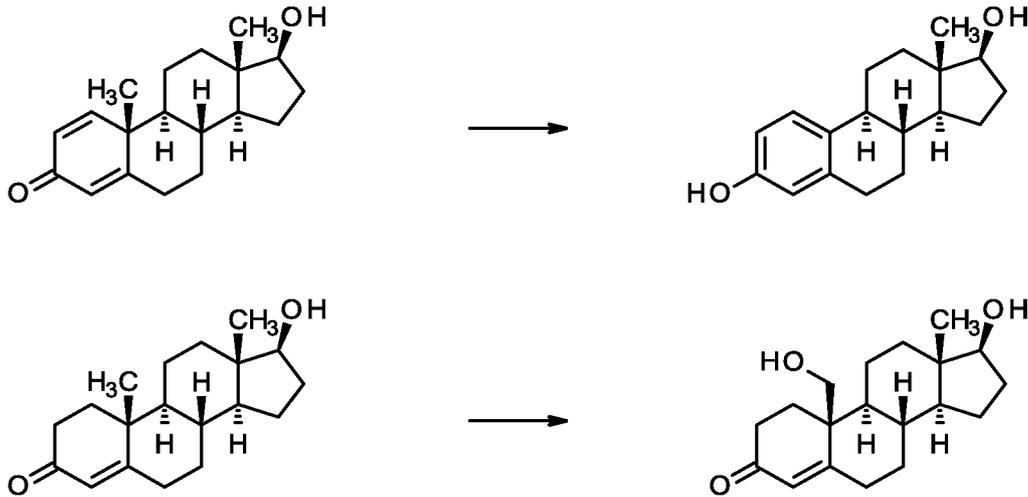
Gly, Ser или Trp и, необязательно, по крайней мере, одно из аминокислотных положений 26, 47, 72, 74 и 354 является измененным. WO2016007623A1 раскрывает варианты цитохром P450 BM3 для получения улучшенной активности в отношении субстратов, выбранных из нифедипина, пропранолола, верапамила и диклофенака. EP1131440A2 раскрывает процесс окисления субстрата, который является ациклическим или циклическим терпеном, выбранным из монотерпенов, сесквитерпенов и дитерпенов, или циклоалкеном; или их замещенными производными, где процесс включает окисление указанного соединения мутантным ферментом P450 BM3, причем мутант включает замену аминокислоты в активном центре на аминокислоту с менее полярной боковой цепью.

Ни один из указанных документов не раскрывает конкретную структуру вариантов BM3 в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, ни один из указанных выше документов не касается C19-гидроксилирования стероидных производных, например, для производства эстрадиола или эстрона. В то же время было описано, что BM3 дикого типа (ДТ) вообще не воспринимает ни тестостерон, ни стероиды в качестве субстрата.

(Kille Sabrina, 2011), (Kille, 2010) и (Acevedo-Rocha, 2018) описали библиотеку вариантов P450 BM3 и использование направленной эволюции P450 BM3. Acevedo-Rocha и др. сообщили о направленной эволюции P450 BM3 для селективного гидроксилирования тестостерона. Однако при использовании этих мутантов соответствующие количества гидроксилирования тестостерона были получены только в положениях 16 α / β . Эти выводы препятствовали дальнейшим разработкам вариантов BM3 для C19-гидроксилирования, поскольку существовало предубеждение в отношении получения только следовых количеств в положении C19 из-за преимущественного гидроксилирования в других положениях (Acevedo-Rocha, 2018).

В соответствии с настоящим изобретением было неожиданно обнаружено, что конкретные новые варианты бактериальных цитохром P450 монооксигеназ BM3 (CYP) также могут быть использованы для катализации эффективного синтеза эстрона и эстрадиола и их производных путем C19-гидроксилирования с помощью эффективного и коммерчески приемлемого способа. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что C19-гидроксилирование субстратов тестостерона, дельта-1-тестостерона и андроста-1,4-диен-3,17-диона может быть достигнуто

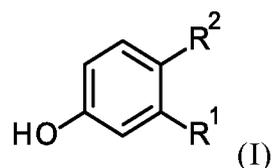
посредством использования мутантов бактериальных цитохром P450 монооксигеназ BM3 в качестве биокатализаторов.



Эти способы использования могут дополнительно поддерживаться введением мутаций в варианты BM3, которые улучшают экспрессию белка BM3.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предлагается вариант цитохром P450 BM3 монооксигеназы (BM3) для катализации C19-гидроксилирования стероида или производного стероида. В соответствии с первым вариантом осуществления первого аспекта вариант BM3 содержит мутацию F87A и, по крайней мере, одну, и предпочтительно две дополнительные мутации, выбранные из (I) мутации в положении V78, предпочтительно V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L, (II) мутации в положении A82, предпочтительно A82E, A82Q или A82P. В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая вариант цитохром P450 BM3 монооксигеназы, как описано в настоящей заявке. В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин для производства варианта цитохром P450 BM3 монооксигеназы. В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант BM3 в соответствии с любым из аспектов, описанных в настоящей заявке. В соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения предусмотрено использование варианта цитохром P450 BM3 монооксигеназы (BM3) для получения соединения формулы I, где R1 и R2 образуют шестичленное кольцо как часть стероида.



В соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения предусмотрено использование варианта ВМЗ для С19-гидроксилирования стероида или производного стероида. В соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения предложен способ С19-гидроксилирования стероида или его производного, который включает (I) (а) культивирование микроорганизма, продуцирующего рекомбинантный вариант цитохром Р450-ВМЗ монооксигеназы (ВМЗ), в культуральной среде при наличии экзогенного или полученного на промежуточном этапе субстрата; или (б) инкубирование реакционной среды, содержащей субстрат, с цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназой; и (II) выделение образовавшегося продукта окисления или его вторичного продукта из среды; при этом указанный процесс дополнительно характеризуется тем, что указанный вариант ВМЗ является вариантом ВМЗ, как описано в настоящей заявке. В соответствии с седьмым аспектом предлагается способ получения оптимизированных вариантов ВМЗ для С19-гидроксилирования стероидов, где указанный способ включает (I) (а) культивирование рекомбинантного микроорганизма, который экспрессирует вариант ВМЗ (исследуемый вариант) в культуральную среду при наличии экзогенного или образованного на промежуточном этапе стероида или производного стероида; или (б) инкубирование стероида или реакционной среды, содержащей стероидные производные, с вариантом ВМЗ (исследуемый вариант); и (II) сравнение полученного выхода продукта и/или селективности для продукта С19-гидроксилирования, образованного при использовании исследуемого варианта или его вторичного продукта, с соответствующим значением, которое получено для исходного варианта, способного катализировать С19-гидроксилирование стероида, и (III) отбор исследуемого варианта в качестве оптимизированного для С19-гидроксилирования стероидов, если исследуемый вариант имеет улучшенный выход продукта и/или селективность по сравнению с исходным вариантом. В соответствии с дополнительным аспектом предлагаются варианты ВМЗ, которые характеризуются улучшенной экспрессией белка ВМЗ по

сравнению с ВМЗ дикого типа (ДТ), где вариант ВМЗ содержит специфические мутации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 а показывает выход эстрадиола, полученного в реакциях биотрансформации для дочерних вариантов ВМЗ-268. Выход эстрадиола (при использовании 50 мг/л $\Delta 1$ -тестостерона в качестве субстрата) представлен как соотношение к исходному типу. По сравнению с исходным типом выход эстрадиола можно было бы дополнительно улучшить путем введения мутаций в положениях V26, L29, R47, V48, T49, R50, Y51, E64, N70, S72, A74, L75, F77, L78, F81, G85, L86, T88, S89, W90, M118, E143, T146, S273, A164, T327, P329, A330, T365, P392, F393, A399, I401, G402, G415, L437, T438.

Фигура 1 б показывает коэффициент селективности для эстрадиола, полученного в реакциях биотрансформации для дочерних вариантов ВМЗ-268. Коэффициент селективности (при использовании 50 мг/л $\Delta 1$ -тестостерона в качестве субстрата) представлен как соотношение к исходному типу. По сравнению с исходным типом коэффициенты селективности могут быть дополнительно улучшены путем введения мутаций в положениях V26, L29, R47, V48, T49, R50, Y51, E64, N70, S72, A74, L75, F77, L78, F81, G85, L86, T88, S89, W90, M118, E143, T146, S176, M271 T327, P329, A330, T365, P392, F393, A399, I401, G402, G415, L437, T438.

Фигура 1 в показывает превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол, которое осуществляли в реакциях биотрансформации (при использовании 50 мг/л $\Delta 1$ -тестостерона в качестве субстрата) с вариантами ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5), где положения L78, E82 и A87 были изменены. Эстрадиол был получен при использовании ВМЗ-268 и вариантов L78 [I, L, M, V] ВМЗ-268.

Фигура 2 а, б показывают выход продукта эстрадиола (а) и коэффициент селективности (б), соответственно, полученные в биотрансформационных реакциях при использовании вариантов ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5), содержащих изображенные двойные мутации. Выход эстрадиола (при использовании 50 мг/л $\Delta 1$ -тестостерона в качестве субстрата) и коэффициент селективности представлены как соотношение к исходному типу. Варианты, имеющие улучшенный выход или коэффициент селективности по сравнению с ВМЗ-268, изображены серым цветом. По сравнению с исходным вариантом ВМЗ-268 выход продукта можно дополнительно улучшить путем введения следующих

мутаций: (S72C, A74 [C, I, L, V]), (S72D, A74C), (S72G, A74 [C, F, H, I, L, S, V, Y]), (S72H, A74C), (S72N, A74 [C, I, V]), (L75I, F81 [C, I, L, S, V]), (L75V, F81 [C, L, V, Y]), (I263H, A264G), (A74[C, R, V], L75V). По сравнению с исходным вариантом BM3-268 коэффициенты селективности могут быть дополнительно

5 улучшены путем введения следующих мутаций: (S72C, A74 [C, I, L, V, Y]), (S72D, A74 [C, F]), (S72G, A74 [C, F, H, I, L, S, V, Y]), (S72H, A74 [C, G, S, Y]), (S72N, A74 [C, I, N, V]), (S72Y, A74V), (L75H, F81S), (L75I, F81 [C, G, H, I, L, S, V, Y]), (L75V, F81 [C, H, I, L, V, Y]), (I263H, A264G), (A74G, L75C), (A74[C, R, V], L75V).

10 **Фигура 3 а, б** показывают выход продукта эстрадиола (а) и коэффициент селективности (б), соответственно, полученные в реакциях биотрансформации с вариантами BM3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15) и дополнительными мутациями, как представлено. Выход эстрадиола и коэффициент селективности (при использовании 100 мг/л Δ 1-тестостерона в качестве субстрата)

15 представлены как соотношение к исходному типу. Варианты SEQ ID No. 15, содержащие дополнительную мутацию в положении L20, V26, L29, R47, T49, L78, T146, L150, F173, F205, M212, H266, E267, G271, L272, W325, T323, A3 T438, были неожиданно обнаружены как такие, которые обеспечивают дальнейший улучшенный выход продукта по сравнению с исходным вариантом в соответствии с SEQ ID No. 15. Варианты SEQ ID No. 15, которые включали

20 дополнительную мутацию в положении L20, V26, L29, R47, T49, A74, L78, F81, E82, L86, T88, T146, L150, F205, M212, I259, F261, E267,2 A330, F331, E352, M354, L356 и/или T438, были неожиданно обнаружены как такие, которые имеют улучшенную селективность по сравнению с исходным вариантом в соответствии с SEQ ID No. 15.

25

Фигура 3 в показывает превращение Δ 1-тестостерона в эстрадиол, полученное в реакциях биотрансформации при использовании 100 мг/л Δ 1-тестостерона в качестве субстрата с применением BM3-268 с мутациями M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), который также содержит дополнительную(ые)

30 мутацию(и) в положении L78, E82 или A87, как указано. Эстрадиол был получен при использовании варианта, включающего SEQ ID No. 15. Кроме того, эстрадиол был получен при использовании вариантов, которые происходят от SEQ ID No. 15 и содержат, по крайней мере, мутацию(и) L78 [L, F, M, Y] или E82 [E, P, Q], или их комбинации.

Фигура 4 а, б, в, г, д, е показывает выход продукта и коэффициент селективности для эстрадиола, полученного в биотрансформационных реакциях при использовании вариантов ВМЗ-268; М177У, А184У (SEQ ID No. 15) (Вар.), которые включают до шести мутаций. В качестве субстрата использовали 100 мг/л Δ 1-тестостерона. Каждый вариант сравнивали с ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5) и улучшенным вариантом ВМЗ-268; М177У, А184У (исходный тип) (SEQ ID No. 15), соответственно. Кроме того, последние два столбца показывают, улучшился ли вариант (с изображенным набором мутаций) относительно выхода или селективности (КС – коэффициент селективности) по сравнению с наилучшим проанализированным вариантом (наилучший) из набора вариантов, которые включают то же самое подмножество мутаций, но по крайней мере, на одну мутацию меньше.

Фигура 5 а и б показывает выход продукта эстрадиола и коэффициент селективности (КС), полученные в реакциях биотрансформации с вариантами ВМЗ-268, которые включают до семи мутаций. В качестве субстрата использовали 50 мг/л Δ 1-тестостерона. Каждый вариант сравнивали с ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5) в отношении выхода продукта и коэффициента селективности (столбцы 1 и 2). Кроме того, столбцы 3 и 4 показывают, улучшился ли вариант (с изображенным набором мутаций) в отношении выхода продукта или коэффициента селективности (КС) по сравнению с наилучшим проанализированным вариантом (наилучший) из набора вариантов, включающего то же подмножество мутаций, но по крайней мере, на одну мутацию меньше.

Фигуры 6 а и б показывают выход продукта (а) и коэффициент селективности (б), соответственно, для эстрогена, полученного в реакциях биотрансформации при использовании вариантов ВМЗ-268; М177У, А184У (SEQ ID No. 15), которые содержат изображенные мутации. Коэффициент выхода/селективности эстрогена при использовании 100 мг/л АДД в качестве субстрата представлен как соотношение к исходному типу (SEQ ID No. 15). По сравнению с исходным типом выход эстрогена можно дополнительно повысить путем введения мутаций в положениях L20, V26, R47, T49, Y51, A74, L78, F81, E82, T146, L150, F205, M212, I259, G271, L27, A330, E352, M354, T436 и/или T438. Коэффициенты селективности можно дополнительно улучшить по сравнению с исходным типом путем введения мутаций в положениях L20, V26,

T49, A74, L78, F81, T146, L150, F173, F205, M212, I259, F261, I262, 26, W325, T327, E352, M354, L356 и/или T438.

Фигура 6 в показывает превращение АДД в эстрон, который получают в реакциях биотрансформации при использовании 100 мг/л АДД в качестве субстрата при использовании вариантов BM3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), которые включают мутацию в положении L78, E82 или A87. Эстрон был получен при использовании варианта, имеющего SEQ ID No. 15, и вариантов L78[M], E82[P] последовательности SEQ ID No. 15.

7 а, б, в, г, д, е показывает выход продукта и коэффициент селективности для эстрона, полученного в реакциях биотрансформации при использовании вариантов BM3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15) (Var.), которые имеют до шести мутаций. В качестве субстрата использовали 100 мг/л АДД. Каждый вариант сравнивали с BM3-268 (SEQ ID No. 5) и улучшенным вариантом BM3-268; M177Y, A184Y (PT) (SEQ ID No. 15). Кроме того, последние два столбца показывают, улучшился ли вариант (с изображенным набором мутаций) в отношении выхода или селективности (КС) по сравнению с наилучшим проанализированным вариантом (наилучший) из набора вариантов, включающего то же подмножество мутаций, но по крайней мере, на одну мутацию меньше.

Фигура 8 показывает выход продукта и селективность (КС) для эстрона, полученного в биотрансформационных реакциях с вариантами BM3-268, которые имеют многочисленные мутации. В качестве субстрата использовали 100 мг/л АДД. Каждый вариант сравнивали с BM3-268 (SEQ ID No. 5) в отношении выхода продукта и селективности (столбцы 1 и 2). Кроме того, столбцы 3 и 4 показывают улучшился ли вариант (с изображенным набором мутаций) относительно выхода или селективности (КС) по сравнению с наилучшим проанализированным вариантом (наилучший) из набора вариантов, включающего то же подмножество мутаций, но по крайней мере, на одну мутацию меньше.

Фигуры 9 и 10 показывают титр продукта (А) и соотношение целевого продукта (Б), соответственно, для эстрона, полученного в реакциях биотрансформации при использовании вариантов BM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (SEQ ID No. 117), которые включают представленные мутации. Титр эстрона/коэффициент селективности

при использовании 2000 мг/л АДД в качестве субстрата приведен как соотношение к исходному типу (SEQ ID No. 117). По сравнению с исходным типом титры эстрогена могут быть дополнительно улучшены путем введения мутаций в положениях M5, A44, S53, Q73, K76, R79, D80, H92, G114, E140, P172, F173, I174, T175, S176, R17 E183, N186, K187, Q189, R190, A225, G227, H236, G240, I258, T269, S270, V299, E337, Q397, A399, Q403, Q404 и/или K440. Селективность может быть дополнительно улучшена по сравнению с исходным типом путем введения мутаций в положениях M5, A44, G46, S53, Q73, K76, R79, H92, G114, E140, P172, F173, I174, T175, S176, R179, D1, N186, K187, Q189, R190, A225, H236, G240, I258, T269, S270, V299, E337, A399, Q403, Q404, E409 и/или K440.

Фигура 11 показывает титр продукта и соотношение целевого продукта (СЦП) для эстрогена, полученного в реакциях биотрансформации при использовании вариантов BM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (SEQ ID No. 117), которые включают многочисленные мутации. 2000 мг/л АДД использовали в качестве субстрата. Столбцы 1 и 2 показывают, улучшился ли вариант (с изображенным набором мутаций) относительно титра или селективности продукта по сравнению с наилучшим проанализированным вариантом из набора вариантов, включающего то же самое множество мутаций, но по крайней мере, на одну мутацию меньше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Перечень последовательностей, связанных с настоящей заявкой, представлен в электронном формате и включен данной ссылкой в описание изобретения в полном объеме.

SEQ ID NO.	Объект	Мутации	Тип
1	BM3 дикого типа (ДТ)		Белок
2	BM3-254	V78Y, A82E, F87A	Белок
3	BM3-261	V78M, A82E, F87A	Белок
4	BM3-263	V78I, A82E, F87A	Белок
5	BM3-268	V78L, A82E, F87A	Белок
6	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A	Белок
7	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A	Белок
8	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A	Белок
9	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A	Белок

SEQ ID NO.	Объект	Мутации	Тип
10	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A	Белок
11	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A	Белок
12	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A	Белок
13	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A	Белок
14	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Белок
15	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Белок
16	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Белок
17	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Белок
18	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Белок
19	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Белок
20	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Белок
21	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Белок
22	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Белок
23	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Белок
24	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Белок
25	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Белок
26	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Белок
27	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Белок
28	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Белок
29	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, M177Y	Белок
30	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, M177Y	Белок
31	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, M177Y	Белок
32	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, M177Y	Белок
33	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, M177Y	Белок
34	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, M177Y	Белок
35	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, M177Y	Белок
36	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, M177Y	Белок
37	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, M177Y	Белок
38	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, M177Y	Белок
39	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, M177Y	Белок
40	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, M177Y	Белок
41	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, M177Y	Белок
42	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, M177Y	Белок
43	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, M177Y	Белок
44	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, A184Y	Белок
45	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, A184Y	Белок
46	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, A184Y	Белок
47	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, A184Y	Белок
48	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, A184Y	Белок
49	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, A184Y	Белок
50	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, A184Y	Белок
51	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, A184Y	Белок
52	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, A184Y	Белок
53	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, A184Y	Белок
54	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, A184Y	Белок

SEQ ID NO.	Объект	Мутации	Тип
55	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, A184Y	Белок
56	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, A184Y	Белок
57	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, A184Y	Белок
58	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, A184Y	Белок
59	Дикий тип		Нукл. к-та
60	BM3-254	V78Y, A82E, F87A	Нукл. к-та
61	BM3-261	V78M, A82E, F87A	Нукл. к-та
62	BM3-263	V78I, A82E, F87A	Нукл. к-та
63	BM3-268	V78L, A82E, F87A	Нукл. к-та
64	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A	Нукл. к-та
65	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A	Нукл. к-та
66	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A	Нукл. к-та
67	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A	Нукл. к-та
68	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A	Нукл. к-та
69	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A	Нукл. к-та
70	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A	Нукл. к-та
71	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A	Нукл. к-та
72	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
73	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
74	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
75	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
76	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
77	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
78	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
79	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
80	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
81	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
82	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
83	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
84	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
85	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
86	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, M177Y, A184Y	Нукл. к-та
87	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, M177Y	Нукл. к-та
88	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, M177Y	Нукл. к-та
89	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, M177Y	Нукл. к-та
90	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, M177Y	Нукл. к-та
91	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, M177Y	Нукл. к-та
92	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, M177Y	Нукл. к-та
93	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, M177Y	Нукл. к-та
94	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, M177Y	Нукл. к-та
95	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, M177Y	Нукл. к-та
96	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, M177Y	Нукл. к-та
97	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, M177Y	Нукл. к-та
98	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, M177Y	Нукл. к-та
99	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, M177Y	Нукл. к-та

SEQ ID NO.	Объект	Мутации	Тип
100	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, M177Y	Нукл. к-та
101	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, M177Y	Нукл. к-та
102	BM3 вариант	V78F, A82E, F87A, A184Y	Нукл. к-та
103	BM3 вариант	V78L, A82E, F87A, A184Y	Нукл. к-та
104	BM3 вариант	V78I, A82E, F87A, A184Y	Нукл. к-та
105	BM3 вариант	V78M, A82E, F87A, A184Y	Нукл. к-та
106	BM3 вариант	V78Y, A82E, F87A, A184Y	Нукл. к-та
107	BM3 вариант	V78F, A82P, F87A, A184Y	Нукл. к-та
108	BM3 вариант	V78L, A82P, F87A, A184Y	Нукл. к-та
109	BM3 вариант	V78I, A82P, F87A, A184Y	Нукл. к-та
110	BM3 вариант	V78M, A82P, F87A, A184Y	Нукл. к-та
111	BM3 вариант	V78Y, A82P, F87A, A184Y	Нукл. к-та
112	BM3 вариант	V78F, A82Q, F87A, A184Y	Нукл. к-та
113	BM3 вариант	V78L, A82Q, F87A, A184Y	Нукл. к-та
114	BM3 вариант	V78I, A82Q, F87A, A184Y	Нукл. к-та
115	BM3 вариант	V78M, A82Q, F87A, A184Y	Нукл. к-та
116	BM3 вариант	V78Y, A82Q, F87A, A184Y	Нукл. к-та
117	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F	Белок
118	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y	Белок
119	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N	Белок
120	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F	Нукл. к-та
121	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y	Нукл. к-та
122	BM3 вариант	S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N	Нукл. к-та
123	Вставка	GKHIIQGPMYDVSGTAPVNVVN	Белок
124	Вставка	LRASVSAIQQTTKQIYDDQSLVNV	Белок
125	Вставка	AASKPEFIKPEDVSAEVVEKEYQVQL	Белок
126	Вставка	AKKPLNTEGVMKSRSN	Белок
127	Вставка	SAAAATPAVRTVPQYKYAAGVRNPQQH LNAQPQVTMQQPAVHVQGQEPL	Белок
128	Вставка	TVHFESFGATNTNARENTPF	Белок
129	Вставка	ENPGVTQLNRLAAHPPFAS	Белок
130	Вставка	VKMVRVQAIEKNRYRA	Белок
131	Вставка	VREALLRQRAFRELPG	Белок
132	Вставка	IRPRAIGGSKPRVA	Белок
133	Вставка	DETYVPKEFNAETF	Белок
134	Вставка	WQYTAATATPTIGHV	Белок
135	Вставка	ARKLLSPEVAND	Белок
136	Вставка	VQTPGHANQSMMPQFIMPANNQFSAQ	Белок

SEQ ID NO.	Объект	Мутации	Тип
137	Вставка	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	Белок
138	Вставка	GGGGSGGGGSGGGGS	Белок
139	Вставка	APAPAPAPAPAPAP	Белок
140	Вставка	PSTEQSAKKVRKKAEN	Белок
141	Вставка	PSPSTEQSKVRKKAEN	Белок
142	Вставка	PSPSTEQSAKKVR	Белок
143	Вставка	TKLPEAQQRVGGCFLNLMQMKTLYLTYCANHPSAVNVL	Белок
144	Вставка	GNVPELPDTTEHSRTDL	Белок
145	Вставка	TARKGKGAFcNGQKLQV	Белок
146	Вставка	PSDNVDAQLYNGFFSDAD	Белок
147	Вставка	AMSLYLAGeISLLILDEPT	Белок
148	Вставка	GCAWYELMPAETTVRLRA	Белок
149	Вставка	LSLEVAEEIARLEAEV	Белок
150	Вставка	ASSYTAPQPGLG	Белок
151	Вставка	IPVPTRDLEKPF	Белок
152	Вставка	VIGYMPIPVGVA	Белок
153	Вставка	RGRWMARLARM	Белок
154	Вставка	FLMKLINRPII	Белок
155	Вставка	LSPDEAP	Белок
156	Вставка	VEPPDL	Белок
157	Вставка	FITPII	Белок
158	Вставка	LRKMRTGKP	Белок
159	Вставка	SNSTMKKHGR	Белок
160	Вставка	YLSITFL	Белок
161	Вставка	AAAEKNVPLY	Белок
162	Вставка	SEFEDPLV	Белок
163	Вставка	KRSPW	Белок
164	Вставка	NASCT	Белок
165	Вставка	IQRKK	Белок
166	Вставка	EDSGF	Белок
167	Вставка	FVGVL	Белок
168	Вставка	GGGGSGGGGS	Белок
169	Вставка	GGGGS	Белок
170	Вставка	PAPAP	Белок
171	Вставка	PSPSTEVRKKAEN	Белок
172	Вставка	PSPSTKKAEN	Белок
173	Вставка	PEN	Белок

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, то все научные и технические термины, которые
5 используются в описании, фигурах и формуле изобретения, имеют свое обычное

значение, обычно понятное для специалиста в данной области техники. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие положения, упомянутые в настоящей заявке, полностью введены в нее путем ссылки. Если два или более документов, включенных путем ссылки, содержат противоречивое и/или
5
непоследовательное раскрытие информации по отношению друг к другу, тогда документ, имеющий более позднюю дату вступления в силу, имеет преимущественную силу. Материалы, методы и примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения. Если не
10
указано иное, то следующие термины, которые используются в настоящей заявке, включая описание и формулу изобретения, имеют определения, приведенные ниже.

Термины «содержащий», «включающий», «состоящий из», «имеющий» и т.д. следует читать расширенно или неисчерпывающим образом и без ограничений. Формы единственного числа включают также ссылку на
15
множество, если контекст четко не указывает на другое. Если не указано иное, то термин **«по крайней мере»**, предшествующий серии элементов, следует понимать как обозначение каждого элемента серии. Термины **«по крайней мере, один»** и **«по крайней мере, один из»** включают, например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более элементов.

20
Кроме того, понятно, что незначительные вариации выше и ниже указанного диапазона могут быть использованы для достижения фактически тех же результатов, что и значения в пределах диапазона. Также, если не указано иное, то раскрытие диапазонов предполагается как непрерывный диапазон, включающий каждое значение между минимальным и максимальным
25
значениями.

Если белковые или аминокислотные последовательности предоставляются в заявке, специалист в данной области техники также понимает, что одна или несколько аминокислот могут быть заменены аминокислотами с подобными свойствами для достижения по существу того же эффекта, то есть
30
эквивалентного результата. Специалисту в данной области техники известно, что определенный белок или аминокислотная последовательность может быть закодирована различными последовательностями нуклеиновых кислот. Для данной аминокислотной последовательности, как определено в настоящем документе, каждая из перечисленных последовательностей нуклеиновых кислот,

кодирующих конкретную аминокислотную последовательность, должна считаться раскрытой в настоящем документе. Кроме того, если последовательности нуклеиновых кислот представлены в заявке, то также понятно, что могут быть введены молчащие мутации.

5 Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются в настоящей заявке как взаимозаменяемые и относятся к соединению, которое содержит, по крайней мере, два аминокислотных остатка, ковалентно связанные, по крайней мере, одной пептидной связью. Нет ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут входить в последовательность пептида. «Пептид»
10 может включать, но без ограничения такими, как модифицированные аминокислоты, неприродные аминокислоты и/или D-аминокислоты. Если не указано иное, то конкретная пептидная последовательность также включает варианты, в которых, по крайней мере, одна аминокислота была заменена аминокислотой, которая характеризуется подобными структурными свойствами.
15 «Пептид» может быть природным пептидом, рекомбинантным пептидом, синтетическим пептидом или их комбинацией. Пептид может быть, например, биологически активным фрагментом, олигопептидом, гомодимером, гетеродимером, вариантом пептида, модифицированным пептидом, производным пептида, аналогом пептида, слитым белком и т.п.

20 Термин «аминокислота» или «аминокислотный остаток» («aa»), как он используется в данной заявке, обычно относится к природной аминокислоте, но может также относиться к неприродной аминокислоте. Термин, как правило, относится к L-аминокислотам, но также может охватывать D-аминокислоты. Аминокислота может или не может быть модифицирована, как описано в
25 настоящей заявке. Однобуквенный код используется в данной заявке для обозначения соответствующей аминокислоты. Как используется в настоящем описании, «заряженная аминокислота» означает аминокислоту, которая заряжена отрицательно или положительно. «Отрицательно заряженные аминокислоты» - это аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E).
30 «Положительно заряженные аминокислоты» – это аргинин (R), лизин (K) и гистидин (H). «Полярные аминокислоты» – это все аминокислоты, которые образуют водородные связи как доноры или акцепторы. Это все заряженные аминокислоты и аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y) и цистеин (C). «Полярными незаряженными» аминокислотами являются

аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y) и цистеин (C). **«Амфифатические аминокислоты»** – это триптофан (W), тирозин (Y) и метионин (M). **«Ароматические аминокислоты»** – это фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W). **«Гидрофобными аминокислотами»** являются глицин (G), аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), метионин (M) и цистеин. **«Малые аминокислоты»** представляют собой глицин (G), аланин (A), серин (S), пролин (P), треонин (T), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагин (N).

Две аминокислоты **«характеризуются подобными структурными свойствами»**, если (а) обе являются заряженными аминокислотами, предпочтительно обе являются отрицательно заряженными аминокислотами или обе являются положительно заряженными аминокислотами, (б) обе являются полярными аминокислотами, (в) обе являются полярными незаряженными аминокислотами, (г) обе являются амфифатическими аминокислотами, (д) обе являются ароматическими аминокислотами, (е) обе являются гидрофобными аминокислотами, или (ж) обе являются малыми аминокислотами. Как будет понятно специалисту в данной области, когда аминокислотная последовательность обеспечивается в описании, аминокислоты, характеризующиеся подобными структурными свойствами, могут быть заменены друг на друга для достижения по существу такого же или эквивалентного результата.

Термины **«цитохром P450 BM3 монооксигеназа»**, **«цитохром P450-BM3»**, **«P450-BM3»** (также **BM3**, **BM-3**) относятся к ферменту цитохрому P450, полученному из *Bacillus megaterium*, который катализирует гидроксирование амидов, а также эпоксидирование ненасыщенных жирных кислот. Не желая быть связанным с теорией, можно сказать, что P450-BM3 естественно экспрессируется штаммами *Bacillus megaterium* ATCC 14581, DSM 32, JCM 2506, NBRC 15308, NCIMB 9376, NCTC 1034. Альтернативное название включает название цитохром P450/NADPH-P450 редуктаза. Белок P450-BM3 кодируется геном sup102A1. Указанная последовательность доступна через идентификатор UniProt P14779 (CPXB_BACMB). Для разных штаммов могут существовать разные изоформы и варианты, и все они охватываются этим термином. Если конкретную мутацию можно заменить без изменения описанных каталитических свойств исходной последовательности, то понятно, что последовательность,

имеющая такую функционально молчащую мутацию, эквивалентна исходной последовательности. Кроме того, белок может подвергаться различным модификациям, например синтетическим или естественным модификациям.

5 Ген, который кодирует цитохром P450 монооксигеназу (P450-ВМЗ) из *Bacillus megaterium*, сначала был амплифицирован из геномной ДНК с помощью ПЦР и затем был клонирован с помощью эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *SacI* в полилинкерную последовательность плазмиды pETM-1 ВМЗ (Kille, 2010). Эта процедура добавляет гексагистидиновую метку и последовательность линкера, состоящую из 18 аминокислот к N-концу полученного белка, но это не является
10 необходимым для функционирования. Введение сайта *NcoI* на 5'-конце последовательности гена приводило к изменению второго кодона гена P450-ВМЗ и к аминокислотному обмену в полученном белке (Т1А).

Положение аминокислоты обычно указывается путем указания соответствующего положения в соответствии с аминокислотой дикого типа при
15 использовании однобуквенного кода (например, V78, где дикий тип имеет валин в положении 78). Список разделенных запятыми букв в квадратных скобках определяет мутацию или аминокислотный обмен. Например, если в положении 78 варианта дикого типа валин заменен любым из изолейцина, лейцина или метионина, или он вообще не мутирован, это сокращенно обозначается как V78
20 [I, L, M, V].

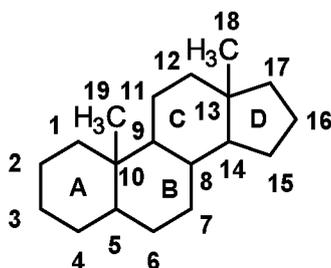
В настоящей заявке **подсчет положений аминокислот** в аминокислотной последовательности P450-ВМЗ начинается с первой аминокислоты, которая
25 появляется в последовательности белка, лежащего в основе кристаллической структуры варианта P450-ВМЗ (PDB ID: 2UWH), который использовался для конструирования белковых библиотек. Это также обычная практика в литературе, связанной с P450-ВМЗ, смотри (Kille, 2010), (Kille Sabrina, 2011), (Acevedo-Rocha, 2018). N-терминальный метионин игнорируется, поэтому
30 подсчет начинается с треонина 1, который был превращен в аланин в процессе клонирования pETM11-ВМЗ и представляет собой кодон 28 в соответствии с SEQ ID, приведенными в настоящей заявке.

Термин «**вариант P450-ВМЗ**» относится к P450-ВМЗ, который содержит, по крайней мере, одну мутацию по сравнению с последовательностью дикого типа. В частности, термин относится к белкам, имеющим, по крайней мере, 60%, 70%, 80% или 90% идентичности последовательности с P450-ВМЗ дикого типа

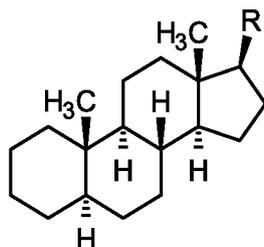
(SEQ ID No. 1). Предпочтительно варианты P450-ВМЗ являются функциональными, то есть каталитически активными, по крайней мере, в отношении одного субстрата. Если указаны мутации варианта, то эти мутации являются ограничительными, т.е. для ВМЗ-268 варианта; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), который имеет до шести мутаций, требуется наличие мутаций M177Y и A184Y.

«Дочерний вариант» «исходного варианта» представляет собой вариант, имеющий последовательность своего родительского варианта и, по крайней мере, одну дополнительную мутацию. Дочерний вариант может иметь множество родительских вариантов.

В соответствии с определением IUPAC, «стероиды» - это природные соединения и синтетические аналоги, которые основаны на углеродном скелете циклопента[а]фенантрена и могут быть частично или полностью гидрогенизированы. Обычно, но не обязательно, в С-10 и С-13 содержатся метильные группы, а в С-17 часто, но не обязательно, имеется алкильная группа. В соответствии с этим могут происходить или не происходить один или более разрывов связей, расширений колец и/или сужений колец скелета (IUPAC без даты). В данной заявке стероиды пронумерованы, а кольца обозначены буквами, как в следующей формуле:



Когда кольца стероида обозначаются как проекции на плоскость бумаги, то формула обычно должна быть ориентирована так, как это приведено в следующей формуле:



Атом или группа, которая присоединена к кольцу, изображенному в этой ориентации, называется **«альфа»**, если она лежит под плоскостью бумаги, или **«бета»**, если она лежит над плоскостью бумаги. Примеры стероидов включают андрогены, эстрогены и гестагены, кортикостероиды, глюкокортикоиды, минералокортикоиды, холестерин, эстрадиол, тестостерон, дексаметазон, ланостерол, прогестерон, медрогестон, β -ситостерол.

Термин **производное стероида** относится к молекулам, которые получены из стероида, то есть молекулам, которые содержат углеродный скелет циклопента[а]фенантрена.

Термин **«С19-гидроксилирование»** относится к введению гидроксильной группы (-ОН) в стероид или производное стероида в положении С19.

«Селективность» процесса биотрансформации или фермента можно определить на основе коэффициента селективности или соотношения целевого продукта. Другие способы определения селективности являются известным специалистам в данной области техники. В случае сомнений, коэффициент селективности, как определено в данной заявке, имеет преимущество.

«Коэффициент селективности» реакции является показателем селективности реакции и рассчитывается путем деления измеренной концентрации продукта на потребленную концентрацию субстрата (который представляет собой разницу между начальной концентрацией субстрата и измеренной концентрацией субстрата после процесса биотрансформации). Концентрацию продукта и субстрата можно измерить способами, которые известны в данной области техники, и как описано в примерах. Обычные методы включают анализ ВЭЖХ при использовании стандартов субстрата и продукта в качестве эталонных и количественного определения. Если не указано иное, то коэффициент селективности для С19-гидроксилирования, по крайней мере, одного стероида или его производного рассчитывается на основе стероида или его производного (для концентрации потребленного субстрата) и С19-гидроксилированного стероида или его производного (для концентрации продукта). Если С19-гидроксилированный стероид далее превращается во вторичный продукт, то коэффициент селективности также может быть рассчитан в отношении коммерчески релевантного продукта.

«Соотношение целевого продукта» (СЦП) реакции рассчитывается как интегральная площадь (на хроматограмме ВЭЖХ) для желаемого продукта,

разделенная на сумму всех интегрированных площадей для продуктов. Продукт может быть C19-гидроксилированным стероидом. Если C19-гидроксилированный стероид далее превращается во вторичный продукт, то соотношение целевого продукта также может быть рассчитано относительно коммерчески релевантного продукта. Например, при превращении из АДД в продукт эстрон площадь под кривой для эстрогена была разделена на площадь под кривой для всех других продуктов (т.е. не для полученного продукта АДД). В случае сомнений, делается ссылка на различные примеры, описанные в настоящем описании.

10 **«Выход продукта»** рассчитывается путем деления измеренной концентрации продукта на начальную концентрацию субстрата в эксперименте. Таким образом, выход продукта для данного варианта P450-ВМ3 специфичен для данного субстрата и данного продукта. Например, субстратом может быть стероид, а продуктом может быть C19-гидроксилированный стероид. Если C19-гидроксилированный стероид далее превращается во вторичный продукт, то выход продукта также может быть рассчитан относительно коммерчески релевантного продукта.

15 **«Титр продукта»** представлен в мг/л, он представляет собой альтернативный показатель для описания достигнутого выхода продукта биотрансформации. Если в данном документе не указано иное, то титр продукта определяется в стандартных условиях, как описано в Примере 2.

20 Термин **«нуклеиновая кислота»** относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам, состоящим из мономеров (нуклеотидов), содержащих сахар, фосфат и основание, которое представляет собой либо пурин, либо пиримидин. К примеру, и без ограничения, нуклеиновые кислоты могут встречаться в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если нет специальных ограничений, то этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, подобными таковым для эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются подобно природным нуклеотидам. Если не 25 30 указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные ей последовательности, а также четко указанную последовательность. В частности, вырожденные замены

кодонов могут быть достигнуты путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer и др., (1991); Ohtsuka и др., (1985); Rossolini и др., (1994)).

5 **«Идентичность последовательности», «процент идентичности»** или **«процент (%) идентичности последовательности»** описывает, насколько последовательность в соответствии с запросом похожа на целевую последовательность, в частности, сколько символов в каждой последовательности являются идентичными после выравнивания. Идентичность последовательности можно рассчитать с помощью BLAST (основное средство поиска на локальное подобие, NCBI), которое выполняет сравнение между парами последовательностей, отыскивая участки локального подобия. Соответствующие методы выравнивания известны в данной области техники, например, алгоритм Нидлмена-Вунша для глобального выравнивания при использовании матрицы BLOSUM62 со штрафом за открытие разрыва 11 и штрафом за расширение разрыва 1.

15 **«Клетка-хозяин»** - это клетка, которая используется для получения, поддержания, воспроизведения и амплификации вектора. Клетка-хозяин также может использоваться для экспрессии кодируемого вектором полипептида. Нуклеиновая кислота, которая содержится в векторе реплицируется, когда клетка-хозяин подвергается делению, тем самым амплифицируя нуклеиновые кислоты.

20 Термин **«система экспрессии»** относится к любой системе производства белка, известной в данной области техники и пригодной для производства вариантов P450-ВМЗ в соответствии с настоящим изобретением. Подходящие системы экспрессии хорошо известны в данной области техники, и примеры систем включают штаммы *E. coli*, такие как DH5alpha, BL21 (DE3) или Rosetta (DE3), а также различные другие бактериальные и небактериальные системы. Подходящие системы экспрессии включают грамположительные бактерии, такие как *Bacillus* или *Rhodococcus*, такие как *Bacillus megaterium* или *Bacillus subtilis*.

30 Термин **«вектор»**, который используется в настоящей заявке, известен в данной области техники и касается молекулы нуклеиновой кислоты, способной к размножению молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин дополнительно включает плазмиды (невирусные) и вирусные векторы.

ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предлагается вариант цитохрома P450 BM3 монооксигеназы (BM3) для катализации C19-гидроксилирования стероида или производного стероида.

5 В соответствии с первым вариантом осуществления первого аспекта вариант BM3 содержит мутацию F87A и, по крайней мере, одну и предпочтительно две дополнительные мутации, выбранные из

(I) мутации в положении V78, предпочтительно V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L, и

10 (II) мутации в положении A82, предпочтительно A82E, A82Q или A82P.

Такие BM3 могут или не могут включать в себя дополнительные мутации.

Например, мутация в соответствии с (I) может быть V78F, а мутация в соответствии с (II) может представлять собой A82E, A82Q или A82P. Например, мутация в соответствии с (I) может быть V78Y, а мутация в соответствии с (II) может быть A82E, A82Q или A82P. Например, мутация в соответствии с (I) может быть V78M, а мутация в соответствии с (II) может быть A82E, A82Q или A82P. Например, мутация в соответствии с (I) может быть V78I, а мутация в соответствии с (II) может быть A82E, A82Q или A82P. Например, мутация в соответствии с (I) может быть V78L, а мутация в соответствии с (II) может быть A82E, A82Q или A82P. Например, мутация в соответствии с (II) может быть A82E, а мутация в соответствии с (I) может быть V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L. Например, мутация в соответствии с (II) может быть A82Q, а мутация в соответствии с (I) может быть V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L. Например, мутация в соответствии с (II) может быть A82P, а мутация в соответствии с (I) может быть V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L.

Дополнительные необязательные мутации могут включать мутацию в положении M177 и/или A184. Например, мутация в положении M177 и/или A184 может представлять собой M177Y и/или A184Y.

Получение вариантов фермента в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнено так, как это известно в данной области техники. Например, мутации можно ввести в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих BM3 дикого типа или варианты BM3, любым способом, пригодным для замены нуклеотидов в последовательностях нуклеиновых кислот. Полезный способ получения мутированной последовательности нуклеиновой кислоты в

соответствии с изобретением и соответствующего белка включает проведение сайт-направленного мутагенеза на кодонах, кодирующих одну или более заранее выбранных аминокислот, изменяя выбранные кодоны таким образом, чтобы они кодировали различные аминокислоты. Методы получения этих сайт-направленных мутаций хорошо известны специалистам и широко описаны в литературе (в частности: (McPherson, 1991)). Коммерчески доступны различные наборы, например, QUIKCHANGE™ lightening набор для мутагенеза от Qiagen или Stratagene.

В соответствии со вторым вариантом воплощения первого аспекта предоставляются варианты, которые могут или не могут быть вариантами в соответствии с первым вариантом воплощения. Варианты P450-BM3 в соответствии со вторым вариантом осуществления включают:

(I) по крайней мере, приведенные мутации:

- а) V78Y, A82E и F87A (BM3-254, SEQ ID No. 2),
- б) V78M, A82E и F87A (BM3-261, SEQ ID No. 3),
- в) V78I, A82E и F87A (BM3-263, SEQ ID No. 4),
- г) V78L, A82E и F87A (BM3-268, SEQ ID No. 5).
- д) V78Y, A82P и F87A (SEQ ID No. 6),
- е) V78M, A82P и F87A (SEQ ID No. 7),
- ж) V78I, A82P и F87A (SEQ ID No. 8),
- з) V78L, A82P и F87A (SEQ ID No. 9),
- и) V78Y, A82Q и F87A (SEQ ID No. 10),
- й) V78M, A82Q и F87A (SEQ ID No. 11),
- к) V78I, A82Q и F87A (SEQ ID No. 12), или
- л) V78L, A82Q и F87A (SEQ ID No. 13),

и по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять дополнительных мутаций,

и/или

(II) по крайней мере, следующие мутации:

- а) V78F, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 14),
- б) V78L, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 15),
- в) V78I, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 16),
- г) V78M, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 17),
- д) V78Y, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 18),

- е) V78F, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 19),
ж) V78L, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 20),
з) V78I, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 21),
и) V78M, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 22),
5 й) V78Y, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 23),
к) V78F, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 24),
л) V78L, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 25),
м) V78I, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 26),
н) V78M, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 27),
10 о) V78Y, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 28),
п) V78L, A82E, F87A, S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y и L188F (SEQ
ID No. 117),
р) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y и A184Y (SEQ
ID No. 118), или
15 с) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S,
I458G и A477N (SEQ ID No. 119).

В некоторых весьма предпочтительных из этих вторых воплощений P450-
BM3 вариант включает S72G. В некоторых весьма предпочтительных из этих
вторых воплощений P450-BM3 вариант включает T146F. В некоторых весьма
20 предпочтительных из этих вторых воплощений вариант P450-BM3 включает
M177Y. В некоторых весьма предпочтительных из этих вторых воплощений
P450-BM3 вариант включает V178W. В некоторых весьма предпочтительных из
этих вторых воплощений P450-BM3 вариант включает V178P. В некоторых
весьма предпочтительных из этих вторых воплощений P450-BM3 вариант
25 включает L181Y. В некоторых весьма предпочтительных из этих вторых
воплощений P450-BM3 вариант включает A184Y. В некоторых весьма
предпочтительных из этих вторых воплощений P450-BM3 вариант включает
L188F. В некоторых весьма предпочтительных из этих вторых воплощений P450-
BM3 вариант включает G457S. В некоторых очень предпочтительных из этих
30 вторых воплощений P450-BM3 вариант включает I458G. В некоторых весьма
предпочтительных из этих вторых воплощений P450-BM3 вариант включает
A477N. За исключением случаев, когда они явно несовместимы друг с другом,
эти весьма предпочтительные варианты осуществления можно объединить.

Варианты ВМЗ в соответствии со вторым воплощением могут или не могут содержать дополнительную(ые) мутацию(и).

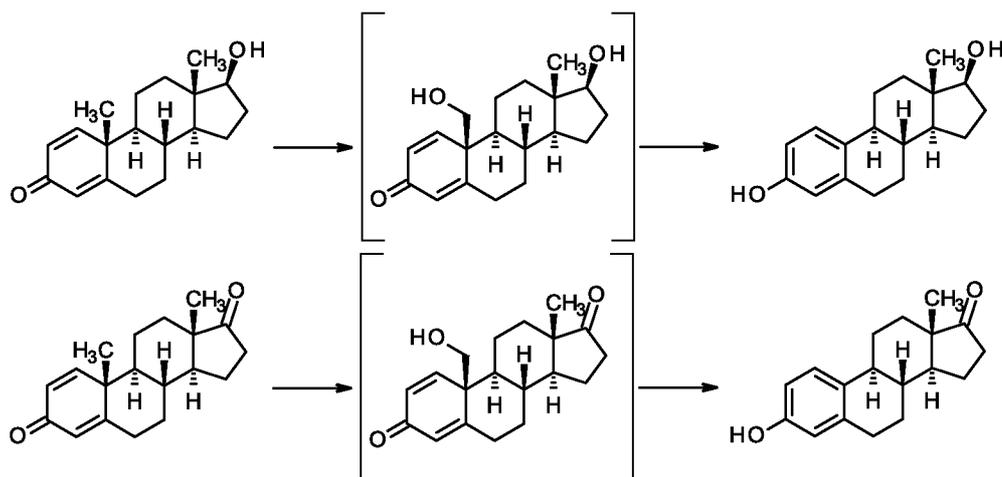
Некоторые предпочтительные варианты в соответствии со вторым воплощением первого аспекта содержат, по крайней мере, одну
5 дополнительную мутацию, предпочтительно, по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или более дополнительных мутаций.

В то время как Р450-ВМЗ дикого типа, а также сотни проверенных вариантов из литературы или созданных *de novo* были неспособны
10 катализировать С19-гидроксилирование стероидов или производных стероидов, варианты в соответствии с первым аспектом данного изобретения неожиданно оказались подходящими катализаторами для эффективного С1-гидроксилирования стероидов или их производных.

Не желая быть ограниченным теорией, описанные варианты в соответствии
15 с рассматриваемым аспектом, в частности, варианты в соответствии с SEQ ID No. 2–28 и 117–119, являются технически связанными, таким образом, что они индуцируют третичную структуру белка, которая позволяет не только осуществлять связывание стероидов, но также их эффективное С19-гидроксилирование без поддержания побочных реакций, таких как другие
20 реакции окисления, например, как указано в настоящей заявке.

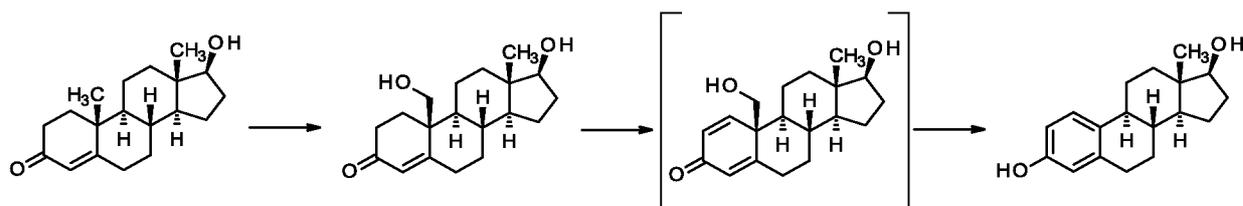
Кратко, варианты Р450-ВМЗ в соответствии с первым аспектом распознают стероиды как субстраты, в частности, стероиды, содержащие 1,4-диен-3-он-А-кольцо, или стероиды, содержащие 4-ен-3-он-А-кольцо. Кроме того, варианты Р450-ВМЗ в соответствии с первым аспектом могут катализировать С19-
25 гидроксилирование этих стероидов.

Не желая быть ограниченным теорией, для стероидов с **1,4-диен-3-он-А-кольцом**, например, (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-она (синонимы: 1-дегидротестостерон, Δ 1-тестостерон, болденон) или андроста-1,4-диен-3,17-диона (синоним: АДД), С19-гидроксилирование, как полагают, приводит к
30 образованию нестабильного промежуточного продукта, который подвергается немедленной ароматизации и образованию эстрадиола или эстрона и их производных.



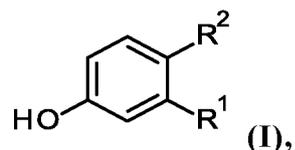
Пример 8 Таблица E2 показывает полученные скрининговые выходы эстрадиола при использовании дельта-1-тестостерона в качестве субстрата для вариантов P450-BM3 BM3-254 (SEQ ID No. 2), BM3-261 (SEQ ID No. 3), BM3 ID No. 4) и BM3-268 (SEQ ID No. 5).

Не желая быть ограниченным теорией, можно сказать, что для стероидов с 4-ен-3-он-А-кольцом, например (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-она (синоним: тестостерон), продукт C1-гидроксилирования обычно является стабильным и может быть изолирован. Такие продукты могут затем путем дальнейшей функционализации во время дегидрогенизации образовывать тот же нестабильный промежуточный продукт, а затем во время ароматизации эстрадиол и производные эстрадиола (как показано для подобных производных эстрона (F. Templeton, 1997)).

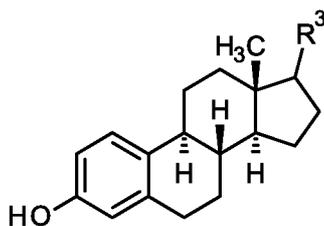


Пример 9, Таблица E5 показывает полученные результаты скрининга для C19-гидроксилированных продуктов на основе тестостерона в качестве субстрата для вариантов P450-BM3 BM3-254 (SEQ ID No. 2), BM3-261 (SEQ ID No. 3), BM3-263 (SEQ ID No. 4) и BM3-268 (SEQ ID No. 5).

Как следствие, описанные варианты P450-BM3 являются подходящими катализаторами для C19-гидроксилирования стероидов, что позволяет получать соединения формулы (I).



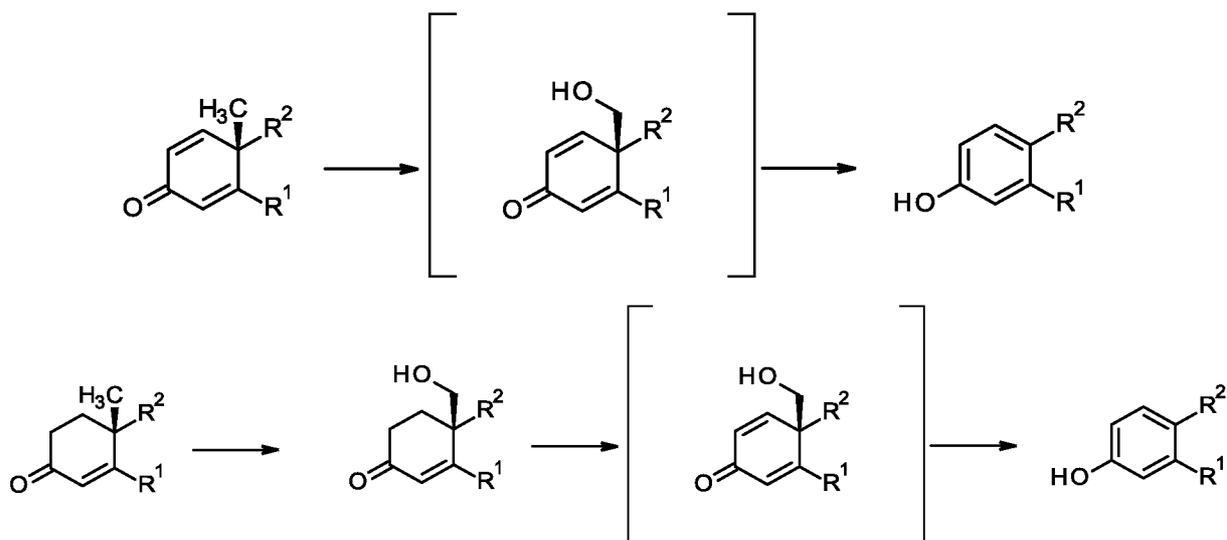
где R^1 и R^2 образуют шестичленное кольцо в составе стероида. Кроме того, описанные варианты Р450-ВМЗ в соответствии с первым аспектом являются подходящими катализаторами для С19-гидроксилирования стероидов, что позволяет получать соединения формулы (II).

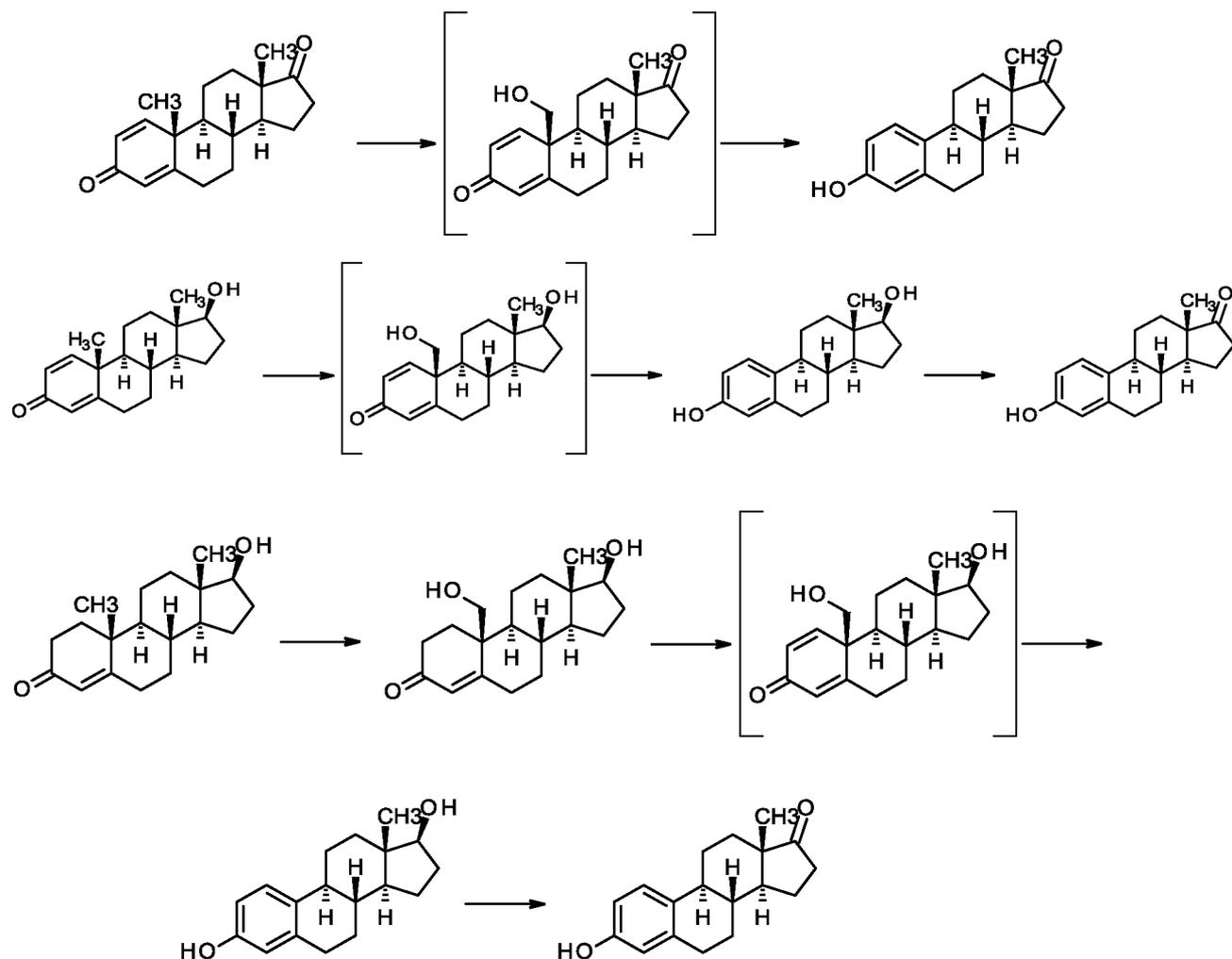


где R^3 представляет собой бета-гидрокси группу(-ОН) или оксо группу (=О).

В соответствии с некоторыми весьма предпочтительными вариантами осуществления варианты Р450-ВМЗ в соответствии с первым аспектом катализируют С19-гидроксилирование стероидов для получения соединений формулы (I), где формула (I) является предпочтительно формулой (II).

Не связываясь с теорией, можно сказать, что используя варианты Р450-ВМЗ в качестве катализаторов, соединения формулы (I) и (II) могут быть синтезированы следующими способами:





Эстрадиол и производные эстрадиола могут быть окислены до эстрона и производных эстрона, например, как описано (Kawahara R, 2012).

5 В соответствии с третьим воплощением первого аспекта существуют варианты, характеризующиеся выходом продукта для, по крайней мере, одного C19-гидроксилированного стероида или его производного, или его вторичного продукта, который выше на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 10 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 92, 93, 94 или 95%.

15 Например, указанный выход продукта для, по крайней мере, одного C19-гидроксилированного стероида или его производного или его вторичного продукта может быть > 5%, предпочтительно > 8%, > 10%, или > 12%, даже более предпочтительно > 15%, > 20%, > 25%, > 30%, > 35%, > 40%, > 45%, или > 50%, предпочтительно > 55%, > 60%, > 65%, > 70% или > 75%. Например,

указанный выход продукта может представлять собой выход продукта эстрадиола или эстрогена или их производных. Например, указанный стероид или производное стероида может быть стероидом или производным стероида, который содержит 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо, таким, как d1-тестостерон или АДД .

Третий вариант осуществления в соответствии с первым аспектом может быть предложен для объединения с каждым вариантом осуществления или примером в соответствии с первым аспектом и, в частности, первым, вторым, четвертым, пятым или шестым вариантом осуществления первого аспекта.

Например, обеспечивается вариант ВМЗ, который содержит мутацию F87A и, по крайней мере, одну, и предпочтительно две дополнительные мутации, выбранные из

(I) мутации в положении V78, предпочтительно V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L, и

(II) мутации в положении A82, предпочтительно A82E, A82Q или A82P, и необязательно включает дополнительные мутации, например, как указано в настоящей заявке, при этом указанный вариант ВМЗ имеет выход продукта, по крайней мере, для одного C19-гидроксилированного стероида или его производного, или его вторичного продукта > 5%, предпочтительно > 8%, > 10 %, или > 12%, даже более предпочтительно > 15%, >20%, >25%, > 30%, >35%, > 40%, > 45%, или > 50%, предпочтительно > 55%, > 60 %, >65%, >70% или >75%.

Например, вариант ВМЗ может включать мутацию M177Y и/или A184Y.

Например, обеспечивается ВМЗ вариант, который включает:

(I) по крайней мере, мутации;

- а) V78Y, A82E и F87A (ВМЗ-254, SEQ ID No. 2),
- б) V78M, A82E и F87A (ВМЗ-261, SEQ ID No. 3),
- в) V78I, A82E и F87A (ВМЗ-263, SEQ ID No. 4),
- г) V78L, A82E и F87A (ВМЗ-268, SEQ ID No. 5),
- д) V78Y, A82P и F87A (SEQ ID No. 6),
- е) V78M, A82P и F87A (SEQ ID No. 7),
- ж) V78I, A82P и F87A (SEQ ID No. 8),
- з) V78L, A82P и F87A (SEQ ID No. 9),
- и) V78Y, A82Q и F87A (SEQ ID No. 10),
- й) V78M, A82Q и F87A (SEQ ID No. 11),

к) V78I, A82Q и F87A (SEQ ID No. 12), или

л) V78L, A82Q и F87A (SEQ ID No. 13),

и по крайней мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять дополнительных мутаций,

5 и/или

(II) по крайней мере мутации:

а) V78F, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 14),

б) V78L, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 15),

в) V78I, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 16),

10 г) V78M, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 17),

д) V78Y, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 18),

е) V78F, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 19),

ж) V78L, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 20),

з) V78I, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 21),

15 и) V78M, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 22),

й) V78Y, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 23),

к) V78F, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 24),

л) V78L, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 25),

м) V78I, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 26),

20 н) V78M, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 27),

о) V78Y, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 28),

п) V78L, A82E, F87A, S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y и L188F (SEQ ID No. 117),

25 р) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y и A184Y (SEQ ID No. 118), или

с) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G и A477N (SEQ ID No. 119),

Указанный вариант ВМЗ имеет выход продукта, по крайней мере, одного C19-гидроксилированного стероида или его производного, или его вторичного
30 продукта > 5%, преимущественно > 8%, > 10%, или > 12%, навѣть бѣльш преимущественно > 15%, >20%, >25 %, > 30%, >35%, > 40%, > 45%, или > 50%, преимущественно > 55%, > 60%, > 65%, > 70% или > 75%.

Таблица А1 показывает выход продукта эстрадиола при превращении d1-тестостерона в эстрадиол при использовании 50 мг/л субстрата для вариантов,

полученных из исходного типа V78L, A82E, F87A (SEQ ID No. 5), который включает дополнительные мутации, как показано ниже.

Мутация	Выход эстрадиола [%]						
A74I	52,8	V178M	10,9	L181I	7,7	M177G	6,0
A74V	42,2	A184Q	10,8	A399Q	7,7	M118K	6,0
S72G, A74V	40,2	A321G	10,7	R50D	7,7	L29Y	6,0
F77A	38,3	P392Q	10,5	M177A	7,6	A399L	6,0
A184G	37,4	A399E	10,5	S72C, A74C	7,6	M177I	6,0
M177Y	36,5	M177F	10,4	S89V	7,6	T49H	6,0
V178P	36,3	T365I	10,3	R50S	7,5	R47C	6,0
A184Y	34,2	L75V, F81L	10,3	V371A	7,5	I401V	5,9
A74T	33,3	F77P	10,2	E143I	7,5	T146A	5,9
A184R	31,5	V314P	10,2	T49Q	7,5	S176L	5,9
R50S, A74V	30,7	S72G, A74Y	10,2	T365G	7,5	S72G, A74F	5,9
S72G, A74I	30,2	S89E	10,1	F77M	7,5	K224W	5,9
A74C	29,2	M118E	10,0	T146D	7,5	E267T	5,9
M185V	29,1	T146R	10,0	R47H	7,4	M185D	5,8
L188K	27,0	V26I	9,9	R255K	7,4	Y51L	5,8
A330R	26,3	E64Q	9,9	E143V	7,4	M118S	5,8
K224P	26,0	W90Y	9,7	V314F	7,3	M118T	5,8
V48H	25,9	L29T	9,6	A330F	7,3	A399G	5,8
V26N	25,9	T327V	9,6	Y51W	7,3	A330C	5,8
A184E	24,9	F81W	9,6	M118A	7,3	K224Y	5,8
F77V	24,8	H266N	9,6	T49D	7,3	S89G	5,7
A184W	24,7	A184F	9,6	E267D	7,2	S72N, A74I	5,7
A74M	24,2	V48S	9,5	F261Y	7,2	S72C, A74L	5,7
F77S	24,1	M177T	9,5	T365L	7,2	E143Q	5,7
A74L	23,8	G85A	9,5	W90D	7,2	R47D	5,7
V26H	23,5	M118Y	9,5	L29M	7,2	A264V	5,6
F77L	23,0	L437I	9,5	L75I	7,2	R47M	5,6
A184D	22,3	R50Y	9,4	V26A	7,2	N70R	5,6
M177V	21,9	M118W	9,4	T49W	7,2	I401M	5,6
F77T	20,5	A74R, L75V	9,3	R50P	7,2	F393W	5,6
T146F	20,3	E64V	9,3	L29V	7,2	A74D, F81V	5,6
V178W	20,0	A321N	9,2	R47T	7,1	G415D	5,6

Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]
L188R	19,7	M118L	9,2	S72N, A74C	7,1	L75I, F81I	5,6
A74F	19,7	L188A	9,2	V48Y	7,1	T49G	5,6
F77K	19,7	T365W	9,2	T146C	7,1	S89N	5,5
L188N	19,5	T49C	9,2	E143M	7,1	E64A	5,5
T49R	19,4	I263L	9,1	V48F	7,0	E143G	5,5
S89T	19,4	T146M	9,1	R255P	7,0	A330N	5,5
L188W	19,1	T49A	9,1	R50I	7,0	H266E	5,5
A74W	19,0	V48T	9,0	H266A	7,0	R50F	5,5
V178Y	19,0	M118P	8,9	M118V	7,0	F77G	5,4
A74Y	18,9	V314E	8,9	L29A	7,0	R47E	5,4
M177C	18,8	M177L	8,8	E143K	7,0	R255A	5,4
A184K	18,4	F77Y	8,8	E64Y	6,9	A74V, L75V	5,4
A184N	18,2	R50G	8,8	L29I	6,9	L78M	5,4
H266S	18,1	R47L	8,8	F77D	6,9	T146N	5,3
S89C	18,1	R50N	8,7	T49F	6,8	F261V	5,3
L188F	17,9	F77H	8,7	S89I	6,8	K224L	5,3
V178Q	17,6	E143F	8,7	F81Y	6,8	I401A	5,3
S176P	17,5	F261I	8,7	V48R	6,8	R47W	5,3
F77E	17,2	V178R	8,7	R255N	6,8	T365D	5,3
L188I	17,0	A184L	8,7	V178N	6,8	N70F	5,2
S72W	16,9	A74R	8,6	S72N, A74V	6,8	N70C	5,2
S72G, A74C	16,9	T49L	8,6	E267R	6,7	S176N	5,2
A399V	16,8	P392G	8,6	E143P	6,7	L86V	5,2
L181Y	16,4	F77N	8,6	L75V	6,7	E143N	5,2
S176G	15,8	F261M	8,6	R50C	6,6	V48M	5,2
L181P	15,8	S89Q	8,6	T438V	6,6	K224M	5,1
S176M	15,4	T365Q	8,6	V48L	6,6	A321T	5,1
G415A	15,4	E143C	8,6	R47A	6,6	A321E	5,1
F77W	15,2	F77I	8,5	E143A	6,6	E64L	5,1
T49V	15,2	M177H	8,5	A330T	6,5	G85S	5,1
M118G	15,2	V26M	8,5	V48I	6,5	T146V	5,1
A330K	14,9	V178S	8,5	L75V, F81Y	6,5	L75I, F81L	5,1
K224H	14,9	V314A	8,5	L86M	6,5	M177E	5,1
S72G, A74L	14,8	I263K	8,5	S176K	6,5	M118N	5,1
A184H	14,7	V178L	8,5	S72H, A74C	6,5	I401T	5,0
M177Q	14,6	T49N	8,4	A321I	6,5		

Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]
A330W	14,5	A330V	8,4	L29Q	6,4		
L188H	14,2	E143D	8,3	T365K	6,4		
A399I	14,0	F77R	8,3	S176H	6,4		
V178D	14,0	S176F	8,3	M177D	6,4		
T327L	13,7	A399N	8,2	S89L	6,4		
A74H	13,6	G415T	8,2	E344K	6,3		
G415S	13,5	R47Q	8,2	K224C	6,3		
T365V	13,4	E64G	8,1	F81S	6,3		
S176C	13,1	V26K	8,1	L29H	6,3		
V314H	13,0	R50M	8,1	F261C	6,3		
T365Y	12,8	A74P	8,1	W325F	6,3		
S72G, A74S	12,8	S176D	8,1	F393M	6,3		
T365P	12,7	L29C	8,1	E143Y	6,3		
A74S	12,6	A321V	8,1	A321D	6,3		
F77C	12,6	R50V	8,0	K224I	6,2		
L188M	12,5	E143R	8,0	S72G, A74H	6,2		
R50Q	12,5	V314Q	8,0	T365F	6,2		
R255I	12,4	E64H	8,0	V178T	6,2		
V178I	12,4	P392R	8,0	M118H	6,2		
V314S	12,2	L188S	8,0	V26G	6,2		
A399M	12,0	R47K	8,0	F261A	6,2		
A74C, L75V	12,0	I263N	7,9	E344G	6,2		
L188D	11,8	V178K	7,9	S176Q	6,2		
T49P	11,6	V26L	7,9	K224E	6,1		
P392V	11,6	F81L	7,8	A74N	6,1		
L188E	11,5	S72C, A74V	7,8	M177N	6,1		
T49I	11,4	R50L	7,8	V178A	6,1		
A399C	11,4	V371P	7,8	L75I, F81V	6,1		
M118F	11,3	V48W	7,8	R255L	6,1		
E143W	11,1	V48D	7,8	S176E	6,1		
L29F	10,9	L262I	7,7	A330D	6,1		

Таблица А2 показывает выход продукта эстрадиола при превращении $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол при использовании 100 мг/л субстрата для вариантов, полученных из исходного типа V78L, A82E, F87A, M177Y, A184Y (SEQ ID No. 5 15), которые имеют дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]	Мутация	Выход эстрадиола [%]
L150W	65,2	L20R	39,4	F205R	44,0	L20C	33,3
L78M	64,0	T149P	39,3	A330W	43,8	T146V, A191T	33,2
L20W	59,5	F205K	38,8	F205D	43,4	L20Y	32,3
M212F	52,2	W325Y	38,6	F205D, D208N	43,2	L20M	31,4
L20F	52,2	P9S	38,3	L150Y	43,1	T49A	31,3
A330Y	50,1	V26Q	37,0	T327M	42,3	T146A, L272W	30,8
M212Y	48,9	R47S	36,4	L20N	41,9	T49L	30,7
E267D	48,3	L272V	36,1	K210E	41,7	L150F	30,2
L20P	47,5	S89T	35,5	T146A, L150A	41,7	T146L	28,5
M212W	47,1	F205H	35,1	R47W	41,5	L20D	28,2
F205Y	46,8	W325F	34,4	F205E	41,4	L20S	28,1
F205G	46,4	E93G	34,2	F77V	41,2	L20I	27,7
F205W	45,0	T49P	34,0	L20T	40,7	L20V	26,6
T146A, F205G	44,2	E352N	33,5	F205T	39,7	T49I	25,9

Таблица А3 показывает выход продукта эстрадиола, полученного в реакциях биотрансформации из ВМ3-268; варианты M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), которые имеют до шести мутаций. В качестве субстрата использовали 100 мг/л $\Delta 1$ -тестостерона.

5

Мутации	Выход эстрадиола [%]	Мутации	Выход эстрадиола [%]
S72G,A74V,T146F,V178W, L181Y	75,9	T146F,V178W,L188F	49,1
S72G,A74T,T146F,V178W, L181Y,L188R	72,8	A74T,T146F,V178P,L181Y	47,9
S72G,A74V,T146F,V178W, L188R	72,3	S72G,V178W	47,7
S72G,A74T,T146F,V178W, L188R	72,2	V178P	47,0
S72G,A74V,T146F,L181Y, L188R	72,1	T146F,V178W,L188K	46,1
S72G,T146F,V178W, L188F	65,9	S72G,V178W,L181Y	45,8
S72G,A74V,T146F, L181Y	65,8	S72G,A74T,L181Y,L188F	45,1
S72G,V178P, L181Y	64,8	S72G,V178W,L188F	45,0

Мутации	Выход эстрадиола [%]	Мутации	Выход эстрадиола [%]
A74T,T146F,L181Y, L188R	63,9	S72G,L188F	44,9
S72G,A74I,V178P,L181Y	62,6	S72G,A74T,T146F,V178W, L188F	44,7
S72G,A74V,T146F,V178W	61,2	S72G,A74V,T146F,V178P, L181Y,L188R	44,5
A74I,T146F,V178W	61,0	T146F,V178W	43,7
S72G,T146F,V178W,L188R	61,0	S72G	43,6
S72G,A74I,T146F,L181Y,L188K	60,7	S72G,A74T,T146F,L188R	43,1
S72G,T146F,V178W,L181Y, L188F	59,0	S72G,T146F,V178W	42,9
T146F,V178W,L188R	58,9	S72G,A74V,T146F,V178P, L181Y,L188K	41,9
A74V,V178P,L181Y,L188K	58,4	S72G,V178W,L188R	39,9
T146F,L181Y,L188F	58,1	S72G,T146F,L188F	38,8
S72G,V178P,L181Y,L188F	57,6	S72G,A74I,T146F,L181Y, L188F	35,0
V178P,L181Y	56,9	S72G,T146F	34,7
S72G,V178P,L181Y,L188K	56,0	A74V,V178P,L181Y,L188F	34,4
S72G,A74V,T146F,V178P, L181Y	56,0	S72G,A74T,L181Y,L188K	33,7
S72G,V178P,L181Y,L188R	55,8	S72G,A74I,T146F,L181Y,L188R	29,9
S72G,T146F,V178W,L181Y	55,4	A74T,T146F,L188K	29,8
S72G,T146F,V178W,L188K	55,4	S72G,A74V,L188R	29,5
T146F,L181Y	55,3	S72G,A74T,T146F,V178P, L181Y	29,2
S72G,A74T,T146F,L181Y, L188K	54,8	S72G,V178W,L188K	29,1
S72G,A74V,V178P,L181Y, L188K	54,1	S72G,A74I,T146F,L181Y	28,8
S72G,T146F,V178W,L181Y, L188K	53,9	S72G,T146F,V178P,L188R	28,3
A74T,T146F,L181Y,L188K	53,9	S72G,A74T,V178P,L188F	28,2
T146F,V178W,L181Y,L188R	52,6	V178W	28,2
A74V,V178P,L181Y,L188R	52,1	S72G,T146F,L181Y,L188R	26,6
V178P,L181Y,L188R	52,0	A74T,T146F,V178P,L188R	26,2
A74T,T146F,V178W	51,3		

Таблица А4 показывает выход продукта эстрогена при превращения АДД в эстроген при использовании 100 мг/л субстрата для вариантов, полученных из исходного типа ВМЗ-268; М177У, А184У (SEQ ID No. 15), которые имеют дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]
F205Y	24,5	F205K	8,4	L272W	6,3
M212Y	18,9	L150G	8,1	L272F	6,3
L150Y	18,4	F205P	8,0	T146A, L272H	6,1
M212F	17,2	E352I	7,9	E352N	5,8
F205H	15,8	L20F	7,9	T438V	5,8
F205R	15,6	M212T	7,6	E93G	5,7
L20W	15,4	E352V	7,5	T49Q	5,7
F205G	15,2	F81D	7,4	F205S	5,6
L78M	14,0	L20P	7,4	D363G, T438C	5,5
F205W	13,2	F173Y, I174F	6,8	W325Y	5,4
M212W	13,0	T49I	6,7	M212H	5,4
K210E	11,6	T49R	6,7	T438C	5,3
L20Y	11,3	L272Y	6,7	L150W	5,3
T146F	10,7	L20R	6,7	F205I	5,1
L150F	10,5	F205N	6,6	F205V	5,1
S89T	10,0	E352M	6,6	F81Y	5,1
T146A, F205G	9,7	R203C	6,5		
F205D, D208N	9,5	F205D	6,4		

5

Таблица А5 показывает выход продукта эстрогена, который получен в реакциях биотрансформации с производными вариантами на основе SEQ ID No. 15, которые имеют до шести мутаций. В качестве субстрата использовали 100 мг/л АДД.

Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]
S72G,T146F, V178W,L181Y	66,6	S72G,V178P, L181Y,L188R	14,8	S72G,V178W, L188R	7,9
S72G,T146F, V178W,L181Y, L188F	58,4	S72G,V178W, L181Y	14,7	S72G,T146F, V178P,L188F	7,6
S72G,T146F, V178W	55,2	S72G,A74T, T146F,V178P	14,6	S72G,A74I, T146F,L181Y, L188R	7,6

Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]
S72G,T146F, V178W,L188F	53,1	S72G,A74V,V17 8W,L181Y	14,6	S72G,A74V, T146F,V178P, L188R	7,5
S72G,V178P, L181Y	38,1	S72G,A74V, V178P,L188R	14,1	S72G,A74I, T146F,V178P, L188K	7,5
S72G,T146F, L181Y,L188R	37,4	S72G,A74I, T146F,V178P, L181Y	14,0	S72G,T146F, V178P,L181Y, L188F	7,2
S72G,T146F, L181Y,L188F	37,3	S72G,T146F	13,6	A74T,T146F, V178P,L188K	7,0
S72G,A74V,T146F, V178W,L181Y	36,3	S72G,T146F, V178W,L188K	13,5	S72G,A74I,T146 F,V178P,L181Y, L188F	6,9
S72G,T146F, V178W,L188R	33,5	S72G,V178P, L188R	13,2	S72G,A74V,T14 6F,L181Y,L188K	6,9
S72G,A74T,T146F, V178W,L181Y, L188R	30,0	S72G,A74V, L181Y	13,1	S72G,A74I,T146 F,V178P,L188F	6,9
S72G,A74V,T146F, L181Y	29,4	S72G,A74V,T14 6F,V178P, L181Y, L188R	13,0	S72G,L188K	6,8
S72G,T146F, V178P,L181Y	29,0	T146F,L181Y, L188F	12,9	S72G,A74V, V178P,L181Y, L188R	6,6
S72G,A74T, V178P,L181Y	27,6	S72G	12,7	S72G,T146F, L188K	6,6
S72G,A74T, T146F,V178W, L181Y	26,5	S72G,A74T,T14 6F,V178P, L181Y	12,3	S72G,A74I, T146F,L181Y	6,5
S72G,V178P, L181Y,L188F	25,2	S72G,L188F	11,9	S72G,A74V, T146F,V178W, L188R	6,3
T146F,L181Y	25,2	S72G,A74I, V178P,L181Y	11,8	T146F,V178W, L188R	6,2
S72G,A74V,T146F, L181Y,L188F	24,1	S72G,A74T, V178P,L188F	11,7	A74I,T146F, L181Y	6,2
S72G,A74V,V178P, L181Y,L188F	23,1	A74T,T146F, V178P,L181Y	11,5	A74T,T146F, V178W	6,2
S72G,A74T, T146F,V178W, L188F	23,0	S72G,A74V, T146F,V178W	11,3	S72G,A74V, V178P	6,1
S72G,A74T,T146F, V178W,L181Y, L188K	22,7	S72G,T146F, V178P	11,3	T146F,V178W, L188F	6,0
S72G,T146F, L181Y,L188K	21,4	S72G,V178P	11,1	V178P	6,0
S72G,A74V,T146F, V178P,L181Y	20,8	A74I,T146F, V178P	11,0	S72G,A74V, T146F,L188F	5,9

Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]	Мутация(и)	Выход эстрогена [%]
S72G,A74I, T146F,V178W, L181Y	20,7	S72G,V178W, L188F	10,8	S72G,A74I, T146F,V178P, L188R	5,9
S72G,A74V, T146F,L181Y, L188R	20,6	T146F	10,7	S72G,L188R	5,9
S72G,A74T,V178P, L181Y,L188K	20,3	S72G,A74V, T146F,V178P, L188F	10,3	S72G,V178W, L188K	5,8
T146F,V178W, L181Y,L188R	19,6	S72G,V178P, L181Y,L188K	10,0	S72G,A74I, T146F,V178P	5,8
S72G,L181Y, L188R	18,8	S72G,A74V,T14 6F,V178W, L181Y,L188R	10,0	S72G,A74T, T146F,V178P, L188R	5,7
S72G,T146F, V178W,L181Y, L188K	18,8	V178P,L181Y	9,9	S72G,T146F, L188R	5,6
A74T,T146F, V178W,L181Y	18,3	A74T,T146F, L181Y,L188K	9,3	S72G,T146F, L181Y	5,6
S72G,A74T, T146F,L181Y, L188K	18,0	S72G,A74V, V178P,L188F	9,3	T146F,L181Y, L188K	5,4
S72G,L181Y, L188K	18,0	S72G,V178W, L181Y,L188R	9,0	A74I,T146F, V178P,L188R	5,3
S72G,T146F, V178P,L181Y, L188R	17,4	S72G,T146F, V178P,L188R	8,9	S72G,L181Y	5,3
S72G,A74V,T146F, V178P,L181Y, L188K	16,8	A74T,T146F, V178P	8,8	S72G,A74I, T146F,L181Y,L1 88F	5,3
S72G,V178P, L188F	16,5	S72G,A74T, T146F,V178P, L188F	8,7	S72G,A74T, T146F,V178W, L181Y,L188F	5,2
A74I,T146F, V178W,L188R	15,9	S72G,T146F, L188F	8,6	S72G,A74I,T146 F,V178P,L181Y, L188R	5,2
S72G,V178P,L188K	15,3	T146F,V178P, L181Y,L188R	8,5	A74V,T146F, L181Y,L188R	5,1
T146F,V178W, L188K	15,3	T146F,V178W	8,4	T146F,V178P	5,1
S72G,A74T, T146F,V178W, L188R	14,9	S72G,T146F, V178P,L181Y, L188K	8,2		

Таблица А6 показывает титры продукта эстрогена в процессе превращения АДД в эстрон при использовании 2000 мг/л субстрата для вариантов, полученных из исходного типа ВМЗ-268; М177Y, А184Y; S72G, V178P, L181Y,

L188F (SEQ ID No. 117), которые имеют дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация	Титр эстрогена (мг/л)						
R179L	303,62	P172A	95,82	N186E	73,51	H236D	60,79
K440C	210,34	D182I	95,57	Q404F	73,20	A44T	60,30
Q403R	180,62	H236A	95,57	K76C	72,91	A225M	60,06
R179A	178,01	R190S	94,64	G227N	72,90	H92Y	59,91
F173W	169,97	Q73E	93,66	H236P	72,87	G114L	59,70
G240K	169,04	T175N	93,23	R190C	71,96	E140L	59,57
R179V	152,25	R179H	93,07	A44Q	71,48	Q189I	59,51
R190V	148,61	N186Y	92,47	N186Q	71,19	A225S	59,38
K440T	148,43	N186F	91,72	E140D	70,70	D80L	59,34
R179M	147,50	I258C	90,90	G114N	70,12	M5E	59,30
K440N	145,90	I174T	90,35	R190W	69,96	A225N	58,19
R79K	141,47	T269V	89,15	N186D	69,25	Q189N	57,96
D182V	141,05	K76E	88,93	D182M	67,40	M5P	57,88
I258M	139,83	Q73L	88,56	K76N	67,21	Q73S	57,80
T175M	136,11	G240S	86,69	S270A	66,64	D80C	57,66
Q403K	134,74	N186K	85,42	H236M	66,60	D182A	56,31
K187N	127,66	T175Q	82,76	V299L	66,47	Q397R	55,83
H236K	125,70	R190G	82,37	S270D	66,38	D80S	55,82
D182C	125,68	N186H	82,29	H236R	66,18	I258L	55,62
G240R	124,47	G240H	81,19	E337V	65,96	N186V	55,58
A399R	122,05	D182E	81,05	E140K	65,62	K187A	55,20
H236S	121,43	G240N	80,92	S176M	64,58	D80W	54,87
R190M	121,39	N186A	79,82	Q73Y	64,36	G240C	54,73
K76I	119,26	N186L	79,45	Q189V	64,26	E140M	54,62
V299W	119,23	H236C	79,42	E140A	64,05	G114K	54,56
H236I	118,01	T175L	79,26	I174V	63,70	K187R	54,55
R190N	114,74	Q73T	79,25	D182N	63,37	K440M	53,99
A225T	114,35	Q73F	78,92	Q189K	63,12	E183D	53,53
T175G	114,34	K76F	78,76	T175R	63,01	D80M	53,46
N186M	104,02	D182W	78,45	G114W	62,88	E337L	53,35
N186T	103,98	D80T	77,88	G240A	62,81	M5C	53,31
T175F	103,16	Q73W	77,22	S53C	62,05	D182H	52,88
K76V	100,58	S176D	76,43	K76H	61,81	A225Q	52,37
Q404Y	100,03	A225C	75,67	G114C	61,50	I258V	51,53
T175H	98,82	P172D	75,44	H236F	61,26	D80N	48,87
T175Y	98,67	R179P	74,92	Q189E	61,00	G227R	46,02
K187G	98,01	A225Y	74,80	H92F	60,99		
R190K	96,19	P172G	74,43	E140T	60,90		

В соответствии с четвертым воплощением первого аспекта существуют варианты, которые характеризуются коэффициентом селективности для С19-гидроксилирования, по крайней мере, одного стероида или его производного, который выше, чем 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,3, 0,31, 0,32, 0,33, 0,34, 0,35, 0,36, 0,37, 0,38, 0,39, 0,4, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44, 0,45, 0,46, 0,47, 0,48, 0,49, 0,5, 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,6, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, 0,7, 0,71, 0,72, 0,73, 0,74, 0,75, 0,76, 0,77, 0,78, 0,79, 0,8, 0,81, 0,82, 0,83, 0,84, 0,85, 0,86, 0,87, 0,88, 0,89, 0,9, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 или 0,99.

Например, указанный коэффициент селективности для С19-гидроксилирования стероида или производного стероида может быть $> 0,1$, предпочтительно $> 0,2$ или $> 0,3$, даже более предпочтительно $> 0,4$ или $> 0,5$, наиболее предпочтительно $> 0,5$, $> 0,6$, $> 0,7$, $> 0,8$ или $> 0,9$. Например, указанный стероид или производное стероида может быть стероидом или производным стероида, включающим 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо, таким, как d1-тестостерон или АДД.

Четвертый вариант осуществления в соответствии с первым аспектом может быть соединен и предлагается для соединения с каждым вариантом осуществления в соответствии с первым аспектом и, в частности, с первым, вторым, третьим, пятым или шестым вариантом осуществления первого аспекта.

Например, обеспечивается вариант ВМЗ, включающий мутацию F87A и, по крайней мере, одну и предпочтительно две дополнительные мутации, выбранные из:

(I) мутации в положении V78, предпочтительно V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L, и

(II) мутации в положении A82, предпочтительно A82E, A82Q или A82P, и необязательно включает дополнительные мутации, например такие, как описано в данной заявке, где указанный вариант ВМЗ имеет коэффициент селективности для С19-гидроксилирования, по крайней мере, одного стероида или производного стероида $> 0,1$, предпочтительно $> 0,2$ или $> 0,3$ даже более предпочтительно $> 0,4$ или $> 0,5$, наиболее предпочтительно $> 0,5$, $> 0,6$, $> 0,7$, $> 0,8$ или $> 0,9$. Предпочтительно, когда вариант ВМЗ, кроме того, характеризуется выходом продукта С19-гидроксилирования стероида или производного стероида

> 5%, предпочтительно > 8%, > 10%, или > 12%, даже более предпочтительно > 15%, > 20%, > 25 %, > 30%, > 35%, > 40%, > 45%, или > 50%, предпочтительно > 55%, > 60%, > 65%, > 70% или > 75%.

Предпочтительно вариант ВМЗ содержит мутации М177Y и/или А184Y.

5 Например, обеспечивается ВМЗ вариант, который включает

(I) по крайней мере, мутации:

а) V78Y, A82E и F87A (ВМЗ-254, SEQ ID No. 2),

б) V78M, A82E и F87A (ВМЗ-261, SEQ ID No. 3),

в) V78I, A82E и F87A (ВМЗ-263, SEQ ID No. 4),

10 г) V78L, A82E и F87A (ВМЗ-268, SEQ ID No. 5),

д) V78Y, A82P и F87A (SEQ ID No. 6),

е) V78M, A82P и F87A (SEQ ID No. 7),

ж) V78I, A82P и F87A (SEQ ID No. 8),

з) V78L, A82P и F87A (SEQ ID No. 9),

15 и) V78Y, A82Q и F87A (SEQ ID No. 10),

й) V78M, A82Q и F87A (SEQ ID No. 11),

к) V78I, A82Q и F87A (SEQ ID No. 12), или

л) V78L, A82Q и F87A (SEQ ID No. 13),

и по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять

20 или десять дополнительных мутаций и/или

(II) по крайней мере, мутации:

а) V78F, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 14),

б) V78L, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 15),

в) V78I, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 16),

25 г) V78M, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 17),

д) V78Y, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 18),

е) V78F, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 19),

ж) V78L, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 20),

з) V78I, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 21),

30 и) V78M, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 22),

й) V78Y, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 23),

к) V78F, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 24),

л) V78L, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 25),

м) V78I, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 26),

н) V78M, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 27),

о) V78Y, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 28),

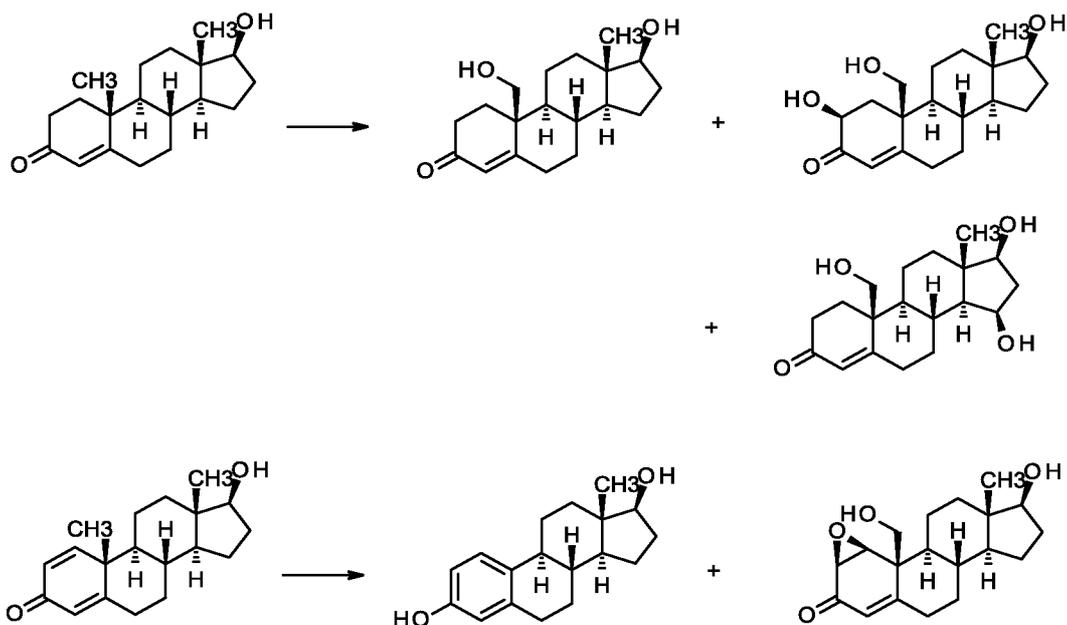
п) V78L, A82E, F87A, S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y и L188F (SEQ ID No. 117),

5 р) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y и A184Y (SEQ ID No. 118), или

с) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G и A477N (SEQ ID No. 119),

при этом указанный вариант ВМЗ имеет коэффициент селективности для
10 С19-гидроксилирования стероида или производного стероида $> 0,1$, предпочтительно $> 0,2$ или $> 0,3$, даже более предпочтительно $> 0,4$ или $> 0,5$, наиболее предпочтительно $> 0,5$, $> 0,6$, $> 0,7$, $> 0,8$ или $> 0,9$. Предпочтительно, когда вариант ВМЗ, кроме того, характеризуется выходом продукта С19-гидроксилирования стероида или производной стероида $> 5\%$, предпочтительно
15 $> 8\%$, $> 10\%$, или $> 12\%$, даже более предпочтительно $> 15\%$, $> 20\%$, $> 25\%$, $> 30\%$, $> 35\%$, $> 40\%$, $> 45\%$, или $> 50\%$, предпочтительно $> 55\%$, $> 60\%$, $> 65\%$, $> 70\%$, или $> 75\%$.

Исходные варианты Р450-ВМЗ, в частности, варианты в соответствии с
SEQ ID No. 2-5 и их производные варианты, катализируют не только С19-
20 гидроксилирование, но и последующие окислительные реакции. Наблюдалось значительное образование продуктов С19-гидроксилирования и дополнительного окисления в других положениях молекулы стероида. При использовании тестостерона в качестве субстрата было выделено (2бета)-2,19-дигидрокситестостерон и (15бета)-15,19-дигидрокситестостерон, при
25 использовании дельта-1-тестостерона в качестве субстрата был выделен (1бета,2бета)-1,2-эпокси-19-гидрокситестостерон.



Таким образом, например, варианты P450-ВМЗ могут катализировать образование (6бета)-ОН, (15бета)-ОН или (1бета,2бета)-1,2-эпоксидных производных либо вместо, либо в комбинации с С19-гидроксилированием (см. 5 Примеры 8, 9, Таблицы Е3, Е5). Образование этих побочных продуктов приводит к нарушению коэффициента селективности. Однако для перечисленных исходных вариантов ВМЗ было неожиданно обнаружено, что даже в случае побочных реакций полученные продукты С19-гидроксилирования (переокисления) все еще могут иметь значение для коммерческого синтеза 10 стероидов. По сравнению с их соответствующими исходными вариантами, варианты в соответствии с четвертым воплощением первого аспекта были предпочтительны в отношении селективности.

Таблица Б1 показывает коэффициенты селективности (КС) эстрадиола для превращения d1-тестостерона в эстрадиол при использовании 50 мг/л субстрата 15 для вариантов, полученных из исходного типа ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5), имеющего дополнительные мутации, как представлено ниже

Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)
V26E	0,58	L188H	0,14	M177N	0,09	V26G	0,07
A74I	0,53	I263L	0,14	H266V	0,09	L86M	0,07
G85L	0,48	V178D	0,14	E64V	0,09	T146C	0,07
A74V	0,42	T146M	0,14	M118N	0,09	E143M	0,07
I263C	0,42	S72C, A74I	0,14	A321N	0,09	V48F	0,07
V178P	0,42	T327L	0,14	M118L	0,09	R50I	0,07

Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)
S72G, A74V	0,40	L29Q	0,14	E143R	0,09	A321D	0,07
F77A	0,38	S72N, A74I	0,14	L75I, F81G	0,09	R255L	0,07
A184G	0,37	G415S	0,13	L188A	0,09	M118V	0,07
M177Y	0,37	S89Q	0,13	T365W	0,09	L29A	0,07
A330V	0,36	T365V	0,13	T49C	0,09	T365K	0,07
A184Y	0,34	L75V, F81L	0,13	E143D	0,09	E64Y	0,07
A74T	0,33	S176C	0,13	V178K	0,09	L29I	0,07
H266S	0,32	L75I, F81L	0,13	V48T	0,09	L181H	0,07
T146F	0,31	G402A	0,13	V178R	0,09	T49F	0,07
A184R	0,31	V314H	0,13	M118P	0,09	V48R	0,07
A184F	0,31	T365Y	0,13	R50E	0,09	V178N	0,07
R50S, A74V	0,31	M177T	0,13	G415T	0,09	S72D, A74C	0,07
S72G, A74I	0,30	T365P	0,13	M177L	0,09	E267R	0,07
A74C	0,29	L188D	0,13	S72N, A74V	0,09	K224I	0,07
M185V	0,29	L262Y	0,13	R50G	0,09	S176Q	0,07
A330R	0,28	P392V	0,13	V48W	0,09	L75V	0,07
M177K	0,28	A74S	0,13	R47L	0,09	L75I, F81V	0,07
L188K	0,28	F77C	0,13	R50N	0,09	V48L	0,07
I263N	0,27	L188M	0,13	F81Y	0,09	R47A	0,07
A184W	0,27	I263H, A264G	0,13	F77H	0,09	E143A	0,07
A74M	0,27	R50Q	0,12	E143F	0,09	L78M	0,07
S89L	0,27	R255I	0,12	S176F	0,09	A330T	0,07
K224P	0,26	S72G, A74Y	0,12	L75I, F81Y	0,09	V48I	0,07
V48H	0,26	V178I	0,12	F261I	0,09	S176K	0,07
V26N	0,26	W90D	0,12	F77D	0,09		
A399I	0,26	L75I, F81S	0,12	A184L	0,09		
A74L	0,26	P392G	0,12	F77N	0,09		
A184E	0,25	V314S	0,12	F261M	0,09		
F77V	0,25	V178M	0,12	E143C	0,09		
F77S	0,24	A74R	0,12	F77I	0,09		
V178W	0,24	M177F	0,12	V26M	0,08		
V26H	0,24	A74G, L75C	0,12	V178S	0,08		
L181P	0,23	L29S	0,12	V314A	0,08		
F77L	0,23	L75I, F81H	0,12	R47K	0,08		

Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)	Мутация	КС (эстра- диол)
F77W	0,23	I263K	0,12	T49N	0,08		
A184D	0,22	A399M	0,12	R50P	0,08		
S72W	0,22	V178L	0,12	L75I, F81C	0,08		
M177V	0,22	F261V	0,12	F77R	0,08		
V178Y	0,22	S72Y, A74V	0,12	L29H	0,08		
A74H	0,21	A399C	0,12	T49W	0,08		
L181V	0,21	S72C, A74L	0,12	V48D	0,08		
A74C, L75V	0,21	L188E	0,11	A399N	0,08		
S176P	0,21	G415D	0,11	R47Q	0,08		
F77T	0,21	T49I	0,11	E64G	0,08		
S89E	0,20	M118F	0,11	V26K	0,08		
M177R	0,20	L75V, F81C	0,11	R50M	0,08		
T49R	0,20	T88C	0,11	A321V	0,08		
A74Y	0,20	E143W	0,11	R50V	0,08		
A74W	0,20	V314P	0,11	V314Q	0,08		
M177C	0,20	F81W	0,11	E64H	0,08		
S72C, A74V	0,20	L181I	0,11	P392R	0,08		
L188R	0,20	S89V	0,11	M185L	0,08		
A74F	0,20	T438V	0,11	L188S	0,08		
F77K	0,20	S176D	0,11	V26L	0,08		
A74R, L75V	0,19	L86V	0,11	F81L	0,08		
F261D	0,19	L29F	0,11	L29Y	0,08		
L188N	0,19	I401T	0,11	R50L	0,08		
S89T	0,19	A184Q	0,11	V371P	0,08		
L188W	0,19	A321G	0,11	E267D	0,08		
M177H	0,19	M118Y	0,11	L262W	0,08		
T49P	0,19	W90Y	0,11	A399Q	0,08		
F81S	0,19	L262I	0,11	M177A	0,08		
A184K	0,18	T146R	0,11	E143G	0,08		
A184N	0,18	L29C	0,11	V371A	0,08		
M177Q	0,18	P392Q	0,10	M177P	0,08		
L75H, F81S	0,18	A399E	0,10	S72N, A74C	0,08		
S89C	0,18	H266E	0,10	R50S	0,08		
S89M	0,18	S72C, A74Y	0,10	S176E	0,08		
L188F	0,18	T49A	0,10	E143I	0,08		
L181Y	0,18	S72C, A74C	0,10	T49Q	0,08		
V178Q	0,18	L75V,	0,10	T365G	0,07		

Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)
		F81Y					
F77E	0,18	T365I	0,10	F77M	0,07		
F261C	0,17	F77P	0,10	R50C	0,07		
L188I	0,17	R50Y	0,10	T146D	0,07		
F261S	0,17	S72G, A74F	0,10	R47H	0,07		
S72G, A74C	0,17	M118E	0,10	R255K	0,07		
A399V	0,17	S72H, A74C	0,10	E143V	0,07		
A330K	0,17	A74P	0,10	R255P	0,07		
S72G, A74H	0,17	V26I	0,10	V48Y	0,07		
F261A	0,16	E64Q	0,10	V314F	0,07		
S176M	0,16	L75V, F81I	0,10	A330F	0,07		
A74N	0,16	V314E	0,10	Y51W	0,07		
S176G	0,16	T146P	0,10	M118A	0,07		
T365Q	0,16	T49L	0,10	E143P	0,07		
S89N	0,16	M177E	0,10	T49D	0,07		
G415A	0,15	L29T	0,10	E143K	0,07		
A264V	0,15	T327V	0,10	R255N	0,07		
S89I	0,15	H266N	0,10	H266A	0,07		
T49V	0,15	V48S	0,10	F261Y	0,07		
M118G	0,15	R50D	0,10	T365L	0,07		
K224H	0,15	G85A	0,09	L29M	0,07		
S72G, A74L	0,15	L437I	0,09	L75I	0,07		
A184H	0,15	F77Y	0,09	V26A	0,07		
A330W	0,15	T146S	0,09	L29V	0,07		
S72G, A74S	0,14	M118W	0,09	R47T	0,07		

Таблица Б2 показывает коэффициенты селективности для эстрадиола в случае превращения $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол при использовании 100 мг/л субстрата для вариантов, полученных из исходного типа VM3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), которые имели дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)
L150W	0,65	T49I	0,51	F205Y	0,47
L78M	0,64	F205G	0,51	K210E	0,47
W325Y	0,61	A330W	0,51	L20I	0,47
L20W	0,60	L20N	0,50	F205R	0,46

Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)	Мутация	КС (эстрадиол)
E93G	0,59	F205H	0,50	T49A	0,46
T149P	0,59	F205D, D208N	0,50	L20D	0,46
V26Q	0,57	L150Y	0,50	L20V	0,46
W325F	0,56	E267D	0,50	L20S	0,46
M212F	0,55	L20C	0,49	L20M	0,45
S89T	0,55	T146L	0,49	T146A, F205G	0,45
M212W	0,54	M212Y	0,49	R47W	0,45
L20T	0,54	F205T	0,49	T146A, L272W	0,45
L150F	0,53	L20R	0,49	F205W	0,45
A330Y	0,53	F77V	0,48	R47S	0,45
L20F	0,53	F205E	0,48	T327M	0,43
T49P	0,52	T49L	0,48	F205K	0,42
L20P	0,52	T146V, A191T	0,47	T146A, L150A	0,42
L272V	0,52	F205D	0,47	E352N	0,38
L20Y	0,51	P9S	0,47		

Таблица Б3 показывает коэффициенты селективности для эстрадиола, полученного в реакциях биотрансформации при использовании 100 мг/л Δ 1-тестостерона в качестве субстрата при использовании вариантов ВМ3-268; 5 M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), которые включают до шести мутаций.

Мутации	КС эстра- диола	Мутации	КС эстра- диола
S72G,A74I,V178P,L181Y	0,83	S72G,V178P,L181Y,L188F	0,61
S72G,A74V,V178P,L181Y,L188K	0,83	S72G,V178W,L188R	0,61
A74V,V178P,L181Y,L188R	0,83	T146F,L181Y	0,6
S72G,A74V,T146F,V178P,L181Y, L188R	0,82	T146F,V178W,L188R	0,59
A74V,V178P,L181Y,L188K	0,8	S72G,T146F,V178W	0,59
S72G,A74V,T146F,V178P,L181Y, L188K	0,8	T146F,L181Y,L188F	0,58
S72G,A74V,T146F,V178P,L181Y	0,79	A74T,T146F,L181Y,L188K	0,58
S72G,A74I,T146F,L181Y,L188F	0,77	A74T,T146F,V178W	0,58
S72G,A74V,T146F,V178W,L181Y	0,76	V178P	0,58
S72G,A74T,T146F,V178W,L188R	0,76	S72G,A74T,T146F,L188R	0,58
S72G,A74V,T146F,L181Y,L188R	0,75	S72G,V178P,L181Y,L188K	0,57
S72G,A74V,T146F,L181Y	0,75	S72G,V178W,L188F	0,57
A74V,V178P,L181Y,L188F	0,74	S72G,V178P,L181Y,L188R	0,56
S72G,A74T,T146F,V178W, L181Y,L188R	0,73	S72G,T146F,V178W,L181Y, L188K	0,56
S72G,A74V,T146F,V178W,L188R	0,72	S72G,T146F,V178W,L188K	0,55

Мутации	КС эстрадиола	Мутации	КС эстрадиола
A74T,T146F,V178P,L181Y	0,72	T146F,V178W,L181Y,L188R	0,55
A74I,T146F,V178W	0,68	V178P,L181Y,L188R	0,55
S72G,A74T,T146F,L181Y,L188K	0,68	T146F,V178W,L188F	0,55
S72G,A74T,L181Y,L188F	0,68	S72G,A74V,L188R	0,55
S72G,A74T,T146F,V178P,L181Y	0,68	S72G,A74T,V178P,L188F	0,55
S72G,A74T,T146F,V178W,L188F	0,67	S72G,T146F,V178P,L188R	0,54
S72G,T146F,V178W,L188F	0,66	S72G,V178W,L188K	0,53
S72G,A74I,T146F,L181Y,L188K	0,66	V178W	0,53
S72G,A74I,T146F,L181Y,L188R	0,66	S72G,V178W	0,52
S72G,V178P,L181Y	0,65	S72G,T146F,L188F	0,52
A74T,T146F,L181Y,L188R	0,65	S72G,T146F,L181Y,L188R	0,52
V178P,L181Y	0,65	A74T,T146F,V178P,L188R	0,51
S72G,V178W,L181Y	0,65	T146F,V178W	0,49
S72G,T146F,V178W,L181Y, L188F	0,63	S72G	0,47
S72G,T146F,V178W,L181Y	0,63	A74T,T146F,L188K	0,47
S72G,A74T,L181Y,L188K	0,63	T146F,V178W,L188K	0,46
S72G,A74I,T146F,L181Y	0,63	S72G,L188F	0,46
S72G,A74V,T146F,V178W	0,62	S72G,T146F	0,46

Таблица Б4 показывает коэффициенты селективности для эстрогена в процессе превращения АДД в эстроген при использовании 100 мг/л субстрата для вариантов, полученных из исходного типа BM3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No.

5 15), которые имеют дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена
I259M	0,75	T146A, F205G	0,29	L20R	0,23
L150W	0,72	F205E	0,29	F205W	0,23
L272C	0,65	F205S	0,29	V26S	0,23
F205D	0,45	M354Q	0,29	E352A	0,23
F205N	0,44	W325Y	0,29	E352I	0,23
R203C	0,44	F205I	0,28	M212F	0,22
F205V	0,42	F205G	0,28	M212T	0,22
E93G	0,41	M212H	0,28	L272W	0,21
F173Y, I174F	0,40	T438V	0,28	E352M	0,20
F205T	0,39	T438C	0,27	L150F	0,20
M212Y	0,37	M354W	0,27	T49Q	0,20
F205P	0,36	T49R	0,27	L272Y	0,20
L78M	0,36	T327M	0,27	L20F	0,20
F205Y	0,34	F81Y	0,27	T146F	0,20
F205D, D208N	0,34	F205R	0,26	L150G	0,19

Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена
M212W	0,34	S89T	0,26	K210E	0,19
T146L	0,32	I259D	0,26	T49I	0,18
D363G, T438C	0,31	L150Y	0,25	F81D	0,18
F205K	0,31	L20Y	0,24	L20P	0,17
L20W	0,30	T438I	0,24	L272F	0,16
F205C	0,30	F205H	0,24	E352N	0,15
T146A, L272H	0,30	E352V	0,24		

Таблица Б5 показывает коэффициент селективности для эстрогена, полученного в реакциях биотрансформации из 100 мг/л АДД при использовании полученных вариантов ВМ3-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15), которые имеют до шести мутаций.

5

Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена
S72G,A74V,V178P, L181Y,L188F	0,94	S72G,A74T,L188R	0,54	S72G,A74I,T146F, V178P,L188F	0,37
S72G,A74V,L181Y, L188F	0,88	A74V,V178P, L181Y,L188F	0,54	T146F,V178W, L188F	0,37
S72G,A74V,T146F, V178P,L181Y, L188K	0,85	S72G,L181Y,L188R	0,53	S72G,L181Y,L188F	0,37
S72G,A74T,V178P, L181Y	0,84	S72G,A74T,T146F, V178P,L181Y	0,53	A74I,T146F,V178P	0,36
S72G,A74V,T146F, V178P,L181Y, L188R	0,83	S72G,T146F,L181Y, L188R	0,52	S72G,A74I,T146F, L181Y	0,36
S72G,A74V,T146F, L181Y,L188K	0,83	S72G,A74V,T146F, L181Y,L188R	0,52	S72G,L181Y	0,36
S72G,A74V,T146F, V178W,L181Y, L188K	0,82	A74T,T146F,V178P, L181Y	0,51	S72G,A74T,T146F, V178W,L181Y, L188F	0,36
S72G,A74V, V178W,L181Y	0,81	S72G,V178P,L188F	0,50	S72G,A74V,T146F, V178P	0,36
S72G,A74V, V178W,L181Y, L188F	0,79	A74T,T146F, V178W,L188R	0,50	S72G,A74T,T146F, V178P,L188F	0,35
S72G,A74T,T146F, V178W,L181Y	0,78	S72G,L181Y,L188K	0,49	S72G,A74V,V178P, L188R	0,34
S72G,A74I,T146F, V178W,L181Y	0,78	S72G,A74I,V178P, L181Y	0,49	S72G,T146F, V178P,L181Y, L188F	0,34
S72G,A74V,T146F,	0,78	S72G,A74V,V178P,	0,49	V178P,L181Y	0,33

Мутация(и)	КС эст- рона	Мутация(и)	КС эст- рона	Мутация(и)	КС эст- рона
V178W,L181Y, L188R		L188F			
S72G,A74I,T146F, V178P,L181Y, L188R	0,77	S72G,T146F,L188F	0,49	S72G,V178W, L181Y,L188F	0,33
S72G,A74V,T146F, L181Y,L188F	0,76	S72G,V178P,L181Y, L188F	0,48	S72G,A74I,T146F, V178P	0,32
S72G,V178W, L181Y	0,75	S72G,A74T,T146F, V178P	0,48	S72G,T146F,L188R	0,32
S72G,V178W, L181Y,L188R	0,73	S72G,V178W,L188R	0,48	T146F,V178P	0,32
S72G,A74V,T146F, V178P,L181Y	0,71	S72G,A74T,T146F, V178P,L188R	0,48	S72G,A74T,T146F, L181Y	0,32
S72G,A74I,T146F,V 178W,L181Y, L188K	0,71	S72G,T146F, V178W,L181Y, L188K	0,47	T146F,V178W, L181Y,L188R	0,31
S72G,T146F, V178W,L181Y	0,69	S72G,A74I,T146F, V178P,L181Y	0,47	S72G,V178P, L188K	0,31
S72G,A74T,T146F, V178W,L181Y, L188K	0,69	S72G,T146F,V178P, L181Y,L188K	0,47	S72G,L188F	0,31
A74I,T146F, V178W,L188R	0,69	S72G,T146F,V178P, L181Y	0,45	S72G,V178P, L181Y,L188K	0,30
S72G,A74T,V178P, L181Y,L188K	0,68	S72G,T146F,L188K	0,44	S72G,A74T,V178P, L188F	0,29
S72G,T146F, V178W,L181Y, L188F	0,67	S72G,A74T,T146F, L181Y,L188K	0,43	S72G,T146F, V178P,L188R	0,29
S72G,A74V,T146F, V178P,L188F	0,66	S72G,A74V,T146F, V178W,L188R	0,43	S72G,A74V,V178P	0,29
S72G,A74V,T146F, L188F	0,66	S72G,V178P,L188R	0,42	V178P	0,29
S72G,A74T,T146F, V178W,L188R	0,65	T146F,L181Y,L188F	0,42	S72G,A74I,T146F, V178P,L188R	0,29
S72G,A74V,L181Y	0,65	T146F,L181Y	0,41	S72G,V178W	0,29
S72G,T146F, V178W,L188F	0,64	S72G,T146F, V178W,L188K	0,41	A74I,T146F,L181Y, L188K	0,29
S72G,A74V,T146F, V178W,L181Y	0,64	A74T,T146F,V178P	0,41	A74T,T146F, L181Y,L188K	0,28
S72G,A74T,L181Y, L188R	0,64	S72G,A74V,T146F, V178P,L188R	0,41	S72G,A74V,V178P, L181Y,L188R	0,28
S72G,T146F, V178W,L188R	0,63	T146F,L181Y, L188K	0,41	S72G,L188R	0,27
A74T,T146F, V178W,L181Y	0,63	S72G,T146F	0,40	S72G,A74V,T146F, V178P,L188K	0,27
S72G,A74I,T146F,	0,63	S72G	0,40	S72G,A74V,L188R	0,26

Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена	Мутация(и)	КС эстрогена
L181Y,L188F					
S72G,A74V,T146F,L181Y	0,62	S72G,A74I,T146F,V178P,L188K	0,40	S72G,T146F,V178P,L188K	0,26
S72G,A74T,T146F,V178W,L181Y,L188R	0,61	S72G,A74I,T146F,V178P,L181Y,L188F	0,40	A74I,T146F,V178W,L188K	0,26
S72G,T146F,L181Y,L188K	0,61	S72G,T146F,L181Y	0,40	T146F,V178P,L181Y,L188R	0,25
A74I,T146F,L181Y	0,61	A74I,T146F,V178P,L188R	0,40	T146F,V178W	0,25
S72G,T146F,V178W	0,59	A74V,T146F,L181Y,L188R	0,40	A74T,T146F,V178W	0,25
S72G,T146F,L181Y,L188F	0,59	S72G,A74V,T146F,V178W	0,39	S72G,L188K	0,24
S72G,T146F,V178P,L188F	0,56	S72G,V178P	0,39	S72G,A74V,L188K	0,24
S72G,V178W,L188K	0,56	S72G,A74I,T146F,L181Y,L188R	0,39	T146F,V178W,L188R	0,23
S72G,T146F,V178P	0,55	S72G,V178P,L181Y	0,38	T146F,V178W,L188K	0,21
S72G,V178W,L188F	0,55	S72G,V178P,L181Y,L188R	0,38	T146F	0,20
S72G,A74T,T146F,V178P,L188K	0,55	A74T,T146F,V178P,L188K	0,38		
S72G,A74T,T146F,V178W,L188F	0,54	S72G,T146F,V178P,L181Y,L188R	0,37		

5 **Таблица Б6** показывает соотношение целевого продукта (СЦП) для превращения АДД в эстрон при использовании 2000 мг/л субстрата для вариантов на основе исходного типа ВМЗ-268; М177Y, А184Y; S72G, V178P, L181Y, L188F (SEQ ID No. 117), которые имеют дополнительные мутации, как представлено ниже.

Мутация	СЦП эстрогена (%)						
R79K	76,80	D182W	58,98	G240H	54,09	T175R	51,15
R179L	74,43	K76E	58,51	T269A	54,01	Q404F	51,10
I174V	70,26	N186L	58,42	E140K	54,01	Q189V	51,07
K187N	67,17	T175Q	58,42	H236G	54,01	V299L	51,03
R179M	65,99	A44Q	58,41	H236P	53,97	H92Y	50,93
K440C	65,82	T175M	58,25	A225S	53,86	R190W	50,61
F173W	65,23	H236C	58,23	G114C	53,81	S270D	50,56
D182A	64,50	T269V	58,21	S176D	53,74	E140T	50,47

Мутация	СЦП эстроны (%)						
N186K	64,40	N186Y	58,09	E409N	53,71	Q189I	50,31
D182I	64,27	V299W	58,05	R190S	53,68	G114K	50,30
K76V	63,28	R190K	57,79	T175G	53,63	S53C	50,24
D182H	62,78	K187G	57,79	G114L	53,61	A225V	50,06
R179A	62,59	G240A	57,78	A225G	53,39	N186E	50,02
D182E	62,29	G240R	57,66	M5P	53,22	H236F	50,01
D182V	62,26	H236I	57,50	N186V	53,02	Q189K	49,82
D182C	62,21	A399R	57,44	E140D	52,94	A225N	49,79
K76I	62,18	Q73F	57,39	K76H	52,86	K76C	49,74
G240S	61,85	N186A	57,23	G240C	52,86	Q73A	49,62
I258L	61,68	K440T	57,21	K187A	52,78	H236R	49,59
R190V	61,58	P172G	56,97	R179V	52,77	A225Y	49,58
Q73L	61,26	A225T	56,85	R190G	52,74	G240N	49,45
N186M	61,23	G114N	56,33	Q73W	52,67	T175H	49,43
Q403R	61,19	N186F	55,94	R190C	52,45	G46T	49,27
T175F	61,08	H236K	55,94	S270G	52,40	I258V	49,20
T175Y	61,06	D182M	55,78	T175N	52,37	H236A	49,15
H236Y	61,01	Q73T	55,69	G240M	52,11	M5C	49,13
K440N	61,00	G240Q	55,69	I174T	52,08	K76L	49,12
H236D	60,98	E140A	55,42	S270A	51,99	E183T	49,08
Q403K	60,90	K76N	55,22	A225Q	51,90	A44G	49,03
R190M	60,87	H236S	55,17	R179P	51,77	E337L	48,74
R190N	59,98	Q73E	54,76	Q73S	51,75	K187R	48,64
K76F	59,97	R179H	54,69	N186Q	51,68	M5E	48,63
P172A	59,90	I258M	54,67	E140M	51,65	R79E	48,59
N186T	59,83	G114W	54,67	M5Q	51,59	G240V	48,49
N186H	59,68	D182N	54,47	N186D	51,43		
T175L	59,57	P172D	54,40	H92F	51,29		
G240K	59,46	Q404Y	54,31	A225C	51,22		

Обеспечиваются варианты в соответствии с пятым вариантом осуществления в соответствии с первым аспектом, где указанный вариант P450-VM3 включает дополнительную(ые) мутацию(и), по крайней мере, в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более положений. В частности, варианты в соответствии с пятым вариантом осуществления могут быть вариантами в соответствии с первым или вторым вариантом осуществления первого аспекта такими, как варианты, которые имеют происхождение от вариантов в соответствии с SEQ ID No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 117, 118 или 119.

Предпочтительно указанное(ые) положение является выбранным(и) из (A184), (A191), (A221), (A264), (A321), (A328), (A33), (A330), (A399), (A74), (D168), (D208), (D222), (D363), (E13), (E143), (E267), (E352), (E64), (E82), (E93), (F173), (F205), (F261), (F331), (F393), (F77), (F81), (G240), (G271), (G402), (G415), (G570), (G677), (G85), (H266), (H659), (I153), (I174), (I258), (I259), (I263), (I401), (K210), (K224), (L150), (L181), (L188), (L20), (L262), (L272), (L29), (L324), (L333), (L356), (L437), (L75), (L78), (L86), (M118), (M177), (M185), (M212), (M354), (N70), (P243), (P326), (P329), (P392), (P9), (R147), (R161), (R190), (R203), (R255), (R323), (R47), (R50), (S164), (S176), (S54), (S72), (S89), (T146), (T149)), (T260), (T268), (T269), (T327), (T365), (T436), (T438), (T49), (T88), (V178), (V26), (V299), (V314), (V371), (V48), (W325), (W367), (W90), (Y51), (A225), (A44), (D182), (D80), (E140), (E183)), (E337), (E409), (G114), (G227), (G46), (H236), (H92), (K187), (K440), (K76), (M5), (N186), (P172), (Q189), (Q397), (Q403), (Q404), (Q73), (R179), (R79), (S270), (S53) и (T175).

Предпочтительно, когда указанный вариант ВМЗ имеет улучшенную селективность и/или выход продукта для С19-гидроксилирования по сравнению с его исходным вариантом ВМЗ. Предпочтительно вариант ВМЗ содержит мутации M177Y и/или A184Y.

Было неожиданно обнаружено, что нацеливание на эти положения и введение «приемлемой» аминокислотной замены может дополнительно улучшить либо выход продукта (см. Таблицы А1, А2, А3, А4, А5 и А6), либо селективность С19-гидроксилирования (см. Таблицы Б1, Б2, Б3 , Б4, Б5 и Б6), тем самым дополнительно улучшая эффективность процесса С19-гидроксилирования. Оценку того, какая аминокислота является «приемлемой» для положения с целью получения улучшения, можно легко провести, если целевое положение раскрыто в настоящем документе. Чтобы оценить, какая из аминокислот «пригодна» для этого положения, нужно просто изменить данное положение путем введения аминокислоты, как является известным в данной области техники (см. также Пример 1) и оценить производительность полученного варианта для С19-гидроксилирования, например, по сравнению с исходным вариантом и/или по сравнению с остальными 18 аминокислотами.

Обеспечивается **первая предпочтительная подгруппа**, которая включает варианты в соответствии с **пятым вариантом воплощения**, где варианты Р450-ВМЗ имеют улучшенный выход продукта или титр продукта для С19-

гидроксилирования по сравнению с исходным вариантом. В эту подгруппу входят варианты, где упомянутые положения выбираются из (A184), (A191), (A221), (A264), (A321), (A33), (A330), (A399), (A74), (D208) (D222), (D363), (E13), (E143), (E267), (E352), (E64), (E82), (E93), (F173), (F205), (F261), (F331), (F393), (F77), (F81), (G240), (G271), (G402), (G415), (G677), (G85), (H266), (H659), (I153) , (I174), (I258), (I259), (I263), (I401), (K210), (K224), (L150), (L181), (L188), (L20), (L262), (L272), (L29), (L324), (L356), (L437), (L75), (L78), (L86), (M118), (M177), (M185), (M212), (M354) , (N70), (P243), (P329), (P392), (P9), (R147), (R161), (R190), (R203), (R255), (R47), (R50), (S176), (S54), (S72), (S89), (T146), (T149), (T260), (T268), (T269), (T327), (T365), (T436), (T438) , (T49), (T88), (V178), (V26), (V314), (V371), (V48), (W325), (W367), (W90), (Y51), (A225), (A44), (D182), (D80), (E140), (E183), (E337), (G114), (G227), (H236), (H92), (K187), (K440), (K76) , (M5), (N186), (P172), (Q189), (Q397), (Q403), (Q404), (Q73), (R179), (R79), (S270), (S53), (T175) и (V299).

15 Обеспечивается **вторая предпочтительная подгруппа**, включающая варианты в соответствии с **пятым вариантом осуществления**, где варианты P450-ВМЗ обладают улучшенной селективностью (как определено при использовании КС или СЦП) для С19-гидроксилирования по сравнению с исходным вариантом (см. Фиг. 1 б). В эту подгруппу входят варианты, где
 20 упомянутое(ые) положение(я) выбирается(ются) из: (A184), (A191), (A221), (A264), (A321), (A328), (A33), (A330), (A399), (A74), (D168), (D208), (D222), (D363), (E143), (E267), (E352), (E64), (E82), (E93), (F173) , (F205), (F261), (F331), (F393), (F77), (F81), (G240), (G271), (G402), (G415), (G570), (G677), (G85), (H266), (H659), (I153), (I174), (I258), (I259), (I263), (I401), (K210), (K224),
 25 (L150), (L181) , (L188), (L20), (L262), (L272), (L29), (L324), (L333), (L356), (L437), (L75), (L78), (L86), (M118), (M177), (M185), (M212), (M354), (N70), (P243), (P326), (P329), (P392), (P9), (R147), (R161) , (R190), (R203), (R255), (R323), (R47), (R50), (S164), (S176), (S54), (S72), (S89), (T146), (T149), (T260), (T268), (T269), (T327), (T365), (T436), (T438), (T49), (T88), (V178), (V26), (V299),
 30 (V314), (V48), (W325), (W367), (W90), (Y51), (A225), (A44), (D182), (E140), (E183), (E337), (E409), (G114), (G46), (H236), (H92), (K187), (K440), (K76), (M5), (N186), (P172), (Q1 89), (Q403), (Q404), (Q73), (R179), (R79), (S270), (S53) и (T175).

Обеспечивается **третья предпочтительная подгруппа**, которая включает варианты в соответствии с **пятым вариантом осуществления**, где варианты P450-ВМЗ обладают улучшенной селективностью (как определено при использовании КС или СЦП) и улучшенным выходом продукта или титром продукта С19-гидроксилирования по сравнению с исходным вариантом. В эту подгруппу входят варианты, где упомянутое(ые) положение(я) выбирается(ются) из: (A184), (A191), (A221), (A264), (A321), (A33), (A330), (A399), (A74), (D208), (D222), (D363), (E13), (E143), (E267), (E352), (E64), (E82), (E93), (F173), (F205), (F261), (F331), (F393), (F77), (F81), (G240), (G271), (G402), (G677), (G85), (H266), (H659), (I153), (I174), (I258), (I259), (I263), (I401), (K210), (K224), (L150), (L181), (L188), (L20), (L262), (L272), (L29), (L324), (L356), (L437), (L75), (L78), (L86), (M118), (M177), (M185), (M212), (M354), (N70), (P243), (P329), (P392), (P9), (R147), (R161), (R190), (R203), (R255), (R47), (R50), (S176), (S54), (S72), (S89), (T146), (T149), (T268), (T269), (T327), (T365), (T436), (T438), (T49), (T88), (V178), (V26), (V314), (V48), (W325), (W367), (W90), (Y51), (A225), (A44), (D182), (E140), (E337), (G114), (H236), (H92), (K187), (K440), (K76), (M5), (N186), (P172), (Q189), (Q403), (Q404), (Q73), (R179), (R79), (S270), (S53), (T175) и (V299).

Пятый вариант осуществления изобретения и каждая из обеспечиваемых подгрупп могут быть объединены и предусматриваются для объединения со всеми предыдущими вариантами воплощения, как это понятно для специалиста в данной области техники, и могут быть или могут не быть вариантами осуществления в соответствии со **вторым вариантом осуществления** первого аспекта.

Обеспечиваются варианты в соответствии с **шестым вариантом осуществления** в соответствии с первым аспектом, где указанный вариант P450-ВМЗ включает, по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более дополнительных мутаций. В частности, варианты в соответствии с шестым вариантом осуществления могут быть вариантами в соответствии с первым или вторым вариантом осуществления первого аспекта, такими, как варианты, которые получены из вариантов в соответствии с SEQ ID No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 117, 118 или 119. Шестой вариант осуществления может быть объединен и предусматривается для объединения со

всеми предыдущими воплощениями, и может быть или может не быть воплощением в соответствии с пятым вариантом осуществления.

Предпочтительно, когда указанная дополнительная мутация в соответствии с шестым воплощением первого аспекта представляют собой (A184D) или
 5 (A184D, L188K), или (A184E), или (A184F), или (A184G), или (A184H), или (A184I), или (A184K), или (A184L), или (A184N), или (A184Q), или (A184R), или (A184W), или (A184W, L188F), или (A184Y), или (A184Y, L188K), или (A184Y, R50S), или (A221S), или (A264V), или (A321C), или (A321D), или (A321E), или (A321G), или (A321I), или (A321N), или (A321T), или (A321V), или (A328P), или
 10 (A330C), или (A330D), или (A330E), или (A330F), или (A330G), или (A330H), или (A330I), или (A330K), или (A330L), или (A330M), или (A330N), или (A330Q), или (A330R), или (A330S), или (A330T), или (A330T, E352A), или (A330T, F331V), или (A330V), или (A330W), или (A330Y), или (A330Y, W367C), или (A33V), или (A399C), или (A399E), или (A399G), или (A399I), или (A399L),
 15 или (A399M), или (A399N), или (A399Q), или (A399R), или (A399S), или (A399T), или (A399V), или (A74C), или (A74C, L75V), или (A74D), или (A74D, F81V), или (A74E), или (A74F), или (A74G), или (A74G, L75C), или (A74H), или (A74I), или (A74I, A184W, L188F), или (A74I, F77A, L181Y, A184W), или (A74I, L181Y, L188K), или (A74I, L181Y, L188R), или (A74I, L188F), или (A74I, L188K),
 20 или (A74I, L188R), или (A74I, M177Y, A184R, L188F), или (A74I, M177Y, V178P, A184G), или (A74I, T146F), или (A74I, T146F, L181Y), или (A74I, T146F, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, L188F), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F),
 25 или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188R), или (A74I, T146F, V178W), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, V178W, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L188K), или (A74I, T146F, V178W, L188R), или (A74I, V178P), или (A74I, V178P, L181Y),
 30 или (A74I, V178P, L181Y, L188R), или (A74I, V178P, L188F), или (A74I, V178P, L188K), или (A74I, V178P, L188R), или (A74I, V178W, L188F), или (A74I, V178W, L188K), или (A74I, V178W, L188R), или (A74K), или (A74L), или (A74M), или (A74N), или (A74P), или (A74Q), или (A74R), или (A74R, L75V), или (A74S), или (A74T), или (A74T, A184D), или (A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K),
 или (A74T, F77A, V178W, A184Y), или (A74T, F77L, L181Y, A184D,

L188K), или (A74T, L181Y), или (A74T, L181Y, A184D, L188K), или (A74T,
 L181Y, A184Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188R),
 или (A74T, L188K), или (A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K), или (A74T,
 5 T146F, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188K), или (A74T,
 T146F, L181Y, L188R), или (A74T, T146F, L188F), или (A74T, T146F, L188K),
 или (A74T, T146F, L188R), или (A74T, T146F, V178P), или (A74T, T146F, V178P,
 L181Y), или (A74T, T146F, V178P, L188K), или (A74T, T146F, V178P, L188R),
 или (A74T, T146F, V178W), или (A74T, T146F, V178W, L181Y), или (A74T,
 10 T146F, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, V178W, L188R), или (A74T,
 V178P), или (A74T, V178P, L188F), или (A74T, V178P, L188K), или (A74T,
 V178P, L188R), или (A74T, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, V178W, L188K),
 или (A74T, V178W, L188R), или (A74V), или (A74V, F77A, A184N, L188F), или
 (A74V, L181Y), или (A74V, L181Y, A184D, L188K), или (A74V, L181Y, A184W,
 L188F), или (A74V, L181Y, L188F), или (A74V, L188F), или (A74V, L188K), или
 15 (A74V, L75V), или (A74V, T146F, L181Y, L188K), или (A74V, T146F, L181Y,
 L188R), или (A74V, T146F, L188K), или (A74V, T146F, L188R), или (A74V,
 T146F, V178W), или (A74V, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74V, V178P,
 A184W, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, L181Y,
 L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188R), или (A74V, V178P, L188F), или
 20 (A74V, V178W, L188K), или (A74W), или (A74Y), или (D168Y, F173D), или
 (D363G, T438C), или (E13D, R47L), или (E143A), или (E143C), или (E143D), или
 (E143F), или (E143G), или (E143I), или (E143K), или (E143L), или (E143M), или
 (E143N), или (E143P), или (E143Q), или (E143R), или (E143S), или (E143V), или
 (E143W), или (E143Y), или (E267A), или (E267C), или (E267D), или (E267G), или
 25 (E267K), или (E267P), или (E267R), или (E267S), или (E267T), или (E267Y), или
 (E352A), или (E352D), или (E352F), или (E352G), или (E352I), или (E352L), или
 (E352M), или (E352N), или (E352P), или (E352R), или (E352S), или (E352T), или
 (E352V), или (E352W), или (E352Y), или (E64A), или (E64G), или (E64H), или
 (E64I), или (E64K), или (E64L), или (E64M), или (E64N), или (E64Q), или
 30 (E64V), или (E64W), или (E64Y), или (E82P), или (E93G), или (F173C), или
 (F173C, F205G), или (F173D), или (F173I), или (F173K), или (F173L), или
 (F173M), или (F173N), или (F173P), или (F173Q), или (F173R), или (F173S), или
 (F173S, F205P), или (F173V), или (F173W), или (F173Y), или (F173Y, I174F), или
 (F205A), или (F205C), или (F205D), или (F205D, D208N), или (F205E), или

(F205G), или (F205H), или (F205I), или (F205K), или (F205L), или (F205M), или (F205N), или (F205P), или (F205R), или (F205S), или (F205T), или (F205V), или (F205W), или (F205Y), или (F261A), или (F261C), или (F261D), или (F261G), или (F261I), или (F261L), или (F261M), или (F261N), или (F261Q), или (F261S), или (F261T), или (F261V), или (F261W), или (F261Y), или (F331C), или (F331H), или (F331I), или (F331L), или (F331M), или (F331N), или (F331P), или (F331T), или (F331V), или (F331W), или (F331Y), или (F393M), или (F393W), или (F77A), или (F77A, A184W), или (F77A, L181P, A184Y, L188K), или (F77A, M177Y), или (F77C), или (F77D), или (F77E), или (F77G), или (F77H), или (F77I), или (F77K), или (F77L), или (F77M), или (F77N), или (F77P), или (F77R), или (F77S), или (F77T), или (F77V), или (F77V, L86M), или (F77W), или (F77Y), или (F81A), или (F81C), или (F81D), или (F81I), или (F81L), или (F81P), или (F81R), или (F81S), или (F81T), или (F81V), или (F81W), или (F81Y), или (G271A), или (G271C), или (G271D), или (G271E), или (G271F), или (G271H), или (G271K), или (G271L), или (G271M), или (G271N), или (G271P), или (G271Q), или (G271R), или (G271S), или (G271T), или (G271V), или (G271W), или (G271Y), или (G402A), или (G415A), или (G415D), или (G415S), или (G415T), или (G415V), или (G85A), или (G85L), или (G85S), или (H266A), или (H266C), или (H266D), или (H266E), или (H266F), или (H266G), или (H266I), или (H266K), или (H266M), или (H266N), или (H266P), или (H266Q), или (H266R), или (H266S), или (H266T), или (H266V), или (H266W), или (H266Y), или (I153F, G271L), или (I153L), или (I153L, F173Y), или (I259A), или (I259C), или (I259D), или (I259F), или (I259G), или (I259H), или (I259K), или (I259L), или (I259M), или (I259N), или (I259Q), или (I259S), или (I259T), или (I259V), или (I259W), или (I259Y), или (I263A), или (I263C), или (I263E), или (I263F), или (I263G), или (I263H, A264G), или (I263K), или (I263L), или (I263M), или (I263N), или (I263Q), или (I263S), или (I263T), или (I263V), или (I263Y), или (I401A), или (I401L), или (I401M), или (I401T), или (I401V), или (K210E), или (K210T, G271V), или (K224C), или (K224E), или (K224F), или (K224H), или (K224I), или (K224L), или (K224M), или (K224P), или (K224Q), или (K224W), или (K224Y), или (L150A), или (L150C), или (L150D), или (L150E), или (L150F), или (L150G), или (L150H), или (L150I), или (L150K), или (L150M), или (L150N), или (L150Q), или (L150R), или (L150R, F205R), или (L150S), или (L150S, F173L), или (L150T), или (L150V), или (L150W), или (L150Y), или (L181H), или (L181I), или (L181M), или (L181P), или

(L181V), или (L181Y), или (L181Y, A184D), или (L181Y, L188F), или (L181Y, L188K), или (L181Y, L188K, H659R), или (L188A), или (L188D), или (L188E), или (L188F), или (L188H), или (L188I), или (L188K), или (L188M), или (L188N), или (L188Q), или (L188R), или (L188S), или (L188W), или (L20C), или (L20D),
5 или (L20E), или (L20F), или (L20G), или (L20G, R47L), или (L20I), или (L20M), или (L20N), или (L20P), или (L20R), или (L20S), или (L20T), или (L20V), или (L20W), или (L20Y), или (L262I), или (L262V), или (L262W), или (L262Y), или (L272A), или (L272C), или (L272E), или (L272F), или (L272G), или (L272I), или (L272K), или (L272M), или (L272N), или (L272Q), или (L272R), или (L272S), или
10 (L272T), или (L272V), или (L272W), или (L272Y), или (L29A), или (L29C), или (L29D), или (L29F), или (L29H), или (L29I), или (L29M), или (L29M, R47G), или (L29P), или (L29Q), или (L29S), или (L29T), или (L29V), или (L29W), или (L29Y), или (L324F), или (L356C), или (L356F), или (L356H), или (L356I), или (L356M), или (L356N), или (L356Q), или (L356S), или (L356T), или (L356V), или
15 (L356W), или (L437I), или (L437M), или (L75H, F81S), или (L75I), или (L75I, F81C), или (L75I, F81G), или (L75I, F81H), или (L75I, F81I), или (L75I, F81L), или (L75I, F81S), или (L75I, F81V), или (L75I, F81Y), или (L75V), или (L75V, F81C), или (L75V, F81H), или (L75V, F81I), или (L75V, F81L), или (L75V, F81V), или (L75V, F81Y), или (L78F), или (L78I), или (L78M), или (L78V), или (L78Y),
20 или (L86A, S89T), или (L86I), или (L86I, S89T), или (L86M), или (L86M, S89T), или (L86N, S89T), или (L86V), или (L86V, S89T), или (M118A), или (M118E), или (M118F), или (M118G), или (M118H), или (M118I), или (M118K), или (M118L), или (M118N), или (M118P), или (M118Q), или (M118S), или (M118T), или (M118V), или (M118W), или (M118Y), или (M177A), или (M177C), или
25 (M177C, V178Y), или (M177D), или (M177E), или (M177F), или (M177G), или (M177H), или (M177I), или (M177K), или (M177L), или (M177N), или (M177P), или (M177Q), или (M177R), или (M177T), или (M177V), или (M177Y), или (M177Y, A184W), или (M177Y, A184Y), или (M177Y, M185V), или (M177Y, R50S), или (M177Y, V178P), или (M177Y, V178P, A184Y, L188F), или (M177Y, V178W), или (M177Y, V178W, A184Y), или (M177Y, V178W, A184Y, L188F),
30 или (M185C), или (M185D), или (M185E), или (M185G), или (M185H), или (M185K), или (M185L), или (M185N), или (M185Q), или (M185R), или (M185V), или (M185Y), или (M212A), или (M212C), или (M212C, I259L), или (M212D), или (M212E), или (M212F), или (M212G), или (M212H), или (M212K), или (M212L),

или (M212L, I259F), или (M212P), или (M212Q), или (M212R), или (M212S), или (M212T), или (M212V), или (M212W), или (M212Y), или (M354A), или (M354C), или (M354D), или (M354E), или (M354G), или (M354I), или (M354K), или (M354K, D363Y), или (M354L), или (M354N), или (M354Q), или (M354R), или (M354S), или (M354T), или (M354V), или (M354W), или (M354Y), или (N70A), или (N70C), или (N70F), или (N70G), или (N70H), или (N70K), или (N70R), или (N70W), или (N70Y), или (P243T, H266L), или (P326C), или (P326D), или (P326G), или (P326N), или (P326S), или (P326T), или (P329A), или (P329C), или (P329G), или (P329K), или (P329S), или (P329T), или (P392C), или (P392G), или (P392Q), или (P392R), или (P392V), или (P9S), или (R147C, H266G), или (R161C, G271D), или (R190L, F261V), или (R203C), или (R255A), или (R255F), или (R255G), или (R255I), или (R255K), или (R255L), или (R255M), или (R255N), или (R255P), или (R255T), или (R255W), или (R323C), или (R47A), или (R47C), или (R47D), или (R47E), или (R47F), или (R47G), или (R47H), или (R47H, A74W), или (R47I), или (R47K), или (R47L), или (R47M), или (R47N), или (R47P), или (R47Q), или (R47S), или (R47T), или (R47V), или (R47W), или (R50A), или (R50C), или (R50D), или (R50E), или (R50F), или (R50G), или (R50I), или (R50L), или (R50M), или (R50N), или (R50P), или (R50Q), или (R50S), или (R50S, A184W, L188F), или (R50S, A74I, A184W, L188F), или (R50S, A74M, A184Y, L188K), или (R50S, A74T, L181Y, A184D, L188K, G240R), или (R50S, A74V), или (R50S, M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184W), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A330R), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A74V, G677D), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, H266S), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181P), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188K), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, T146F), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, V26N), или (R50S, M177Y, V178W, L181Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, T146F, M177Y, V178W, A184Y), или (R50V), или (R50Y), или (S164N, F261L), или (S176A, A184Y, L188K), или (S176C), или (S176D), или (S176E), или (S176F), или (S176G), или (S176H), или (S176K), или (S176L), или (S176M), или (S176N), или (S176P), или (S176Q), или (S176R), или (S72C, A74C), или (S72C, A74I), или

(S72C, A74L), или (S72C, A74V), или (S72C, A74Y), или (S72D, A74C), или (S72D, A74F), или (S72G), или (S72G, A74C), или (S72G, A74F), или (S72G, A74H), или (S72G, A74I), или (S72G, A74I, A184W, L188F), или (S72G, A74I, F77A, M177Y), или (S72G, A74I, F77L), или (S72G, A74I, F77L, M177Y), или (S72G, A74I, L181Y), или (S72G, A74I, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, L188F), или (S72G, A74I, L188K), или (S72G, A74I, L188R), или (S72G, A74I, T146F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74I, V178P), или (S72G, A74I, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178P, L188F), или (S72G, A74I, V178P, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L188R), или (S72G, A74I, V178W), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178W, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L188R), или (S72G, A74L), или (S72G, A74M, A184Y, L188K), или (S72G, A74S), или (S72G, A74T), или (S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, L188F), или (S72G, A74T, L188K), или (S72G, A74T, L188R), или (S72G, A74T, T146F), или (S72G, A74T, T146F, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, L188F), или (S72G, A74T, T146F, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178P), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188F),

или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74T, V178P), или (S72G, A74T, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188R), или (S72G, A74T, V178W), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188R), или (S72G, A74V), или (S72G, A74V, A184W), или (S72G, A74V, A221V), или (S72G, A74V, F77A), или (S72G, A74V, F77A, M177Y), или (S72G, A74V, F77L, M177Y), или (S72G, A74V, F77S), или (S72G, A74V, L181Y), или (S72G, A74V, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, L188F), или (S72G, A74V, L188K), или (S72G, A74V, L188R), или (S72G, A74V, T146F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V, V178P), или (S72G, A74V, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178P, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178W), или (S72G, A74V, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178W,

L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178W, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L188R), или (S72G, A74Y), или (S72G, L181Y), или (S72G, L181Y, L188F), или (S72G, L181Y, L188K), или (S72G, L181Y, L188R), или (S72G, L188F), или (S72G, L188K), или (S72G, L188R), или (S72G, M177Y, V178W), или (S72G, M177Y, V178W, L188K), или (S72G, T146F), или (S72G, T146F, L181Y), или (S72G, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, L188F), или (S72G, T146F, L188K), или (S72G, T146F, L188R), или (S72G, T146F, V178P), или (S72G, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, V178P, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L188R), или (S72G, T146F, V178W), или (S72G, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188R), или (S72G, V178P), или (S72G, V178P, L181Y), или (S72G, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, V178P, L188F), или (S72G, V178P, L188K), или (S72G, V178P, L188R), или (S72G, V178W), или (S72G, V178W, L181Y), или (S72G, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, V178W, L188F), или (S72G, V178W, L188K), или (S72G, V178W, L188R), или (S72H, A74C), или (S72H, A74G), или (S72H, A74S), или (S72H, A74Y), или (S72N, A74C), или (S72N, A74I), или (S72N, A74N), или (S72N, A74V), или (S72T), или (S72W), или (S72W, A74I, A184W, L188F), или (S72W, A74V), или (S72W, L333R), или (S72W, W90Y, V299G), или (S72Y, A74V), или (S89C), или (S89E), или (S89G), или (S89I), или (S89L), или (S89M), или (S89N), или (S89Q), или (S89R), или (S89T), или (S89V), или (T146A), или (T146A, D222Y, I263M), или (T146A, F173D), или (T146A, F173V), или (T146A, F205G), или (T146A, F261C), или (T146A, F261S), или (T146A, F261V), или (T146A, G271R), или (T146A, G271S), или (T146A, G271T), или (T146A, H266T), или (T146A, H266V), или (T146A, I258T, I259S), или (T146A, I259H), или (T146A, I263F), или (T146A, I263L), или (T146A, I263N), или (T146A, I263V), или (T146A, L150A), или (T146A, L150G), или (T146A, L150K), или (T146A, L150R, F173I), или (T146A, L272H), или (T146A, L272R),

или (T146A, L272S), или (T146A, L272W), или (T146A, M212A), или (T146C),
или (T146D), или (T146E), или (T146F), или (T146F, L181Y), или (T146F, L181Y,
L188F), или (T146F, L181Y, L188K), или (T146F, L188K), или (T146F, L188R),
или (T146F, V178P), или (T146F, V178P, L181Y, L188R), или (T146F, V178P,
5 L188K), или (T146F, V178P, L188R), или (T146F, V178W), или (T146F, V178W,
L181Y, L188R), или (T146F, V178W, L188F), или (T146F, V178W, L188K), или
(T146F, V178W, L188R), или (T146G), или (T146H), или (T146L), или (T146M),
или (T146N), или (T146P), или (T146R), или (T146S), или (T146V), или (T146V,
A191T), или (T146Y), или (T149P), или (T260A), или (T260S), или (T260W), или
10 (T268A), или (T268S), или (T269K), или (T327A), или (T327A, A330W), или
(T327C), или (T327D), или (T327E), или (T327G), или (T327I), или (T327L), или
(T327M), или (T327N), или (T327P), или (T327Q), или (T327S), или (T327V), или
(T365A), или (T365C), или (T365D), или (T365F), или (T365G), или (T365H), или
(T365I), или (T365K), или (T365L), или (T365N), или (T365P), или (T365Q), или
15 (T365V), или (T365W), или (T365Y), или (T436A), или (T436C), или (T436D), или
(T436E), или (T436F), или (T436G), или (T436H), или (T436I), или (T436K), или
(T436L), или (T436M), или (T436N), или (T436P), или (T436Q), или (T436R), или
(T436S), или (T436V), или (T436W), или (T436Y), или (T438A), или (T438C), или
(T438G), или (T438I), или (T438L), или (T438S), или (T438V), или (T49A), или
20 (T49C), или (T49D), или (T49E), или (T49F), или (T49G), или (T49H), или (T49I),
или (T49K), или (T49L), или (T49L, S54N), или (T49M), или (T49N), или (T49P),
или (T49Q), или (T49R), или (T49R, R50C), или (T49R, R50S, M177Y, V178W,
A184Y), или (T49S), или (T49V), или (T49W), или (T49Y), или (T88A), или
(T88C), или (T88S), или (T88V), или (V178A), или (V178D), или (V178F), или
25 (V178H), или (V178I), или (V178K), или (V178L), или (V178M), или (V178N),
или (V178P), или (V178P, L181Y), или (V178P, L181Y, L188R), или (V178P,
L188F), или (V178P, L188K), или (V178P, L188R), или (V178Q), или (V178R),
или (V178S), или (V178T), или (V178W), или (V178W, A184Y), или (V178W,
L181Y, L188K), или (V178W, L181Y, L188R), или (V178W, L188R), или (V178W,
30 R50S), или (V178Y), или (V26A), или (V26C), или (V26E), или (V26F), или
(V26G), или (V26G, R47S), или (V26H), или (V26I), или (V26K), или (V26L), или
(V26M), или (V26N), или (V26N, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (V26Q),
или (V26R), или (V26S), или (V26T), или (V26W), или (V26Y), или (V314A), или
(V314E), или (V314F), или (V314H), или (V314P), или (V314Q), или (V314S), или

(V314Y), или (V371P), или (V48A), или (V48D), или (V48E), или (V48F), или (V48G), или (V48H), или (V48I), или (V48L), или (V48M), или (V48P), или (V48Q), или (V48R), или (V48S), или (V48T), или (V48W), или (V48Y), или (W325A), или (W325C), или (W325D), или (W325E), или (W325F), или (W325G),
5 или (W325I), или (W325K), или (W325L), или (W325M), или (W325Q), или (W325R), или (W325S), или (W325T), или (W325V), или (W325Y), или (W90D), или (W90Y), или (W90Y, V299G, G570D), или (Y51A), или (Y51C), или (Y51E), или (Y51F), или (Y51G), или (Y51H), или (Y51I), или (Y51L), или (Y51M), или (Y51N), или (Y51P), или (Y51Q), или (Y51S), или (Y51S, F77V), или (Y51T), или
10 (Y51V), или (Y51W), или (A225C), или (A225G), или (A225M), или (A225N), или (A225Q), или (A225S), или (A225T), или (A225V), или (A225Y), или (A44G), или (A44Q), или (A44T), или (D182A), или (D182C), или (D182E), или (D182H), или (D182I), или (D182M), или (D182N), или (D182V), или (D182W), или (D80C), или (D80L), или (D80M), или (D80N), или (D80S), или (D80T), или (D80W), или
15 (E140A), или (E140D), или (E140K), или (E140L), или (E140M), или (E140T), или (E183D), или (E183T), или (E337L), или (E337V), или (E409N), или (G114C), или (G114K), или (G114L), или (G114N), или (G114W), или (G227N), или (G227R), или (G240A), или (G240C), или (G240H), или (G240K), или (G240M), или (G240N), или (G240Q), или (G240R), или (G240S), или (G240V), или (G46T), или
20 (H236A), или (H236C), или (H236D), или (H236F), или (H236G), или (H236I), или (H236K), или (H236M), или (H236P), или (H236R), или (H236S), или (H236Y), или (H92F), или (H92Y), или (I174T), или (I174V), или (I258C), или (I258L), или (I258M), или (I258V), или (K187A), или (K187G), или (K187N), или (K187R), или (K440C), или (K440M), или (K440N), или (K440T), или (K76C), или (K76E), или
25 (K76F), или (K76H), или (K76I), или (K76L), или (K76N), или (K76V), или (M5C), или (M5E), или (M5P), или (M5Q), или (N186A), или (N186D), или (N186E), или (N186F), или (N186H), или (N186K), или (N186L), или (N186M), или (N186Q), или (N186T), или (N186V), или (N186Y), или (P172A), или (P172D), или (P172G), или (Q189E), или (Q189I), или (Q189K), или (Q189N), или (Q189V),
30 или (Q397R), или (Q403K), или (Q403R), или (Q404F), или (Q404Y), или (Q73A), или (Q73E), или (Q73F), или (Q73L), или (Q73S), или (Q73T), или (Q73W), или (Q73Y), или (R179A), или (R179H), или (R179L), или (R179M), или (R179P), или (R179V), или (R190C), или (R190G), или (R190K), или (R190M), или (R190N), или (R190S), или (R190V), или (R190W), или (R79E), или (R79K), или (S270A),

или (S270D), или (S270G), или (S53C), или (T175F), или (T175G), или (T175H),
 или (T175L), или (T175M), или (T175N), или (T175Q), или (T175R), или (T175Y),
 или (T269A), или (T269V), или (V299L), или (V299W), или (A225V, H236K,
 G240V, T269V), или (D80I, D182H, A225V, G240V, T269V), или (F173W, R179L,
 5 R190V, A225V), или (F173W, R179L, R190V, K440C), или (F173W, R179L,
 T269V, K440C), или (F173W, R190V, H236K, T269V), или (H236K, G240V,
 T269V, K440C), или (K76I, F173W, R179L, D182I, R190V, K440C), или (Q73W,
 D80I, N186V, G240V), или (R179L, A225S), или (R179L, A225V, G240V, K440C),
 или (R179L, R190V), или (R190V, A225V, T269V, K440C), или (T175M, H236D),
 10 или (T175M, R190V).

Неожиданно было обнаружено, что варианты в соответствии с **шестым**
вариантом осуществления демонстрируют улучшенный выход продукта или
 титр, или селективность C19-гидроксилирования, тем самым дополнительно
 улучшая эффективность процесса C19-гидроксилирования по сравнению с
 15 исходным вариантом.

Обеспечивается **первая предпочтительная подгруппа**, которая включает
 варианты в соответствии с шестым вариантам осуществления, где варианты
 P450-ВМ3 имеют улучшенный выход продукта или титр продукта для C19-
 гидроксилирования по сравнению с исходным вариантом. Эта подгруппа
 20 включает варианты, которые включали, по крайней мере, мутацию(и) (A184D),
 или (A184D, L188K), или (A184E), или (A184F), или (A184G), или (A184H), или
 (A184I), или (A184K), или (A184L), или (A184N), или (A184Q), или (A184R), или
 (A184W), или (A184W, L188F), или (A184Y), или (A184Y, L188K), или (A184Y,
 R50S), или (A221S), или (A264V), или (A321C), или (A321D), или (A321E), или
 25 (A321G), или (A321I), или (A321N), или (A321T), или (A321V), или (A330C), или
 (A330D), или (A330E), или (A330F), или (A330G), или (A330H), или (A330I), или
 (A330K), или (A330L), или (A330M), или (A330N), или (A330Q), или (A330R),
 или (A330S), или (A330T), или (A330T, E352A), или (A330V), или (A330W), или
 (A330Y), или (A330Y, W367C), или (A33V), или (A399C), или (A399E), или
 30 (A399G), или (A399I), или (A399L), или (A399M), или (A399N), или (A399Q),
 или (A399R), или (A399S), или (A399T), или (A399V), или (A74C), или (A74C,
 L75V), или (A74D), или (A74D, F81V), или (A74E), или (A74F), или (A74H), или
 (A74I), или (A74I, A184W, L188F), или (A74I, F77A, L181Y, A184W), или (A74I,
 L181Y, L188R), или (A74I, L188F), или (A74I, L188K), или (A74I, L188R), или

(A74I, M177Y, A184R, L188F), или (A74I, M177Y, V178P, A184G), или (A74I, T146F), или (A74I, T146F, L181Y), или (A74I, T146F, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, L188F), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188R), или (A74I, T146F, V178W), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, V178W, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L188K), или (A74I, T146F, V178W, L188R), или (A74I, V178P), или (A74I, V178P, L181Y), или (A74I, V178P, L181Y, L188R), или (A74I, V178P, L188F), или (A74I, V178P, L188K), или (A74I, V178P, L188R), или (A74I, V178W, L188F), или (A74I, V178W, L188R), или (A74K), или (A74L), или (A74M), или (A74N), или (A74P), или (A74Q), или (A74R), или (A74R, L75V), или (A74S), или (A74T), или (A74T, A184D), или (A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, F77A, V178W, A184Y), или (A74T, F77L, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y), или (A74T, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y, A184Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188R), или (A74T, L188K), или (A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188R), или (A74T, T146F, L188F), или (A74T, T146F, L188K), или (A74T, T146F, L188R), или (A74T, T146F, V178P), или (A74T, T146F, V178P, L181Y), или (A74T, T146F, V178P, L188K), или (A74T, T146F, V178P, L188R), или (A74T, T146F, V178W), или (A74T, T146F, V178W, L181Y), или (A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, V178W, L188R), или (A74T, V178P), или (A74T, V178P, L188F), или (A74T, V178P, L188K), или (A74T, V178P, L188R), или (A74T, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, V178W, L188K), или (A74V), или (A74V, F77A, A184N, L188F), или (A74V, L181Y), или (A74V, L181Y, A184D, L188K), или (A74V, L181Y, A184W, L188F), или (A74V, L181Y, L188F), или (A74V, L188F), или (A74V, L188K), или (A74V, L75V), или (A74V, T146F, L181Y, L188K), или (A74V, T146F, L181Y, L188R), или (A74V, T146F, L188K), или (A74V, T146F, L188R), или (A74V, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, A184W, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, L181Y, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188R), или (A74V, V178P, L188F), или (A74V, V178W, L188K), или (A74W), или (A74Y), или (D363G, T438C), или (E13D,

R47L), или (E143A), или (E143C), или (E143D), или (E143F), или (E143G), или (E143I), или (E143K), или (E143L), или (E143M), или (E143N), или (E143P), или (E143Q), или (E143R), или (E143S), или (E143V), или (E143W), или (E143Y), или (E267D), или (E267R), или (E267T), или (E352A), или (E352D), или (E352F), или (E352G), или (E352I), или (E352L), или (E352M), или (E352N), или (E352P), или (E352R), или (E352S), или (E352T), или (E352V), или (E352W), или (E352Y), или (E64A), или (E64G), или (E64H), или (E64K), или (E64L), или (E64M), или (E64N), или (E64Q), или (E64V), или (E64Y), или (E82P), или (E93G), или (F173C), или (F173C, F205G), или (F173D), или (F173I), или (F173K), или (F173L), или (F173M), или (F173N), или (F173P), или (F173Q), или (F173R), или (F173S), или (F173S, F205P), или (F173V), или (F173W), или (F173Y), или (F173Y, I174F), или (F205A), или (F205C), или (F205D), или (F205D, D208N), или (F205E), или (F205G), или (F205H), или (F205I), или (F205K), или (F205L), или (F205M), или (F205N), или (F205P), или (F205R), или (F205S), или (F205T), или (F205V), или (F205W), или (F205Y), или (F261A), или (F261C), или (F261D), или (F261G), или (F261I), или (F261L), или (F261M), или (F261Q), или (F261S), или (F261T), или (F261V), или (F261Y), или (F331H), или (F331I), или (F331L), или (F331M), или (F331V), или (F331W), или (F331Y), или (F393M), или (F393W), или (F77A), или (F77A, A184W), или (F77A, L181P, A184Y, L188K), или (F77A, M177Y), или (F77C), или (F77D), или (F77E), или (F77G), или (F77H), или (F77I), или (F77K), или (F77L), или (F77M), или (F77N), или (F77P), или (F77R), или (F77S), или (F77T), или (F77V), или (F77V, L86M), или (F77W), или (F77Y), или (F81D), или (F81I), или (F81L), или (F81R), или (F81S), или (F81V), или (F81W), или (F81Y), или (G271A), или (G271C), или (G271D), или (G271E), или (G271F), или (G271H), или (G271K), или (G271L), или (G271M), или (G271N), или (G271P), или (G271Q), или (G271S), или (G271T), или (G271V), или (G271W), или (G271Y), или (G402A), или (G415A), или (G415D), или (G415S), или (G415T), или (G415V), или (G85A), или (G85L), или (G85S), или (H266A), или (H266C), или (H266E), или (H266F), или (H266I), или (H266K), или (H266M), или (H266N), или (H266Q), или (H266S), или (H266V), или (H266W), или (H266Y), или (I153F, G271L), или (I153L), или (I153L, F173Y), или (I259A), или (I259C), или (I259D), или (I259F), или (I259H), или (I259K), или (I259L), или (I259M), или (I259N), или (I259Q), или (I259S), или (I259T), или (I259V), или (I263A), или (I263C), или (I263E), или (I263F), или (I263H, A264G), или (I263K), или (I263L),

или (I263M), или (I263N), или (I263Q), или (I263S), или (I263V), или (I263Y),
или (I401A), или (I401M), или (I401T), или (I401V), или (K210E), или (K210T,
G271V), или (K224C), или (K224E), или (K224H), или (K224I), или (K224L), или
(K224M), или (K224P), или (K224Q), или (K224W), или (K224Y), или (L150A),
5 или (L150C), или (L150D), или (L150E), или (L150F), или (L150G), или (L150H),
или (L150I), или (L150K), или (L150M), или (L150N), или (L150Q), или (L150R),
или (L150R, F205R), или (L150S), или (L150S, F173L), или (L150T), или (L150V),
или (L150W), или (L150Y), или (L181H), или (L181I), или (L181M), или (L181P),
или (L181V), или (L181Y), или (L181Y, A184D), или (L181Y, L188F), или
10 (L181Y, L188K), или (L181Y, L188K, H659R), или (L188A), или (L188D), или
(L188E), или (L188F), или (L188H), или (L188I), или (L188K), или (L188M), или
(L188N), или (L188Q), или (L188R), или (L188S), или (L188W), или (L20C), или
(L20D), или (L20E), или (L20F), или (L20G), или (L20G, R47L), или (L20I), или
(L20M), или (L20N), или (L20P), или (L20R), или (L20S), или (L20T), или
15 (L20V), или (L20W), или (L20Y), или (L262I), или (L262V), или (L262W), или
(L272A), или (L272C), или (L272E), или (L272F), или (L272G), или (L272I), или
(L272K), или (L272M), или (L272N), или (L272Q), или (L272S), или (L272T), или
(L272V), или (L272W), или (L272Y), или (L29A), или (L29C), или (L29D), или
(L29F), или (L29H), или (L29I), или (L29M), или (L29M, R47G), или (L29Q), или
20 (L29S), или (L29T), или (L29V), или (L29W), или (L29Y), или (L324F), или
(L356C), или (L356F), или (L356I), или (L356M), или (L356V), или (L437I), или
(L437M), или (L75I), или (L75I, F81C), или (L75I, F81I), или (L75I, F81L), или
(L75I, F81S), или (L75I, F81V), или (L75V), или (L75V, F81C), или (L75V, F81L),
или (L75V, F81V), или (L75V, F81Y), или (L78F), или (L78I), или (L78M), или
25 (L78V), или (L86I), или (L86I, S89T), или (L86M), или (L86M, S89T), или (L86V),
или (M118A), или (M118E), или (M118F), или (M118G), или (M118H), или
(M118I), или (M118K), или (M118L), или (M118N), или (M118P), или (M118Q),
или (M118S), или (M118T), или (M118V), или (M118W), или (M118Y), или
(M177A), или (M177C), или (M177C, V178Y), или (M177D), или (M177E), или
30 (M177F), или (M177G), или (M177H), или (M177I), или (M177L), или (M177N),
или (M177P), или (M177Q), или (M177R), или (M177T), или (M177V), или
(M177Y), или (M177Y, A184W), или (M177Y, A184Y), или (M177Y, M185V), или
(M177Y, R50S), или (M177Y, V178P), или (M177Y, V178P, A184Y, L188F), или
(M177Y, V178W), или (M177Y, V178W, A184Y), или (M177Y, V178W, A184Y,

L188F), или (M185C), или (M185D), или (M185E), или (M185G), или (M185H),
 или (M185K), или (M185L), или (M185N), или (M185Q), или (M185V), или
 (M212A), или (M212C), или (M212D), или (M212E), или (M212F), или (M212G),
 или (M212H), или (M212K), или (M212L), или (M212L, I259F), или (M212Q), или
 5 (M212R), или (M212S), или (M212T), или (M212V), или (M212W), или (M212Y),
 или (M354A), или (M354C), или (M354D), или (M354E), или (M354G), или
 (M354I), или (M354K), или (M354K, D363Y), или (M354L), или (M354N), или
 (M354Q), или (M354R), или (M354S), или (M354T), или (M354V), или (M354W),
 или (M354Y), или (N70A), или (N70C), или (N70F), или (N70G), или (N70H), или
 10 (N70K), или (N70R), или (N70Y), или (P243T, H266L), или (P329A), или (P392C),
 или (P392G), или (P392Q), или (P392R), или (P392V), или (P9S), или (R147C,
 H266G), или (R161C, G271D), или (R190L, F261V), или (R203C), или (R255A),
 или (R255G), или (R255I), или (R255K), или (R255L), или (R255M), или (R255N),
 или (R255P), или (R255T), или (R255W), или (R47A), или (R47C), или (R47D),
 15 или (R47E), или (R47F), или (R47G), или (R47H), или (R47H, A74W), или (R47I),
 или (R47K), или (R47L), или (R47M), или (R47N), или (R47P), или (R47Q), или
 (R47S), или (R47T), или (R47V), или (R47W), или (R50A), или (R50C), или
 (R50D), или (R50E), или (R50F), или (R50G), или (R50I), или (R50L), или
 (R50M), или (R50N), или (R50P), или (R50Q), или (R50S), или (R50S, A184W,
 20 L188F), или (R50S, A74I, A184W, L188F), или (R50S, A74M, A184Y, L188K), или
 (R50S, A74T, L181Y, A184D, L188K, G240R), или (R50S, A74V), или (R50S,
 M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184W), или (R50S,
 M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A330R), или (R50S,
 M177Y, V178W, A184Y, A74V, G677D), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y,
 25 L181P), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181Y), или (R50S, M177Y, V178W,
 A184Y, L188K), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, M177Y,
 V178W, A184Y, T146F), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, V26N), или (R50S,
 M177Y, V178W, L181Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V), или (R50S, S72G,
 A74V, M177Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178P, A184Y), или
 30 (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y,
 V178W, A184Y, L188R), или (R50S, T146F, M177Y, V178W, A184Y), или (R50V),
 или (R50Y), или (S176A, A184Y, L188K), или (S176C), или (S176D), или (S176E),
 или (S176F), или (S176G), или (S176H), или (S176K), или (S176L), или (S176M),
 или (S176N), или (S176P), или (S176Q), или (S72C, A74C), или (S72C, A74I), или

(S72C, A74L), или (S72C, A74V), или (S72D, A74C), или (S72G), или (S72G, A74C), или (S72G, A74F), или (S72G, A74H), или (S72G, A74I), или (S72G, A74I, A184W, L188F), или (S72G, A74I, F77A, M177Y), или (S72G, A74I, F77L), или (S72G, A74I, F77L, M177Y), или (S72G, A74I, L181Y), или (S72G, A74I, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, L188F), или (S72G, A74I, L188K), или (S72G, A74I, L188R), или (S72G, A74I, T146F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74I, V178P), или (S72G, A74I, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178P, L188F), или (S72G, A74I, V178P, L188R), или (S72G, A74I, V178W), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178W, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L188R), или (S72G, A74L), или (S72G, A74M, A184Y, L188K), или (S72G, A74S), или (S72G, A74T), или (S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, L188F), или (S72G, A74T, L188K), или (S72G, A74T, L188R), или (S72G, A74T, T146F), или (S72G, A74T, T146F, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, L188F), или (S72G, A74T, T146F, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178P), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W), или (S72G, A74T,

T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188F), или
 (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W,
 L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74T,
 T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188R), или (S72G,
 5 A74T, V178P), или (S72G, A74T, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, V178P,
 L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74T,
 V178P, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L188K), или (S72G, A74T, V178P,
 L188R), или (S72G, A74T, V178W), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188F),
 или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188F), или
 10 (S72G, A74T, V178W, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188R), или (S72G,
 A74V), или (S72G, A74V, A184W), или (S72G, A74V, A221V), или (S72G, A74V,
 F77A), или (S72G, A74V, F77A, M177Y), или (S72G, A74V, F77L, M177Y), или
 (S72G, A74V, F77S), или (S72G, A74V, L181Y), или (S72G, A74V, L181Y,
 L188F), или (S72G, A74V, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, L188F), или (S72G,
 15 A74V, L188K), или (S72G, A74V, L188R), или (S72G, A74V, T146F), или (S72G,
 A74V, T146F, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188F), или (S72G,
 A74V, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188R), или
 (S72G, A74V, T146F, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L188K), или (S72G,
 A74V, T146F, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P), или (S72G, A74V,
 20 T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188F), или
 (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P,
 L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74V,
 T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188R), или (S72G,
 A74V, T146F, V178W), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y), или (S72G,
 25 A74V, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y,
 L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74V, T146F,
 V178W, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V,
 V178P), или (S72G, A74V, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, V178P, L181Y,
 L188F), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178P,
 30 L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178P, L188F), или (S72G, A74V, V178P,
 L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178W), или
 (S72G, A74V, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188F), или
 (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188R),
 или (S72G, A74V, V178W, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L188K), или (S72G,

A74V, V178W, L188R), или (S72G, A74Y), или (S72G, L181Y), или (S72G, L181Y, L188F), или (S72G, L181Y, L188K), или (S72G, L181Y, L188R), или (S72G, L188F), или (S72G, L188K), или (S72G, L188R), или (S72G, M177Y, V178W), или (S72G, M177Y, V178W, L188K), или (S72G, T146F), или (S72G, T146F, L181Y), или (S72G, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, L188F), или (S72G, T146F, L188K), или (S72G, T146F, L188R), или (S72G, T146F, V178P), или (S72G, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, V178P, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L188K), или (S72G, T146F, V178W), или (S72G, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188R), или (S72G, V178P), или (S72G, V178P, L181Y), или (S72G, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, V178P, L188F), или (S72G, V178P, L188K), или (S72G, V178P, L188R), или (S72G, V178W), или (S72G, V178W, L181Y), или (S72G, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, V178W, L188F), или (S72G, V178W, L188K), или (S72G, V178W, L188R), или (S72H, A74C), или (S72N, A74C), или (S72N, A74I), или (S72N, A74V), или (S72W), или (S72W, A74V), или (S89C), или (S89E), или (S89G), или (S89I), или (S89L), или (S89N), или (S89Q), или (S89R), или (S89T), или (S89V), или (T146A), или (T146A, D222Y, I263M), или (T146A, F173D), или (T146A, F173V), или (T146A, F205G), или (T146A, F261C), или (T146A, F261S), или (T146A, F261V), или (T146A, G271S), или (T146A, G271T), или (T146A, H266V), или (T146A, I258T, I259S), или (T146A, I259H), или (T146A, I263F), или (T146A, I263L), или (T146A, I263N), или (T146A, I263V), или (T146A, L150A), или (T146A, L150G), или (T146A, L150K), или (T146A, L150R, F173I), или (T146A, L272H), или (T146A, L272S), или (T146A, L272W), или (T146A, M212A), или (T146C), или (T146D), или (T146E), или (T146F), или (T146F, L181Y), или (T146F, L181Y, L188F), или (T146F, L181Y, L188K), или (T146F, L188K), или (T146F, L188R), или (T146F, V178P), или (T146F, V178P, L181Y, L188R), или (T146F, V178P, L188K), или (T146F, V178P, L188R), или (T146F, V178W), или (T146F, V178W, L181Y,

L188R), или (T146F, V178W, L188F), или (T146F, V178W, L188K), или (T146F,
 V178W, L188R), или (T146G), или (T146H), или (T146L), или (T146M), или
 (T146N), или (T146P), или (T146R), или (T146S), или (T146V), или (T146V,
 A191T), или (T146Y), или (T149P), или (T260W), или (T268A), или (T268S), или
 5 (T269K), или (T327A), или (T327A, A330W), или (T327C), или (T327D), или
 (T327E), или (T327I), или (T327L), или (T327M), или (T327N), или (T327P), или
 (T327Q), или (T327S), или (T327V), или (T365C), или (T365D), или (T365F), или
 (T365G), или (T365H), или (T365I), или (T365K), или (T365L), или (T365N), или
 (T365P), или (T365Q), или (T365V), или (T365W), или (T365Y), или (T436A), или
 10 (T436C), или (T436D), или (T436E), или (T436F), или (T436G), или (T436H), или
 (T436I), или (T436K), или (T436L), или (T436M), или (T436N), или (T436P), или
 (T436Q), или (T436R), или (T436S), или (T436V), или (T436W), или (T436Y), или
 (T438A), или (T438C), или (T438I), или (T438S), или (T438V), или (T49A), или
 (T49C), или (T49D), или (T49E), или (T49F), или (T49G), или (T49H), или (T49I),
 15 или (T49K), или (T49L), или (T49L, S54N), или (T49M), или (T49N), или (T49P),
 или (T49Q), или (T49R), или (T49R, R50C), или (T49R, R50S, M177Y, V178W,
 A184Y), или (T49S), или (T49V), или (T49W), или (T49Y), или (T88C), или
 (T88S), или (T88V), или (V178A), или (V178D), или (V178H), или (V178I), или
 (V178K), или (V178L), или (V178M), или (V178N), или (V178P), или (V178P,
 20 L181Y), или (V178P, L181Y, L188R), или (V178P, L188F), или (V178P, L188K),
 или (V178P, L188R), или (V178Q), или (V178R), или (V178S), или (V178T), или
 (V178W), или (V178W, A184Y), или (V178W, L181Y, L188K), или (V178W,
 L181Y, L188R), или (V178W, L188R), или (V178W, R50S), или (V178Y), или
 (V26A), или (V26C), или (V26F), или (V26G), или (V26H), или (V26I), или
 25 (V26K), или (V26L), или (V26M), или (V26N), или (V26N, R50S, M177Y, V178W,
 A184Y), или (V26Q), или (V26S), или (V26T), или (V26W), или (V26Y), или
 (V314A), или (V314E), или (V314F), или (V314H), или (V314P), или (V314Q), или
 (V314S), или (V314Y), или (V371P), или (V48A), или (V48D), или (V48E), или
 (V48F), или (V48G), или (V48H), или (V48I), или (V48L), или (V48M), или
 30 (V48P), или (V48Q), или (V48R), или (V48S), или (V48T), или (V48W), или
 (V48Y), или (W325A), или (W325C), или (W325D), или (W325E), или (W325F),
 или (W325G), или (W325I), или (W325K), или (W325L), или (W325M), или
 (W325Q), или (W325S), или (W325T), или (W325V), или (W325Y), или (W90Y),
 или (Y51A), или (Y51C), или (Y51F), или (Y51H), или (Y51I), или (Y51L), или

(Y51M), или (Y51P), или (Y51S, F77V), или (Y51T), или (Y51V), или (Y51W), или (A225C), или (A225M), или (A225N), или (A225Q), или (A225S), или (A225T), или (A225Y), или (A44Q), или (A44T), или (D182A), или (D182C), или (D182E), или (D182H), или (D182I), или (D182M), или (D182N), или (D182V), или (D182W), или (D80C), или (D80L), или (D80M), или (D80N), или (D80S), или (D80T), или (D80W), или (E140A), или (E140D), или (E140K), или (E140L), или (E140M), или (E140T), или (E183D), или (E337L), или (E337V), или (G114C), или (G114K), или (G114L), или (G114N), или (G114W), или (G227N), или (G227R), или (G240A), или (G240C), или (G240H), или (G240K), или (G240N), или (G240R), или (G240S), или (H236A), или (H236C), или (H236D), или (H236F), или (H236I), или (H236K), или (H236M), или (H236P), или (H236R), или (H236S), или (H92F), или (H92Y), или (I174T), или (I174V), или (I258C), или (I258L), или (I258M), или (I258V), или (K187A), или (K187G), или (K187N), или (K187R), или (K440C), или (K440M), или (K440N), или (K440T), или (K76C), или (K76E), или (K76F), или (K76H), или (K76I), или (K76N), или (K76V), или (M5C), или (M5E), или (M5P), или (N186A), или (N186D), или (N186E), или (N186F), или (N186H), или (N186K), или (N186L), или (N186M), или (N186Q), или (N186T), или (N186V), или (N186Y), или (P172A), или (P172D), или (P172G), или (Q189E), или (Q189I), или (Q189K), или (Q189N), или (Q189V), или (Q397R), или (Q403K), или (Q403R), или (Q404F), или (Q404Y), или (Q73E), или (Q73F), или (Q73L), или (Q73S), или (Q73T), или (Q73W), или (Q73Y), или (R179A), или (R179H), или (R179L), или (R179M), или (R179P), или (R179V), или (R190C), или (R190G), или (R190K), или (R190M), или (R190N), или (R190S), или (R190V), или (R190W), или (R79K), или (S270A), или (S270D), или (S53C), или (T175F), или (T175G), или (T175H), или (T175L), или (T175M), или (T175N), или (T175Q), или (T175R), или (T175Y), или (T269V), или (V299L), или (V299W), или (A225V, H236K, G240V, T269V), или (D80I, D182H, A225V, G240V, T269V), или (F173W, R179L, T269V, K440C), или (F173W, R190V, H236K, T269V), или (H236K, G240V, T269V, K440C), или (Q73W, D80I, N186V, G240V), или (R179L, A225S), или (T175M, H236D), или (T175M, R190V).

Обеспечивается **вторая предпочтительная подгруппа**, которая включает варианты в соответствии с **шестым вариантом осуществления**, где варианты P450-ВМ3 обладают улучшенной селективностью (как определено при использовании КС или СЦП) для С19-гидроксилирования по сравнению с

исходным вариантом (см. Фигуру 1 б). В это подмножество входят варианты, которые включают, по крайней мере, мутацию(и) (A184D) или (A184D, L188K), или (A184E), или (A184F), или (A184G), или (A184H), или (A184I), или (A184K), или (A184L), или (A184N), или (A184Q), или (A184R), или (A184W), или (A184W, L188F), или (A184Y), или (A184Y, L188K), или (A184Y, R50S), или (A221S), или (A264V), или (A321C), или (A321D), или (A321E), или (A321G), или (A321I), или (A321N), или (A321T), или (A321V), или (A328P), или (A330C), или (A330D), или (A330E), или (A330F), или (A330G), или (A330H), или (A330I), или (A330K), или (A330L), или (A330M), или (A330N), или (A330Q), или (A330R), или (A330S), или (A330T), или (A330T, E352A), или (A330T, F331V), или (A330V), или (A330W), или (A330Y), или (A330Y, W367C), или (A33V), или (A399C), или (A399E), или (A399G), или (A399I), или (A399L), или (A399M), или (A399N), или (A399Q), или (A399R), или (A399S), или (A399T), или (A399V), или (A74C), или (A74C, L75V), или (A74D), или (A74D, F81V), или (A74E), или (A74F), или (A74G), или (A74G, L75C), или (A74H), или (A74I), или (A74I, A184W, L188F), или (A74I, F77A, L181Y, A184W), или (A74I, L181Y, L188K), или (A74I, L181Y, L188R), или (A74I, L188F), или (A74I, L188K), или (A74I, L188R), или (A74I, M177Y, A184R, L188F), или (A74I, M177Y, V178P, A184G), или (A74I, T146F), или (A74I, T146F, L181Y), или (A74I, T146F, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, L188F), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188R), или (A74I, T146F, V178W), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, V178W, L188K), или (A74I, T146F, V178W, L188R), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, V178P, L181Y), или (A74I, V178P, L181Y, L188R), или (A74I, V178P, L188F), или (A74I, V178P, L188K), или (A74I, V178P, L188R), или (A74I, V178W, L188F), или (A74I, V178W, L188K), или (A74I, V178W, L188R), или (A74K), или (A74L), или (A74M), или (A74N), или (A74P), или (A74Q), или (A74R), или (A74R, L75V), или (A74S), или (A74T), или (A74T, A184D), или (A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, F77A, V178W, A184Y), или (A74T, F77L, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y), или (A74T, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y, A184Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188R), или (A74T,

L188K), или (A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188R), или (A74T, T146F, L188F), или (A74T, T146F, L188K), или (A74T, T146F, L188R), или (A74T, T146F, V178P), или (A74T, T146F, V178P, L181Y),
 5 или (A74T, T146F, V178P, L188K), или (A74T, T146F, V178P, L188R), или (A74T, T146F, V178W), или (A74T, T146F, V178W, L181Y), или (A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, V178W, L188R), или (A74T, V178P), или (A74T, V178P, L188F), или (A74T, V178P, L188K), или (A74T, V178P, L188R),
 10 или (A74T, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, V178W, L188K), или (A74T, V178W, L188R), или (A74V), или (A74V, F77A, A184N, L188F), или (A74V, L181Y), или (A74V, L181Y, A184D, L188K), или (A74V, L181Y, A184W, L188F), или (A74V, L181Y, L188F), или (A74V, L188F), или (A74V, L188K), или (A74V, L75V), или (A74V, T146F, L181Y, L188K), или (A74V, T146F, L181Y, L188R),
 15 или (A74V, T146F, L188K), или (A74V, T146F, L188R), или (A74V, T146F, V178W), или (A74V, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, A184W, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, L181Y, L188K),
 или (A74V, V178P, L181Y, L188R), или (A74V, V178P, L188F), или (A74V, V178W, L188K), или (A74W), или (A74Y), или (D168Y, F173D), или (D363G, T438C), или (E13D, R47L), или (E143A), или (E143C), или (E143D), или (E143F),
 20 или (E143G), или (E143I), или (E143K), или (E143L), или (E143M), или (E143N), или (E143P), или (E143Q), или (E143R), или (E143S), или (E143V), или (E143W), или (E143Y), или (E267A), или (E267C), или (E267D), или (E267G), или (E267K),
 или (E267P), или (E267R), или (E267S), или (E267T), или (E267Y), или (E352A), или (E352D), или (E352F), или (E352G), или (E352I), или (E352L), или (E352M),
 25 или (E352N), или (E352P), или (E352R), или (E352S), или (E352T), или (E352V), или (E352W), или (E352Y), или (E64A), или (E64G), или (E64H), или (E64I), или (E64K), или (E64L), или (E64M), или (E64N), или (E64Q), или (E64V), или (E64W),
 или (E64Y), или (E82P), или (E93G), или (F173C), или (F173C, F205G), или (F173D), или (F173I), или (F173K), или (F173L), или (F173M), или (F173N),
 30 или (F173P), или (F173Q), или (F173R), или (F173S), или (F173S, F205P), или (F173V), или (F173W), или (F173Y), или (F173Y, I174F), или (F205A), или (F205C), или (F205D), или (F205D, D208N), или (F205E), или (F205G), или (F205H), или (F205I), или (F205K), или (F205L), или (F205M), или (F205N), или (F205P), или (F205R), или (F205S), или (F205T), или (F205V), или (F205W), или

(F205Y), или (F261A), или (F261C), или (F261D), или (F261G), или (F261I), или (F261L), или (F261M), или (F261N), или (F261Q), или (F261S), или (F261T), или (F261V), или (F261W), или (F261Y), или (F331C), или (F331H), или (F331I), или (F331L), или (F331M), или (F331N), или (F331P), или (F331T), или (F331V), или (F331W), или (F331Y), или (F393M), или (F393W), или (F77A), или (F77A, A184W), или (F77A, L181P, A184Y, L188K), или (F77A, M177Y), или (F77C), или (F77D), или (F77E), или (F77G), или (F77H), или (F77I), или (F77K), или (F77L), или (F77M), или (F77N), или (F77P), или (F77R), или (F77S), или (F77T), или (F77V), или (F77V, L86M), или (F77W), или (F77Y), или (F81A), или (F81C), или (F81D), или (F81I), или (F81L), или (F81P), или (F81R), или (F81S), или (F81T), или (F81V), или (F81W), или (F81Y), или (G271A), или (G271C), или (G271D), или (G271E), или (G271F), или (G271H), или (G271K), или (G271L), или (G271M), или (G271N), или (G271P), или (G271Q), или (G271R), или (G271S), или (G271T), или (G271V), или (G271W), или (G271Y), или (G402A), или (G415A), или (G415D), или (G415S), или (G415T), или (G415V), или (G85A), или (G85L), или (G85S), или (H266A), или (H266C), или (H266D), или (H266E), или (H266F), или (H266G), или (H266I), или (H266K), или (H266M), или (H266N), или (H266P), или (H266Q), или (H266R), или (H266S), или (H266T), или (H266V), или (H266W), или (H266Y), или (I153F, G271L), или (I153L), или (I153L, F173Y), или (I259A), или (I259C), или (I259D), или (I259F), или (I259G), или (I259H), или (I259K), или (I259L), или (I259M), или (I259N), или (I259Q), или (I259S), или (I259T), или (I259V), или (I259W), или (I259Y), или (I263A), или (I263C), или (I263E), или (I263F), или (I263G), или (I263H, A264G), или (I263K), или (I263L), или (I263M), или (I263N), или (I263Q), или (I263S), или (I263T), или (I263V), или (I263Y), или (I401A), или (I401L), или (I401M), или (I401T), или (I401V), или (K210E), или (K210T, G271V), или (K224C), или (K224E), или (K224F), или (K224H), или (K224I), или (K224L), или (K224M), или (K224P), или (K224Q), или (K224W), или (K224Y), или (L150A), или (L150C), или (L150D), или (L150E), или (L150F), или (L150G), или (L150H), или (L150I), или (L150K), или (L150M), или (L150N), или (L150Q), или (L150R), или (L150R, F205R), или (L150S), или (L150S, F173L), или (L150T), или (L150V), или (L150W), или (L150Y), или (L181H), или (L181I), или (L181M), или (L181P), или (L181V), или (L181Y), или (L181Y, A184D), или (L181Y, L188F), или (L181Y, L188K), или (L181Y, L188K, H659R), или (L188A), или (L188D), или (L188E), или (L188F), или (L188H), или

(L188I), или (L188K), или (L188M), или (L188N), или (L188Q), или (L188R), или (L188S), или (L188W), или (L20C), или (L20D), или (L20E), или (L20F), или (L20G), или (L20G, R47L), или (L20I), или (L20M), или (L20N), или (L20P), или (L20R), или (L20S), или (L20T), или (L20V), или (L20W), или (L20Y), или (L262I), или (L262V), или (L262W), или (L262Y), или (L272A), или (L272C), или (L272E), или (L272F), или (L272G), или (L272I), или (L272K), или (L272M), или (L272N), или (L272Q), или (L272R), или (L272S), или (L272T), или (L272V), или (L272W), или (L272Y), или (L29A), или (L29C), или (L29D), или (L29F), или (L29H), или (L29I), или (L29M), или (L29M, R47G), или (L29P), или (L29Q), или (L29S), или (L29T), или (L29V), или (L29W), или (L29Y), или (L324F), или (L356C), или (L356F), или (L356H), или (L356I), или (L356M), или (L356N), или (L356Q), или (L356S), или (L356T), или (L356V), или (L356W), или (L437I), или (L437M), или (L75H, F81S), или (L75I), или (L75I, F81C), или (L75I, F81G), или (L75I, F81H), или (L75I, F81I), или (L75I, F81L), или (L75I, F81S), или (L75I, F81V), или (L75I, F81Y), или (L75V), или (L75V, F81C), или (L75V, F81H), или (L75V, F81I), или (L75V, F81L), или (L75V, F81V), или (L75V, F81Y), или (L78F), или (L78I), или (L78M), или (L78V), или (L78Y), или (L86A, S89T), или (L86I), или (L86I, S89T), или (L86M), или (L86M, S89T), или (L86N, S89T), или (L86V), или (L86V, S89T), или (M118A), или (M118E), или (M118F), или (M118G), или (M118H), или (M118I), или (M118K), или (M118L), или (M118N), или (M118P), или (M118Q), или (M118S), или (M118T), или (M118V), или (M118W), или (M118Y), или (M177A), или (M177C), или (M177C, V178Y), или (M177D), или (M177E), или (M177F), или (M177H), или (M177I), или (M177K), или (M177L), или (M177N), или (M177P), или (M177Q), или (M177R), или (M177T), или (M177V), или (M177Y), или (M177Y, A184W), или (M177Y, A184Y), или (M177Y, M185V), или (M177Y, R50S), или (M177Y, V178P), или (M177Y, V178P, A184Y, L188F), или (M177Y, V178W), или (M177Y, V178W, A184Y), или (M177Y, V178W, A184Y, L188F), или (M185C), или (M185D), или (M185E), или (M185G), или (M185H), или (M185K), или (M185L), или (M185N), или (M185Q), или (M185R), или (M185V), или (M185Y), или (M212A), или (M212C), или (M212C, I259L), или (M212D), или (M212E), или (M212F), или (M212G), или (M212H), или (M212K), или (M212L), или (M212L, I259F), или (M212P), или (M212Q), или (M212R), или (M212S), или (M212T), или (M212V), или (M212W), или (M212Y), или (M354A), или (M354C), или (M354D), или

(M354E), или (M354G), или (M354I), или (M354K), или (M354K, D363Y), или (M354L), или (M354N), или (M354Q), или (M354R), или (M354S), или (M354T), или (M354V), или (M354W), или (M354Y), или (N70A), или (N70C), или (N70F), или (N70G), или (N70H), или (N70K), или (N70R), или (N70W), или (N70Y), или (P243T, H266L), или (P326C), или (P326D), или (P326G), или (P326N), или (P326S), или (P326T), или (P329A), или (P329C), или (P329G), или (P329K), или (P329S), или (P329T), или (P392C), или (P392G), или (P392Q), или (P392R), или (P392V), или (P9S), или (R147C, H266G), или (R161C, G271D), или (R190L, F261V), или (R203C), или (R255A), или (R255F), или (R255G), или (R255I), или (R255K), или (R255L), или (R255M), или (R255N), или (R255P), или (R255T), или (R255W), или (R323C), или (R47A), или (R47C), или (R47D), или (R47E), или (R47F), или (R47G), или (R47H), или (R47H, A74W), или (R47I), или (R47K), или (R47L), или (R47M), или (R47N), или (R47P), или (R47Q), или (R47S), или (R47T), или (R47V), или (R47W), или (R50A), или (R50C), или (R50D), или (R50E), или (R50F), или (R50G), или (R50I), или (R50L), или (R50M), или (R50N), или (R50P), или (R50Q), или (R50S), или (R50S, A184W, L188F), или (R50S, A74I, A184W, L188F), или (R50S, A74M, A184Y, L188K), или (R50S, A74T, L181Y, A184D, L188K, G240R), или (R50S, A74V), или (R50S, M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184W), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A330R), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A74V, G677D), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, H266S), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181P), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188K), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, T146F), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, V26N), или (R50S, M177Y, V178W, L181Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, T146F, M177Y, V178W, A184Y), или (R50V), или (R50Y), или (S164N, F261L), или (S176A, A184Y, L188K), или (S176C), или (S176D), или (S176E), или (S176F), или (S176G), или (S176H), или (S176K), или (S176L), или (S176M), или (S176N), или (S176P), или (S176Q), или (S176R), или (S72C, A74C), или (S72C, A74I), или (S72C, A74L), или (S72C, A74V), или (S72C, A74Y), или (S72D, A74C), или (S72D, A74F), или (S72G), или (S72G, A74C), или (S72G, A74F), или (S72G,

A74H), или (S72G, A74I), или (S72G, A74I, A184W, L188F), или (S72G, A74I,
 F77A, M177Y), или (S72G, A74I, F77L), или (S72G, A74I, F77L, M177Y), или
 (S72G, A74I, L181Y), или (S72G, A74I, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, L181Y,
 L188K), или (S72G, A74I, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, L188F), или (S72G,
 5 A74I, L188K), или (S72G, A74I, L188R), или (S72G, A74I, T146F), или (S72G,
 A74I, T146F, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74I,
 T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188R), или (S72G,
 A74I, T146F, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L188K), или (S72G, A74I, T146F,
 L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178P), или (S72G, A74I, T146F, V178P,
 10 L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F,
 V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188R), или
 (S72G, A74I, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188K), или
 (S72G, A74I, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W), или
 (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y,
 15 L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I,
 T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188F), или
 (S72G, A74I, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188R),
 или (S72G, A74I, V178P), или (S72G, A74I, V178P, L181Y), или (S72G, A74I,
 V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188R), или (S72G,
 20 A74I, V178P, L188F), или (S72G, A74I, V178P, L188K), или (S72G, A74I, V178P,
 L188R), или (S72G, A74I, V178W), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188F), или
 (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178W, L188F), или
 (S72G, A74I, V178W, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L188R), или (S72G,
 A74L), или (S72G, A74M, A184Y, L188K), или (S72G, A74S), или (S72G, A74T),
 25 или (S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188F), или
 (S72G, A74T, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188R), или (S72G,
 A74T, L188F), или (S72G, A74T, L188K), или (S72G, A74T, L188R), или (S72G,
 A74T, T146F), или (S72G, A74T, T146F, L181Y), или (S72G, A74T, T146F,
 L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74T,
 30 T146F, L188F), или (S72G, A74T, T146F, L188K), или (S72G, A74T, T146F,
 L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178P), или (S72G, A74T, T146F, V178P,
 L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74T, T146F,
 V178P, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74T,
 T146F, V178W), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74T,

T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74T, V178P), или (S72G, A74T, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188R), или (S72G, A74T, V178W), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188R), или (S72G, A74V), или (S72G, A74V, A184W), или (S72G, A74V, A221V), или (S72G, A74V, F77A), или (S72G, A74V, F77A, M177Y), или (S72G, A74V, F77L, M177Y), или (S72G, A74V, F77S), или (S72G, A74V, L181Y), или (S72G, A74V, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, L188F), или (S72G, A74V, L188K), или (S72G, A74V, L188R), или (S72G, A74V, T146F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V, V178P), или (S72G, A74V, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178P, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178W), или (S72G, A74V, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178W, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L188R), или (S72G, A74Y), или

(S72G, L181Y), или (S72G, L181Y, L188F), или (S72G, L181Y, L188K), или (S72G, L181Y, L188R), или (S72G, L188F), или (S72G, L188K), или (S72G, L188R), или (S72G, M177Y, V178W), или (S72G, M177Y, V178W, L188K), или (S72G, T146F), или (S72G, T146F, L181Y), или (S72G, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, L188F), или (S72G, T146F, L188K), или (S72G, T146F, L188R), или (S72G, T146F, V178P), или (S72G, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, V178P, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L188R), или (S72G, T146F, V178W), или (S72G, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188R), или (S72G, V178P), или (S72G, V178P, L181Y), или (S72G, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, V178P, L188F), или (S72G, V178P, L188K), или (S72G, V178P, L188R), или (S72G, V178W), или (S72G, V178W, L181Y), или (S72G, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, V178W, L188F), или (S72G, V178W, L188K), или (S72G, V178W, L188R), или (S72H, A74C), или (S72H, A74G), или (S72H, A74S), или (S72H, A74Y), или (S72N, A74C), или (S72N, A74I), или (S72N, A74N), или (S72N, A74V), или (S72T), или (S72W), или (S72W, A74I, A184W, L188F), или (S72W, A74V), или (S72W, L333R), или (S72W, W90Y, V299G), или (S72Y, A74V), или (S89C), или (S89E), или (S89G), или (S89I), или (S89L), или (S89M), или (S89N), или (S89Q), или (S89R), или (S89T), или (S89V), или (T146A), или (T146A, D222Y, I263M), или (T146A, F173D), или (T146A, F173V), или (T146A, F205G), или (T146A, F261C), или (T146A, F261S), или (T146A, F261V), или (T146A, G271R), или (T146A, G271S), или (T146A, G271T), или (T146A, H266T), или (T146A, H266V), или (T146A, I258T, I259S), или (T146A, I259H), или (T146A, I263F), или (T146A, I263L), или (T146A, I263N), или (T146A, I263V), или (T146A, L150A), или (T146A, L150G), или (T146A, L150K), или (T146A, L150R, F173I), или (T146A, L272H), или (T146A, L272R), или (T146A, L272S), или (T146A, L272W), или (T146A, M212A), или (T146C), или (T146D), или (T146E), или (T146F), или (T146F, L181Y), или (T146F, L181Y, L188F), или (T146F,

L181Y, L188K), или (T146F, L188K), или (T146F, L188R), или (T146F, V178P),
 или (T146F, V178P, L181Y, L188R), или (T146F, V178P, L188K), или (T146F,
 V178P, L188R), или (T146F, V178W), или (T146F, V178W, L181Y, L188R), или
 (T146F, V178W, L188F), или (T146F, V178W, L188K), или (T146F, V178W,
 5 L188R), или (T146G), или (T146H), или (T146L), или (T146M), или (T146N), или
 (T146P), или (T146R), или (T146S), или (T146V), или (T146V, A191T), или
 (T146Y), или (T149P), или (T260A), или (T260S), или (T268A), или (T268S), или
 (T269K), или (T327A), или (T327A, A330W), или (T327C), или (T327D), или
 (T327E), или (T327G), или (T327I), или (T327L), или (T327M), или (T327N), или
 10 (T327P), или (T327Q), или (T327S), или (T327V), или (T365A), или (T365C), или
 (T365D), или (T365F), или (T365G), или (T365H), или (T365I), или (T365K), или
 (T365L), или (T365N), или (T365P), или (T365Q), или (T365V), или (T365W), или
 (T365Y), или (T436A), или (T436C), или (T436D), или (T436E), или (T436F), или
 (T436G), или (T436H), или (T436I), или (T436K), или (T436L), или (T436M), или
 15 (T436N), или (T436P), или (T436Q), или (T436R), или (T436S), или (T436V), или
 (T436W), или (T436Y), или (T438A), или (T438C), или (T438G), или (T438I), или
 (T438L), или (T438S), или (T438V), или (T49A), или (T49C), или (T49D), или
 (T49E), или (T49F), или (T49G), или (T49H), или (T49I), или (T49K), или (T49L),
 или (T49L, S54N), или (T49M), или (T49N), или (T49P), или (T49Q), или (T49R),
 20 или (T49R, R50C), или (T49R, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (T49S), или
 (T49V), или (T49W), или (T49Y), или (T88A), или (T88C), или (T88S), или
 (T88V), или (V178D), или (V178F), или (V178H), или (V178I), или (V178K), или
 (V178L), или (V178M), или (V178N), или (V178P), или (V178P, L181Y), или
 (V178P, L181Y, L188R), или (V178P, L188F), или (V178P, L188K), или (V178P,
 25 L188R), или (V178Q), или (V178R), или (V178S), или (V178T), или (V178W), или
 (V178W, A184Y), или (V178W, L181Y, L188K), или (V178W, L181Y, L188R), или
 (V178W, L188R), или (V178W, R50S), или (V178Y), или (V26A), или (V26C), или
 (V26E), или (V26F), или (V26G), или (V26G, R47S), или (V26H), или (V26I), или
 (V26K), или (V26L), или (V26M), или (V26N), или (V26N, R50S, M177Y, V178W,
 30 A184Y), или (V26Q), или (V26R), или (V26S), или (V26T), или (V26W), или
 (V26Y), или (V314A), или (V314E), или (V314F), или (V314H), или (V314P), или
 (V314Q), или (V314S), или (V314Y), или (V48A), или (V48D), или (V48E), или
 (V48F), или (V48G), или (V48H), или (V48I), или (V48L), или (V48M), или
 (V48P), или (V48Q), или (V48R), или (V48S), или (V48T), или (V48W), или

(V48Y), или (W325A), или (W325C), или (W325D), или (W325E), или (W325F),
или (W325G), или (W325I), или (W325K), или (W325L), или (W325M), или
(W325Q), или (W325R), или (W325S), или (W325T), или (W325V), или (W325Y),
или (W90D), или (W90Y), или (W90Y, V299G, G570D), или (Y51A), или (Y51C),
5 или (Y51E), или (Y51F), или (Y51G), или (Y51H), или (Y51I), или (Y51L), или
(Y51M), или (Y51N), или (Y51P), или (Y51Q), или (Y51S), или (Y51S, F77V), или
(Y51T), или (Y51V), или (Y51W), или (A225C), или (A225G), или (A225N), или
(A225Q), или (A225S), или (A225T), или (A225V), или (A225Y), или (A44G), или
(A44Q), или (D182A), или (D182C), или (D182E), или (D182H), или (D182I), или
10 (D182M), или (D182N), или (D182V), или (D182W), или (E140A), или (E140D),
или (E140K), или (E140M), или (E140T), или (E183T), или (E337L), или (E409N),
или (G114C), или (G114K), или (G114L), или (G114N), или (G114W), или
(G240A), или (G240C), или (G240H), или (G240K), или (G240M), или (G240N),
или (G240Q), или (G240R), или (G240S), или (G240V), или (G46T), или (H236A),
15 или (H236C), или (H236D), или (H236F), или (H236G), или (H236I), или (H236K),
или (H236P), или (H236R), или (H236S), или (H236Y), или (H92F), или (H92Y),
или (I174T), или (I174V), или (I258L), или (I258M), или (I258V), или (K187A),
или (K187G), или (K187N), или (K187R), или (K440C), или (K440N), или
(K440T), или (K76C), или (K76E), или (K76F), или (K76H), или (K76I), или
20 (K76L), или (K76N), или (K76V), или (M5C), или (M5E), или (M5P), или (M5Q),
или (N186A), или (N186D), или (N186E), или (N186F), или (N186H), или
(N186K), или (N186L), или (N186M), или (N186Q), или (N186T), или (N186V),
или (N186Y), или (P172A), или (P172D), или (P172G), или (Q189I), или (Q189K),
или (Q189V), или (Q403K), или (Q403R), или (Q404F), или (Q404Y), или (Q73A),
25 или (Q73E), или (Q73F), или (Q73L), или (Q73S), или (Q73T), или (Q73W), или
(R179A), или (R179H), или (R179L), или (R179M), или (R179P), или (R179V), или
(R190C), или (R190G), или (R190K), или (R190M), или (R190N), или (R190S),
или (R190V), или (R190W), или (R79E), или (R79K), или (S270A), или (S270D),
или (S270G), или (S53C), или (T175F), или (T175G), или (T175H), или (T175L),
30 или (T175M), или (T175N), или (T175Q), или (T175R), или (T175Y), или (T269A),
или (T269V), или (V299L), или (V299W), или (F173W, R179L, R190V, A225V),
или (F173W, R179L, R190V, K440C), или (F173W, R179L, T269V, K440C), или
(H236K, G240V, T269V, K440C), или (K76I, F173W, R179L, D182I, R190V,

К440С), или (R179L, A225V, G240V, K440С), или (R179L, R190V), или (R190V, A225V, T269V, K440С).

Обеспечивается **третья предпочтительная подгруппа**, которая включает варианты в соответствии с шестым вариантом осуществления, где варианты

5 Р450-ВМЗ имеют улучшенный выход продукта или титр продукта и улучшенную селективность для С19-гидроксилирования (как определено при использовании КС или СЦП) по сравнению с исходным вариантом. В эту подгруппу входят варианты, которые включают, по крайней мере, мутацию(и) (A184D), или

10 (A184D, L188K), или (A184E), или (A184F), или (A184G), или (A184H), или (A184I), или (A184K), или (A184L), или (A184N), или (A184Q), или (A184R), или (A184W), или (A184W, L188F), или (A184Y), или (A184Y, L188K), или (A184Y, R50S), или (A221S), или (A264V), или (A321C), или (A321D), или (A321E), или (A321G), или (A321I), или (A321N), или (A321T), или (A321V), или (A330C), или (A330D), или (A330E), или (A330F), или (A330G), или (A330H), или (A330I), или

15 (A330K), или (A330L), или (A330M), или (A330N), или (A330Q), или (A330R), или (A330S), или (A330T), или (A330T, E352A), или (A330V), или (A330W), или (A330Y), или (A330Y, W367C), или (A33V), или (A399C), или (A399E), или (A399G), или (A399I), или (A399L), или (A399M), или (A399N), или (A399Q), или (A399R), или (A399S), или (A399T), или (A399V), или (A74C), или (A74C, L75V), или (A74D), или (A74D, F81V), или (A74E), или (A74F), или (A74H), или

20 (A74I), или (A74I, A184W, L188F), или (A74I, F77A, L181Y, A184W), или (A74I, L181Y, L188R), или (A74I, L188F), или (A74I, L188K), или (A74I, L188R), или (A74I, M177Y, A184R, L188F), или (A74I, M177Y, V178P, A184G), или (A74I, T146F), или (A74I, T146F, L181Y), или (A74I, T146F, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, L188F), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188R), или (A74I, T146F, V178W), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, V178W, L188K), или (A74I, T146F, V178W, L188R), или (A74I, V178P), или (A74I, V178P, L181Y), или (A74I, V178P, L181Y, L188R), или (A74I, V178P, L188F), или (A74I, V178P, L188K), или (A74I, V178P, L188R), или (A74I, V178W, L188F), или (A74I, V178W, L188R), или (A74K), или

30 (A74L), или (A74M), или (A74N), или (A74P), или (A74Q), или (A74R), или

(A74R, L75V), или (A74S), или (A74T), или (A74T, A184D), или (A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, F77A, V178W, A184Y), или (A74T, F77L, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y), или (A74T, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y, A184Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188R), или (A74T, L188K), или (A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188R), или (A74T, T146F, L188F), или (A74T, T146F, L188K), или (A74T, T146F, L188R), или (A74T, T146F, V178P), или (A74T, T146F, V178P, L181Y), или (A74T, T146F, V178P, L188K), или (A74T, T146F, V178P, L188R), или (A74T, T146F, V178W), или (A74T, T146F, V178W, L181Y), или (A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, V178W, L188R), или (A74T, V178P), или (A74T, V178P, L188F), или (A74T, V178P, L188K), или (A74T, V178P, L188R), или (A74T, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, V178W, L188K), или (A74T, V178W, L188R), или (A74V), или (A74V, F77A, A184N, L188F), или (A74V, L181Y), или (A74V, L181Y, A184D, L188K), или (A74V, L181Y, A184W, L188F), или (A74V, L181Y, L188F), или (A74V, L188F), или (A74V, L188K), или (A74V, L75V), или (A74V, T146F, L181Y, L188K), или (A74V, T146F, L181Y, L188R), или (A74V, T146F, L188K), или (A74V, T146F, L188R), или (A74V, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, A184W, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, L181Y, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188R), или (A74V, V178P, L188F), или (A74V, V178W, L188K), или (A74W), или (A74Y), или (D363G, T438C), или (E13D, R47L), или (E143A), или (E143C), или (E143D), или (E143F), или (E143G), или (E143I), или (E143K), или (E143L), или (E143M), или (E143N), или (E143P), или (E143Q), или (E143R), или (E143S), или (E143V), или (E143W), или (E143Y), или (E267D), или (E267R), или (E267T), или (E352A), или (E352D), или (E352F), или (E352G), или (E352I), или (E352L), или (E352M), или (E352N), или (E352P), или (E352R), или (E352S), или (E352T), или (E352V), или (E352W), или (E352Y), или (E64A), или (E64G), или (E64H), или (E64K), или (E64L), или (E64M), или (E64N), или (E64Q), или (E64V), или (E64Y), или (E82P), или (E93G), или (F173C), или (F173C, F205G), или (F173D), или (F173I), или (F173K), или (F173L), или (F173M), или (F173N), или (F173P), или (F173Q), или (F173R), или (F173S), или (F173S, F205P), или (F173V), или (F173W), или (F173Y), или (F173Y, I174F), или (F205A), или (F205C), или (F205D), или (F205D, D208N), или

(F205E), или (F205G), или (F205H), или (F205I), или (F205K), или (F205L), или (F205M), или (F205N), или (F205P), или (F205R), или (F205S), или (F205T), или (F205V), или (F205W), или (F205Y), или (F261A), или (F261C), или (F261D), или (F261G), или (F261I), или (F261L), или (F261M), или (F261Q), или (F261S), или (F261T), или (F261V), или (F261Y), или (F331H), или (F331I), или (F331L), или (F331M), или (F331V), или (F331W), или (F331Y), или (F393M), или (F393W), или (F77A), или (F77A, A184W), или (F77A, L181P, A184Y, L188K), или (F77A, M177Y), или (F77C), или (F77D), или (F77E), или (F77G), или (F77H), или (F77I), или (F77K), или (F77L), или (F77M), или (F77N), или (F77P), или (F77R), или (F77S), или (F77T), или (F77V), или (F77V, L86M), или (F77W), или (F77Y), или (F81D), или (F81I), или (F81L), или (F81R), или (F81S), или (F81V), или (F81W), или (F81Y), или (G271A), или (G271C), или (G271D), или (G271E), или (G271F), или (G271H), или (G271K), или (G271L), или (G271M), или (G271N), или (G271P), или (G271Q), или (G271S), или (G271T), или (G271V), или (G271W), или (G271Y), или (G402A), или (G415A), или (G415D), или (G415S), или (G415T), или (G415V), или (G85A), или (G85L), или (G85S), или (H266A), или (H266C), или (H266E), или (H266F), или (H266I), или (H266K), или (H266M), или (H266N), или (H266Q), или (H266S), или (H266V), или (H266W), или (H266Y), или (I153F, G271L), или (I153L), или (I153L, F173Y), или (I259A), или (I259C), или (I259D), или (I259F), или (I259H), или (I259K), или (I259L), или (I259M), или (I259N), или (I259Q), или (I259S), или (I259T), или (I259V), или (I263A), или (I263C), или (I263E), или (I263F), или (I263H, A264G), или (I263K), или (I263L), или (I263M), или (I263N), или (I263Q), или (I263S), или (I263V), или (I263Y), или (I401A), или (I401M), или (I401T), или (I401V), или (K210E), или (K210T, G271V), или (K224C), или (K224E), или (K224H), или (K224I), или (K224L), или (K224M), или (K224P), или (K224Q), или (K224W), или (K224Y), или (L150A), или (L150C), или (L150D), или (L150E), или (L150F), или (L150G), или (L150H), или (L150I), или (L150K), или (L150M), или (L150N), или (L150Q), или (L150R), или (L150R, F205R), или (L150S), или (L150S, F173L), или (L150T), или (L150V), или (L150W), или (L150Y), или (L181H), или (L181I), или (L181M), или (L181P), или (L181V), или (L181Y), или (L181Y, A184D), или (L181Y, L188F), или (L181Y, L188K), или (L181Y, L188K, H659R), или (L188A), или (L188D), или (L188E), или (L188F), или (L188H), или (L188I), или (L188K), или (L188M), или (L188N), или (L188Q), или (L188R), или (L188S), или (L188W), или (L20C), или

(L20D), или (L20E), или (L20F), или (L20G), или (L20G, R47L), или (L20I), или (L20M), или (L20N), или (L20P), или (L20R), или (L20S), или (L20T), или (L20V), или (L20W), или (L20Y), или (L262I), или (L262V), или (L262W), или (L272A), или (L272C), или (L272E), или (L272F), или (L272G), или (L272I), или (L272K), или (L272M), или (L272N), или (L272Q), или (L272S), или (L272T), или (L272V), или (L272W), или (L272Y), или (L29A), или (L29C), или (L29D), или (L29F), или (L29H), или (L29I), или (L29M), или (L29M, R47G), или (L29Q), или (L29S), или (L29T), или (L29V), или (L29W), или (L29Y), или (L324F), или (L356C), или (L356F), или (L356I), или (L356M), или (L356V), или (L437I), или (L437M), или (L75I), или (L75I, F81C), или (L75I, F81I), или (L75I, F81L), или (L75I, F81S), или (L75I, F81V), или (L75V), или (L75V, F81C), или (L75V, F81L), или (L75V, F81V), или (L75V, F81Y), или (L78F), или (L78I), или (L78M), или (L78V), или (L86I), или (L86I, S89T), или (L86M), или (L86M, S89T), или (L86V), или (M118A), или (M118E), или (M118F), или (M118G), или (M118H), или (M118I), или (M118K), или (M118L), или (M118N), или (M118P), или (M118Q), или (M118S), или (M118T), или (M118V), или (M118W), или (M118Y), или (M177A), или (M177C), или (M177C, V178Y), или (M177D), или (M177E), или (M177F), или (M177H), или (M177I), или (M177L), или (M177N), или (M177P), или (M177Q), или (M177R), или (M177T), или (M177V), или (M177Y), или (M177Y, A184W), или (M177Y, A184Y), или (M177Y, M185V), или (M177Y, R50S), или (M177Y, V178P), или (M177Y, V178P, A184Y, L188F), или (M177Y, V178W), или (M177Y, V178W, A184Y), или (M177Y, V178W, A184Y, L188F), или (M185C), или (M185D), или (M185E), или (M185G), или (M185H), или (M185K), или (M185L), или (M185N), или (M185Q), или (M185V), или (M212A), или (M212C), или (M212D), или (M212E), или (M212F), или (M212G), или (M212H), или (M212K), или (M212L), или (M212L, I259F), или (M212Q), или (M212R), или (M212S), или (M212T), или (M212V), или (M212W), или (M212Y), или (M354A), или (M354C), или (M354D), или (M354E), или (M354G), или (M354I), или (M354K), или (M354K, D363Y), или (M354L), или (M354N), или (M354Q), или (M354R), или (M354S), или (M354T), или (M354V), или (M354W), или (M354Y), или (N70A), или (N70C), или (N70F), или (N70G), или (N70H), или (N70K), или (N70R), или (N70Y), или (P243T, H266L), или (P329A), или (P392C), или (P392G), или (P392Q), или (P392R), или (P392V), или (P9S), или (R147C, H266G), или (R161C, G271D), или (R190L, F261V), или (R203C), или (R255A),

или (R255G), или (R255I), или (R255K), или (R255L), или (R255M), или (R255N),
или (R255P), или (R255T), или (R255W), или (R47A), или (R47C), или (R47D),
или (R47E), или (R47F), или (R47G), или (R47H), или (R47H, A74W), или (R47I),
или (R47K), или (R47L), или (R47M), или (R47N), или (R47P), или (R47Q), или
5 (R47S), или (R47T), или (R47V), или (R47W), или (R50A), или (R50C), или
(R50D), или (R50E), или (R50F), или (R50G), или (R50I), или (R50L), или
(R50M), или (R50N), или (R50P), или (R50Q), или (R50S), или (R50S, A184W,
L188F), или (R50S, A74I, A184W, L188F), или (R50S, A74M, A184Y, L188K), или
(R50S, A74T, L181Y, A184D, L188K, G240R), или (R50S, A74V), или (R50S,
10 M177Y, V178P, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184W), или (R50S,
M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, A330R), или (R50S,
M177Y, V178W, A184Y, A74V, G677D), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y,
L181P), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L181Y), или (R50S, M177Y, V178W,
A184Y, L188K), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188R), или (R50S, M177Y,
15 V178W, A184Y, T146F), или (R50S, M177Y, V178W, A184Y, V26N), или (R50S,
M177Y, V178W, L181Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V), или (R50S, S72G,
A74V, M177Y, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y, V178P, A184Y), или
(R50S, S72G, A74V, M177Y, V178W, A184Y), или (R50S, S72G, A74V, M177Y,
V178W, A184Y, L188R), или (R50S, T146F, M177Y, V178W, A184Y), или (R50V),
20 или (R50Y), или (S176A, A184Y, L188K), или (S176C), или (S176D), или (S176E),
или (S176F), или (S176G), или (S176H), или (S176K), или (S176L), или (S176M),
или (S176N), или (S176P), или (S176Q), или (S72C, A74C), или (S72C, A74I), или
(S72C, A74L), или (S72C, A74V), или (S72D, A74C), или (S72G), или (S72G,
A74C), или (S72G, A74F), или (S72G, A74H), или (S72G, A74I), или (S72G, A74I,
25 A184W, L188F), или (S72G, A74I, F77A, M177Y), или (S72G, A74I, F77L), или
(S72G, A74I, F77L, M177Y), или (S72G, A74I, L181Y), или (S72G, A74I, L181Y,
L188F), или (S72G, A74I, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, L181Y, L188R), или
(S72G, A74I, L188F), или (S72G, A74I, L188K), или (S72G, A74I, L188R), или
(S72G, A74I, T146F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y), или (S72G, A74I, T146F,
30 L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F,
L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, L188F), или (S72G, A74I, T146F,
L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P), или (S72G, A74I, T146F, V178P,
L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F,
V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L181Y, L188R), или

(S72G, A74I, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74I, V178P), или (S72G, A74I, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178P, L188F), или (S72G, A74I, V178P, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L188R), или (S72G, A74I, V178W), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178W, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L188R), или (S72G, A74L), или (S72G, A74M, A184Y, L188K), или (S72G, A74S), или (S72G, A74T), или (S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, L188F), или (S72G, A74T, L188K), или (S72G, A74T, L188R), или (S72G, A74T, T146F), или (S72G, A74T, T146F, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, L188F), или (S72G, A74T, T146F, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178P), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74T, V178P), или (S72G, A74T, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188R), или (S72G, A74T, V178W), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188R), или (S72G, A74V), или (S72G, A74V, A184W), или (S72G, A74V, A221V), или (S72G, A74V, F77A), или (S72G, A74V, F77A, M177Y), или (S72G, A74V, F77L, M177Y), или (S72G, A74V, F77S), или (S72G, A74V, L181Y),

или (S72G, A74V, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, L188F), или (S72G, A74V, L188K), или (S72G, A74V, L188R), или (S72G, A74V, T146F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V, V178P), или (S72G, A74V, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178P, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178W), или (S72G, A74V, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178W, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L188R), или (S72G, A74Y), или (S72G, L181Y), или (S72G, L181Y, L188F), или (S72G, L181Y, L188K), или (S72G, L181Y, L188R), или (S72G, L188F), или (S72G, L188K), или (S72G, L188R), или (S72G, M177Y, V178W), или (S72G, M177Y, V178W, L188K), или (S72G, T146F), или (S72G, T146F, L181Y), или (S72G, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, L188F), или (S72G, T146F, L188K), или (S72G, T146F, L188R), или (S72G, T146F, V178P), или (S72G, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, V178P, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L188R), или (S72G, T146F, V178W), или (S72G, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188F),

или (S72G, T146F, V178W, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188R), или (S72G, V178P), или (S72G, V178P, L181Y), или (S72G, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, V178P, L188F), или (S72G, V178P, L188K), или (S72G, V178P, L188R),

5 или (S72G, V178W), или (S72G, V178W, L181Y), или (S72G, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, V178W, L188F), или (S72G, V178W, L188K), или (S72G, V178W, L188R), или (S72H, A74C), или (S72N, A74C), или (S72N, A74I), или (S72N, A74V), или (S72W), или (S72W, A74V), или (S89C), или (S89E), или (S89G), или

10 (S89I), или (S89L), или (S89N), или (S89Q), или (S89R), или (S89T), или (S89V), или (T146A), или (T146A, D222Y, I263M), или (T146A, F173D), или (T146A, F173V), или (T146A, F205G), или (T146A, F261C), или (T146A, F261S), или (T146A, F261V), или (T146A, G271S), или (T146A, G271T), или (T146A, H266V), или (T146A, I258T, I259S), или (T146A, I259H), или (T146A, I263F), или (T146A,

15 I263L), или (T146A, I263N), или (T146A, I263V), или (T146A, L150A), или (T146A, L150G), или (T146A, L150K), или (T146A, L150R, F173I), или (T146A, L272H), или (T146A, L272S), или (T146A, L272W), или (T146A, M212A), или (T146C), или (T146D), или (T146E), или (T146F), или (T146F, L181Y), или (T146F, L181Y, L188F), или (T146F, L181Y, L188K), или (T146F, L188K), или

20 (T146F, L188R), или (T146F, V178P), или (T146F, V178P, L181Y, L188R), или (T146F, V178P, L188K), или (T146F, V178P, L188R), или (T146F, V178W), или (T146F, V178W, L181Y, L188R), или (T146F, V178W, L188F), или (T146F, V178W, L188K), или (T146F, V178W, L188R), или (T146G), или (T146H), или (T146L), или (T146M), или (T146N), или (T146P), или (T146R), или (T146S), или

25 (T146V), или (T146V, A191T), или (T146Y), или (T149P), или (T268A), или (T268S), или (T269K), или (T327A), или (T327A, A330W), или (T327C), или (T327D), или (T327E), или (T327I), или (T327L), или (T327M), или (T327N), или (T327P), или (T327Q), или (T327S), или (T327V), или (T365C), или (T365D), или (T365F), или (T365G), или (T365H), или (T365I), или (T365K), или (T365L), или

30 (T365N), или (T365P), или (T365Q), или (T365V), или (T365W), или (T365Y), или (T436A), или (T436C), или (T436D), или (T436E), или (T436F), или (T436G), или (T436H), или (T436I), или (T436K), или (T436L), или (T436M), или (T436N), или (T436P), или (T436Q), или (T436R), или (T436S), или (T436V), или (T436W), или (T436Y), или (T438A), или (T438C), или (T438I), или (T438S), или (T438V), или

(T49A), или (T49C), или (T49D), или (T49E), или (T49F), или (T49G), или (T49H), или (T49I), или (T49K), или (T49L), или (T49L, S54N), или (T49M), или (T49N), или (T49P), или (T49Q), или (T49R), или (T49R, R50C), или (T49R, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (T49S), или (T49V), или (T49W), или (T49Y), или
5 (T88C), или (T88S), или (T88V), или (V178D), или (V178H), или (V178I), или (V178K), или (V178L), или (V178M), или (V178N), или (V178P), или (V178P, L181Y), или (V178P, L181Y, L188R), или (V178P, L188F), или (V178P, L188K), или (V178P, L188R), или (V178Q), или (V178R), или (V178S), или (V178T), или (V178W), или (V178W, A184Y), или (V178W, L181Y, L188K), или (V178W,
10 L181Y, L188R), или (V178W, L188R), или (V178W, R50S), или (V178Y), или (V26A), или (V26C), или (V26F), или (V26G), или (V26H), или (V26I), или (V26K), или (V26L), или (V26M), или (V26N), или (V26N, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (V26Q), или (V26S), или (V26T), или (V26W), или (V26Y), или (V314A), или (V314E), или (V314F), или (V314H), или (V314P), или (V314Q), или
15 (V314S), или (V314Y), или (V48A), или (V48D), или (V48E), или (V48F), или (V48G), или (V48H), или (V48I), или (V48L), или (V48M), или (V48P), или (V48Q), или (V48R), или (V48S), или (V48T), или (V48W), или (V48Y), или (W325A), или (W325C), или (W325D), или (W325E), или (W325F), или (W325G), или (W325I), или (W325K), или (W325L), или (W325M), или (W325Q), или
20 (W325S), или (W325T), или (W325V), или (W325Y), или (W90Y), или (Y51A), или (Y51C), или (Y51F), или (Y51H), или (Y51I), или (Y51L), или (Y51M), или (Y51P), или (Y51S, F77V), или (Y51T), или (Y51V), или (Y51W), или (A225C), или (A225N), или (A225Q), или (A225S), или (A225T), или (A225Y), или (A44Q), или (D182A), или (D182C), или (D182E), или (D182H), или (D182I), или
25 (D182M), или (D182N), или (D182V), или (D182W), или (E140A), или (E140D), или (E140K), или (E140M), или (E140T), или (E337L), или (G114C), или (G114K), или (G114L), или (G114N), или (G114W), или (G240A), или (G240C), или (G240H), или (G240K), или (G240N), или (G240R), или (G240S), или (H236A), или (H236C), или (H236D), или (H236F), или (H236I), или (H236K), или (H236P),
30 или (H236R), или (H236S), или (H92F), или (H92Y), или (I174T), или (I174V), или (I258L), или (I258M), или (I258V), или (K187A), или (K187G), или (K187N), или (K187R), или (K440C), или (K440N), или (K440T), или (K76C), или (K76E), или (K76F), или (K76H), или (K76I), или (K76N), или (K76V), или (M5C), или (M5E), или (M5P), или (N186A), или (N186D), или (N186E), или (N186F), или

(N186H), или (N186K), или (N186L), или (N186M), или (N186Q), или (N186T),
или (N186V), или (N186Y), или (P172A), или (P172D), или (P172G), или (Q189I),
или (Q189K), или (Q189V), или (Q403K), или (Q403R), или (Q404F), или
(Q404Y), или (Q73E), или (Q73F), или (Q73L), или (Q73S), или (Q73T), или
5 (Q73W), или (R179A), или (R179H), или (R179L), или (R179M), или (R179P), или
(R179V), или (R190C), или (R190G), или (R190K), или (R190M), или (R190N),
или (R190S), или (R190V), или (R190W), или (R79K), или (S270A), или (S270D),
или (S53C), или (T175F), или (T175G), или (T175H), или (T175L), или (T175M),
или (T175N), или (T175Q), или (T175R), или (T175Y), или (T269V), или (V299L),
10 или (V299W), или (F173W, R179L, T269V, K440C), или (H236K, G240V, T269V,
K440C).

В соответствии с одним вариантом осуществления предлагается вариант
BM3, где указанный вариант имеет улучшенную селективность и/или выход
продукта или титр продукта для C19-гидроксилирования по сравнению, по
15 крайней мере, с одним вариантом BM3 в соответствии с SEQ ID No. 2-28 или
117-119, предпочтительно, по крайней мере, с одним вариантом BM3,
выбранным из BM3-254, BM3-261, BM3-263 или BM3-268. Этот вариант
осуществления может сочетаться и предлагается для сочетания со всеми
предыдущими вариантами осуществления, в частности, с первым, вторым,
20 третьим, четвертым, пятым и/или шестым вариантом воплощения или
описанными подгруппами.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения предлагается
вариант BM3 для катализации C19-гидроксилирования стероида или
производного стероида, где аминокислотная последовательность (вставка) была
25 введена между аминокислотными положениями 458 и 477, и где вставка имеет,
по крайней мере, 90,9% или 100% идентичности последовательности в
соответствии с любой из последовательностей SEQ ID No. 123-173. Наиболее
предпочтительно, когда этот вариант осуществления является вариантом BM3 в
соответствии с любым из описанных ранее вариантов осуществления первого
30 аспекта.

Было неожиданно обнаружено, что варианты BM3 для C19-
гидроксилирования стероидов, которые включают эти вставки аминокислотной
последовательности, имели улучшенный титр продукта или СЦП, например,

если вставку вводили в вариант ВМЗ с последовательностью SEQ ID No. 118 или 119.

В соответствии с отдельным аспектом 1Б предоставляется вариант ВМЗ, который характеризуется улучшенной экспрессией белка ВМЗ по сравнению с ВМЗ дикого типа (ДТ), где вариант ВМЗ включает мутации, по крайней мере, в одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или всех положениях аминокислот (С62), (S106), (Q110), (A117), (Q128), (T152), (G157), (G227), (P243), (H285), (Q288), (A295), (N319), (G368), (V371), (K391), (N395) и (H408). Эти варианты ВМЗ также могут соответствовать некоторым вариантам осуществления первого аспекта.

В частности, в данной заявке представлен вариант ВМЗ, характеризующийся улучшенной экспрессией белка ВМЗ по сравнению с ВМЗ дикого типа (ДТ), где вариант ВМЗ включает, по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или все мутации, выбранные из (С62L), (S106A), (Q110E), (A117P), (Q128E), (T152I), (G157L), (G227P), (P243E), (H285E), (Q288E), (A295D), (N319E), (G368E), (V371P), (K391L), (N395F) и (H408L).

В некоторых конкретных вариантах реализации предоставляется вариант ВМЗ в соответствии с предыдущими вариантами воплощения, где вариант ВМЗ включает мутации (S106A, Q128E), или (S106A, H285E, Q288E), или (S106A, Q128E, H285E), или (С62L, А1 G157L, N319E), или (С62L, G227P, N319E, K391L), или (Q110E, Q128E, Q288E, N319E), или (Q128E, H285E, Q288E, N319E), А15 или (С62L, S106A, A117P, G227P, P243E), или (С62L, S106A, Q128E, G227P, K391L), или (S106A, Q110E, G227P, H285E, K312L Q288E, K391L), (S106A, G227P, H285E, V371P, K391L, H408L), или (S106A, Q110E, G227P, N319E, K391L, N395F), или (С62,), или (S106A, Q110E, Q128E, G227P, Q288E, N319E, K391L), или (С62L, S106A, Q128E, G157L, P243E, A295D, G368E, K3912, (N319E, V371P, N395F).

Как показано в Таблице Е7Г и Примере 7Д, введение этих мутаций приводило к улучшенной экспрессии белка ВМЗ. Экспрессию белка можно измерять так, как это известно в данной области техники, например, с помощью ДСН ПААГ, Вестерн-блота, масс-спектрометрии или любого другого приемлемого метода. Таким образом, эти мутации и варианты ВМЗ можно

использовать для решения той же проблемы, то есть для улучшения C19-гидроксилирования.

5 Как будет понятным специалисту в данной области техники, варианты осуществления ВМЗ для улучшенного производства белка можно сочетать и предлагать для сочетания с каждым из описанных ранее вариантов осуществления, которые пригодны для улучшения селективности или выхода продукта C19-гидроксилирования.

10 Кроме того, варианты осуществления ВМЗ для улучшенного производства белка включают, однако не ограничиваются C19-гидроксилированием, и могут также использоваться более широко, т.е. для улучшения производства белка для любого ВМЗ белка, независимо от его пригодности для гидроксилирования стероидов.

15 В соответствии со **вторым аспектом** настоящего изобретения предоставляется нуклеиновая кислота, кодирующая вариант цитохром P450 ВМЗ монооксигеназы, как описано в настоящей заявке.

20 Определенная белковая или аминокислотная последовательность может быть закодирована разными последовательностями нуклеиновых кислот. Если аминокислотная последовательность была определена в данной заявке, то каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих эту аминокислотную последовательность, также должна считаться раскрытой в настоящем документе. Поэтому является понятным, что последовательность нуклеиновой кислоты, как обеспечивается, например, в SEQ ID No. 59 для последовательности дикого типа, следует считать приведенной в качестве примера.

25 Предпочтительно, когда нуклеиновая кислота кодирует вариант в соответствии с первым аспектом. Еще более предпочтительно, когда нуклеиновая кислота кодирует вариант в соответствии с первым аспектом, первым вариантом осуществления, или когда нуклеиновая кислота кодирует вариант в соответствии с первым аспектом, вторым вариантом осуществления, например, вариантом в соответствии с SEQ ID No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 30 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 117, 118 или 119 или функциональные варианты, которые происходят от них. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть нуклеиновой кислотой, кодирующей вариант в соответствии с третьим, четвертым, пятым или шестым воплощениям первого аспекта.

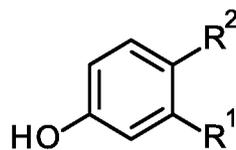
Нуклеиновые кислоты в соответствии со вторым аспектом могут быть созданы *de novo*, как это известно в данной области техники, или могут быть получены путем мутации доступных последовательностей нуклеиновых кислот ВМЗ. После этого нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант Р450-ВМЗ в соответствии с настоящим изобретением, можно ввести в приемлемую систему экспрессии или клетку-хозяина для экспрессии варианта ВМЗ. Последовательности нуклеиновых кислот могут быть проверены так, как это известно в данной области техники. Примеры методов проверки последовательности описаны, например, в (Green и Sambrook, 2012).

10 В соответствии с **третьим аспектом** настоящего изобретения предлагается клетка-хозяин для производства варианта цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназы. В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант ВМЗ в соответствии с любым аспектом, описанным в настоящей заявке.

15 Приемлемые экспрессионные системы являются хорошо известными в данной области техники; примеры систем включают штаммы *E. coli*, такие как DH5alpha, BL21 (DE3) или Rosetta (DE3), а также различные другие бактериальные и небактериальные системы. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин является прокариотической клеткой (например, *E.coli*) или эукариотической клеткой (например, клеткой CHO). В предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку *E.coli*, например DH5alpha, BL21 (DE3) или Rosetta (DE3). В другом предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин происходит от штамма *E.coli* W3110 (NC_007779.1), JM101 или MG1655 (NC_000913.3).
20 Введение нуклеиновых кислот, кодирующих вариант ВМЗ, например, в соответствии со вторым аспектом, в клетку-хозяина может происходить так, как это известно в данной области техники, т.е. при использовании соответствующих векторов или систем переноса. Например, когда используются бактериальные системы экспрессии, такие как DH5alpha, BL21 (DE3) или Rosetta (DE3), используются соответствующие векторы, известные в данной области техники, такие как pSE420 (Invitrogen), pET21a (EMD Biosciences), pET22b (EMD Millipore), pLys (EMD Biosciences) или pETM11 (EMBL Vector Collection, Германия). Для подробного описания см. раздел 4.2 «Клонирование конструкции»

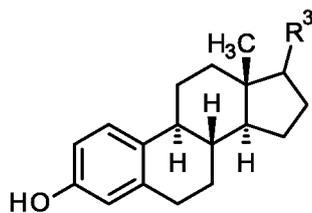
sup102A1 и *pETM11-VM3*» сопроводительной информации (Acevedo-Rocha 2018) и приведенные там примеры.

В соответствии с **четвертым аспектом** настоящего изобретения предусмотрено использование варианта цитохром P450 VM3 монооксигеназы (VM3) для получения соединения в соответствии с формулой I, где R¹ и R² образуют шестичленное кольцо как часть стероида.



(I)

В предпочтительном воплощении в соответствии с четвертым аспектом формула I представляет собой формулу (II), где R³ представляет собой бета-гидрокси группу(-OH) или оксо группу(=O).



(II)

Как описано в настоящей заявке, было неожиданно обнаружено, что варианты VM3 можно использовать для производства соединений в соответствии с формулой I и II в коммерчески релевантной установке, то есть для промышленного применения. С этой целью вариант VM3, приемлемый для катализации C19-гидроксилирования, инкубируют с приемлемым субстратом, например, так, как описано в Примерах 2, 8, 10, 13, 17, 20, 21, 24, 25.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с четвертым аспектом субстратом для варианта VM3 является стероид или производное стероида.

В соответствии с **пятым аспектом** настоящего изобретения предусмотрено использование варианта VM3 для C19-гидроксилирования стероида или производного стероида.

Как описано в настоящей заявке, было неожиданно обнаружено, что варианты VM3 можно использовать для C19-гидроксилирования стероида или стероидного производного в коммерчески релевантной установке, то есть для

промышленного применения. С этой целью вариант ВМЗ, приемлемый для катализации С19-гидроксилирования, инкубируют с приемлемым субстратом, например так, как описано в Примерах 2, 8, 10, 13, 17, 20, 21, 24, 25.

5 В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления **четвертого или пятого аспекта** вариант ВМЗ является вариантом, как описано в данной заявке. Предпочтительно, когда вариант ВМЗ является вариантом в соответствии с первым аспектом. Даже более предпочтительно, когда вариант ВМЗ является вариантом в соответствии с первым аспектом, первым вариантом осуществления, или вариант ВМЗ является
10 вариантом в соответствии с первым аспектом, вторым вариантом осуществления, например, вариантом в соответствии с SEQ ID No. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 117, 118 или 119, или вариантом, производным от любого из них. Кроме того, вариант ВМЗ может быть вариантом в соответствии с третьим, четвертым, пятым или шестым
15 воплощением первого аспекта.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с **четвертым или пятым аспектом** вариант ВМЗ очищают перед инкубацией с субстратом при использовании методики очистки, известной в данной области техники, такой как, но без ограничения, аффинная хроматография с иммобилизованным
20 металлом, ионообменная хроматография или эксклюзионная хроматография. В других вариантах осуществления в соответствии с четвертым аспектом вариант ВМЗ остается в клеточной суспензии при инкубации с субстратом, например, не происходит отделения варианта ВМЗ и системы экспрессии перед проведением биотрансформации, например, биотрансформации цельной клетки.

25 В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления **четвертого или пятого аспекта** указанные стероиды или производные стероидов содержат 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо. В соответствии с некоторыми еще более предпочтительными вариантами осуществления в соответствии с **четвертым или пятым аспектом**, указанным
30 стероидом или производным стероида является андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД), или (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (дельта1 тестостерон).

В некоторых воплощениях **четвертого или пятого аспекта** субстратный стероид или производное стероида добавляют к реакции биотрансформации как очищенное соединение. В некоторых вариантах осуществления субстратный

стероид или производное стероида растворяют в подходящем растворителе, который может добавляться в раствор к смеси для биотрансформации. В других вариантах осуществления субстратный стероид или производное стероида образуется в процессе реакции, предшествующей С19-гидроксилированию.

5 Реакция, предшествующая реакции С19-гидроксилирования, может быть другой реакцией биотрансформации или химической реакцией, например, восстановлением дельта¹ тестостерона до тестостерона или окисления дельта¹ тестостерона до АДД.

10 В некоторых вариантах реализации **четвертого или пятого аспекта** образованный С19-гидроксилированный стероид или производное стероида экстрагируют из реакционной смеси биотрансформации посредством способа, известного в данной области техники, например, при использовании 4-метил-2-пентанона (см. Пример 10). В некоторых других вариантах осуществления в соответствии с четвертым или пятым аспектом образованный С19-
15 гидроксилированный стероид или производное стероида превращают во вторичный продукт. Это преобразование может происходить, например, посредством биотрансформации или химической реакции. Вторичным продуктом может быть, например, эстрон или его производное.

20 Экстракция С19-гидроксилированного стероида или стероидного производного или его вторичного продукта может происходить так, как известно в данной области техники, например, путем перемешивания реакционной смеси с 4-метил-2-пентанолом, отделения органической фазы и концентрирования выпариванием органических растворителей. Последующую очистку С19-
25 гидроксилированного стероида или стероидного производного или его вторичного продукта можно осуществлять с помощью хроматографических методов таких, как флеш-хроматография при использовании силикагеля или препаративная ВЭЖХ, или кристаллизация.

30 Анализ производства С19-гидроксилированного стероида, производного стероида или вторичного продукта может происходить так, как это является известным в данной области техники, например, при использовании МС- или ЯМР-методов.

Подходящие условия биотрансформации описаны в приведенных в настоящей заявке примерах. Однако для специалиста в данной области техники является понятным, как стандартным образом оптимизировать условия реакции

для варианта ВМЗ для получения оптимальных выходов продукта реакции. Например, инкубация может происходить в буфере $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, включающем водный раствор ЭДТА в диапазоне рН от 6,6 до 7,4. Подходящее время инкубации может составлять, например, от 12 до 48 часов.

5 В соответствии с **шестым аспектом** настоящего изобретения предложен процесс С19-гидроксилирования стероида или его производного, включающий:

(I) (a) культивирование рекомбинантного микроорганизма, продуцирующего цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназу (ВМЗ), в культуральной среде в присутствии экзогенного или промежуточного субстрата; или

10 (б) инкубацию среды, содержащей субстрат, с цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназой; и

(II) изоляцию образовавшегося продукта окисления или его вторичного продукта из среды;

15 где указанный процесс дополнительно характеризуется тем, что указанный вариант ВМЗ является вариантом ВМЗ, как описано в настоящей заявке.

Микроорганизм, который продуцирует рекомбинантный вариант ВМЗ, представляет собой микроорганизм, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант ВМЗ. Микроорганизм, который продуцирует рекомбинантный вариант ВМЗ, может быть получен из любой приемлемой системы экспрессии. Желательно, когда микроорганизм, продуцирующий рекомбинантный вариант ВМЗ, является микроорганизмом в соответствии с третьим аспектом. Например, вариант ВМЗ может быть вариантом в соответствии с первым аспектом.

25 В некоторых вариантах реализации шестого аспекта процесс включает культивирование микроорганизма, продуцирующего рекомбинантный вариант ВМЗ, в культуральной среде. Это может осуществляться так, как является известным в данной области техники, например, как описано в примерах. Однако специалист в данной области техники знает разнообразные установки для культивирования микроорганизмов. Подходящие культуральные среды, описанные в данной области техники для соответствующей системы экспрессии, могут быть легко адаптированы.

30 В некоторых воплощениях шестого аспекта вариант ВМЗ очищают перед инкубацией с субстратом с помощью методики очистки, известной в данной

области техники, такой как аффинная хроматография с иммобилизованным металлом, ионообменная хроматография или эксклюзионная хроматография. В некоторых других воплощениях шестого аспекта вариант ВМЗ остается в клеточной суспензии при инкубации с субстратом, например, не происходит
5 отделение варианта ВМЗ и системы экспрессии перед биотрансформацией, например, биотрансформацией цельной клетки.

В некоторых вариантах осуществления процесс включает инкубацию реакционной среды, содержащей субстрат, с вариантом ВМЗ (например очищенной или неочищенной смесью с клетками системы экспрессии).
10 Подходящие среды и условия описаны в приведенных в настоящей заявке примерах. Однако оптимизация условий реакции для улучшения выхода продукта реакции для варианта ВМЗ является обычной процедурой для специалиста в данной области техники.

Например, субстрат может представлять собой экзогенный субстрат. Такой
15 экзогенный субстрат добавляют к реакции биотрансформации, например, в виде очищенного соединения, раствора или смеси. Субстрат также может быть промежуточным субстратом, т.е. субстратом, который может образовываться в ходе реакции, предшествующей С19-гидроксилированию. Реакция, предшествующая реакции С19-гидроксилирования, может быть другой реакцией
20 биотрансформации или химической реакцией.

Подходящими субстратами являются стероиды или производные стероидов, в частности, те, которые содержат 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо. Например, АДД или d1-тестостерон являются приемлемыми субстратами для описанных вариантов ВМЗ. В некоторых предпочтительных вариантах
25 осуществления в соответствии с шестым аспектом указанный стероид или его производное содержит 1,4-диен-3-он-А-кольцо и 19-метильную группу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с шестым аспектом указанный стероид или его производное содержит 4-ен-3-он-А-кольцо и 19-метильную группу.

30 После биотрансформации продукт С19-гидроксилирования можно выделить из реакционной среды, как описано в области техники. В качестве альтернативы вторичный продукт может быть выделен из реакционной среды. Выделение можно осуществлять, например, с помощью хроматографических методов, таких как препаративная или аналитическая ВЭЖХ, или путем экстракции. Экстракция

C19-гидроксилированного стероида или стероидного производного или его вторичного продукта может происходить так, как это известно в данной области техники, например, при использовании 4-метил-2-пентанона (см. Пример 10). Последующую очистку C19-гидроксилированного стероида или стероидного производного, или его вторичного продукта можно осуществлять с помощью хроматографических методов, например, флэш-хроматографии при использовании силикагеля или препаративной ВЭЖХ, или кристаллизации.

Анализ производства C19-гидроксилированного стероида, производного стероида или вторичного продукта может происходить так, как это известно в данной области техники, например, при использовании МС- или ЯМР-методов.

В соответствии с **седьмым аспектом** предлагается способ получения оптимизированных вариантов ВМЗ для C19-гидроксилирования стероидов, где указанный способ включает

(I) (а) культивирование рекомбинантного микроорганизма, который экспрессирует вариант ВМЗ (исследуемый вариант), в культуральной среде в присутствии экзогенного или промежуточного стероида или производного стероида; или

(б) инкубацию реакционной среды, содержащей стероид или производное стероида, с вариантом ВМЗ; и

(II) сравнение выхода полученного продукта или титра, и/или селективности для продукта C19-гидроксилирования, образованного при использовании исследуемого варианта или его вторичного продукта, с соответствующим значением, полученным для исходного варианта исследуемого варианта, способного катализировать C19-гидроксилирование стероида; и

(III) отбор исследуемого варианта в качестве оптимизированного для C19-гидроксилирования стероидов, если изучаемый вариант имеет улучшенный выход продукта или титр, и/или селективность по сравнению с исходным вариантом.

Описание, которое предоставляется для процесса в соответствии с пятым и шестым аспектами, применяется с соответствующими изменениями, в частности, в отношении этапа (I) а и б.

В предпочтительном варианте осуществления стероид или производное стероида содержит 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо. В

предпочтительном воплощении стероидом или производным стероида представляет собой АДД или d1-тестостерон. В некоторых предпочтительных вариантах реализации седьмого аспекта стероид или его производное содержит 1,4-диен-3-он-А-кольцо и 19-метильную группу. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления седьмого аспекта указанный стероид или его производное содержит 4-ен-3-он-А-кольцо и 19-метильную группу.

Выход продукта и селективность (коэффициент) рассчитываются так, как описано в данном документе. Выход продукта может быть выходом продукта для C19-гидроксилированного стероида или производного стероида или продукта, полученного из них. Предпочтительно выход продукта является выходом продукта для эстрадиола или эстрона. Коэффициент селективности может представлять собой коэффициент селективности для C19-гидроксилированного стероида или производного стероида.

Предпочтительно, когда дочерний вариант имеет последовательность своего исходного варианта и, по крайней мере, одну дополнительную мутацию. Предпочтительно, когда исходный вариант является вариантом в соответствии с первым аспектом.

ПРИМЕРЫ

Если не указано иное, то культуральные среды готовили в деминерализованной воде и стерилизовали при 121°C в течение 20 минут или стерильно фильтровали. Все растворы готовили с водой MilliQ и стерильно фильтровали, если не указано иное. Все препараты готовились в стерильных условиях.

Оксфордский раствор микроэлементов содержал FeCl₃ x 6 H₂O (27 г/л), ZnCl₂ (1,31 г/л), CoCl₂ x 6 H₂O (2,87 г/л), CuCl₂ x 2H₂O (1,27 г/л), борную кислоту (0,5 г/л), CaCl₂ x 2 H₂O (1,32 г/л), Na₂MoO₄ x 2 H₂O (2,35 г/л), соляную кислоту (37%) (100 мл/л).

Список сокращений: Δ...удаление аминокислоты; ДМСО диметилсульфоксид; ДМФА диметилформамид; ЕДТА...этилендиаминтетраацетат; × г...кратность гравитации; ИПТГ...изопропилтиогактопиранозид; LB...бульон Лурии-Бертани; OD550...оптическая плотность при 550 нм; об./мин.... оборотов в минуту;

SOC среда для выращивания...#B9020S от BioLabs: 2% овощной пептон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкозы.

Pluronic®PE 8100... Pluronic PE типов представляют собой неионные
5 поверхностно-активные вещества с низким пенообразованием. Это блок-сополимеры, в которых центральная группа полипропиленгликоля фланкирована двумя группами полиэтиленгликоля. PE 8100 соответствует следующей структурной формуле: HO(CH₂CH₂O)_x(CH₂C(CH₃)HO)_y(CH₂CH₂O)_zH.

PE 8100 представляет собой блок-сополимер полипропиленгликоля с
10 молярной массой 2300 г/моль и 10% полипропиленгликоля в молекуле.

Пример 1

Клонирование вариантов P450 BM3 (BM3)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие варианты P450-BM3, как описано в данной заявке, могут быть синтезированы так, как известно в данной
15 области техники, например, как предлагаются соответствующими поставщиками услуг, такими как Eurofins Genomics GmbH (Eurofins Genomics GmbH, Anzinger Str. 7a, 85560 Ebersberg, Германия). Вкратце, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие P450-BM3 ДТ (например, SEQ ID No. 59) или другие варианты P450-BM3, как описано в настоящей заявке, были клонированы в
20 вектор экспрессии на основе вектора pETM-11 (EMBL Vector Collection, Германия) или другого приемлемого вектора. Подробное описание см. в разделе 4.2 «Клонирование конструкции sup102A1 и pETM11-BM3» дополнительная информация (Acevedo-Rocha, 2018). Генетические элементы вводили в модифицированный pETM-11 вектор общеизвестными методами. Для экспрессии
25 вариантов BM3 вектор экспрессии вводили в клетки штамма *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen™, Lifetechnologies), клетки *E. coli* BL 21 (DE3) или клетки *E. coli* BL 21 Gold (DE3) ΔdkgA :: FRT T7 (конструкция описана в (Agudo R, 2012)).

Получение вариантов фермента

30 Нуклеотидные замены (замещения) были введены в исходные последовательности нуклеиновых кислот, например, для получения замены T88 на другие аминокислоты при использовании SEQ ID No. 5 в качестве исходной последовательности. Несколько молекулярных биологических методов могут использоваться для введения этих замен. Полезный способ получения

мутированной нуклеиновой кислоты в соответствии с изобретением и соответствующего белка включает проведение сайт-направленного мутагенеза на кодонах, кодирующих одну или более заранее выбранных аминокислот. Методы получения этих сайт-направленных мутаций являются хорошо известными специалисту в данной области техники и широко описаны в литературе (в частности: Направленный мутагенез: практический подход, 1991, под редакцией M.J. McPHERSON, IRL PRESS), или это методы, для которых можно использовать коммерческие наборы (например, набор QUIKCHANGE™ для молниеносного мутагенеза от Qiagen или Stratagene). После сайт-направленного мутагенеза нуклеиновые кислоты трансформировали в штамм *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen™, Lifetechnologies). Замены в гене BM3 были созданы вначале путем введения BsaI-сайтов в каркас вектора с последовательностью SEQ ID No. 122, что обеспечивало получение вектора введения и последующее лигирование последовательностей вставок из библиотеки, имеющих разную длину и свойства, в рамке в ген BM3.

Трансформированные клетки анализировали в соответствующих реакциях биотрансформации, чтобы определить выход продукта и селективность. Подходящие реакции биотрансформации описаны ниже, см. Пример 2. Проверку последовательности проводили так, как это известно в данной области техники.

Культуры *E. coli* в глицерине, трансформированные соответствующими экспрессионными плазмидами, готовили путем добавления одного объема 40% раствора глицерина в один объем культуры *E. coli*.

Для выделения единичных бактериальных колоний соответствующие разведения культур *E. coli* высевали на чашки с LB-агаром, которые содержали соответствующие концентрации канамицина и инкубировали при 37°C до получения единичных колоний.

Пример 2

Анализ вариантов P450-BM3 для продукции эстрадиола или эстрогена

Культивирование

Для целей скрининга штамм *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen™, Lifetechnologies) использовался как хозяин для экспрессионных плазмид (Пример 1). Для предварительных культур стерилизованные 96-луночные планшеты с глубокими лунками на 2,5 мл (850301, NJ-Bioanalytik, Erkelenz, Германия) заполняли 490 мкл LB-среды (LB Broth Miller, Fisher Bioreagents,

BP1426-50 -Aldrich, 50 мкг/мл), инокулировали при использовании 10 мкл исходного глицеринового раствора подходящих вариантов (которые были приготовлены в 96-луночных микротитровальных планшетах) или, альтернативно, 500 мкл среды LB были инокулированы клеточным материалом из колоний планшетов с агаром. Предварительные культуры инкубировали в течение 17 часов при 37°C и 250 об./мин. в шюттель-аппарате Climo ISF1-X (Kühner AG, Birsfelden, Швейцария).

Среда для экспрессионных культур содержала триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), мясной пептон триптического расщепления (2 г/л), K_2HPO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (9,4 г/л) (9,4 г/л), глицерин (0,4% [об./об.]), рибофлавин (0,001 г/л), гидрохлорид тиамин (0,337 г/л) и оксфордский раствор микроэлементов (250 мкл/л). Триптон, дрожжевой экстракт и мясной пептон готовили как исходные растворы с концентрацией 50 г/л, а K_2PO_4 готовили как 50-кратный основной раствор. Эти исходные растворы стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. Рибофлавин и гидрохлорид тиамин были свежеприготовленными в виде маточных растворов с концентрацией 0,06 г/л и 10 г/л и стерильно отфильтрованы, соответственно. Среду готовили из исходных растворов и добавляли канамицин (раствор канамицина, K0254, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) до получения заключительной концентрации 50 мг/л.

Для экспрессии культур стерилизованные 96-луночные культуральные планшеты с глубокими лунками на 2,5 мл (850301, NJ-Bioanalytik, Эркеленц, Германия) заполняли 440 мкл экспрессионной среды с добавлением канамицина (50 мг/л); экспрессионные культуры инокулировали 50 мкл предварительных культур. Культуральные планшеты для экспрессии инкубировали при 37°C и 250 об./мин. в шюттель-аппарате Climo. Через 4 часа инкубации 10 мкл 30 мМ ИПТГ, разведенного в среде для экспрессии (с добавлением 50 мг/л канамицина), добавляли в каждую лунку, чтобы индуцировать экспрессию фермента (с получением конечной концентрации 0,6 мМ ИПТГ). Планшеты с экспрессионными культурами затем инкубировали в течение 20 часов при 27°C в термостате при встряхивании.

Клетки собирали центрифугированием экспрессионных культур в течение 15 мин. при 4°C и 2500×g. Супернатант культуры выбрасывали, оставшиеся клеточные осадки ресуспендировали в 495 мкл буфера для анализа P450 (100 мМ буфер KPO_4 при pH 7,4, 50 г/л глюкозы, 35 г/л глицерина, 1 мМ ЭДТА) или 250

мкл буфера для анализа 2 x P450 (200 мМ буфера KPO_4 при pH 7,0, 100 г/л глюкозы, 70 г/л глицерина, 2 мМ ЭДТА). Планшеты с глубокими лунками хранили при -80°C до использования.

Биотрансформация

5 Планшеты с глубокими лунками, содержащими клеточные суспензии, оттаивали при комнатной температуре. Реакцию биотрансформации начинали с (I) добавления 5 мкл основного раствора Δ^1 -тестостерона или андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) (при концентрации 5 мг/мл или 10 мг/мл в N,N-диметилформамиде) к клеткам, ресуспендированным в 495 мкл буфера для
10 анализа P450, или (II) путем добавления 250 мкл маточного раствора андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) (4000 мг/мл) к 250 мкл клеточной суспензии в буфере для анализа 2 x P450, инкубацию проводили в течение 22 часов при 27°C в термостате при встряхивании. Реакции останавливали путем добавления 500 мкл
15 стоп-раствора (содержащего ацетонитрил, метанол и диметилсульфоксид в соотношении 1:1:1) и для экстракции стероидов инкубировали на шюттель-аппарате в течение 30 мин. при 20°C . После этого планшеты центрифугировали в течение 15 мин. при 4°C и $2500\times g$. Из каждой лунки 120 мкл супернатанта переносили в 96-луночный фильтровальный планшет (Corning, 3504), который затем центрифугировали в течение 5 минут при 4°C и $650\times g$. Отфильтрованные
20 образцы хранили при -20°C или непосредственно подвергали анализу ВЭЖХ.

Аналитический метод ВЭЖХ

Аналитическую ВЭЖХ проводили при использовании следующей установки:

25 Прибор: Agilent Technologies 1290 Infinity; колонка Ascentis Express C18, 50 x 2,1 мм, 2,7 мкм; Элюент А: вода (+0,025% или 0,005% трифторуксусной кислоты); Элюент Б: ацетонитрил; скорость истечения 1,5 мл/мин.; температура: 45°C ; объем ввода: 4 мкл, определение при 280 нм. Градиент: 0 – 0,18 мин. 5% растворитель Б, 0,18–0,4 мин. 5 – 10% растворитель Б, 0,4 – 4,6 мин. 10 – 27% растворитель Б, 4,6 – 7,0 мин. 27 – 95% растворитель Б, 7,01 – 7,5 мин. 5%
30 растворитель Б.

Андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД), Δ^1 -тестостерон, эстрадиол и эстрон (растворенные в N,N-диметилформамиде) использовали как референтные вещества и как стандарт для количественного определения. Были подготовлены

соответствующие разведения, охватывающие диапазон вплоть до максимальной концентрации, используемой в биотрансформации.

Наблюдаемое время удержания составляло 4,01 мин. для $\Delta 1$ -тестостерона, 4,22 мин. для АДД, 4,37 мин. для эстрадиола и 4,86 мин. для эстрогена.

5 Концентрацию соответствующих соединений в образцах рассчитывали путем сравнения полученных площадей пиков с площадями пиков стандартов.

Пример 3

Превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол с помощью вариантов ВМЗ на основе исходного типа ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5)

10 Варианты ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5) с мутациями в одном или двух положениях были подготовлены так, как описано в Примере 1, и проверены на превращение тестостерона $\Delta 1$ в эстрадиол. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы
15 глицерина, начальная концентрация субстрата (1-тестостерона) составляла 50 мг/л.

Результаты в отношении выхода продукта эстрадиола и коэффициента селективности для эстрадиола представлены на Фигурах 1 а, б и 2 а, б. Для вариантов, полученных из ВМЗ-268, которые включают мутации в положениях
20 L78, E82 или A87, результаты преобразования $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол представлены на Фигуре 1 в.

Пример 4

Превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол с помощью вариантов ВМЗ на основе ВМЗ-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15)

25 Варианты производного ВМЗ ВМЗ-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15) с последующими мутациями до шести положений (Пример 1) проверяли на превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы
30 глицерина, а начальная концентрация $\Delta 1$ -тестостерона, применяемая в эксперименте, составляла 100 мг/л.

Полученный выход продукта эстрадиола и коэффициенты селективности для эстрадиола показаны на Фигуре 3 а, б и Фигуре 4 а, б, в, г, д, е. Для производных вариантов SEQ ID NO. 15, которые включали мутации в

положениях L78, E82 или A87, результаты превращения $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол представлены на Фигуре 3 в.

Пример 5

5 Превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол при использовании вариантов ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5), которые включают до семи мутаций

10 Варианты ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5), которые включали в себя семь мутаций в различных положениях (Пример 1), проверяли на превращение $\Delta 1$ -тестостерона в эстрадиол. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для
15 культивирования использовали колонии на чашках с агаром, начальная концентрация $\Delta 1$ -тестостерона, применяемая в эксперименте, составляла 50 мг/л. Результаты выхода эстрадиола и коэффициент селективности для эстрадиола показаны на Фигурах 5 а и б.

Пример 6

15 Превращение андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон при использовании вариантов ВМЗ на основе ВМЗ-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15)

20 Варианты ВМЗ-268; M177Y, A184Y (SEQ ID No. 15) с дополнительными мутациями, включающими до шести положений (Пример 1), были проверены на конверсию андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы глицерина, а начальная концентрация АДД, применяемая в эксперименте, составляла 100 мг/л.

25 Результаты в отношении выхода эстрона и коэффициента селективности для эстрона представлены на Фигуре 6 а, б и Фигуре 7 а, б, в, г, д, е. Для производных вариантов SEQ ID No. 15, которые включали мутации в положениях L78, E82 или A87, результаты превращения АДД в эстрон представлены на Фигуре 6 в.

Пример 7

Превращение андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон при использовании VM3-268 (SEQ ID No. 5) вариантов, которые включали вплоть до шести мутаций.

5 Варианты VM3-268 (SEQ ID No. 5), которые включали вплоть до шести мутаций в различных положениях (Пример 1), подвергали скринингу на конверсию андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали колонии из чашек с
10 агаром, применяемая в эксперименте начальная концентрация АДД составляла 100 мг/л. Результаты выхода эстрогена и коэффициент селективности для эстрогена представлены на Фигуре 8.

Пример 7А

Превращение андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон при
15 использовании VM3 вариантов на основе VM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (SEQ ID No. 117)

 Варианты VM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (SEQ ID No. 117), которые включали дополнительные мутации в
20 одном или двух положениях (Пример 1), подвергали скринингу на конверсию 4 - 3,17-диона (АДД) в эстрон. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы глицерина, исходная концентрация АДД, применяемая в эксперименте, составляла 2000 мг/л.

 Результаты полученных титров эстрогена и соотношение целевого продукта
25 для эстрогена представлены на Фигурах 9 и 10.

Пример 7Б

Превращение андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон при
использовании VM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y,
A184Y, L188F (SEQ ID No. 117) вариантов, содержащих вплоть до 5 мутаций

30 Варианты VM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (SEQ ID No. 117), которые включали вплоть до 5 мутаций в различных положениях (Пример 1), подвергали скринингу на конверсию андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В

качестве инокулята для культивирования использовали колонии из чашек с агаром, применяемая в эксперименте начальная концентрация АДД составляла 2000 мг/л. Результаты полученных титров эстрогена и соотношение целевого продукта для эстрогена представлены на Фигуре 11.

5 **Пример 7В**

Преобразование андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстроген при использовании BM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y вариантов с тремя мутациями.

10 Вариант G457S, I458G, A477N, BM3-268; S72G, V78L, A82E, F87A, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y (SEQ ID No. 118) (см. Пример 1) подвергали скринингу на конверсию андроста-1,4-диен-3,17-диона в эстроген. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы глицерина, исходная концентрация АДД, применяемая в
15 эксперименте, составляла 2000 мг/л. Результаты полученного титра эстрогена и соотношение целевого продукта (СЦП) приведены в Таблице Е7В.

Таблица Е7В: Полученные титры эстрогена и соотношение целевого продукта (СЦП) при использовании вариантов BM3 SEQ ID No. 118 и 119.

BM3-268 вариант	SEQ ID No.	Титр эстрогена (средн. знач.) (мг/л)	Титр эстрогена (станд. отклон.) (мг/л)	СЦП эстрогена (средн. знач.)	СЦП эстрогена (станд. отклон.) (мг/л)
S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y	118	209,22	21,26	0,732	0,169
S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N	119	253,32	26,78	0,784	0,146

Пример 7Г

Преращение андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в эстрон при использовании ВМЗ-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (SEQ ID No. 119) с заменами в аминокислотной последовательности между положениями 458 и 477 при использовании вставок с различной длиной и последовательностями.

Варианты ВМЗ-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (SEQ ID No. 119) с заменами в аминокислотной последовательности между положениями 458 и 477 (Пример 1) подвергали скринингу на конверсию андроста-1,4-диен-3,17-диона-3,17-диона (АДД) в эстрон. Культивирование, биотрансформацию и анализ ВЭЖХ проводили так, как описано в Примере 2. В качестве инокулята для культивирования использовали исходные растворы глицерина, исходная концентрация АДД, применяемая в эксперименте, составляла 2000 мг/л.

Результаты для полученных титров эстрона и соотношения целевых продуктов (СЦП) приведены в Таблице Е7Г. Перечислены только те варианты, в которых по сравнению с исходным типом вставка («линкер») улучшала (I) выход продукта, как определяется титром, и/или (II) селективность, как определяется СЦП.

Таблица Е7Г: Полученный титр эстрона и соотношение целевого продукта (СЦП) при использовании вариантов ВМЗ с заменой аминокислотной последовательности между положениями 458 и 477 в ВМЗ-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (SEQ ID No. 119)

Вариант линкер/вставка	Титр эстрона (мг/л)	Соотн. титра эстрона по сравнен. с SEQ ID No. 119	СЦП эстрона	СЦП (вариант по сравнен. с SEQ ID No. 119)
GKHIIQGPMYDVSGTAPVNVN	265,68	1,05	0,737	1,016
LRASVSAIQQTTKQIYDDQSLVNV	282,72	1,12	0,718	0,989
AASKPEFIKPEDVSAEVVEKEYQV QL	254,76	1,01	0,722	0,996
AKKPLNTEGVMKSRN	254,20	1,01	0,734	1,012
SAAAATPAVRTVPQYKYAAGVRN PQQHLNAQPQVMTMQQPAVHVQG QEPL	296,28	1,17	0,745	1,028
TVHFESFGATNTNARENTPF	265,56	1,05	0,951	1,000

Вариант линкер/вставка	Титр эстрогена (мг/л)	Соотн. титра эстрогена по сравнен. с SEQ ID No. 119	СЦП эстрогена	СЦП (вариант по сравнен. с SEQ ID No. 119)
ENPGVTQLNRLAAHPPFAS	260,11	1,03	0,714	0,985
VKMVRVQAIEKNRYRA	377,77	1,49	0,968	1,018
VREALLRQRAFRELPG	327,64	1,29	0,958	1,008
IRPRAIGGSKPRVA	260,09	1,03	0,723	0,997
DETYVPKEFNAETF	256,58	1,02	0,751	1,036
WQYTAATATPTIGHV	257,69	1,02	0,814	1,122
ARKLLSPEVAND	260,90	1,03	0,750	1,034
VQTPGHANQSMMPQFIMPANNQF SAQ	300,62	1,19	0,802	1,106
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	277,31	1,10	0,839	1,157
GGGGSGGGGSGGGGS	272,08	1,08	0,769	1,060
APAPAPAPAPAPAPAP	253,89	1,01	0,724	0,999
PSTEQSAKKVRKKAEN	346,70	1,37	0,964	1,014
PSPSTEQSKVRKKAEN	290,90	1,15	0,965	1,015
PSPSTEQSAKKVR	259,95	1,03	0,829	1,143
TKLPEAQQRVGGCFLNLMPQMKT LYLTYCANHPSAVNVL	135,79	0,54	0,975	1,025
GNVPELPDTTEHSRTDL	232,63	0,92	0,741	1,022
TARKGKGAFcNGQKLQV	237,15	0,94	0,961	1,011
PSDNVDAQLYNGFFSDAD	225,89	0,89	0,961	1,010
AMSLYLAGEISLLILDEPT	94,19	0,37	1,000	1,052
GCAWYELMPAETTVRLRA	239,61	0,95	0,795	1,096
LSLEVAEEIARLEAEV	250,97	1,00	0,740	1,021
ASSYTAPQPGLG	169,78	0,67	1,000	1,052
IPVPTRDLEKPF	189,87	0,75	0,981	1,032
VIGYMPIPVGVA	233,26	0,92	0,756	1,042
RGRWMARLARM	153,66	0,61	1,000	1,052
FLMKLINRPII	162,51	0,64	0,992	1,044
LSPDEAP	207,67	0,82	1,000	1,052
VEPPDL	193,74	0,76	1,000	1,052
FITPII	191,08	0,75	0,960	1,010
LRKMRTGKP	188,21	0,74	1,000	1,052
SNSTMKKHGR	244,12	0,96	0,808	1,114
YLSITFL	112,07	0,44	1,000	1,052
AAAENKVPY	216,16	0,85	0,977	1,028
SEFEDPLV	199,76	0,79	0,964	1,014
KRSPW	198,09	0,78	1,000	1,052
NASCT	176,89	0,70	0,955	1,005
IQRKK	197,47	0,78	1,000	1,052
EDSGF	222,51	0,88	0,969	1,019

Вариант линкер/вставка	Титр эстрогена (мг/л)	Соотн. титра эстрогена по сравнен. с SEQ ID No. 119	СЦП эстрогена	СЦП (вариант по сравнен. с SEQ ID No. 119)
FVGV L	188,23	0,74	1,000	1,052
GGGGSGGGGS	241,84	0,95	0,804	1,109
GGGGS	205,94	0,81	0,966	1,016
PAPAP	128,37	0,51	0,952	1,001
PSPSTEVRKKAEN	249,06	0,99	0,748	1,031
PSPSTKKAEN	212,52	0,84	0,994	1,046
PEN	207,56	0,82	1,000	1,052

Пример 7Д

Уровень ВМЗ белка вариантов ВМЗ на основе дикого типа (SEQ ID No. 1), которые включают замены вплоть до восьми аминокислот.

- 5 Варианты ВМЗ дикого типа (SEQ ID No. 1), которые включали до восьми мутаций (Пример 1), в различных положениях проверяли на уровень белка ВМЗ. Культивирование клеток проводили так, как описано в Примере 2. Уровни клеточного белка анализировали с помощью ПАГЕ-геля (NuPAGE™ с 4 до 12%, Бис-Трис, 1,0 мм, Mini Protein Gel, 15-луночный; Thermo Fisher Scientific).
- 10 Экспрессионные культуры доводили до значения OD600 нм 0,5 и добавляли один объем 2-кратной смеси NuPAGE® LDS буфера для образцов (4X) и NuPAGE® восстановительного агента для образцов (10X) (оба Thermo Fisher Scientific). Образцы подвергали денатурации в течение 5 минут при 99°C в амплификаторе. Впоследствии 10 мкл денатурированных образцов наносили на
- 15 гель, электрофорез проводили в течение 60 минут при 180 вольтах в NuPAGE® MOPS ДСН электродном буфере (Thermo Fisher Scientific). После электрофореза гели окрашивали с помощью SimplyBlue™ SafeStain (Thermo Fisher Scientific) и делали цифровое изображение. Количественное определение белковых полос производили с помощью программного пакета ImageJ (ImageJ версия 1,53e,
- 20 National Institutes of Health, Bethesda, MD, США). Изображение геля было преобразовано в 8-битную шкалу в градациях серого цвета, и вычитание фонового значения было выполнено с помощью параметра «светлый фон» при радиусе трек-бола 50. Площади в профиле геля рассчитывались в отношении каждой дорожки для пика белка ВМЗ и для суммы всех пиков (общий белок). На
- 25 основе значений площади белка ВМЗ и общего белка для каждого образца

рассчитывали соотношение ВМЗ к общему белку, и эти значения сравнивали с контрольными образцами дикого типа ((площадь ВМЗ/площадь общего белка для варианта) / (площадь ВМЗ/площадь общего белка дикого типа)). Результаты уровня белка ВМЗ по отношению к ВМЗ дикого типа приведены в Таблице Е7Д.

- 5 **Таблица Е7Д:** Уровни белка ВМЗ вариантов ВМЗ, которые включают вплоть до 8 мутаций, по отношению к такому типу (SEQ ID No. 1).

Мутации	Площадь ВМЗ / общ. площадь	Площадь ВМЗ / общ. площадь вариант-к-ДТ
C62L, A117P, G157L, N319E	0,498	1,255
C62L, G227P, N319E, K391L	0,399	1,048
C62L, S106A, A117P, A295D, V371P	0,400	1,053
C62L, S106A, A117P, G227P, P243E	0,448	1,129
C62L, S106A, Q128E, G157L, P243E, A295D, G368E, K391L	0,431	1,133
C62L, S106A, Q128E, G227P, K391L	0,400	1,052
C62L, S106A, Q128E, G227P, Q288E, K391L	0,407	1,070
C62L, S106A, Q128E, T152I, G227P, P243E, H408L	0,498	1,310
Q110E, Q128E, Q288E, N319E	0,415	1,046
Q128E, H285E, Q288E, N319E	0,401	1,011
S106A, A117P, Q128E, T152I, G227P, N319E, V371P, N395F	0,390	1,025
S106A, G227P, H285E, V371P, K391L, H408L	0,415	1,045
S106A, H285E, Q288E	0,539	1,358
S106A, Q110E, G227P, H285E, K391L	0,421	1,108
S106A, Q110E, G227P, N319E, K391L, N395F	0,583	1,469
S106A, Q110E, Q128E, G227P, Q288E, N319E, K391L	0,424	1,069
S106A, Q128E	0,400	1,008
S106A, Q128E, H285E	0,523	1,317

Пример 8

- 10 **Способ скрининга вариантов Р450-ВМЗ на С19-гидроксилирование (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-она (дельта-1-тестостерона)**

Среда

Триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Предварительная культура

Каждая лунка планшета на 96 глубоких лунок содержала 0,25 мл среды, инокулированной штаммами *E. coli* (2 мкл), содержащими варианты P450-ВМЗ, хранящиеся в глицерине. Планшет встряхивали при 37°C и 800 об./мин. в течение 17 часов.

Основная культура

Каждая лунка 96-луночного планшета содержала 1,5 мл среды, в которую вносили 50 мкл предварительной культуры. Культуры встряхивали при 37°C и 800 об./мин. в течение 3 часов. Затем температуру снижали до 27°C в течение 1 часа и добавляли ИПТГ (1 мМ) в деминерализованной воде, чтобы начать экспрессию белка. После 4 часов экспрессии планшеты подвергали центрифугированию, супернатант удаляли, ресуспендировали осадок в 500 мкл реакционного буфера (КН₂РО₄ (4 г/л), К₂НРО₄ (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Биотрансформация

Планшеты размораживали и начинали реакцию с добавлением 5 мкл основного раствора стероида (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-она (12,5 мкг, растворенного в 5 мкл ДМФ), встряхивали планшеты в течение 22 часов при 700 об./мин. и при температуре 27°C, накрыв крышками. Планшеты замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Размороженные образцы готовили для скрининга ВЭЖХ путем добавления 500 мкл смеси ацетонитрил/метанол/ДМСО 1:1:1 (класса ВЭЖХ). Планшеты встряхивали и центрифугировали, затем 200 мкл супернатанта переносили в аналитический планшет. Планшет прикрывали силиконовой герметизирующей прокладкой и подвергали ВЭЖХ анализу.

Анализ ВЭЖХ

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ:

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка: Thermo Accucore С30 2,6мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,05 об.% муравьиной кислоты, Элюент Б: ацетонитрил + 0,05 об.% муравьиной кислоты; градиент: 0,0–2,0 мин. 5-30% Б, 2,0-5,0 мин. 85% Б; объем введения 4 мкл; скорость истечения 0,9 мл/мин.; температура: 45°C; DAD сканирование: 248-280 нм.

Таблица Е1: ВЭЖХ время удержания

Вещество	Время удержания
Дельта-1-тестостерон	2,40
Эстрадиол (Пример 10)	2,55
(15бета-ОН)-дельта-1-тестостерон (Пример 12)	1,39
(1альфа,2альфа-эпокси)-тестостерон (Пример 11)	2,46
(1альфа,2альфа-эпокси-15бета-ОН)-тестостерон (Пример 15)	1,35
(6бета-ОН)-дельта-1-тестостерон (Пример 16)	1,50
(1альфа,2альфа-эпокси-19-ОН)-тестостерон (Пример 14)	1,56
(15бета-ОН)-эстрадиол (Пример 13)	1,69

Результаты

После анализа сотен вариантов Р450-ВМ3 лишь несколько мутантов обеспечивали возможность С19-гидроксилирования дельта-1-тестостерона, что приводило к получению эстрадиола в качестве конечного продукта:

Таблица Е2: Выход эстрадиолового продукта в % для некоторых вариантов Р450 ВМ3.

	Мутации	Субстрат	Продукт	Выход приемлемых после исследования (%)
ВМ3 254	V78Y, A82E, F87A	дельта-1-тестостерон	эстрадиол	1,9
ВМ3 261	V78M, A82E, F87A	дельта-1-тестостерон	эстрадиол	6
ВМ3 263	V78I, A82E, F87A	дельта-1-тестостерон	эстрадиол	4,8
ВМ3 268	V78L, A82E, F87A	дельта-1-тестостерон	эстрадиол	6,6

В последующем эксперименте скрининга четырех вариантов ВМ3 были обнаружены следующие результаты скрининга для следующих (побочных) продуктов:

Таблица Е3: Продукты, полученные при использовании дельта-1-тестостерона в качестве субстрата для некоторых вариантов Р450 ВМ3.

Вариант	Субстрат	Выход приемлемых после исследования (%)					
		Пример 10	Пример 12	Пример 11	Пример 15	Пример 16	Пример 14
ВМ3 254	дельта-1-тестостерон	2,5	10,3	8,6	3,4	2,2	-
ВМ3 261	дельта-1-тестостерон	6,3	15	13,2	9,3	0,4	10,1
ВМ3	дельта-1-	3	21,6	1,6	11,8	1,5	6,5

Вариант	Субстрат	Выход приемлемых после исследования (%)					
		Пример 10	Пример 12	Пример 11	Пример 15	Пример 16	Пример 14
263	тестостерон						
ВМЗ 268	дельта-1- тестостерон	6,7	26,3	5,4	7,8	4,1	10,3

Пример 9

Способ скрининга вариантов Р450-ВМЗ для С19-гидроксилирования (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-она (тестостерона) в качестве субстрата.

5 Среду, предварительную и основную культуру готовили так, как описано для дельта-1-тестостерона (Пример 8).

Анализ ВЭЖХ

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ:

10 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Ascentis Express C18 2,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,05 об.% муравьиной кислоты, Элюент Б: ацетонитрил + 0,05 об.% муравьиной кислоты; градиент: 0,0–3,0 мин. 5–30% Б, 3,0–5,0 95% Б, 5,0–5,5 5% Б; объем введения 4 мкл; скорость истечения: 0,9 мл/мин.; температура: 45°C; DAD сканирование: 244 нм.

Таблица Е4: Время удерживания ВЭЖХ

Речовина	Час утримування
Тестостерон	3,45
(19-ОН)-тестостерон (Пример 17)	2,19
(2бета, 19-ди-ОН)-тестостерон (Пример 20)	1,63
(15бета, 19-ди-ОН)-тестостерон (Пример 18)	1,23
(2бета, 15бета-ди-ОН)-тестостерон (Пример 19)	1,17
(15бета-ОН)-тестостерон	1,95
(2бета-ОН)-тестостерон	2,92

15

Результаты

После исследования сотен вариантов Р450-ВМЗ лишь несколько вариантов обеспечивали возможность С19-гидроксилирования тестостерона:

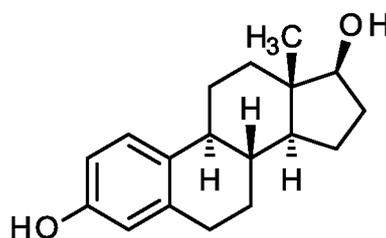
20 **Таблица Е5:** Продукты, образованные при использовании тестостерона в качестве субстрата для некоторых вариантов Р450 ВМЗ

Вариант	Субстрат	Выход приемлемых после исследования (%)					
		Пример 17	Пример 20	Пример 18	Пример 19	(2бета-ОН)-тестостерон	(15бета-ОН)-тестостерон
ВМЗ	тестостерон	8	4	-	-	29	5

Вариант	Субстрат	Выход приемлемых после исследования (%)					
		Пример 17	Пример 20	Пример 18	Пример 19	(2бета-ОН)-тестостерон	(15бета-ОН)-тестостерон
254							
ВМЗ 261	тестостерон	-	23	-	13	31	17
ВМЗ 263	тестостерон	-	11	4	5	35	16
ВМЗ 268	тестостерон	-	39	5	7	9	20

Пример 10

(17бета)-эстра-1(10),2,4-триен-3,17-диол



5 Экспрессионная система

Экспрессионная система *E. coli* BL 21(DE3) pETM11 из ВМЗ-268 была предоставлена М.Т. Reetz и описана в (Kille Sabrina, 2011) (DOI:10,1038/NCHEM,1113). Подходящие последовательности белка и гена, такого как pETM11-ВМЗ-268, приведены в SEQ ID No. 5 и 63, соответственно.

10 Культивирование

Среда предварительной культуры включала триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали перед добавлением канамицина (50 мг/л). Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 (DE3) pETM11-ВМЗ-268 (SEQ ID No. 5) (50 мкл), содержащим желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного 5-литрового стального ферментера. Среду культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,5 мл) растворяли в деминерализованной воде (4,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (0,25 г) в деминерализованной воде (10 мл). После инокуляции ферментера (16-часовая предварительная культура)

инокулированную культуру перемешивали при 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 2,5 л/мин. и парциальным давлением кислорода 30%, которое регулировалось скоростью перемешивания до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 40 г/ч). Через 4 часа и 25 минут, когда
5 было достигнуто значение OD550 16, температуру снижали до 28°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,19 г) в деминерализованной воде (50 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 8 часов и 35 минут клетки (124,6 г) собирали центрифугированием, суспендировали в буфере (125 мл; KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА
10 (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 4 x 45 мл, 1 x 35 мл и 10 x 1 мл.

Биотрансформация

В 5-литровый стальной ферментер, содержащий KH_2PO_4 (15 г), K_2HPO_4 (46,15 г), Pluronic® PE 8100 (0,5 мл), деминерализованную воду (3,8 л), водный
15 раствор глюкозы (50%, 375 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 3,75 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (500 мг, 1,75 ммоль), растворенный в ДМФА (10 мл), и смесь перемешивали при 140 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 2,0 л/мин. Добавляли клетки в буфере (215 мл) и смесь для биотрансформации перемешивали при парциальном давлении
20 кислорода 50%, которое регулировалось скоростью перемешивания до 800 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 26 часов и 5 мин. смесь биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном. Органический слой концентрировали с получением неочищенного масла (4,98 г), которое смешивали
25 с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 4 г масла. Сырьевой продукт очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/ацетон) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединения (4,3 мг, выход 0,8%).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

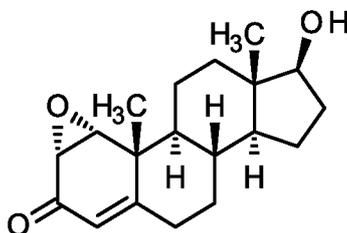
30 Прибор: система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 микрон 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,2 об.% водный раствор аммиака (32%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00–0,50 мин. 17% Б (40-70 мл/мин.), 0,51-5,50 мин. 34-44% Б (70 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

ЖХ-МС: $R_t = 1,01$ мин.; МС (электрораспылительная ионизация (ЭРИ) нег.): $m/z = 271 [M-H]^-$

1H -ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ [част. на млн.]: 0,000 (1,83), 0,710 (4,29), 1,102 (0,18), 1,113 (0,30), 1,132 (0,31), 1,141 (0,29), 1,160 (0,32), 1,185 (0,85), 1,213 (0,54), 1,224 (0,54), 1,243 (0,60), 1,255 (0,59), 1,273 (0,57), 1,286 (0,46), 1,303 (0,52), 1,317 (0,44), 1,329 (0,32), 1,348 (0,47), 1,355 (0,45), 1,375 (0,54), 1,398 (0,55), 1,407 (0,56), 1,429 (0,57), 1,438 (0,51), 1,460 (0,41), 1,471 (0,41), 1,509 (0,63), 1,590 (0,24), 1,599 (0,21), 1,616 (0,31), 1,621 (0,29), 1,633 (0,23), 1,640 (0,26), 1,775 (0,23), 1,783 (0,23), 1,790 (0,24), 1,807 (0,22), 1,814 (0,24), 1,821 (0,20), 1,851 (0,23), 1,859 (0,34), 1,867 (0,24), 1,882 (0,22), 1,890 (0,31), 1,898 (0,20), 2,030 (0,22), 2,043 (0,24), 2,053 (0,23), 2,063 (0,26), 2,077 (0,30), 2,100 (0,32), 2,211 (0,25), 2,218 (0,25), 2,244 (0,24), 2,252 (0,22), 2,554 (16,00), 2,736 (0,53), 2,749 (0,54), 2,776 (0,22), 3,642 (0,29), 3,664 (0,50), 3,685 (0,27), 6,498 (0,70), 6,546 (0,36), 6,552 (0,31), 6,567 (0,39), 6,574 (0,34), 7,076 (0,58), 7,097 (0,53).

Пример 11

(1альфа,2альфа,17бета)-17-гидрокси-1,2-эпоксиандрост-4-ен-3-он



Для получения указанного в заглавии соединения см. получение в соответствии с Примером 10. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/ацетон) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (13 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 16% Б (25-70 мл/мин.), 0,51-5,50 мин. 33-48% Б (70 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

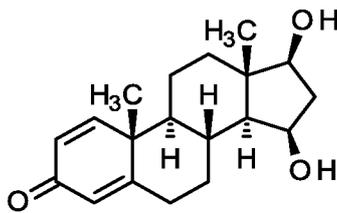
Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC ВЕН С18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210-400 нм.

Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 2,04$ мин.

1H-ЯМР (600 МГц, пиридин-d5): δ [част. на млн.]: 0,77 – 0,91 (м, 2H), 0,98 – 1,05 (м, 1H), 0,99 (с, 3H), 1,11 (тд, 1H), 1,23 – 1,32 (м, 1H), 1,34 (с, 3H), 1,43 – 1,53 (м, 2H), 1,55 – 1,67 (м, 2H), 1,73 – 1,81 (м, 2H), 2,01 – 2,14 (м, 3H), 2,20 (тд, 1H), 3,63 (дд, 1H), 3,74 (д, 1H), 3,89 (тд, 1H), 5,91 – 5,93 (м, 1H), 6,18 (д, 1H).

Пример 12

(15бета,17бета)-15,17-дигидроксиандроста-1,4-диен-3-он



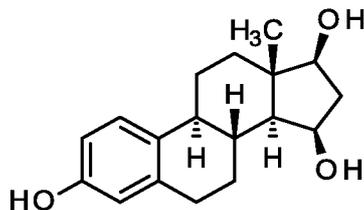
Для получения указанного в заглавии соединения см. получение в соответствии с Примером 10. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/ацетон) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (78 мг).

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 0,74$ мин.; МС (ЭРИ поз.): $m/z = 303$ [M+H]⁺

1H-ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ [част. на млн.]: 0,82 (дд, 1H), 1,05 – 1,16 (м, 3H), 1,11 (с, 3H), 1,28 (с, 3H), 1,58 – 1,65 (м, 1H), 1,71 (кд, 1H), 1,75 – 1,80 (м, 1H), 1,86 (дт, 1H), 2,09 (кд, 1H), 2,20 – 2,29 (м, 1H), 2,37 – 2,42 (м, 1H), 2,55 (тдд, 1H), 2,63 (ддд, 1H), 3,58 (т, 1H), 4,21 (ддд, 1H), 6,09 (с, 1H), 6,24 (дд, 1H), 7,08 (д, 1H).

Пример 13

(15бета,17бета)-эстра-1(10),2,4-триен-3,15,17-триол

**Культивирование**

- 5 Среду предварительной культуры с триптоном (16 г/л), хлоридом натрия (10 г/л) и дрожжевым экстрактом (10 г/л) в деминерализованной воде доводили до значения pH 7,3 при использовании раствора гидроксида натрия (16% в воде) и стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).
- 10 Одну предварительную культуру (100 мл каждая) инокулировали штаммом *Escherichia coli* BL 21 Gold (DE3) ΔdkgA :: FRT T7 gdh (50 мкл), который экспрессирует VM3-268; F77L и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эти предварительные культуры (100 мл) использовали для инокуляции одного 10-литрового стального ферментера. Среды для культивирования
- 15 готовили в ферментерах. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), K₂HPO₄ (2,2 г/л), K₂HPO₄ (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл),
- 20 гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции 17-часовой предварительной культурой инокулированную культуру перемешивали при 315 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. для регуляции парциального давления при значении pH 6,6, которое регулировали путем добавления водного раствора
- 25 гидроксида натрия (16%) или водного раствора фосфорной кислоты (16%). Через 2 часа, когда было достигнуто значение OD₅₅₀ 0,92, температуру снижали до 27°C в течение 15 минут и добавляли ИПТГ (2,38 г) в деминерализованной воде (40 мл) и аминокислоту (838 мг) в деминерализованной воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Через 12 часов водный раствор фосфорной
- 30 кислоты (16%) заменяли водным раствором глюкозы (50%) для регулирования

значения pH. Через дополнительные 24 часа клетки собирали центрифугированием (96,86 g), суспендировали в буфере (97 мл; KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 2 x 40 мл, 1 x 80 мл и 5 x 1 мл.

Биотрансформация 1

К одному ферментеру Biostat Q на 1 л, который содержал KH_2PO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл) добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (50 мг, 174,5 мкмоля), растворенный в ДМФА (4 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Добавляли клетки в буфере (20 мл), и биотрансформацию поддерживали при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Через 24 часа и 40 минут смесь биотрансформации замораживали и хранили при -20°C .

Биотрансформация 2

К одному ферментеру Biostat Q на 1 л, содержащему KH_2PO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (50 мг, 174,5 мкмоля), растворенный в ДМФА (4 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Добавляли клетки в буфере (40 мл) и биотрансформацию поддерживали при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Через 24 часа и 40 мин. смесь биотрансформации собирали, замораживали и хранили при -20°C .

Биотрансформация 3 + 4

К двум ферментерам Biostat Q объемом на 1 л, содержащим KH_2PO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (50 мг, 174,5 мкмоля), растворенный в ДМФА (4 мл). Смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4.

Прибавляли клетки в буфере (40 мл), и биотрансформацию поддерживали при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Через 5 часов и 20 минут культуру собирали, замораживали и хранили при -20°C.

5 Собранные четыре продукта биотрансформации размораживали, объединяли и экстрагировали 4-метил-2-пентаноном.

Органические фазы концентрировали с получением неочищенного масла (1,69 г), которое смешивали с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 1,04 г масла. Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (13,0 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

15 Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-8,00 мин. 35% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

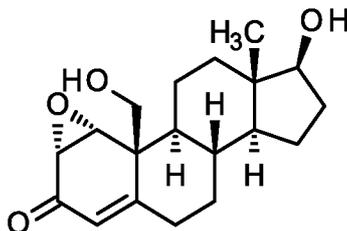
20 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210-400 нм.

Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,78$ мин.

25 1H-ЯМР (600 МГц, пиридин-d5): δ [част. на млн.]: 1,08 (дд, 1H), 1,37 (тд, 1H), 1,49 (кд, 1H), 1,61 (с, 3H), 1,65 - 1,74 (м, 1H), 2,17 - 2,24 (м, 2H), 2,28 (ддд, 1H), 2,32 - 2,39 (м, 2H), 2,49 - 2,56 (м, 1H), 2,81 - 2,89 (м, 2H), 2,94 - 3,01 (м, 1H), 3,96 (тд, 1H), 4,55 (с, 1H), 5,85 (д, 1H), 6,25 (д, 1H), 7,02 (д, 1H), 7,12 (дд, 1H), 7,38 (д, 1H), 11,16 (с, 1H).

Пример 14

(1альфа,2альфа,17бета)-17,19-дигидрокси-1,2-эпоксиандрост-4-ен-3-он



Для получения указанного в заголовке соединения см. Пример 13.

- 5 Сырьевой продукт (1,04 г) подвергали дополнительной обработке с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол), при этом препаративная ВЭЖХ обеспечивала получение указанного в заголовке соединения (7,4 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

- 10 Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-8,00 мин. 35% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

- 15 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210-400 нм.

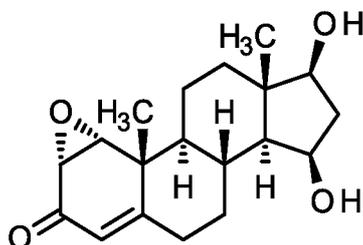
- 20 Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,80$ мин.

- 1H-ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ [част. на млн.]: -0,006 (0,17), 0,000 (4,06), 0,005 (0,19), 0,772 (0,44), 0,816 (16,00), 0,880 (0,19), 0,969 (0,54), 0,981 (0,62), 0,987 (0,73), 0,989 (0,80), 0,999 (0,79), 1,001 (0,80), 1,007 (0,70), 1,015 (0,41), 1,020 (0,77), 1,036 (0,77), 1,044 (0,88), 1,057 (0,93), 1,064 (0,94), 1,069 (1,08), 1,076 (1,00), 1,086 (0,47), 1,090 (0,59), 1,096 (0,51), 1,253 (0,81), 1,260 (0,82), 1,266 (0,73), 1,278 (0,76), 1,282 (1,02), 1,287 (0,83), 1,299 (0,81), 1,305 (0,86), 1,313 (0,39), 1,324 (0,90), 1,334 (0,94), 1,344 (1,03), 1,354 (1,03), 1,365 (0,45), 1,374 (0,43), 1,432 (0,59), 1,437 (0,64), 1,445 (0,72), 1,451 (0,96), 1,454 (0,88), 1,457 (0,79), 1,460 (0,87), 1,465 (0,68), 1,468 (0,78), 1,471 (0,71), 1,474 (0,96), 1,480 (0,52), 1,488 (0,46), 1,494 (0,47), 1,506 (0,43), 1,512 (0,49), 1,528 (0,85),
- 25
- 30

1,534 (1,04), 1,550 (0,85), 1,556 (0,84), 1,572 (0,55), 1,574 (0,61), 1,579 (0,75),
 1,586 (0,60), 1,590 (0 ,81), 1,595 (0,92), 1,602 (0,83), 1,607 (1,01), 1,611 (0,91),
 1,616 (0,83), 1,623 (1,01), 1,628 (1 ,22), 1,640 (1,51), 1,761 (0,34), 1,767 (0,37),
 1,779 (0,68), 1,785 (0,77), 1,799 (0,70), 1,806 (0, 68), 1,816 (0,29), 1,823 (0,30),
 5 1,862 (0,36), 1,868 (0,80), 1,873 (1,01), 1,882 (1,30), 1,884 (1,47)), 1,889 (1,08),
 1,898 (1,30), 1,905 (1,12), 1,910 (0,58), 1,992 (0,36), 2,000 (0,71), 2,004 (0,72) ,
 2,014 (0,49), 2,022 (0,68), 2,026 (0,67), 2,033 (0,35), 2,052 (0,38), 2,062 (0,43),
 2,067 (0,72), 2,074 (0,56), 2,077 (0,75), 2,083 (0,62), 2,090 (0,70), 2,092 (0,54),
 10 2,100 (0,62), 2,105 (0,40), 2,115 (0,33), 2,312 (0,50), 2,319 (0,68), 2,324 (0,56),
 2,334 (0,85), 2,339 (1,05), 2,346 (0,78), 2,372 (0,43), 2,396 (0,84), 2,403 (0,73),
 2,405 (0,74), 2,418 (0,98), 2,426 (0,94), 2,439 (0,42), 2,441 (0 ,42), 2,447 (0,39),
 3,358 (2,18), 3,361 (2,22), 3,364 (2,35), 3,367 (2,14), 3,633 (0,88), 3,647 (1, 53),
 3,662 (0,85), 3,944 (2,87), 3,950 (2,82), 4,173 (0,59), 4,263 (2,71), 4,281 (1,88),
 5,900 (2,52)), 7,267 (12,12).

15 **Пример 15**

(1альфа,2альфа,15бета,17бета)-15,17-дигидрокси-1,2-эпоксиандрост-4-ен-3-он
 он



20 Для получения указанного в заголовке соединения см. Пример 13. Неочищенный продукт (1,04 г) подвергали дополнительной обработке с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметана/этанола) и препаративной ВЭЖХ для получения указанного в заголовке соединения (2,8 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

25 Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (50-100 мл/мин), 0,51-8,00 мин. 5-35% Б (100 мл/мин), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

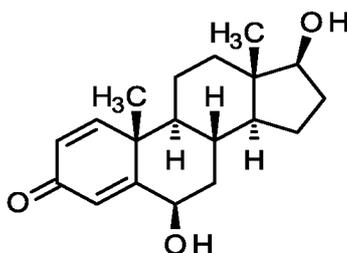
Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC ВЕН С18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210-400 нм.

Аналитическая хиральная ВЭЖХ: Rt = 0,73 мин.

¹H-ЯМР (600 МГц, CDCl₃, ХЛОРОФОРМ-d) δ [част. на млн.]: -0,006 (0,48), 0,000 (11,79), 0,005 (0,44), 0,825 (1,12), 0,835 (1,15), 0,844 (1,18), 0,854 (1,23), 0,857 (1,22), 0,881 (0,35), 1,070 (0,62), 1,076 (0,66), 1,091 (1,49), 1,104 (13,48), 1,112 (1,31), 1,119 (1,11), 1,134 (0,39), 1,141 (0,37), 1,227 (0,58), 1,234 (0,66), 1,254 (2,09), 1,266 (0,93), 1,272 (0,78), 1,398 (0,70), 1,440 (15,22), 1,457 (1,29), 1,513 (0,45), 1,546 (0,44), 1,571 (2,00), 1,576 (2,63), 1,590 (16,00), 1,610 (1,91), 1,614 (2,15), 1,619 (1,27), 1,635 (0,91), 1,641 (0,91), 1,657 (0,40), 1,663 (0,37), 1,786 (0,38), 1,792 (0,80), 1,797 (0,85), 1,804 (0,43), 1,808 (0,34), 1,815 (0,61), 1,820 (0,62), 1,872 (0,61), 1,877 (0,96), 1,883 (0,58), 1,893 (0,64), 1,898 (0,85), 1,905 (0,51), 2,108 (0,34), 2,114 (0,32), 2,126 (0,65), 2,133 (0,70), 2,145 (0,62), 2,152 (0,65), 2,215 (0,47), 2,219 (0,62), 2,226 (0,54), 2,236 (0,60), 2,240 (0,78), 2,247 (0,68), 2,262 (0,38), 2,269 (0,60), 2,274 (0,52), 2,283 (0,45), 2,291 (0,57), 2,294 (0,51), 2,405 (0,51), 2,414 (0,47), 2,428 (0,86), 2,435 (0,79), 2,449 (0,41), 2,457 (0,36), 2,603 (0,67), 2,616 (0,88), 2,617 (0,84), 2,627 (0,79), 2,630 (0,83), 2,640 (0,83), 2,642 (0,82), 2,654 (0,65), 3,385 (1,56), 3,388 (1,69), 3,391 (1,66), 3,395 (1,55), 3,571 (0,58), 3,585 (1,12), 3,600 (0,56), 3,678 (2,43), 3,684 (2,34), 4,182 (0,51), 4,191 (0,87), 4,199 (0,51), 5,746 (2,23).

25 **Пример 16**

(6бета,17бета)-6,17-дигидроксиандроста-1,4-диен-3-он



Для получения указанного в заголовке соединения см. Пример 13. Сырьевой продукт (1,04 г) подвергали дополнительной очистке с помощью

флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметана/этанола) и препаративной ВЭЖХ для получения указанного в заголовке соединения (2,4 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

- 5 Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-8,00 мин. 5-35% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

- 10 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC ВЕН C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210-400 нм.

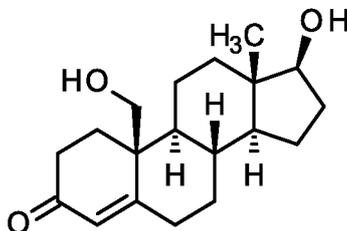
- 15 Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,75$ мин.

- 1Н-ЯМР (600 МГц, $CDCl_3$) δ [част. на млн.]: 0,000 (7,05), 0,850 (0,34), 0,857 (10,48), 0,868 (0,34), 0,960 (0,40), 0,972 (0,39), 0,979 (0,55), 0,990 (0,55), 0,998 (0,48), 1,010 (0,46), 1,056 (0,37), 1,065 (0,43), 1,075 (0,61), 1,082 (0,65), 1,089 (0,52), 1,094 (0,57), 1,096 (0,56), 1,103 (1,02), 1,110 (0,72), 1,118 (0,75), 1,131 (0,41), 1,139 (0,42), 1,215 (0,47), 1,220 (0,44), 1,235 (0,62), 1,238 (0,70), 1,241 (0,73), 1,243 (0,71), 1,253 (1,01), 1,258 (1,09), 1,264 (0,79), 1,377 (0,64), 1,387 (0,69), 1,398 (0,76), 1,407 (0,80), 1,418 (0,40), 1,427 (0,45), 1,440 (1,03), 1,456 (12,77), 1,464 (0,72), 1,470 (0,66), 1,473 (0,63), 1,46 (0,51), 1,478 (0,58), 1,487 (0,52), 1,490 (0,47), 1,492 (0,64), 1,499 (0,39), 1,506 (0,37), 1,512 (0,39), 1,562 (0,37), 1,571 (0,42), 1,602 (1,00), 1,608 (1,08), 1,614 (1,25), 1,619 (1,41), 1,623 (1,48), 1,628 (1,35), 1,631 (1,37), 1,635 (1,48), 1,638 (1,35), 1,644 (1,17), 1,651 (1,05), 1,656 (0,96), 1,705 (0,40), 1,712 (0,39), 1,727 (0,56), 1,734 (0,56), 1,748 (0,66), 1,754 (0,70), 1,768 (0,66), 1,773 (0,86), 1,777 (0,87), 1,780 (0,57), 1,785 (0,56), 1,792 (0,36), 1,795 (0,39), 1,799 (0,37), 1,883 (0,57), 1,889 (0,73), 1,895 (0,53), 1,905 (0,56), 1,910 (0,66), 1,916 (0,46), 2,052 (0,49), 2,057 (0,81), 2,062 (0,63), 2,069 (0,34), 2,074 (0,85), 2,081 (1,05), 2,085 (1,41), 2,090 (0,63), 2,093 (0,33), 2,097 (0,54), 2,102 (0,65), 2,107 (0,74), 2,112 (0,39), 2,122 (0,72), 2,127 (0,45), 3,646 (0,92), 3,660 (1,30), 3,674 (0,85), 4,543 (0,81), 4,548 (1,50), 4,553 (0,85),

6,162 (2,12), 6,165 (2,42), 6,210 (1,34), 6,213 (1,21), 6,226 (1,36), 6,229 (1,27),
7,052 (1,95), 7,069 (1,96), 7,264 (16,00).

Пример 17

(17бета)-17,19-дигидроксиандрост-4-ен-3-он



5

Приготовление 1

Экспрессионная система

Экспрессионная система *E. coli* BL 21(DE3) pETM11-BM3-254 была предоставлена М.Т. Reetz и описана в (Kille Sabrina, 2011) (DOI:10,1038/NСHEM,1113). Последовательности белка и гена приведены в SEQ ID No. 2 и 60, соответственно.

10

Культивирование

Среда предварительной культуры включала триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин.

15

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 (DE3) pETM11-BM3-254 (SEQ ID No. 5) (50 мкл), который включает желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного стального ферментера Biostat Q на 1 л. Среду культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,1 мл) растворяли в деминерализованной воде (1,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали при 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и парциальное давление кислорода 30% поддерживали скоростью перемешивания вплоть до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (50%, 4 г/ч). Через 4 часа и 50 минут, когда было достигнуто значение OD550 16,1, температуру снижали до 28°C в течение 5 минут и добавляли ИПТГ (238 мг) в деминерализованной воде (10 мл) для

20

25

30

начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов клетки (39,1 г) собирали центрифугированием, суспендировали в буфере (39,1 мл; KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 1 x 75 мл, 3 x 1 мл.

Биотрансформация

К двум ферментерам Biostat Q объемом 1 л, каждый из которых содержал KH_2PO_4 (3 г), K_2HPO_4 (9,23 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (0,75 л), водный раствор глюкозы (50%, 15 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 0,75 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-он (75,0 мг, 260 мкмоль), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (в каждом случае по 37 мл) и биотрансформацию поддерживали при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 800 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Через 26 часов добавляли водный раствор глюкозы (50%, 60 мл). Через 102,5 часа продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном. Органический слой концентрировали с получением масла (1,09 г), которое растворяли в метаноле и концентрировали с получением 0,91 г масла. Неочищенный продукт очищали далее с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметана/метанола) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (4,0 мг, выход 2,52%).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ:

Прибор: Labomatic HD5000, Labocord-5000; Gilson GX-241, Колонка Labcol Vario 4000: Chiralpak IA 5 мкм 250x30 мм; Элюент А: ацетонитрил + 0,1 об.% диэтиламина (99%); Элюент Б: этанол; изократический: 90% А + 10% Б; скорость истечения: 50,0 мл/мин.; УФ 254 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ:

Прибор: Agilent ВЭЖХ 1260; Колонка Chiralpak IA 3 мкм 100x4,6 мм; Элюент А: ацетонитрил + 0,1 об.% диэтиламина (99%); Элюент Б: этанол; изократический: 90% А + 10% Б; скорость истечения: 1,4 мл/мин.; температура: 25°C ; DAD 254 нм.

¹H-ЯМР (600 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ [част. на млн.]: 0,79 (с, 3H), 0,92 – 0,99 (м, 1H), 1,02 – 1,09 (м, 3H), 1,31 (кд, 2H), 2,05 - 2,13 (м, 1H), 2,32 - 2,44 (м, 4H), 2,75 (ддд, 1H), 3,65 (т, 1H), 3,92 (д, 1H), 4,08 (дд, 1H), 5,96 (с, 1H).

Приготовление 2

5 Экспрессионная система

Во втором приготовлении соединение, указанное в заголовке, синтезировали с помощью штамма *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA::FRT T7 gdh и плазмиды pETM11-ВМ3-254. Конструкция штамма *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA :: FRT T7 gdh описана в (Agudo R, 2012). Штамму придавали компетентность и трансформировали pETM11-ВМ3-254.

Подготовка компетентных клеток и трансформация

Необходимые растворы: буфер TFB1, который содержит KCH₃COO (2,95 г/л), KCl (7,46 г/л), CaCl₂ (1,11 г/л), глицерин (130 мл). Буфер TFB2 содержал KCl (0,75 г/л), CaCl₂ (11,1 г/л), буфер MOPS (2,1 г/л), глицерин (130 мл). Буферы подвергались автоклавированию. Раствор MgCl₂·6H₂O (95,2 г/л) готовили путем стерильной фильтрации.

Культуру (5 мл) бульонной среды Лурии-Бертани (10 г/л бактотриптона, 5 г/л бакто-дрожжевого экстракта, 10 г/л хлорида натрия) инокулировали глицериновой культурой (2 мкл) штамма *E. coli* BL 21 Gold (DE3 Δ dkgA :: FRT T7 gdh. Эту культуру встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение ночи. Ночную культуру (1 мл) использовали для инокуляции культуры (100 мл) бульонной среды Лурия-Бертани. Культуру инкубировали при 37°C и 165 об./мин. до достижения значения OD₆₀₀ 0,4-0,5, после чего центрифугировали культуру при 4°C и 4000 об./мин. в течение 15 минут. Все последующие вещества предварительно охлаждали на льду. Супернатант культуры удаляли, осадок клеток ресуспендировали в буфере TFB1 (30 мл) и 3,2 мл раствора MgCl₂ (3,2 мл) и инкубировали на льду в течение 15 мин. Смесь центрифугировали при 4°C и 4000 об./мин. в течение 10 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в буфере TFB2 (4 мл) и инкубировали в течение 15 минут на льду. Клетки разделяли на аликвоты по 50 мкл, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Для трансформации 50 мкл компетентных клеток размораживали на льду в течение 15 мин., добавляли 1-2 мкл плазмиды (pETM11-ВМ3-254), и смесь инкубировали на льду в течение 30 мин. Тепловой шок проводили в течение 45

секунд при 42°C с последующей инкубацией на льду в течение 5 минут. После добавления SOC ростовой среды (350 мкл) смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C и встряхивании при 1000 об./мин. Клетки (100 мкл) помещали на чашки с агаровым бульоном Лурия-Бертани, содержащим канамицин (50 мг/л), и инкубировали в течение ночи при 37°C. Единичные колонии отбирали и подвергали секвенированию.

Культивирование *E. coli* BL 21 Gold (DE3) ΔdkgA :: FRT T7 gdh pETM11-VM3-254 и экспрессия белка:

Среда предварительной культуры: триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Культивирование клеток 1

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) ΔdkgA :: FRT T7 gdh pETM11-VM3-254 (50 мкл), который содержит желательную плазмиду и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного ферментера Biostat Q на 1 л. Среду для культивирования готовили в ферментерах. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,1 мл) растворяли в деминерализованной воде (1,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (0,25 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали при 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и парциальным давлением кислорода 30%, которое поддерживали путем перемешивания при скорости до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 8 г/ч). Через 5 часов и 30 минут, когда было достигнуто значение OD550 15,72, температуру снижали до 28°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (238 мг) в деминерализованной воде (10 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов и 50 минут клетки (34,88 г) собирали центрифугированием, суспендировали в буфере (34,88 мл; K₂HPO₄ (4 г/л), K₂HPO₄ (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах. 2 x 25 мл, 3 x 1 мл и 1 x 13 мл.

Культивирование клеток 2

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA :: FRT T7 gdh pETM11-ВМ3-254 (50 мкл), который содержал желательную плазмиду и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного Biostat Q ферментера на 1 л. Среду для культивирования готовили в ферментерах. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,1 мл) растворяли в деминерализованной воде (4,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (0,25 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали при 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и парциальное давление кислорода 30% поддерживали путем перемешивания вплоть до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 8 г/ч). Через 5 часов и 5 минут, когда было достигнуто значение OD550 16,72, температуру снижали до 28°C в течение 5 минут и добавляли ИПТГ (238 мг) в деминерализованной воде (10 мл) и аминоклевулиновую кислоту (42 мг) в деминерализованной воде (5 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов и 10 мин. клетки (38 г) собирали центрифугированием, суспендировали в буфере (38 г; K_2HPO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до последующего использования в аликвотах 2 x 25 мл, 3 x 1 мл и 1x19 мл.

Культивирование клеток 3

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA :: FRT T7 gdh pETM11-ВМ3-254 (50 мкл), который содержал желательную плазмиду, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного стального ферментера на 10 литров. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,1 мл) растворяли в деминерализованной воде (8,8 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (500 мг) в деминерализованной воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции

ферментера (16-часовая предварительная культура) инокулированную культуру перемешивали со скоростью 400 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 4,0 л/мин., и парциальным давлением кислорода 30%, которое поддерживали путем перемешивания при 1200 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 80 г/ч). Через 5 часов и 20 минут, когда было достигнуто значение OD550 16,69, температуру снижали до 28°C в течение 5 минут и добавляли ИПТГ (2,38 г) в деминерализованной воде (20 мл) и аминоклевулиновую кислоту (420 мг) в деминерализованной воде (20 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов и 25 минут клетки (298,42 г) собирали центрифугированием, суспендировали в буфере (298,42 г; K_2HPO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 7 x 25 мл, 3x1 мл и 7x50 мл.

Биотрансформация 1

К одному Biostat Q ферментера на 1 л, который содержал K_2HPO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-он (100 мг, 347 мкмоль), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Добавляли клетки в буфере (50 мл продукта культивирования клеток 1) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 800 об./мин. Через 26,5 часов продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном.

Биотрансформация 2

В один Biostat Q ферментер на 1 л, который содержал K_2HPO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-он (100 мг, 347 мкмоль), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Добавляли клетки в буфере (50 мл продукта культивирования клеток 2) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения

скорости перемешивания до 800 об./мин. Через 26,5 часов продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном.

Биотрансформация 3

К одному Biostat Q ферментеру на 1 л, который содержал K_2HPO_4 (4 г),
5 K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-он (100 мг, 347 мкмоль), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4.
10 Добавляли клетки в буфере (50 мл продукта культивирования клеток 3) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 1200 об./мин. Через 26 часов 25 мин. продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном.

Биотрансформации 4 и 5

15 К двум Biostat Q ферментерам на 1 л, содержащим K_2HPO_4 (4 г), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (930 мл), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандрост-4-ен-3-он (25 мг, 87 мкмол), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью
20 аэрации 0,5 л/мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4. Добавляли клетки в буфере (50 мл продукта культивирования клеток 3) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 800 об./мин. Через 26 часов 25 мин. продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном.

25 Органические фазы пяти продуктов биотрансформаций соединяли и концентрировали, получая масло (4,45 г), которое смешивали с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 1,23 г масла. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и препаративной ВЭЖХ, получая
30 указанное в заголовке соединение (13,0 мг).

Метод аналитической ВЭЖХ:

Прибор: Acquity UPLCMS SingleQuad, колонка: Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент

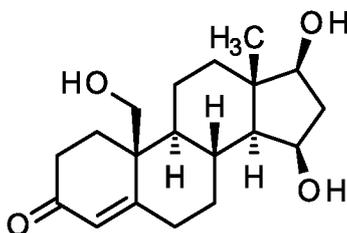
Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1–99% Б, 1,6–2,0 мин. 99% Б; скорость истечения 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210–400 нм.

Метод препаративной ВЭЖХ:

Прибор: Waters Autopurificationsystem; колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм
 5 150x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 9% Б (40-100 мл/мин.), 0,51-8,50 мин. 19-41% Б (100 мл/мин.), DAD сканирование: 210-400 нм.

Пример 18

(15бета,17бета)-15,17,19-тригидроксиандрост-4-ен-3-он



10

Для получения указанного в заголовке соединения см. Приготовление 2
 Примера 17. Сырьевой продукт (1,23 г) подвергали дополнительной очистке с
 помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент
 дихлорметана/этанола) и препаративной ВЭЖХ для получения указанного в
 15 заголовке соединения (2,2 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм
 150x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б:
 ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (40-100 мл/мин.), 0,51-8,50 мин. 5-
 20 30% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN
 C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%),
 Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1–99% Б, 1,6–2,0 мин. 99% Б;
 25 скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; DAD сканирование: 210–
 400 нм.

Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,63$ мин.

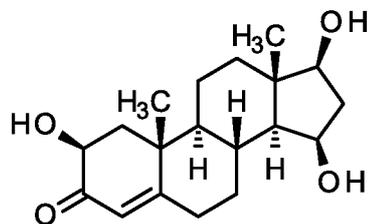
¹H-ЯМР (600 МГц, ДМСО-d₆) δ [част. на млн.]: 0,61 (дд, 1H), 0,82 – 0,97
 (м, 6H), 1,37 – 1,47 (м, 2H), 1,51 – 1,57 (м, 1H), 1,61 (тд, 1H), 1,64 – 1,68 (м, 1H),
 30 1,89 – 1,97 (м, 1H), 2,07 – 2,17 (м, 2H), 2,22 – 2,32 (м, 3H), 2,37 – 2,45 (м, 2H),

2,58 - 2,67 (м, 2H), 3,26 - 3,32 (м, 1H), 3,73 (дд, 1H), 3,85 (дд, 1H), 3,91 - 3,98 (м, 1H), 4,35 (д, 1H), 4,46 (д, 1H)), 4,72 (т, 1H), 5,74 (с, 1H).

1H-ЯМР (600 МГц, ДМСО-d₆) δ [част. на млн.]: -0,006 (0,85), 0,005 (0,77), 0,593 (1,06), 0,603 (1,08), 0,612 (1,10), 0,621 (1,08), 0,832 (0,48), 0,847 (0,83), 5 0,853 (0,89), 0,869 (0,54), 0,875 (0,56), 0,889 (16,00), 0,900 (0,68), 0,907 (0,64), 0,924 (1,06), 0,943 (1,10), 0,957 (0,56), 0,964 (0,54), 1,383 (0,68), 1,387 (0,70), 1,398 (0,85), 1,402 (0,95), 1,406 (0,83), 1,410 (0,77), 1,421 (1,12), 1,425 (1,31), 1,440 (0,68), 1,446 (0,66)), 1,529 (0,77), 1,535 (0,83), 1,552 (0,58), 1,557 (0,54), 1,588 (0,46), 1,602 (0,83), 1,611 (0,85) , 1,625 (0,48), 1,634 (0,46), 1,651 (1,02), 10 1,656 (0,60), 1,666 (0,64), 1,671 (0,95), 1,918 (0,73), 1,924 (0,79), 1,937 (0,73), 1,942 (0,75), 2,076 (0,44), 2,087 (0,60), 2,092 (0,79), 2,099 (0,56), 2,13 (0,73), 2,120 (1,37), 2,126 (1,14), 2,134 (0,54), 2,141 (0,58), 2,145 (0,64), 2,230 (0,77), 2,234 (0,56), 2,248 (0,79), 2,255 (1,31), 2,270 (1,35), 2,275 (0,93), 2,280 (1,24), 2,283 (1,22), 2,294 (1,43), 2,306 (0,77), 2,382 (0,81), 2,385 (1,16), 2,388 (1,64), 2,391 15 (1,31), 2,405 (0,75), 2,411 (0,70), 2,519 (3,59), 2,522 (3,63), 2,525 (3,05), 2,600 (0,58), 2,610 (1,08), 2,613 (1,04), 2,616 (1,33), 2,619 (1,02), 2,624 (0,79), 2,628 (0,75), 2,633 (0,70), 2,637 (0,62), 2,652 (0,62), 2,661 (0,48)), 3,265 (0,54), 3,273 (0,58), 3,279 (1,14), 3,287 (1,16), 3,293 (0,58), 3,302 (0,56), 3,713 (0,99) , 3,723 (1,04), 3,732 (1,31), 3,741 (1,26), 3,837 (1,02), 3,846 (1,08), 3,855 (0,81), 3,863 20 (0,77), 3,943 (0,87), 3,949 (0,87), 4,348 (2,88), 4,355 (2,82), 4,454 (2,47), 4,462 (2,38), 4,711 (1,18), 4,719 (2,47), 4,728(1,16), 5,740(3,34), 6,552(0,56), 8,318(1,16).

Пример 19

(2бета,15бета,17бета)-2,15,17-тригидроксиандрост-4-ен-3-он



25 Для получения указанного в заголовке соединения см. Приготовление 2 Примера 17. Сырьевой продукт (1,23 г) подвергли дополнительной очистке с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметана/этанола) и препаративной ВЭЖХ для получения указанного в заголовке соединения (1 мг).

Метод препаративной хиральной ВЭЖХ

Прибор: Система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 150x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 5% Б (40-100 мл/мин.), 0,51-8,50 мин. 5-30% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической хиральной ВЭЖХ

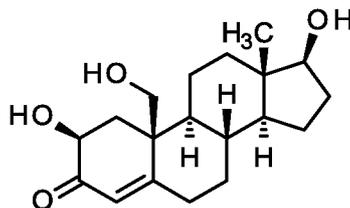
Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1-99% Б, 1,6-2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,64$ мин.

1Н-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ [част. на млн.]: 0,774 (1,91), 0,788 (1,77), 0,802 (1,30), 0,816 (1,29), 0,997 (0,71), 1,010 (14,33), 1,027 (0,71), 1,031 (0,70), 1,040 (0,91), 1,051 (1,46), 1,061 (0,86), 1,072 (0,57), 1,082 (0,82), 1,092 (0,42), 1,129 (0,40), 1,136 (0,42), 1,148 (0,61), 1,160 (16,00), 1,170 (0,89), 1,174 (0,86), 1,184 (3,29), 1,191 (1,47), 1,210 (0,65), 1,349 (0,55), 1,358 (0,57), 1,381 (0,95), 1,389 (0,89), 1,407 (0,92), 1,415 (0,98), 1,434 (0,69), 1,439 (0,56), 1,443 (0,76), 1,456 (0,60), 1,464 (2,08), 1,474 (1,47), 1,498 (3,80), 1,507 (1,42), 1,517 (1,52), 1,523 (1,55), 1,533 (2,86), 1,538 (1,94), 1,554 (1,66), 1,559 (1,68), 1,640 (0,47), 1,708 (0,49), 1,716 (0,89), 1,724 (0,89), 1,733 (0,51), 1,740 (0,42), 1,748 (0,63), 1,757 (0,62), 1,779 (0,74), 1,788 (1,01), 1,796 (0,61), 1,811 (0,61), 1,819 (0,93), 1,828 (0,54), 1,943 (0,50), 1,979 (0,98), 2,026 (1,06), 2,036 (0,61), 2,057 (0,70), 2,063 (0,57), 2,106 (0,64), 2,191 (0,71), 2,198 (1,06), 2,207 (1,84), 2,215 (0,62), 2,227 (1,79), 2,234 (1,28), 2,240 (0,81), 2,400 (1,05), 2,414 (1,07), 2,434 (0,99), 2,448 (0,98), 2,512 (0,43), 2,516 (0,45), 2,521 (0,76), 2,532 (0,66), 2,535 (0,71), 2,540 (1,23), 2,543 (1,28), 2,558 (0,89), 2,562 (1,02), 2,568 (0,44), 2,577 (1,01), 2,580 (1,05), 2,598 (0,68), 3,504 (1,26), 3,526 (2,58), 3,547 (1,18), 4,093 (1,59), 4,101 (0,86), 4,107 (1,71), 4,114 (1,31), 4,119 (0,79), 4,127 (1,90), 4,133 (0,80), 4,142 (1,13), 5,234(4,88), 5,755(3,02), 5,757(2,97).

Пример 20

(2бета,17бета)-2,17,19-тригидроксиандрост-4-ен-3-он



Среда для предварительной культуры: триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Культивирование клеток 1

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) ΔdkgA :: FRT T7 gdh pETM11-ВМ3-254 (50 мкл), который содержит желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного ферментера Biostat Q на 1 л. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,5 мл) растворяли в деминерализованной воде (1,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали со скоростью 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и поддерживали парциальное давление кислорода 30% путем перемешивания до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 8 г/ч). Через 5 часов и 30 минут, когда было достигнуто значение OD550 16,2, температуру снижали до 28°C в течение 15 минут и добавляли ИПТГ (0,24 г) в деминерализованной воде (10 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 10 часов и 5 минут клетки собирали центрифугированием (38,8 г), суспендировали в буфере (38,8 мл; КН₂РО₄ (4 г/л), К₂НРО₄ (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 3 x 1 мл и 7 x 10 мл.

Культивирование клеток 2

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA :: FRT T7 gdh pETM11-ВМ3-254 (50 мкл), который содержит желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного ферментера Biostat Q на 1 л. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,5 мл) растворяли в деминерализованной воде (1,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали со скоростью 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и поддерживали парциальное давление кислорода 30% путем перемешивания до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 8 г/ч). Через 5 часов, когда было достигнуто значение OD550 16,6, температуру снижали до 28°C в течение 15 минут и добавляли ИПТГ (0,24 г) в деминерализованной воде (10 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов и 15 минут клетки собирали центрифугированием (42 г), суспендировали в буфере (42 мл; K_2HPO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 3 x 1 мл и 7 x 10 мл

Культивирование клеток 3

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL 21 Gold (DE3) Δ dkgA :: FRT T7 gdh pETM11-ВМ3-254 (50 мкл), который содержит желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 16 часов. Эту предварительную культуру (10 мл) использовали для инокуляции одного ферментера Biostat Q на 1 л. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (20 г/л), хлорид натрия (20 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л) и Pluronic® PE 8100 (0,5 мл) растворяли в деминерализованной воде (1,0 л) и стерилизовали в течение 30 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (50 мг) в деминерализованной воде (5 мл). После инокуляции ферментера инокулированную культуру перемешивали со скоростью 500 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 0,4 л/мин. и

поддерживали парциальное давление кислорода 30% путем перемешивания при скорости вплоть до 1500 об./мин. Через 3 часа добавляли водный раствор глюкозы (25%, 8 г/ч). Через 5 часов и 5 минут, когда было достигнуто значение OD550 16,72, температуру снижали до 28°C в течение 15 минут и добавляли ИПТГ (0,238 г) в деминерализованной воде (10 мл) и гидрохлорид 5-аминолевулиновой кислоты (0,042 г) в деминерализованной воде (5 мл) для начала экспрессии белка. Через дополнительные 9 часов и 40 мин. клетки собирали центрифугированием (43 g), суспендировали в буфере (43 мл; K_2HPO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 3 x 1 мл и 5 x 15 мл .

Биотрансформация 1

К ферментеру Biostat Q на 1 л, который содержал K_2HPO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (0,93 л), водный раствор глюкозы (50% , 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-4-ен-3-он (100 мг, 0,35 ммоль), растворенный в ДМФА (5 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (50 мл предварительной культуры 2) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 800 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 4 часа снова добавляли клетки в буфере (20 мл). Через 28 часов и 10 минут биотрансформацию прекращали.

Биотрансформация 2

К ферментеру Biostat Q на 1 л, который содержал K_2HPO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (0,93 л), водный раствор глюкозы (50% , 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-4-ен-3-он (100 мг, 0,35 ммоль), растворенный в ДМФА (5 мл). Смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (50 мл предварительной культуры 3) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50% путем изменения скорости перемешивания до 800 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 27 часов и 45 минут биотрансформацию прекращали.

Биотрансформация 3

К ферментеру Biostat Q на 1 л, который содержал KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г), Pluronic® PE 8100 (0,1 мл), деминерализованную воду (0,93 л), водный раствор глюкозы (50% , 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 1 мл), добавляли (17бета)-17-гидроксиандроста-4-ен-3-он (4 x 25 мг, 0,35 ммоль), растворенный в ДМФА (4 x 2,5 мл), с интервалами через 0 час., 2 часа, 4 часа. и 6 часов, и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Клетки в буфере (50 мл продукта культивирования клеток 1) добавляли через 0 час., и биотрансформацию поддерживали при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания от 800 до 1200 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 28 часов биотрансформацию прекращали.

Три продукта биотрансформации соединяли и экстрагировали 4-метил-2-пентанолем. Органический слой концентрировали с получением масла (2,2 г), которое смешивали с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 1,06 г масла. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (7,8 мг, выход 2%).

20 Метод препаративной хиральной ВЭЖХ:

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% водный раствор аммиака (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00–0,50 мин. 10% Б (40-70 мл/мин.), 0,51-5,50 мин. 10-40% Б (70 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

25 Методы аналитической хиральной ВЭЖХ:

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; элюент А: вода + 0,1 об.% водный раствор аммиака (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-1,6 мин. 1–99% Б, 1,6–2,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

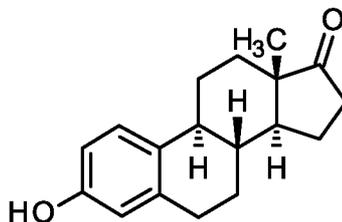
Аналитическая хиральная ВЭЖХ: $R_t = 0,73$ мин

^1H -ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ [част. на млн.]: 0,79 (с, 3H), 0,95 - 1,11 (м, 3H), 1,24 - 1,36 (м, 3H), 1,38 - 1,50 (м, 3H), 1,57 - 1,63 (м, 1H), 1,69 - 1,77 (м, 1H), 1,81 (дк, 1H), 1,87 (дт, 1H), 1,95 - 2,02 (м, 1H), 2,03 - 2,14 (м, 1H), 2,20 - 2,27 (м, 2H),

2,30 (с, 1H), 2,35 - 2,41 (м, 1H), 2,44 - 2,54 (м, 1H), 3,60 - 3,73 (м, 3H), 4,09 - 4,17 (м, 2H).

Пример 21

3-гидроксиэстра-1(10),2,4-триен-17-он



5

Экспрессионная система

E. coli BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, A74V, F77A

Культивирование

Среда для предварительной культуры: триптон (16 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (10 г/л) в деминерализованной воде. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,3. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, A74V, F77A (50 мкл), который содержал желательные плазмиды, встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 17 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного стального ферментера на 10 литров. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), K_2HPO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл), гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции ферментера культуру перемешивали при 315 об./мин. и температуре 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. при pH 6,6, которое регулировали путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%) или водного раствора фосфорной кислоты (16%). Через 2,55 часа, когда было достигнуто значение OD550 0,94, температуру снижали до 27°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,43 г) в воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Через 9,15 часов водный раствор фосфорной кислоты (16%)

заменяли водным раствором глюкозы (50%) для регулирования значения pH. Через дополнительные 23,5 часа, когда было достигнуто значение OD550 23,92, клетки собирали центрифугированием (215,6 г), суспендировали в буфере (215,6 мл; KH_2PO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/ л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до дальнейшего использования в аликвотах по 1 x 150 мл, 1 x 130 мл, 2 x 40 мл и 5 x 1 мл.

Биотрансформация

В 10-литровый стальной ферментер, содержащий KH_2PO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (123 г), Pluronic® PE 8100 (1 мл), деминерализованную воду (9,0 л), водный раствор глюкозы (50%, 200 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 10 мл), добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (500 мг, 1,75 ммоль), растворенный в ДМФА (10 мл), и смесь перемешивали при 315 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. Добавляли клетки в буфере (400 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 26 часов продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентанолом. Органический слой концентрировали с получением масла (2,37 г), которое смешивали с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 2,05 г масла. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол) и дважды с помощью препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (14 мг).

25 1. Метод препаративной ВЭЖХ:

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: Waters XBridge C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,2 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00–0,50 мин. 23% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-13,50 мин. 23-43% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

30 1. Метод аналитической ВЭЖХ:

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б;

скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 1,10$ мин.

2. Метод препаративной ВЭЖХ

5 Прибор: Sepiatec: Prep SFC100; Колонка Chiralpak IG 5 мкм 250x30 мм; Элюент А: CO₂; Элюент Б: метанол; изократический: 20% Б; скорость истечения: 100 мл/мин.; температура: 40°C; BPR: 150 бар; УФ: 280 нм.

2. Метод аналитической ВЭЖХ

10 Прибор: Agilent: 1260, Aurora SFC-Modul; Колонка Chiralpak IG 5 мкм 100x4,6 мм; элюент А: CO₂; Элюент Б: метанол; изократический: 20% Б; скорость истечения: 4 мл/мин.; температура: 37,5°C; BPR: 100 бар; УФ: 280 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 3,66$ мин.

¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ [част. на млн.]: 0,820 (16,00), 1,293 (0,48), 1,322 (0,95), 1,329 (0,75), 1,348 (2,38), 1,371 (1,82), 1,401 (0,24), 1,450 (0,87), 15 1,461 (0,83), 1,476 (1,50), 1,492 (0,75), 1,523 (0,55), 1,529 (0,44), 1,545 (0,36), 1,552 (0,59), 1,575 (0,36), 1,583 (0,32), 1,726 (0,99), 1,733 (0,91), 1,748 (0,79), 1,754 (0,67), 1,882 (0,51), 1,890 (0,55), 1,896 (0,59), 1,915 (0,75), 1,921 (0,83), 1,935 (0,63), 1,943 (0,67), 1,964 (0,48), 1,976 (0,44), 2,011 (0,59), 2,033 (0,91), 2,058 (0,83), 2,071 (0,20), 2,080 (1,19), 2,102 (0,51), 2,136 (0,55), 2,284 (0,40), 20 2,301 (0,71), 2,314 (0,71), 2,326 (0,51), 2,331 (0,24), 2,394 (0,95), 2,414 (1,07), 2,440 (0,75), 2,461 (0,95), 2,518 (0,71), 2,522 (0,48), 2,539 (0,44), 2,664 (0,20), 2,669 (0,24), 2,673 (0,20), 2,710 (0,20), 2,735 (1,35), 2,747 (1,43), 2,775 (0,51), 3,298 (0,20), 6,444 (2,06), 6,450 (2,42), 6,496 (1,35), 6,502 (1,07), 6,517 (1,39), 6,523 (1,15), 7,036 (1,82), 7,056 (1,66), 9,033 (4,63).

25 ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ [част. на млн.]: 0,82 (с, 3H), 1,22 - 1,41 (м, 3H), 1,42 - 1,61 (м, 3H), 1,69 - 1,79 (м, 1H), 1,86 - 1,99 (м, 2H), 2,00 - 2,19 (м, 2H), 2,25 - 2,35 (м, 1H), 2,43 (дд, 1H), 2,68 - 2,83 (м, 2H), 6,45 (д, 1H), 6,51 (дд, 1H), 7,05 (д, 1H), 9,03 (с, 1H).

30 Для другого получения указанного в заглавии соединения см. Пример 25. Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединения (91 мг).

Кроме того, указанное в заголовке соединение синтезировали при использовании андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) в качестве субстрата с помощью следующих процедур со скрининговыми выходами, указанными ниже.

Вариант ВМЗ	Вариант биотрансформации	Конц. субстрата (мг/л)	OD550	pH	Скрининговый выход (%) Пример 21 через 23 часа
А	2	400	35	7,0	61
А	4	800	44	6,6	58
А	3	1500	210	6,6	55
Б	1	400	26	6,6	29
В	1	400	36	6,6	28
В	1	400	28	6,6	61*
Г	2	400	35	7,0	7
Г	2	400	32	7,0	32
Д	1	400	34	6,6	32
Е	1	400	30	6,6	48
Ж	1	400	36	6,6	66
З	1	400	29	6,6	46
И	1	400	34	6,6	60

5 *через 47 часов культивирования

Экспрессионные системы

А: *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; M177Y, A184Y (Белок SEQ ID No. 15; ДНК SEQ ID No. 73) + S72G, V178P, L181Y, L188F

10 **Б:** *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; M177Y, A184Y (Белок SEQ ID No. 15; ДНК SEQ ID No. 73) + S72G, T146F, V178W, L181Y

В: *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (Белок SEQ ID No. 117; ДНК Seq ID No. 120) + R179L

Г: *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y, L188F (Белок SEQ ID No. 117; ДНК SEQ ID No. 120)

15 **Д:** *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (Белок SEQ ID No. 119; ДНК SEQ ID No. 122)

20 **Е:** *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (Белок SEQ ID No. 119; ДНК SEQ ID No. 122) + вставка з последовательностью SEQ ID No. 137

Ж: *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (Белок SEQ ID No. 119; ДНК SEQ ID No. 122) + вставка с последовательностью SEQ ID No. 126

З: *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (Белок SEQ ID No. 119; ДНК SEQ ID No. 122) + вставка с последовательностью SEQ ID No. 139

И: *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S, I458G, A477N (Белок SEQ ID No. 119; ДНК SEQ ID No. 122) + вставка с последовательностью SEQ ID No. 145.

10 Среда для предварительной культуры: триптон (16 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (10 г/л) в деминерализованной воде. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,3. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом (50 мкл), который содержит желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 17 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного 10-литрового стального ферментера. Среда для культивирования готовили в ферментере. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), K_2HPO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл), гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции ферментера культуру перемешивали при 315 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. при значении pH 6,6, которое регулировали путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%) или водного раствора фосфорной кислоты (16%). После достижения значения OD550 0,9-1,0 температуру снижали до 27°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,43 г) в воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Водный раствор фосфорной кислоты (16%) был заменен водным раствором глюкозы (50%) для регулирования значения pH после истечения периода времени, как описано в таблице, представленной ниже. После времени культивирования, указанного в таблице ниже, клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в буфере, 1 г клеточного осадка в 1 мл

буфера (KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)) замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах по 80 мл.

Вариант	Время культивирования (час.)	Время перехода фосфорная кислота-глюкоза (час.)
А	24	12,3
А	48	12,0
А	48	12,0
Б	31	23,5
В	24	14,3
В	48	14,0
Г	24	14,5
Г	31	24,5
Д	48	9,3
Е	48	11,3
Ж	48	9,8
З	48	14,0
И	48	9,5

5 Биотрансформация 1

В стеклянный ферментер объемом 1 л, который содержал KH_2PO_4 (9,54 г), K_2HPO_4 (5,19 г), 0,1 мл Pluronic® PE 8100, деминерализованную воду (0,9 л), водный раствор глюкозы (50 %, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 мМ, 1 мл), добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (400 мг, 1,41 ммоль/л), растворенный в ДМФА (8 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (80 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении растворенного кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 2000 об./мин. После того, как концентрация глюкозы снижалась ниже 5 г/л, начинали подкормку водным раствором глюкозы (50%). Значение pH поддерживали на уровне pH 6,6 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 0 часов, 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 7 часов, 23 часа и 47 часов брали образец для анализа (2 мл) и измеряли титр для Примера 21 методами, указанными ниже.

Вариант	Начал підкормки глюкозой (час.)	Общее количество глюкозы (г)
Б	3	68,5
В	3	66,7
В	7	25,1
Д	5	51,7
Е	5	70,6
Ж	5	70,9
З	1	61,2
И	7	63,9

Биотрансформация 2

В стеклянный ферментер объемом 1 л, который содержал K_2HPO_4 (6,8 г), K_2HPO_4 (8,7 г), 0,1 мл Pluronic® PE 8100, деминерализованную воду (0,9 л), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 мМ, 1 мл), вносили андроста-1,4-диен-3,17-дион (400 мг, 1,41 ммоль/л), растворенный в ДМФА (8 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (80 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении растворенного кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 2000 об./мин. После того, как концентрация глюкозы снижалась ниже 5 г/л, начинали подкормку водным раствором глюкозы (50%). Значение pH поддерживали на уровне pH 7,0 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 0 часов, 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 7 часов и 23 часа брали образец для анализа (2 мл) и измеряли титр для Примера 21 методами, указанными ниже.

Вариант	Начало підкормки підживлення глюкозой (час.)	Общее количество глюкозы (г)
А	7	данные отсутствуют
Г	5	79
Г	5	66,3

Биотрансформация 3

В стеклянный ферментер объемом 1 л, который содержал K_2HPO_4 (9,54 г), K_2HPO_4 (5,19 г), 0,1 мл Pluronic® PE 8100, деминерализованную воду (0,5 л), водный раствор глюкозы (50%, 20 мл), 20 мл ДМФА и водный раствор ЭДТА (0,5 мМ, 1 мл), добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (1500 мг, 5,27 ммоль/л) в

виде водной суспензии (15,4 мл маточного раствора 125 г/л; 78%), и смесь перемешивали при 500 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (400 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении растворенного кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 2000 об./мин. при добавлении чистого кислорода для аэрации в диапазоне 0,4 л/мин. и уменьшая аэрацию воздуха на тот же объем в минуту, чтобы поддерживать скорость аэрации 0,5 л/мин. Через 3 часа начинали подкормку водным раствором глюкозы (50%). Измеренное количество глюкозы не должно было уменьшаться ниже 5 г/л. Общее количество добавленной глюкозы составило 97,9 г. Значение pH поддерживали на уровне pH 6,6 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 0 часов, 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 7 часов и 23 часа брали аналитический образец (2 мл) и измеряли титр для Примера 21 методами, указанными ниже.

Биотрансформация 4

В стеклянный ферментер объемом 1 л, который содержал K_2HPO_4 (9,54 г), K_2HPO_4 (5,19 г), 0,1 мл Pluronic® PE 8100, деминерализованную воду (0,9 л), водный раствор глюкозы (50 %, 20 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 мМ, 1 мл), добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (800 мг, 2,81 ммоль/л), растворенный в ДМФА (16 мл), и смесь перемешивали при 300 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 0,5 л/мин. Добавляли клетки в буфере (80 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении растворенного кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 2000 об./мин. Через 23 часа начинали подкормку водным раствором глюкозы (50%). Измеренное количество глюкозы не должно было снижаться ниже 5 г/л. Общее количество добавленной глюкозы составляло 67,5 г. Значение pH поддерживали на уровне pH 6,6 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 0 часов, 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 7 часов и 23 часа брали аналитический образец (2 мл) и измеряли титр для Примера 21 методами, указанными ниже.

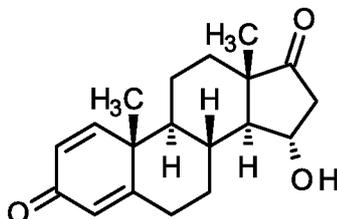
Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLC (I-класс, H-класс) или Thermo Scientific ISQ EM SingleQuad; Колонка: Ascentis Express C18 2,7мкм, 150x2,1 мм; Элюент А: Вода + 0,05% муравьиной кислоты (99%); Элюент Б: ацетонитрил + 0,05% муравьиной кислоты; градиент: 0-9 мин. 5-30% Б, 9-15 мин. 30-95% Б; скорость

истечения: 0,7 мл/мин.; температура: 45°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 243 нм + 280 нм.

Пример 22

15альфа-гидроксиандроста-1,4-диен-3,17-дион



5

Для получения указанного в заглавии соединения см. Пример 21. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол) и дважды с помощью препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (14 мг).

10

1. Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 17% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-8,50 мин. 17-37% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

15

1. Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

20

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 0,82$ мин.

2. Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: PrepCon Labomatic HPLC; Колонка: YMC Cellulose SC 5 мкм, 250x30 мм; Элюент А: гексан + 0,1 об.% диэтиламина; Элюент Б: 2-пропанол; изократический: 70% А + 30% В; скорость истечения: 50 мл/мин.; температура: 25°C; УФ: 254 нм.

25

2. Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Alliance 2695; Колонка: YMC Cellulose SC 3 мкм, 100x4,6 мм; Элюент А: гексан + 0,1 об.% диэтиламина; Элюент Б: 2-пропанол;

30

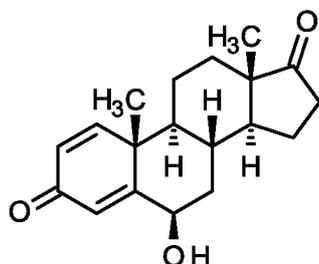
изократический: 70% А + 30% Б; скорость истечения: 1,4 мл/мин.; температура: 25°C; УФ: 254 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 9,28$ мин.

1H-ЯМР (600 МГц, $CDCl_3$) δ [част. на млн.]: 0,000 (2,45), 0,736 (0,49), 0,839 (0,64), 0,848 (0,52), 0,856 (0,53), 0,862 (0,46), 0,869 (0,88), 0,881 (1,19), 0,892 (0,62), 1,071 (0,16), 1,139 (0,57), 1,146 (0,65), 1,157 (0,67), 1,159 (0,78), 1,163 (0,80), 1,166 (0,69), 1,177 (0,65), 1,184 (0,62), 1,189 (0,46), 1,197 (0,55), 1,210 (0,78), 1,217 (0,88), 1,233 (1,06), 1,239 (1,17), 1,254 (5,41), 1,262 (3,03), 1,270 (14,17), 1,281 (2,20), 1,288 (1,62), 1,297 (1,04), 1,306 (16,00), 1,333 (0,30), 1,348 (0,42), 1,356 (0,21), 1,376 (0,22), 1,399 (0,16), 1,412 (0,17), 1,601 (0,17), 1,642 (0,51), 1,700 (0,19), 1,724 (0,23), 1,731 (0,33), 1,747 (0,53), 1,753 (0,50), 1,768 (0,70), 1,774 (0,62), 1,789 (0,32), 1,796 (0,33), 1,840 (0,70), 1,844 (1,02), 1,851 (1,63), 1,858 (0,95), 1,861 (0,97), 1,866 (1,73), 1,868 (1,14), 1,873 (1,06), 1,877 (0,57), 1,884 (0,28), 2,163 (0,24), 2,169 (0,28), 2,181 (0,55), 2,187 (0,64), 2,201 (0,54), 2,206 (0,60), 2,219 (0,21), 2,225 (0,26), 2,267 (0,30), 2,271 (0,41), 2,276 (0,50), 2,280 (0,46), 2,288 (0,41), 2,292 (0,42), 2,297 (0,46), 2,301 (0,44), 2,307 (0,28), 2,434 (0,41), 2,438 (0,48), 2,441 (0,51), 2,445 (0,42), 2,456 (0,59), 2,461 (0,67), 2,463 (0,68), 2,468 (0,52), 2,503 (0,69), 2,513 (0,64), 2,535 (1,79), 2,545 (1,79), 2,567 (0,41), 2,569 (0,53), 2,575 (2,58), 2,590 (0,64), 2,592 (0,66), 2,598 (0,63), 2,600 (0,64), 2,607 (0,88), 2,612 (0,34), 2,614 (0,31), 2,621 (0,27), 2,623 (0,37), 4,576 (0,66), 4,585 (1,06), 4,593 (0,65), 6,107 (1,41), 6,109 (2,45), 6,112 (1,50), 6,245 (1,70), 6,248 (1,64), 6,262 (1,64), 6,266 (1,59), 7,060 (2,35), 7,078 (2,17), 7,267 (8,94).

Пример 23

25 ббета-гидроксиандроста-1,4-диен-3,17-дион



Для получения указанного в заглавии соединения см. Пример 21. Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол)

и дважды с помощью препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (2 мг).

1. Метод препаративной ВЭЖХ

5 Прибор: система автоочистки воды; Колонка: Waters XBrigde C18 5 мкм 50x50 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,00-0,50 мин. 17% Б (50-100 мл/мин.), 0,51-8,50 мин. 17 – 37% Б (100 мл/мин.), УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

1. Метод аналитической ВЭЖХ

10 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты (99%), Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: Rt = 0,82 мин.

2. Метод препаративной ВЭЖХ

15 Прибор: PrepCon Labomatic HPLC; Колонка: YMC Cellulose SC 5 мкм, 250x30 мм; Элюент А: гексан + 0,1 об.% диэтиламина; Элюент Б: 2-пропанол; изократический: 70% А + 30% Б; скорость истечения: 50 мл/мин.; температура: 25°C; УФ: 254 нм.

2. Метод аналитической ВЭЖХ

20 Прибор: Waters Alliance 2695; Колонка: YMC Cellulose SC 3 мкм, 100x4,6 мм; Элюент А: гексан + 0,1 об.% диэтиламина; Элюент Б: 2-пропанол; изократический: 70% А + 30% Б; скорость истечения: 1,4 мл/мин.; температура: 25°C; УФ: 254 нм.

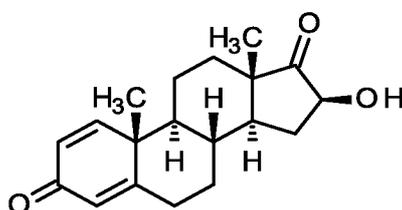
25 Аналитическая ВЭЖХ: Rt = 6,58 мин.

1H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ [част. на млн.]: 0,697 (1,62), 0,717 (0,16), 0,833 (0,65), 0,851 (1,06), 0,879 (16,00), 0,986 (0,57), 0,996 (0,57), 1,014 (0,89), 1,023 (0,97), 1,042 (0,73), 1,052 (0,65), 1,083 (0,32), 1,147 (0,65), 1,164 (1,06), 1,172 (0,89), 1,184 (1,38), 1,195 (1,87), 1,232 (5,28), 1,256 (1,38), 1,272 (1,06), 30 1,289 (1,38), 1,293 (1,46), 1,300 (1,22), 1,317 (0,97), 1,330 (0,97), 1,347 (0,65), 1,351 (0,65), 1,373 (16,00), 1,472 (0,41), 1,495 (0,81), 1,502 (0,65), 1,517 (0,57), 1,526 (1,14), 1,534 (0,57), 1,548 (0,73), 1,557 (0,65), 1,579 (0,32), 1,598 (0,32), 1,609 (0,41), 1,631 (0,65), 1,641 (0,81), 1,668 (2,60), 1,692 (0,89), 1,698 (1,22), 1,708 (0,65), 1,784 (0,73), 1,795 (0,81), 1,805 (0,57), 1,822 (0,65), 1,833 (0,81),

1,847 (0,65), 1,853 (0,73), 1,867 (0,73), 1,883 (0,57), 1,898 (0,49), 1,959 (0,81),
 1,967 (0,81), 1,975 (1,22), 1,981 (1,71), 2,006 (1,46), 2,017 (0,73), 2,028 (1,38),
 2,051 (0,49), 2,080 (0,32), 2,089 (0,32), 2,109 (0,73), 2,116 (0,65), 2,138 (0,73),
 2,165 (0,32), 2,173 (0,24), 2,331 (0,97), 2,336 (0,49), 2,380 (1,14), 2,401 (1,14),
 5 2,428 (1,30), 2,450 (1,79), 2,518 (3,65), 2,522 (2,44), 2,539 (0,49), 2,673 (0,89),
 2,678 (0,41), 4,398 (1,71), 4,405 (1,71), 5,331 (2,27), 5,336 (2,19), 6,054 (3,49),
 6,058 (4,30), 6,084 (2,60), 6,089 (1,79), 6,109 (2,36), 6,114 (1,95), 7,168 (3,17),
 7,193 (3,09).

Пример 24

10 16-бета-гидроксиандроста-1,4-диен-3,17-дион



Экспрессионная система

E. coli BL21 Star™ (DE3) pETM11-ВМ3-268; F77A, M177Y

Культивирование

15 Среда предварительной культуры: триптон (10 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л) в деминерализованной воде. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-ВМ3-268; F77A, M177Y (50 мкл), который
 20 содержал желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 17 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного стального ферментера на 10 л. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), КН₂РО₄ (2,2 г/л),
 25 К₂НРО₄ (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл), гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции ферментера культуру
 30 перемешивали при 315 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. при

значении pH 6,6, которое регулировали путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%) или водного раствора фосфорной кислоты (16%). Через 3,15 часа, когда было достигнуто значение OD550 1,0, температуру снижали до 27°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,43 г) в воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Через 8 часов водный раствор фосфорной кислоты (16%) заменяли водным раствором глюкозы (50%) для регулирования значения pH. Через дополнительные 24 часа, когда было достигнуто значение OD550 25,2, клетки собирали центрифугированием (284,2 г), суспендировали в буфере (284,2 мл; KH_2PO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 2 x 150 мл, 1 x 140 мл, 2 x 40 мл и 5 x 1 мл.

Биотрансформация

В 10-литровый стальной ферментер, который содержал KH_2PO_4 (40 г), K_2HPO_4 (123 г), Pluronic® PE 8100 (1 мл), деминерализованную воду (9,0 л), водный раствор глюкозы (50%, 200 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 10 мл), добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (500 мг, 1,75 ммоль), растворенный в ДМФА (10 мл), и смесь перемешивали при 315 об./мин. и температуре 27°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. Добавляли клетки в буфере (400 мл) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 26 часов продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентаноном. Органический слой концентрировали, получая масло (1,71 г), которое смешивали с метанолом, фильтровали и концентрировали с получением 1,55 г масла. Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/метанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (11 мг).

Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: Sepiatec: Prep SFC100; Колонка Reprosil Chiral NR 8 мкм 250x30 мм; Элюент А: CO_2 ; Элюент Б: 2-пропанол; изократический: 25% Б; скорость истечения: 100 мл/мин.; температура: 40°C; BPR: 150 бар; УФ: 254 нм.

Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Agilent: 1260, Aurora SFC-Modul; Колонка Reprosil Chiral NR 5 мкм 100x4,6 мм; Элюент А: CO₂; Элюент Б: 2-пропанол; изократический: 25% Б; скорость истечения: 4 мл/мин.; температура: 37,5°C; ВРР: 100 бар; УФ: 254 нм.

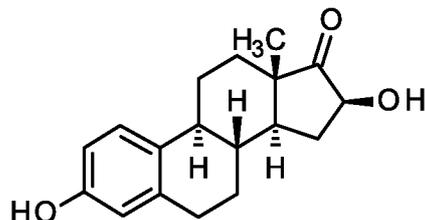
5 Аналитическая ВЭЖХ: Rt = 3,41 мин.

¹H-ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ [част. на млн.]: 0,000 (2,08), 1,032 (13,48), 1,117 (0,25), 1,124 (0,30), 1,129 (0,47), 1,137 (0,99), 1,147 (0,90), 1,150 (0,65), 1,154 (0,70), 1,157 (0,93), 1,168 (0,97), 1,175 (0,53), 1,180 (0,33), 1,188 (0,30), 1,222 (0,50), 1,230 (0,53), 1,237 (0,38), 1,239 (0,59), 1,244 (0,71), 1,248 (0,70), 10 1,252 (0,83), 1,256 (0,66), 1,262 (0,78), 1,272 (16,00), 1,322 (0,38), 1,330 (0,43), 1,337 (0,26), 1,344 (0,81), 1,351 (0,86), 1,366 (0,46), 1,373 (0,45), 1,558 (0,71), 1,573 (0,73), 1,578 (0,78), 1,580 (0,67), 1,593 (0,82), 1,596 (0,70), 1,600 (0,71), 1,616 (0,71), 1,723 (0,35), 1,730 (0,38), 1,745 (0,66), 1,752 (0,68), 1,767 (0,71), 1,774 (0,75), 1,788 (0,35), 1,796 (0,36), 1,850 (0,36), 1,854 (0,71), 1,857 (0,73), 15 1,861 (0,91), 1,869 (0,48), 1,872 (0,82), 1,879 (0,99), 1,884 (0,55), 1,892 (0,77), 1,897 (0,59), 1,909 (0,25), 1,916 (0,27), 1,928 (0,59), 1,933 (0,66), 1,935 (0,65), 1,940 (0,51), 1,950 (0,57), 1,954 (0,62), 1,957 (0,60), 1,961 (0,46), 2,073 (0,30), 2,077 (0,40), 2,081 (0,47), 2,083 (0,44), 2,085 (0,44), 2,092 (0,39), 2,099 (0,40), 2,102 (0,44), 2,104 (0,43), 2,113 (0,27), 2,380 (0,61), 2,388 (0,62), 2,393 (0,63), 20 2,400 (0,80), 2,408 (0,60), 2,413 (0,59), 2,422 (0,84), 2,426 (0,51), 2,430 (0,43), 2,441 (0,67), 2,446 (0,73), 2,448 (0,72), 2,453 (0,59), 2,504 (0,41), 2,507 (0,45), 2,512 (0,45), 2,515 (0,44), 2,526 (0,65), 2,529 (0,66), 2,535 (0,65), 2,538 (0,61), 2,549 (0,29), 2,552 (0,31), 2,557 (0,27), 2,560 (0,25), 2,623 (5,61), 3,948 (1,17), 3,962 (1,59), 3,977 (1,10), 6,101 (1,45), 6,103 (2,45), 6,107 (1,46), 6,241 (1,54), 25 6,244 (1,48), 6,258 (1,70), 6,262 (1,62), 7,031 (2,46), 7,048 (2,39), 7,266 (8,11).

¹H-ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ [част. на млн.]: 1,03 (с, 3H), 1,11 - 1,20 (м, 2H), 1,21 - 1,28 (м, 1H), 1,27 (с, 3H), 1,31 - 1,38 (м, 1H), 1,59 (дд, 1H), 1,76 (кд, 1H), 1,84 - 1,97 (м, 3H), 2,06 - 2,12 (м, 1H), 2,37 - 2,46 (м, 2H), 2,50 - 2,57 (м, 1H), 2,78 (с, 1H), 3,96 (т, 1H), 6,10 (т, 1H), 6,25 (дд, 1H), 7,04 (д, 1H).

Пример 25

3,16бета-дигидроксиэстра-1(10),2,4-триен-17-он

**Культивирование**

5 Среда предварительной культуры: триптон (16 г/л), хлорид натрия (10 г/л) и дрожжевой экстракт (10 г/л) в деминерализованной воде. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,3. Среду стерилизовали при 121°C в течение 20 минут. После этого добавляли канамицин (50 мг/л).

Культивирование клеток 1: одну предварительную культуру (100 мл)
 10 инокулировали штаммом *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; M177Y, A184Y, S72G, V178P, L181Y, L188F (50 мкл), который содержал желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 17 часов. Эту предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного
 15 стального ферментера на 10 литров. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), KH_2PO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли
 20 канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл), гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции ферментера культуру перемешивали при 315 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. при значении pH 6,6, которое регулировали путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%) или водного раствора фосфорной кислоты (16%). Через 4 часа, когда было
 25 достигнуто значение OD550 0,7, температуру снижали до 27°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,43 г) в воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Через 9,50 часов водный раствор фосфорной кислоты (16%) заменяли водным раствором глюкозы (50%) для регулирования значения pH. Через
 30 дополнительные 24 часа, когда было достигнуто значение OD550 19,6, клетки собирали центрифугированием (194,4 г), суспендировали в буфере (194,4 мл;

KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4% (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 1 x 150 мл, 1 x 100 мл, 2 x 40 мл и 5 x 1 мл.

5 Культивирование клеток 2: одну предварительную культуру (100 мл) инокулировали штаммом *E.coli* BL21 Star™ (DE3) pETM11-BM3-268; M177Y, A184Y, S72G, V178P, L181Y, L188F (50 мкл), который содержал желательные плазмиды, и встряхивали при 37°C и 165 об./мин. в течение 17 часов. Эту
10 предварительную культуру (100 мл) использовали для инокуляции одного стального ферментера на 10 литров. Среду для культивирования готовили в ферментере. Триптон (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), предварительно переваренный экстракт говядины (2 г/л), KH_2PO_4 (2,2 г/л), K_2HPO_4 (9,4 г/л) и глицерин (87%, 4,6 г/л) растворяли в деминерализованной воде (9,2 л) и стерилизовали в течение 20 минут при 121°C в ферментере. Затем добавляли
15 канамицин (0,5 г) в воде (20 мл), рибофлавин (10 мг) в воде (20 мл), гидрохлорид тиамин (3,37 г) в воде (10 мл) и оксфордский раствор микроэлементов (2,5 мл). После инокуляции ферментера культуру перемешивали при 315 об./мин. при 37°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. при значении pH 6,6, которое регулировали добавлением водного раствора гидроксида натрия (16%) или
20 водного раствора фосфорной кислоты (16%). Через 3,55 часа, когда было достигнуто значение OD550 0,69, температуру снижали до 27°C в течение 10 минут и добавляли ИПТГ (1,43 г) в воде (40 мл) для начала экспрессии белка. Через 9 часов водный раствор фосфорной кислоты (16%) заменяли водным раствором глюкозы (50%) для регулирования значения pH. Через
25 дополнительные 24 часа, когда было достигнуто значение OD550 27,75, клетки собирали центрифугированием (231 г), суспендировали в буфере (231 мл; KH_2PO_4 (4 г/л), K_2HPO_4 (12,3 г/л), глицерин (4) % (об./об.)), глюкоза (5% (мас./об.)), ЭДТА (0,5 мМ)), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до последующего использования в аликвотах 2 x 150 мл, 1 x 50 мл, 2 x 40 мл и 5
30 x 1 мл.

Биотрансформация

В 10-литровый стальной ферментер, содержащий KH_2PO_4 (40 г), K_2HPO_4 (123 г), Pluronic® PE 8100 (1 мл), деминерализованную воду (9,0 л), водный раствор глюкозы (50%, 200 мл) и водный раствор ЭДТА (0,5 М, 10 мл),

добавляли андроста-1,4-диен-3,17-дион (500 мг, 1,75 ммоль), растворенный в ДМФА (10 мл), и смесь перемешивали при 315 об./мин. при 27°C со скоростью аэрации 3,3 л/мин. Добавляли клетки в буфере (330 мл продукта культивирования клеток 1 и 150 мл продукта культивирования клеток 2) и поддерживали биотрансформацию при парциальном давлении кислорода 50%, изменяя скорость перемешивания до 1200 об./мин. Значение pH поддерживали на уровне pH 7,4 путем добавления водного раствора гидроксида натрия (16%). Через 4 часа продукт биотрансформации экстрагировали 4-метил-2-пентанолом. Органический слой концентрировали с получением масла (5,65 г), которое растворяли в метаноле, и концентрировали с получением 3,73 г масла.

Неочищенный продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (54 мг).

Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: XBrigde C18 5 мкм, 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,0-0,5 мин. 23% Б (35-70 мл/мин.), 0,5-5,5 мин. 23-58% Б; скорость истечения: 70 мл/мин.; температура: 25°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка: Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/хв.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210-400 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 0,84$ мин.

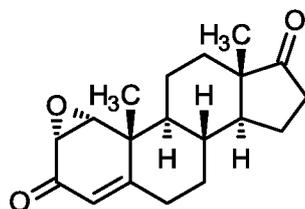
^1H -ЯМР (600 МГц, Пиридин- d_5) δ [част. на млн.]: 1,04 (с, 3H), 1,28 - 1,41 (м, 2H), 1,45 - 1,62 (м, 3H), 1,75 (ддд, 1H), 1,86 - 1,93 (м, 1H), 1,98 - 2,08 (м, 1H), 2,21 - 2,27 (м, 1H), 2,28 - 2,36 (м, 1H), 2,45 - 2,53 (м, 1H), 2,80 - 2,92 (м, 2H), 4,30 (т, 1H), 7,03 (д, 1H), 7,11 (дд, 1H), 7,28 (д, 1H), 7,91 (с, 1H), 11,24 (с, 1H).

^1H -ЯМР (600 МГц, Пиридин- d_5) δ [част. на млн.]: -0,002 (1,01), 0,000 (2,61), 0,965 (0,35), 1,038 (16,00), 1,292 (0,33), 1,303 (0,42), 1,313 (0,94), 1,323 (1,00), 1,333 (1,12), 1,344 (1,18), 1,353 (0,90), 1,355 (0,90), 1,365 (1,11), 1,370 (1,07), 1,374 (1,06), 1,378 (0,87), 1,388 (0,84), 1,396 (0,76), 1,461 (0,25), 1,467 (0,28),

1,483 (0,83), 1,489 (0,69), 1,504 (1,07), 1,508 (1,19), 1,524 (2,72), 1,539 (1,21),
 1,545 (1,23), 1,553 (0,73), 1,557 (0,76), 1,561 (0,70), 1,571 (1,25), 1,574 (1,22),
 1,590 (1,08), 1,593 (1,04), 1,608 (0,40), 1,612 (0,36), 1,722 (0,73), 1,737 (0,96),
 1,741 (1,08), 1,744 (0,91), 1,757 (1,08), 1,759 (0,97), 1,764 (0,84), 1,779 (0,67),
 5 1,875 (0,85), 1,881 (0,87), 1,886 (0,98), 1,890 (0,83), 1,896 (0,93), 1,901 (0,84),
 1,907 (0,81), 2,007 (0,29), 2,026 (1,65), 2,031 (1,03), 2,042 (1,15), 2,046 (1,18),
 2,051 (0,70), 2,224 (0,72), 2,241 (1,12), 2,253 (0,50), 2,260 (0,54), 2,302 (1,04),
 2,313 (0,84), 2,317 (0,78), 2,324 (1,11), 2,329 (1,01), 2,474 (0,74), 2,482 (0,89),
 2,487 (0,99), 2,494 (1,19), 2,502 (0,94), 2,506 (0,82), 2,515 (0,68), 2,813 (0,44),
 10 2,823 (0,52), 2,841 (1,32), 2,849 (1,37), 2,858 (0,95), 2,869 (0,89), 2,879 (0,83),
 2,888 (0,90), 2,907 (0,31), 2,917 (0,27), 3,615 (0,54), 4,287 (0,83), 4,301 (1,48),
 4,314 (0,78), 5,038 (1,80), 7,025 (2,83), 7,029 (2,71), 7,099 (1,47), 7,103 (1,36),
 7,113 (1,74), 7,117 (1,46), 7,212 (11,96), 7,270 (2,43), 7,284 (2,07), 7,580 (5,57),
 7,908 (0,88), 8,729 (10,46), 11,240 (0,77).

15 **Пример 26**

1-альфа,2-альфа-1,2-эпоксиандрост-4-ен-3,17-диен



Для получения указанного в заглавии соединения см. Пример 25. Сырьевой
 продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при
 20 использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и препаративной
 ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (5,8 мг).

Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: XBridge C18 5 мкм, 100x30
 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил;
 25 градиент: 0,0–0,5 мин. 23% Б (35-70 мл/мин.), 0,5-5,5 мин. 23–58% Б; скорость
 истечения: 70 мл/мин.; температура: 25°C; УФ-детектирование на диодной
 матрице: 210–400 нм.

Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC BEH
 30 C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент

Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

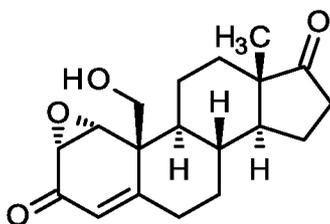
Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 1,06$ мин.

5 1H-ЯМР (600 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ [част. на млн.]: 0,95 (с, 3H), 1,13 (кд, 1H), 1,23 – 1,36 (м, 4H), 1,42 (с, 3H), 1,54 – 1,68 (м, 2H), 1,84 – 1,94 (м, 2H), 1,88 – 1,98 (м, 1H), 2,05 – 2,15 (м, 2H), 2,22 – 2,31 (м, 1H), 2,36 – 2,43 (м, 1H), 2,48 (дд, 1H), 3,40 (дд, 1H), 3,67 (д, 1H), 5,76 (с, 1H).

10 1H-ЯМР (600 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ [част. на млн.]: 0,000 (1,78), 0,880 (0,44), 0,935 (0,39), 0,949 (14,78), 0,988 (1,17), 1,093 (0,36), 1,100 (0,42), 1,114 (0,85), 1,121 (0,85), 1,136 (0,89), 1,143 (0,90), 1,157 (0,45), 1,164 (0,41), 1,238 (0,73), 1,244 (0,81), 1,255 (2,21), 1,279 (1,39), 1,288 (1,42), 1,303 (1,60), 1,309 (1,87), 1,318 (0,94), 1,327 (1,16), 1,419 (16,00), 1,545 (0,66), 1,560 (1,16), 1,565 (1,06), 1,576 (0,92), 1,581 (1,72), 1,587 (1,04), 1,596 (1,54), 1,602 (1,28), 1,610 (1,26), 15 1,617 (1,71), 1,633 (1,26), 1,638 (1,20), 1,654 (0,67), 1,662 (0,58), 1,849 (0,39), 1,856 (0,43), 1,868 (1,11), 1,875 (1,61), 1,880 (1,14), 1,887 (1,23), 1,895 (1,53), 1,900 (2,16), 1,918 (0,88), 1,925 (1,35), 1,936 (0,62), 1,940 (0,70), 1,950 (0,73), 1,956 (0,56), 1,961 (0,61), 1,971 (0,54), 2,013 (0,39), 2,072 (0,90), 2,086 (1,84), 2,093 (0,67), 2,103 (1,67), 2,119 (1,48), 2,134 (0,65), 2,245 (0,61), 2,252 (0,74), 20 2,257 (0,60), 2,267 (0,85), 2,271 (0,99), 2,278 (0,76), 2,291 (0,41), 2,371 (0,67), 2,380 (0,75), 2,393 (1,15), 2,402 (1,07), 2,414 (0,57), 2,423 (0,47), 2,454 (1,10), 2,468 (1,06), 2,486 (0,96), 2,501 (0,92), 2,625 (0,45), 3,393 (1,58), 3,396 (1,81), 3,398 (1,89), 3,402 (1,65), 3,662 (2,62), 3,668 (2,55), 5,756 (2,73), 7,264 (14,93).

Пример 27

25 19-гидрокси-1альфа,2альфа-1,2-эпоксиандрост-4-ен-3,17-дион



30 Для получения указанного в заглавии соединения см. Пример 25. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и дважды с помощью препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (3,7 мг).

1. Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: XBrigde C18 5 мкм, 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,0–0,5 мин. 23% Б (35-70 мл/мин.), 0,5-5,5 мин. 23–58% Б; скорость истечения: 70 мл/мин.; температура: 25°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

1. Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

2. Метод препаративной ВЭЖХ

Прибор: система автоочистки воды; Колонка: XBrigde C18 5 мкм, 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,0–0,5 мин. 20% Б (35-70 мл/мин.), 0,5-5,5 мин. 20–30% Б; скорость истечения: 70 мл/мин.; температура: 25°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

2. Метод аналитической ВЭЖХ

Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 0,82$ мин.

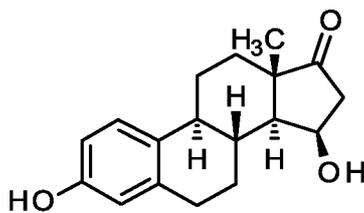
^1H -ЯМР (600 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ [част. на млн.]: 0,95 (с, 3H), 1,12 - 1,21 (м, 1H), 1,23 - 1,37 (м, 3H), 1,54 - 1,65 (м, 2H), 1,84 - 2,01 (м, 4H), 2,06 - 2,18 (м, 2H), 2,33 - 2,41 (м, 2H), 2,43 - 2,52 (м, 2H), 3,38 (дд, 1H), 3,95 (д, 1H), 4,16 (т, 1H), 4,29 (д, 1H), 5,92 (с, 1H).

^1H -ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ [част. на млн.]: 0,881 (0,18), 0,904 (0,57), 0,927 (0,28), 0,948 (16,00), 1,136 (0,33), 1,143 (0,36), 1,157 (0,87), 1,164 (0,89), 1,179 (0,96), 1,186 (0,96), 1,200 (0,48), 1,208 (0,57), 1,240 (0,68), 1,247 (0,73), 1,263 (1,38), 1,269 (1,30), 1,287 (1,12), 1,291 (0,93), 1,297 (0,82), 1,308 (0,99), 1,315 (0,97), 1,318 (0,96), 1,326 (1,21), 1,331 (0,88), 1,336 (0,89), 1,347 (1,18), 1,364

(0,77), 1,369 (0,76), 1,414 (0,40), 1,545 (0,55), 1,552 (0,60), 1,568 (1,36), 1,574 (1,53), 1,590 (2,54), 1,597 (2,84), 1,606 (4,35), 1,621 (2,17), 1,627 (1,63), 1,642 (0,73), 1,881 (0,80), 1,887 (1,28), 1,893 (0,88), 1,904 (0,80), 1,909 (1,20), 1,915 (0,87), 1,926 (0,50), 1,937 (1,32), 1,945 (1,51), 1,952 (1,50), 1,958 (2,52), 1,963 (2,30), 1,970 (1,32), 1,981 (1,80), 2,076 (0,82), 2,090 (1,33), 2,108 (1,19), 2,115 (0,59), 2,123 (2,28), 2,138 (1,12), 2,143 (0,92), 2,148 (0,85), 2,367 (1,13), 2,373 (1,49), 2,388 (1,21), 2,394 (1,41), 2,399 (0,97), 2,435 (0,78), 2,443 (0,82), 2,458 (1,29), 2,464 (2,12), 2,478 (1,61), 2,487 (0,59), 2,495 (1,14), 2,510 (1,01), 2,623 (0,54), 3,377 (1,81), 3,380 (2,08), 3,383 (2,14), 3,387 (1,91), 3,942 (2,83), 3,949 (2,78), 4,146 (0,55), 4,163 (1,05), 4,179 (0,71), 4,278 (2,45), 4,297 (1,82), 5,920 (3,16), 7,266 (11,03).

Пример 28

3,15бета-дигидроксиэстра-1(10),2,4-триен-17-он



15 Для получения указанного в заголовке соединения см. Пример 25. Сырьевой продукт дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии при использовании силикагеля (градиент дихлорметан/этанол) и препаративной ВЭЖХ, получая указанное в заголовке соединение (0,8 мг).

Метод препаративной ВЭЖХ

20 Прибор: система автоочистки воды; Колонка: XBrigde C18 5 мкм, 100x30 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0,0–0,5 мин. 25% Б (35-70 мл/мин.), 0,5-5,5 мин. 25-35% Б; скорость истечения: 70 мл/мин.; температура: 25°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

Метод аналитической ВЭЖХ

25 Прибор: Waters Acquity UPLCMS SingleQuad; Колонка Acquity UPLC VEN C18 1,7 мкм, 50x2,1 мм; Элюент А: вода + 0,1 об.% муравьиной кислоты; Элюент Б: ацетонитрил; градиент: 0-2,6 мин. 1-99% Б, 2,6-3,0 мин. 99% Б; скорость истечения: 0,8 мл/мин.; температура: 60°C; УФ-детектирование на диодной матрице: 210–400 нм.

30

Аналитическая ВЭЖХ: $R_t = 0,85$ мин.

1Н-ЯМР (600 МГц, Пиримидин) δ [част. на млн.]: 0,000 (1,30), 1,267 (0,19),
 1,452 (0,59), 1,458 (0,76), 1,469 (0,83), 1,477 (0,91), 1,492 (4,48), 1,530 (0,23),
 1,551 (0,43), 1,574 (0,61), 1,596 (0,42), 1,618 (0,31), 2,018 (0,47), 2,037 (0,49),
 5 2,137 (0,40), 2,155 (0,41), 2,172 (0,16), 2,301 (0,26), 2,318 (0,42), 2,336 (0,26),
 2,352 (0,45), 2,379 (0,51), 2,496 (0,25), 2,666 (0,30), 2,676 (0,32), 2,697 (0,48),
 2,707 (0,47), 2,816 (0,89), 2,833 (0,26), 2,848 (0,98), 2,859 (0,55), 2,879 (0,32),
 2,887 (0,31), 2,898 (0,31), 4,782 (0,56), 4,989 (1,05), 6,502 (0,65), 7,002 (1,01),
 10 7,106 (0,53), 7,118 (0,60), 7,211 (16,00), 7,313 (0,74), 7,32 (0,66), 7,578(7,55),
 8,731(12,51), 11,201(0,27).

Ссылки

Патент WO200107630 A1 данные отсутствуют

Патент EP1196603 A1 данные отсутствуют

15 Патент WO2016007623 A1 данные отсутствуют

Патент WO200107630 A1 данные отсутствуют

Патент EP1131440 A2 данные отсутствуют

Acevedo-Rocha, CG, Gamble, C, Lonsdale, R, Li, A, Nett, N, Hoebenreich, S,
 Lingnau, JB, Wirtz, C, Fares, C, Hinrichs, H, Deege, A, Mulholland, AJ, Nov, Y,
 20 Leys, D, Mclean, K, Munro, A & Reetz, MT. «P450-Catalyzed Regio- и
 Diastereoselective Steroid Hydroxylation: Efficient Directed Evolution Enabled by
 Mutability Landscaping.» *ACS Catalysis* 8, no. 4 (2018): p. 3395-3410.

Agudo R, Roiban GD, Reetz MT. «Achieving regio- и enantioselectivity of
 P450-catalyzed oxidative CH activation of small functionalized molecules by
 25 structure-guided directed evolution.» *ChemBiochem*, 2012: 1465 -- 73.

Capdevila, Jorge H. и Wei, Shozou и Helvig, Christian и Falck, John R. и
 Belosludtsev, Yuri и Truan, Gilles и Graham-Lorence, Sandra E. и Peterson, Julian A.
 «The Highly Stereoselective Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by
 Cytochrome P450BM-3.» *Journal of Biological Chemistry* 271, no. 37 (1996): p.
 30 22663-22671.

F. Templeton, John и Lin, Weiyang и Ling, Yangzhi и Majgier-Baranowska,
 Helena и Marat, Kirk. «Synthesis of 19-hydroxy-1 β {,}19-cyclosteroids.» *J. Chem.
 Soc., Perkin Trans. 1*, 1997: 2037-2044.

Green, Michael R, и Joseph Sambrook. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

5 Hazel M Girvan, Andrew W Munro. «Applications of microbial cytochrome P450 enzymes in biotechnology и synthetic biology.» *Current Opinion in Chemical Biology* 31 (2016): 136-145.

Hershberg, E B, Rubin, Martin, Schwenk, Erwin. «SYNTHESIS OF ESTRONE FROM ANDROSTADIENEDIONE.» *The Journal of Organic Chemistry* 15, no. 2 (1950): p. 292 - 300.

10 Inhoffen, H H. «Der Weg vom Cholesterin zum Follikelhormon Oestradiol.» *Angewandte Chemie* 59, no. 7-8 (1947): 207 - 212.

IUPAC. *Gold Book - Compendium of Chemical Terminology*. n.d.

15 Kawahara R, Fujita K, Yamaguchi R. «Cooperative Catalysis by Iridium Complexes with a Bipyridonate Ligand: Versatile Dehydrogenative Oxidation of Alcohols и Reversible Dehydrogenation–Hydrogenation between 2- Propanol и Acetone.» 2012: 12790 -- 12794.

Kille Sabrina, Zilly Felipe E., Acevedo Juan P., Reetz Manfred T. «Regio- и stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution.» *Nat Chem*. 3, no. 9 (2011): p. 738–743.

20 Kille, Sabrina. *Flavoproteins in directed evolution : iterative CASTing to evolve YqjM и P450BM3*. Bochum, 2010.

McPherson, M. J. *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*. Vol. 73. IRL Press, 1991.

25 Mitsuteru Numazawa, Kouwa Yamashita, Nao Kimura и Madoka Takahashi. «Chemical aromatization of 19-hydroxyandrosta-1,4-diene-3,17-dione with acid или alkaline: Elimination of the 19-hydroxymethyl group as formaldehyde.» *Steroids* 74, no. 2 (2009): p. 208 - 211.

30 Munro, Andrew W, Daff, Simon, Coggins, John R, Lindsay, J Gordon, Chapman, Stephen K. «Probing Electron Transfer in Flavocytochrome P-450 BM3 и Its Component Domains.» *European Journal of Biochemistry* 239, no. 2 (1996): p. 403-409.

Narhi, L O и Fulco, A J. «Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*.» *Journal of Biological Chemistry* 261, no. 16 (1986): p. 7160-7169.

Noble MA, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, MacKay AC, Reid GA, Hanzlik RP, Munro AW. «Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3.» *The Biochemical journal* 339, no. Pt 2 (1999): p. 371-379.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназы (ВМЗ) для катализа С19-гидроксилирования стероида или производного стероида, где вариант ВМЗ
5 включает мутацию F87A и, по крайней мере, одну, и предпочтительно две дополнительные мутации, выбранные из:

(I) мутации в положении V78, предпочтительно V78F, V78Y, V78M, V78I или V78L, и

(II) мутации в положении A82, предпочтительно A82E, A82Q или A82P.

10

2. Вариант ВМЗ в соответствии с пунктом 1, характеризующийся тем, что включает

(I) по крайней мере, мутации:

а) V78Y, A82E и F87A (ВМЗ-254, SEQ ID No. 2),

15 б) V78M, A82E и F87A (ВМЗ-261, SEQ ID No. 3),

в) V78I, A82E и F87A (ВМЗ-263, SEQ ID No. 4),

г) V78L, A82E и F87A (ВМЗ-268, SEQ ID No. 5).

д) V78Y, A82P и F87A (SEQ ID No. 6),

е) V78M, A82P и F87A (SEQ ID No. 7),

20 ж) V78I, A82P и F87A (SEQ ID No. 8),

з) V78L, A82P и F87A (SEQ ID No. 9),

и) V78Y, A82Q и F87A (SEQ ID No. 10),

й) V78M, A82Q и F87A (SEQ ID No. 11),

к) V78I, A82Q и F87A (SEQ ID No. 12), или

25 л) V78L, A82Q и F87A (SEQ ID No. 13),

и по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять дополнительных мутаций и/или

(II) по крайней мере, мутации:

а) V78F, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 14),

30 б) V78L, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 15),

в) V78I, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 16),

г) V78M, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 17),

д) V78Y, A82E, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 18),

е) V78F, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 19),

- ж) V78L, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 20),
з) V78I, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 21),
и) V78M, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 22),
й) V78Y, A82P, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 23),
5 к) V78F, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 24),
л) V78L, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 25),
м) V78I, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 26),
н) V78M, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 27),
о) V78Y, A82Q, F87A, M177Y и A184Y (SEQ ID No. 28),
10 п) V78L, A82E, F87A, S72G, M177Y, V178P, L181Y, A184Y и L188F (SEQ
ID No. 117),
р) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y и A184Y (SEQ
ID No. 118), или
с) V78L, A82E, F87A, S72G, T146F, M177Y, V178W, L181Y, A184Y, G457S,
15 I458G и A477N (SEQ ID No. 119).

3. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, который характеризуется тем, что выход продукта для, по крайней мере, одного C19-гидроксилированного стероида или его производного или его
20 вторичного продукта составляет > 5%, предпочтительно > 8%, > 10%, или > 12%, даже более предпочтительно > 15%, >20%, >25%, > 30%, >35%, > 40%, > 45%, или > 50%, наиболее предпочтительно > 55%, > 60%, > 65%, 70% или 75%.

4. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, который характеризуется тем, что показатель селективности для C19-гидроксилирования, по крайней мере, одного стероида или производного
25 стероида составляет > 0,1, предпочтительно > 0,2 или > 0,3, даже более предпочтительно > 0,4 или > 0,5, наиболее предпочтительно > 0,5, > 0,6, > 0,7, > 0,8 или > 0,9.

30 5. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из пунктов 1 - 4, включающий мутации, по крайней мере, в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более положениях, выбранных из (A184), (A191), (A221), (A264), (A321), (A328), (A33), (A330), (A399), (A74),

(D168), (D208), (D222), (D363), (E13), (E143), (E267), (E352), (E64), (E82), (E93), (F173), (F205), (F261), (F331), (F393), (F77), (F81), (G240), (G271), (G402), (G415), (G570), (G677), (G85), (H266), (H659), (I153), (I174), (I258), (I259), (I263), (I401), (K210), (K224), (L150), (L181), (L188), (L20), (L262), (L272), (L29), (L324), (L333), (L356), (L437), (L75), (L78), (L86), (M118), (M177), (M185), (M212), (M354), (N70), (P243), (P326), (P329), (P392), (P9), (R147), (R161), (R190), (R203), (R255), (R323), (R47), (R50), (S164), (S176), (S54), (S72), (S89), (T146), (T149), (T260), (T268), (T269), (T327), (T365), (T436), (T438), (T49), (T88), (V178), (V26), (V299), (V314), (V371), (V48), (W325), (W367), (W90), (Y51), (A225), (A44), (D182), (D80), (E140), (E183), (E337), (E409), (G114), (G227), (G46), (H236), (H92), (K187), (K440), (K76), (M5), (N186), (P172), (Q189), (Q397), (Q403), (Q404), (Q73), (R179), (R79), (S270), (S53) и (T175).

6. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанный вариант ВМЗ имеет повышенную селективность и выход продукта С19-гидроксилирования по сравнению, по крайней мере, с одним вариантом ВМЗ, выбранным из вариантов в соответствии с SEQ ID No. 2 – 5.

7. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанная монооксигеназа включает мутации M177Y та/або A184Y.

8. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где указанный вариант включает, по крайней мере, следующие мутации (A184D), или (A184D, L188K), или (A184E), или (A184F), или (A184G), или (A184H), или (A184I), или (A184K), или (A184L), или (A184N), или (A184Q), или (A184R), или (A184W), или (A184W, L188F), или (A184Y), или (A184Y, L188K), или (A184Y, R50S), или (A221S), или (A264V), или (A321C), или (A321D), или (A321E), или (A321G), или (A321I), или (A321N), или (A321T), или (A321V), или (A328P), или (A330C), или (A330D), или (A330E), или (A330F), или (A330G), или (A330H), или (A330I), или (A330K), или (A330L), или (A330M), или (A330N), или (A330Q), или (A330R), или (A330S), или (A330T), или (A330T, E352A), или (A330T, F331V), или (A330V), или (A330W), или (A330Y), или (A330Y, W367C), или (A33V), или (A399C), или (A399E), или (A399G), или (A399I), или (A399L), или (A399M), или (A399N), или (A399Q), или (A399R), или (A399S), или

(A399T), или (A399V), или (A74C), или (A74C, L75V), или (A74D), или (A74D, F81V), или (A74E), или (A74F), или (A74G), или (A74G, L75C), или (A74H), или (A74I), или (A74I, A184W, L188F), или (A74I, F77A, L181Y, A184W), или (A74I, L181Y, L188K), или (A74I, L181Y, L188R), или (A74I, L188F), или (A74I, L188K), или (A74I, L188R), или (A74I, M177Y, A184R, L188F), или (A74I, M177Y, V178P, A184G), или (A74I, T146F), или (A74I, T146F, L181Y), или (A74I, T146F, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, L188F), или (A74I, T146F, L188K), или (A74I, T146F, V178P), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188K), или (A74I, T146F, V178P, L188R), или (A74I, T146F, V178W), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (A74I, T146F, V178W, L188F), или (A74I, T146F, V178W, L188K), или (A74I, T146F, V178W, L188R), или (A74I, V178P), или (A74I, V178P, L181Y), или (A74I, V178P, L181Y, L188R), или (A74I, V178P, L188F), или (A74I, V178P, L188K), или (A74I, V178P, L188R), или (A74I, V178W, L188F), или (A74I, V178W, L188K), или (A74I, V178W, L188R), или (A74K), или (A74L), или (A74M), или (A74N), или (A74P), или (A74Q), или (A74R), или (A74R, L75V), или (A74S), или (A74T), или (A74T, A184D), или (A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, F77A, V178W, A184Y), или (A74T, F77L, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y), или (A74T, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, L181Y, A184Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188K), или (A74T, L181Y, L188R), или (A74T, L188K), или (A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, A184D, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, L181Y, L188R), или (A74T, T146F, L188F), или (A74T, T146F, L188K), или (A74T, T146F, L188R), или (A74T, T146F, V178P), или (A74T, T146F, V178P, L181Y), или (A74T, T146F, V178P, L188K), или (A74T, T146F, V178P, L188R), или (A74T, T146F, V178W), или (A74T, T146F, V178W, L181Y), или (A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, T146F, V178W, L188R), или (A74T, V178P), или (A74T, V178P, L188F), или (A74T, V178P, L188K), или (A74T, V178P, L188R), или (A74T, V178W, L181Y, L188K), или (A74T, V178W, L188K), или (A74T, V178W, L188R), или (A74V), или (A74V, F77A, A184N, L188F), или (A74V, L181Y), или (A74V, L181Y, A184D, L188K), или (A74V, L181Y, A184W, L188F), или (A74V, L181Y, L188F), или (A74V, L188F), или (A74V, L188K), или (A74V, L75V), или (A74V, T146F, L181Y, L188K), или (A74V, T146F, L181Y,

L188R), или (A74V, T146F, L188K), или (A74V, T146F, L188R), или (A74V,
 T146F, V178W), или (A74V, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (A74V, V178P,
 A184W, L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188F), или (A74V, V178P, L181Y,
 L188K), или (A74V, V178P, L181Y, L188R), или (A74V, V178P, L188F), или
 5 (A74V, V178W, L188K), или (A74W), или (A74Y), или (D168Y, F173D), или
 (D363G, T438C), или (E13D, R47L), или (E143A), или (E143C), или (E143D), или
 (E143F), или (E143G), или (E143I), или (E143K), или (E143L), или (E143M), или
 (E143N), или (E143P), или (E143Q), или (E143R), или (E143S), или (E143V), или
 (E143W), или (E143Y), или (E267A), или (E267C), или (E267D), или (E267G), или
 10 (E267K), или (E267P), или (E267R), или (E267S), или (E267T), или (E267Y), или
 (E352A), или (E352D), или (E352F), или (E352G), или (E352I), или (E352L), или
 (E352M), или (E352N), или (E352P), или (E352R), или (E352S), или (E352T), или
 (E352V), или (E352W), или (E352Y), или (E64A), или (E64G), или (E64H), или
 (E64I), или (E64K), или (E64L), или (E64M), или (E64N), или (E64Q), или
 15 (E64V), или (E64W), или (E64Y), или (E82P), или (E93G), или (F173C), или
 (F173C, F205G), или (F173D), или (F173I), или (F173K), или (F173L), или
 (F173M), или (F173N), или (F173P), или (F173Q), или (F173R), или (F173S), или
 (F173S, F205P), или (F173V), или (F173W), или (F173Y), или (F173Y, I174F), или
 (F205A), или (F205C), или (F205D), или (F205D, D208N), или (F205E), или
 20 (F205G), или (F205H), или (F205I), или (F205K), или (F205L), или (F205M), или
 (F205N), или (F205P), или (F205R), или (F205S), или (F205T), или (F205V), или
 (F205W), или (F205Y), или (F261A), или (F261C), или (F261D), или (F261G), или
 (F261I), или (F261L), или (F261M), или (F261N), или (F261Q), или (F261S), или
 (F261T), или (F261V), или (F261W), или (F261Y), или (F331C), или (F331H), или
 25 (F331I), или (F331L), или (F331M), или (F331N), или (F331P), или (F331T), или
 (F331V), или (F331W), или (F331Y), или (F393M), или (F393W), или (F77A), или
 (F77A, A184W), или (F77A, L181P, A184Y, L188K), или (F77A, M177Y), или
 (F77C), или (F77D), или (F77E), или (F77G), или (F77H), или (F77I), или (F77K),
 или (F77L), или (F77M), или (F77N), или (F77P), или (F77R), или (F77S), или
 30 (F77T), или (F77V), или (F77V, L86M), или (F77W), или (F77Y), или (F81A), или
 (F81C), или (F81D), или (F81I), или (F81L), или (F81P), или (F81R), или (F81S),
 или (F81T), или (F81V), или (F81W), или (F81Y), или (G271A), или (G271C), или
 (G271D), или (G271E), или (G271F), или (G271H), или (G271K), или (G271L),
 или (G271M), или (G271N), или (G271P), или (G271Q), или (G271R), или

(G271S), или (G271T), или (G271V), или (G271W), или (G271Y), или (G402A),
или (G415A), или (G415D), или (G415S), или (G415T), или (G415V), или (G85A),
или (G85L), или (G85S), или (H266A), или (H266C), или (H266D), или (H266E),
или (H266F), или (H266G), или (H266I), или (H266K), или (H266M), или
5 (H266N), или (H266P), или (H266Q), или (H266R), или (H266S), или (H266T), или
(H266V), или (H266W), или (H266Y), или (I153F, G271L), или (I153L), или
(I153L, F173Y), или (I259A), или (I259C), или (I259D), или (I259F), или (I259G),
или (I259H), или (I259K), или (I259L), или (I259M), или (I259N), или (I259Q),
или (I259S), или (I259T), или (I259V), или (I259W), или (I259Y), или (I263A),
10 или (I263C), или (I263E), или (I263F), или (I263G), или (I263H, A264G), или
(I263K), или (I263L), или (I263M), или (I263N), или (I263Q), или (I263S), или
(I263T), или (I263V), или (I263Y), или (I401A), или (I401L), или (I401M), или
(I401T), или (I401V), или (K210E), или (K210T, G271V), или (K224C), или
(K224E), или (K224F), или (K224H), или (K224I), или (K224L), или (K224M), или
15 (K224P), или (K224Q), или (K224W), или (K224Y), или (L150A), или (L150C),
или (L150D), или (L150E), или (L150F), или (L150G), или (L150H), или (L150I),
или (L150K), или (L150M), или (L150N), или (L150Q), или (L150R), или (L150R,
F205R), или (L150S), или (L150S, F173L), или (L150T), или (L150V), или
(L150W), или (L150Y), или (L181H), или (L181I), или (L181M), или (L181P), или
20 (L181V), или (L181Y), или (L181Y, A184D), или (L181Y, L188F), или (L181Y,
L188K), или (L181Y, L188K, H659R), или (L188A), или (L188D), или (L188E),
или (L188F), или (L188H), или (L188I), или (L188K), или (L188M), или (L188N),
или (L188Q), или (L188R), или (L188S), или (L188W), или (L20C), или (L20D),
или (L20E), или (L20F), или (L20G), или (L20G, R47L), или (L20I), или (L20M),
25 или (L20N), или (L20P), или (L20R), или (L20S), или (L20T), или (L20V), или
(L20W), или (L20Y), или (L262I), или (L262V), или (L262W), или (L262Y), или
(L272A), или (L272C), или (L272E), или (L272F), или (L272G), или (L272I), или
(L272K), или (L272M), или (L272N), или (L272Q), или (L272R), или (L272S), или
(L272T), или (L272V), или (L272W), или (L272Y), или (L29A), или (L29C), или
30 (L29D), или (L29F), или (L29H), или (L29I), или (L29M), или (L29M, R47G), или
(L29P), или (L29Q), или (L29S), или (L29T), или (L29V), или (L29W), или
(L29Y), или (L324F), или (L356C), или (L356F), или (L356H), или (L356I), или
(L356M), или (L356N), или (L356Q), или (L356S), или (L356T), или (L356V), или
(L356W), или (L437I), или (L437M), или (L75H, F81S), или (L75I), или (L75I,

F81C), или (L75I, F81G), или (L75I, F81H), или (L75I, F81I), или (L75I, F81L),
 или (L75I, F81S), или (L75I, F81V), или (L75I, F81Y), или (L75V), или (L75V,
 F81C), или (L75V, F81H), или (L75V, F81I), или (L75V, F81L), или (L75V, F81V),
 или (L75V, F81Y), или (L78F), или (L78I), или (L78M), или (L78V), или (L78Y),
 5 или (L86A, S89T), или (L86I), или (L86I, S89T), или (L86M), или (L86M, S89T),
 или (L86N, S89T), или (L86V), или (L86V, S89T), или (M118A), или (M118E),
 или (M118F), или (M118G), или (M118H), или (M118I), или (M118K), или
 (M118L), или (M118N), или (M118P), или (M118Q), или (M118S), или (M118T),
 или (M118V), или (M118W), или (M118Y), или (M177A), или (M177C), или
 10 (M177C, V178Y), или (M177D), или (M177E), или (M177F), или (M177G), или
 (M177H), или (M177I), или (M177K), или (M177L), или (M177N), или (M177P),
 или (M177Q), или (M177R), или (M177T), или (M177V), или (M177Y), или
 (M177Y, A184W), или (M177Y, A184Y), или (M177Y, M185V), или (M177Y,
 R50S), или (M177Y, V178P), или (M177Y, V178P, A184Y, L188F), или (M177Y,
 15 V178W), или (M177Y, V178W, A184Y), или (M177Y, V178W, A184Y, L188F),
 или (M185C), или (M185D), или (M185E), или (M185G), или (M185H), или
 (M185K), или (M185L), или (M185N), или (M185Q), или (M185R), или (M185V),
 или (M185Y), или (M212A), или (M212C), или (M212C, I259L), или (M212D), или
 (M212E), или (M212F), или (M212G), или (M212H), или (M212K), или (M212L),
 20 или (M212L, I259F), или (M212P), или (M212Q), или (M212R), или (M212S), или
 (M212T), или (M212V), или (M212W), или (M212Y), или (M354A), или (M354C),
 или (M354D), или (M354E), или (M354G), или (M354I), или (M354K), или
 (M354K, D363Y), или (M354L), или (M354N), или (M354Q), или (M354R), или
 (M354S), или (M354T), или (M354V), или (M354W), или (M354Y), или (N70A),
 25 или (N70C), или (N70F), или (N70G), или (N70H), или (N70K), или (N70R), или
 (N70W), или (N70Y), или (P243T, H266L), или (P326C), или (P326D), или
 (P326G), или (P326N), или (P326S), или (P326T), или (P329A), или (P329C), или
 (P329G), или (P329K), или (P329S), или (P329T), или (P392C), или (P392G), или
 (P392Q), или (P392R), или (P392V), или (P9S), или (R147C, H266G), или (R161C,
 30 G271D), или (R190L, F261V), или (R203C), или (R255A), или (R255F), или
 (R255G), или (R255I), или (R255K), или (R255L), или (R255M), или (R255N), или
 (R255P), или (R255T), или (R255W), или (R323C), или (R47A), или (R47C), или
 (R47D), или (R47E), или (R47F), или (R47G), или (R47H), или (R47H, A74W), или
 (R47I), или (R47K), или (R47L), или (R47M), или (R47N), или (R47P), или

(S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74I, T146F, V178W, L188R),

5 или (S72G, A74I, V178P), или (S72G, A74I, V178P, L181Y), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74I, V178P, L188F), или (S72G, A74I, V178P, L188K), или (S72G, A74I, V178P, L188R), или (S72G, A74I, V178W), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L181Y, L188R),

10 или (S72G, A74I, V178W, L188F), или (S72G, A74I, V178W, L188K), или (S72G, A74I, V178W, L188R), или (S72G, A74L), или (S72G, A74M, A184Y, L188K), или (S72G, A74S), или (S72G, A74T), или (S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, L188F), или (S72G, A74T, L188K), или

15 (S72G, A74T, L188R), или (S72G, A74T, T146F), или (S72G, A74T, T146F, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, L188F), или (S72G, A74T, T146F, L188K), или (S72G, A74T, T146F, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178P), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188F),

20 или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74T, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74T, V178P), или (S72G, A74T, V178P, L181Y), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188F), или (S72G, A74T, V178P, L188K), или (S72G, A74T, V178P, L188R), или (S72G, A74T, V178W), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188F), или (S72G, A74T, V178W, L188K), или (S72G, A74T, V178W, L188R), или (S72G, A74V), или (S72G, A74V, A184W), или (S72G, A74V, A221V), или (S72G, A74V, F77A), или (S72G, A74V, F77A, M177Y), или (S72G, A74V, F77L, M177Y), или (S72G, A74V, F77S), или (S72G, A74V, L181Y), или (S72G, A74V, L181Y, L188F), или (S72G,

30

A74V, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, L188F), или (S72G, A74V, L188K), или (S72G, A74V, L188R), или (S72G, A74V, T146F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, L188F), или (S72G, A74V, T146F, L188K), или (S72G, A74V, T146F, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178P, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188F), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188K), или (S72G, A74V, T146F, V178W, L188R), или (S72G, A74V, V178P), или (S72G, A74V, V178P, L181Y), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178P, L188F), или (S72G, A74V, V178P, L188K), или (S72G, A74V, V178P, L188R), или (S72G, A74V, V178W), или (S72G, A74V, V178W, L181Y), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, A74V, V178W, L188F), или (S72G, A74V, V178W, L188K), или (S72G, A74V, V178W, L188R), или (S72G, A74Y), или (S72G, L181Y), или (S72G, L181Y, L188F), или (S72G, L181Y, L188K), или (S72G, L181Y, L188R), или (S72G, L188F), или (S72G, L188K), или (S72G, L188R), или (S72G, M177Y, V178W), или (S72G, M177Y, V178W, L188K), или (S72G, T146F), или (S72G, T146F, L181Y), или (S72G, T146F, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, L188F), или (S72G, T146F, L188K), или (S72G, T146F, L188R), или (S72G, T146F, V178P), или (S72G, T146F, V178P, L181Y), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, T146F, V178P, L188F), или (S72G, T146F, V178P, L188K), или (S72G, T146F, V178P, L188R), или (S72G, T146F, V178W), или (S72G, T146F, V178W, L181Y), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L181Y, L188K), или (S72G, T146F, V178W, L188F), или (S72G, T146F, V178W, L188K),

или (S72G, T146F, V178W, L188R), или (S72G, V178P), или (S72G, V178P,
L181Y), или (S72G, V178P, L181Y, L188F), или (S72G, V178P, L181Y, L188K),
или (S72G, V178P, L181Y, L188R), или (S72G, V178P, L188F), или (S72G, V178P,
L188K), или (S72G, V178P, L188R), или (S72G, V178W), или (S72G, V178W,
5 L181Y), или (S72G, V178W, L181Y, L188F), или (S72G, V178W, L181Y, L188K),
или (S72G, V178W, L181Y, L188R), или (S72G, V178W, L188F), или (S72G,
V178W, L188K), или (S72G, V178W, L188R), или (S72H, A74C), или (S72H,
A74G), или (S72H, A74S), или (S72H, A74Y), или (S72N, A74C), или (S72N,
A74I), или (S72N, A74N), или (S72N, A74V), или (S72T), или (S72W), или (S72W,
10 A74I, A184W, L188F), или (S72W, A74V), или (S72W, L333R), или (S72W, W90Y,
V299G), или (S72Y, A74V), или (S89C), или (S89E), или (S89G), или (S89I), или
(S89L), или (S89M), или (S89N), или (S89Q), или (S89R), или (S89T), или (S89V),
или (T146A), или (T146A, D222Y, I263M), или (T146A, F173D), или (T146A,
F173V), или (T146A, F205G), или (T146A, F261C), или (T146A, F261S), или
15 (T146A, F261V), или (T146A, G271R), или (T146A, G271S), или (T146A, G271T),
или (T146A, H266T), или (T146A, H266V), или (T146A, I258T, I259S), или
(T146A, I259H), или (T146A, I263F), или (T146A, I263L), или (T146A, I263N),
или (T146A, I263V), или (T146A, L150A), или (T146A, L150G), или (T146A,
L150K), или (T146A, L150R, F173I), или (T146A, L272H), или (T146A, L272R),
20 или (T146A, L272S), или (T146A, L272W), или (T146A, M212A), или (T146C),
или (T146D), или (T146E), или (T146F), или (T146F, L181Y), или (T146F, L181Y,
L188F), или (T146F, L181Y, L188K), или (T146F, L188K), или (T146F, L188R),
или (T146F, V178P), или (T146F, V178P, L181Y, L188R), или (T146F, V178P,
L188K), или (T146F, V178P, L188R), или (T146F, V178W), или (T146F, V178W,
25 L181Y, L188R), или (T146F, V178W, L188F), или (T146F, V178W, L188K), или
(T146F, V178W, L188R), или (T146G), или (T146H), или (T146L), или (T146M),
или (T146N), или (T146P), или (T146R), или (T146S), или (T146V), или (T146V,
A191T), или (T146Y), или (T149P), или (T260A), или (T260S), или (T260W), или
(T268A), или (T268S), или (T269K), или (T327A), или (T327A, A330W), или
30 (T327C), или (T327D), или (T327E), или (T327G), или (T327I), или (T327L), или
(T327M), или (T327N), или (T327P), или (T327Q), или (T327S), или (T327V), или
(T365A), или (T365C), или (T365D), или (T365F), или (T365G), или (T365H), или
(T365I), или (T365K), или (T365L), или (T365N), или (T365P), или (T365Q), или
(T365V), или (T365W), или (T365Y), или (T436A), или (T436C), или (T436D), или

(T436E), или (T436F), или (T436G), или (T436H), или (T436I), или (T436K), или (T436L), или (T436M), или (T436N), или (T436P), или (T436Q), или (T436R), или (T436S), или (T436V), или (T436W), или (T436Y), или (T438A), или (T438C), или (T438G), или (T438I), или (T438L), или (T438S), или (T438V), или (T49A), или
5 (T49C), или (T49D), или (T49E), или (T49F), или (T49G), или (T49H), или (T49I), или (T49K), или (T49L), или (T49L, S54N), или (T49M), или (T49N), или (T49P), или (T49Q), или (T49R), или (T49R, R50C), или (T49R, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (T49S), или (T49V), или (T49W), или (T49Y), или (T88A), или (T88C), или (T88S), или (T88V), или (V178A), или (V178D), или (V178F), или
10 (V178H), или (V178I), или (V178K), или (V178L), или (V178M), или (V178N), или (V178P), или (V178P, L181Y), или (V178P, L181Y, L188R), или (V178P, L188F), или (V178P, L188K), или (V178P, L188R), или (V178Q), или (V178R), или (V178S), или (V178T), или (V178W), или (V178W, A184Y), или (V178W, L181Y, L188K), или (V178W, L181Y, L188R), или (V178W, L188R), или (V178W,
15 R50S), или (V178Y), или (V26A), или (V26C), или (V26E), или (V26F), или (V26G), или (V26G, R47S), или (V26H), или (V26I), или (V26K), или (V26L), или (V26M), или (V26N), или (V26N, R50S, M177Y, V178W, A184Y), или (V26Q), или (V26R), или (V26S), или (V26T), или (V26W), или (V26Y), или (V314A), или (V314E), или (V314F), или (V314H), или (V314P), или (V314Q), или (V314S), или
20 (V314Y), или (V371P), или (V48A), или (V48D), или (V48E), или (V48F), или (V48G), или (V48H), или (V48I), или (V48L), или (V48M), или (V48P), или (V48Q), или (V48R), или (V48S), или (V48T), или (V48W), или (V48Y), или (W325A), или (W325C), или (W325D), или (W325E), или (W325F), или (W325G), или (W325I), или (W325K), или (W325L), или (W325M), или (W325Q), или
25 (W325R), или (W325S), или (W325T), или (W325V), или (W325Y), или (W90D), или (W90Y), или (W90Y, V299G, G570D), или (Y51A), или (Y51C), или (Y51E), или (Y51F), или (Y51G), или (Y51H), или (Y51I), или (Y51L), или (Y51M), или (Y51N), или (Y51P), или (Y51Q), или (Y51S), или (Y51S, F77V), или (Y51T), или (Y51V), или (Y51W), или (A225C), или (A225G), или (A225M), или (A225N), или
30 (A225Q), или (A225S), или (A225T), или (A225V), или (A225Y), или (A44G), или (A44Q), или (A44T), или (D182A), или (D182C), или (D182E), или (D182H), или (D182I), или (D182M), или (D182N), или (D182V), или (D182W), или (D80C), или (D80L), или (D80M), или (D80N), или (D80S), или (D80T), или (D80W), или (E140A), или (E140D), или (E140K), или (E140L), или (E140M), или (E140T), или

(E183D), или (E183T), или (E337L), или (E337V), или (E409N), или (G114C), или (G114K), или (G114L), или (G114N), или (G114W), или (G227N), или (G227R), или (G240A), или (G240C), или (G240H), или (G240K), или (G240M), или (G240N), или (G240Q), или (G240R), или (G240S), или (G240V), или (G46T), или (H236A), или (H236C), или (H236D), или (H236F), или (H236G), или (H236I), или (H236K), или (H236M), или (H236P), или (H236R), или (H236S), или (H236Y), или (H92F), или (H92Y), или (I174T), или (I174V), или (I258C), или (I258L), или (I258M), или (I258V), или (K187A), или (K187G), или (K187N), или (K187R), или (K440C), или (K440M), или (K440N), или (K440T), или (K76C), или (K76E), или (K76F), или (K76H), или (K76I), или (K76L), или (K76N), или (K76V), или (M5C), или (M5E), или (M5P), или (M5Q), или (N186A), или (N186D), или (N186E), или (N186F), или (N186H), или (N186K), или (N186L), или (N186M), или (N186Q), или (N186T), или (N186V), или (N186Y), или (P172A), или (P172D), или (P172G), или (Q189E), или (Q189I), или (Q189K), или (Q189N), или (Q189V), или (Q397R), или (Q403K), или (Q403R), или (Q404F), или (Q404Y), или (Q73A), или (Q73E), или (Q73F), или (Q73L), или (Q73S), или (Q73T), или (Q73W), или (Q73Y), или (R179A), или (R179H), или (R179L), или (R179M), или (R179P), или (R179V), или (R190C), или (R190G), или (R190K), или (R190M), или (R190N), или (R190S), или (R190V), или (R190W), или (R79E), или (R79K), или (S270A), или (S270D), или (S270G), или (S53C), или (T175F), или (T175G), или (T175H), или (T175L), или (T175M), или (T175N), или (T175Q), или (T175R), или (T175Y), или (T269A), или (T269V), или (V299L), или (V299W), или (A225V, H236K, G240V, T269V), или (D80I, D182H, A225V, G240V, T269V), или (F173W, R179L, R190V, A225V), или (F173W, R179L, R190V, K440C), или (F173W, R179L, T269V, K440C), или (F173W, R190V, H236K, T269V), или (H236K, G240V, T269V, K440C), или (K76I, F173W, R179L, D182I, R190V, K440C), или (Q73W, D80I, N186V, G240V), или (R179L, A225S), или (R179L, A225V, G240V, K440C), или (R179L, R190V), или (R190V, A225V, T269V, K440C), или (T175M, H236D), или (T175M, R190V).

30

9. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность (вставка) была введена между аминокислотными положениями 458 и 477, и где вставка имеет, по крайней

мере, 90%, 95%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID No. 123 – 173.

10. Вариант цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназы (ВМЗ),
5 характеризующийся улучшенной экспрессией белка ВМЗ по сравнению с ВМЗ дикого типа (ДТ),

а) где вариант ВМЗ включает мутации, по крайней мере, в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или во всех аминокислотных положениях (С62), (S106), (Q110), (A117), (Q128), (T152),
10 (G157), (G227), (P243), (H285), (Q288), (A295), (N319), (G368), (V371), (K391) , (N395) и (H408), и предпочтительно

б) где указанный вариант ВМЗ включает, по крайней мере, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или все мутации (С62L),
15 (S106A), (Q110E), (A117P), (Q128E), (T152I), (G157L), (G227P), (P243E), (H285E), (Q288E), (A295D), (N319E), (G368E), (V371P), (K391L),) и (H408L).

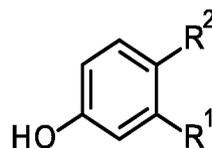
11. Вариант ВМЗ в соответствии с пунктом 10, где вариант ВМЗ включает мутации (S106A, Q128E), или (S106A, H285E, Q288E), или (S106A, Q128E, H285E), или (С62L, A117P, G15 C62L, G227P, N319E, K391L), или
20 (Q110E, Q128E, Q288E, N319E), или (Q128E, H285E, Q288E, N319E), или (С62L, S106A, A117P, A116 A117P, G227P, P243E), или (С62L, S106A, Q128E, G227P, K391L), или (S106A, Q110E, G227P, H285E, K391L), или (С62L, S106A, Q2 S106A, G227P, H285E, V371P, K391L, H408L), (S106A, Q110E, G227P, N319E, K391L, N395F), (С62L, S106A, Q128E, T15 , Q128E, G227P, Q288E, N319E,
25 K391L), или (С62L, S106A, Q128E, G157L, P243E, A295D, G368E, K391L), или (S106A, A117P, Q128E, T152I, G227P, N319E, V371P, N395F).

12. Вариант ВМЗ в соответствии с любым из пунктов 10 или 11, где вариант ВМЗ представляет собой вариант в соответствии с любым из пунктов 1-
30 9.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариант цитохром Р450 ВМЗ монооксигеназы в соответствии с любым из предыдущих пунктов.

14. Клетка-хозяин для получения варианта цитохром P450 BM3 монооксигеназы в соответствии с любым из предыдущих пунктов.

15. Применение варианта цитохром P450 монооксигеназы (BM3) для получения соединения в соответствии с формулой I, где R¹ и R² образуют шестичленное кольцо как часть стероида или производного стероида.



16. Применение варианта BM3 в соответствии с пунктом 15, где указанное соединение в соответствии с формулой I представляет собой эстрон или эстрадиол.

17. Применение варианта BM3 для C19-гидроксилирования стероида или производного стероида, где указанный стероид или производное стероида является таким, который содержит 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо.

18. Применение варианта BM3 для C19-гидроксилирования стероида в соответствии с пунктом 17, где указанное производное стероида представляет собой андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) или (17бета)-17-гидроксиандроста-1,4-диен-3-он (дельта1 тестостерон).

19. Применение варианта BM3 в соответствии с любому из пунктов 15-18, где вариант BM3 представляет собой вариант в соответствии с любым из пунктов 1 - 8.

20. Способ C19-гидроксилирования производного стероида, который включает (I)

а) культивирование рекомбинантного микроорганизма, который продуцирует вариант цитохром P450 BM3 монооксигеназы (BM3), в

культуральной среде в присутствии экзогенного или образованного на промежуточном этапе субстрата; или

б) инкубацию реакционной среды, содержащей субстрат, с вариантом ВМЗ; и (II) изоляцию из среды образовавшегося продукта С19-гидроксилирования или его вторичного продукта;

5 который необязательно дополнительно характеризуется тем, что указанный вариант ВМЗ представляет собой вариант ВМЗ в соответствии с любым из пунктов 1 - 12.

10 21. Способ в соответствии с пунктом 20, где производное стероида включает 1,4-диен-3-он-А-кольцо или 4-ен-3-он-А-кольцо и 19-метильную группу.

15 22. Способ получения оптимизированных вариантов ВМЗ для С19-гидроксилирования стероидов, где указанный способ включает:

(I) (а) культивирование рекомбинантного микроорганизма, который экспрессирует вариант ВМЗ (исследуемый вариант) в культуральную среду, в присутствии экзогенного или образованного на промежуточном этапе субстрата, или

20 (б) инкубацию реакционной среды, содержащей стероид или производное стероида, с вариантом ВМЗ (исследуемый вариант); и

(II) сравнение полученного выхода продукта или титра, и/или селективности для продукта С19-гидроксилирования, образованного при использовании исследуемого варианта или его вторичного продукта, с соответствующим значением, полученным для исходного варианта исследуемого варианта, способного катализировать С19-гидроксилирование стероида,

25 (III) селекцию исследуемого варианта в качестве оптимизированного для С19-гидроксилирования стероидов, если исследуемый вариант имеет
30 улучшенный выход продукта или титр, и/или селективность по сравнению с исходным вариантом.

Фиг. 1 в

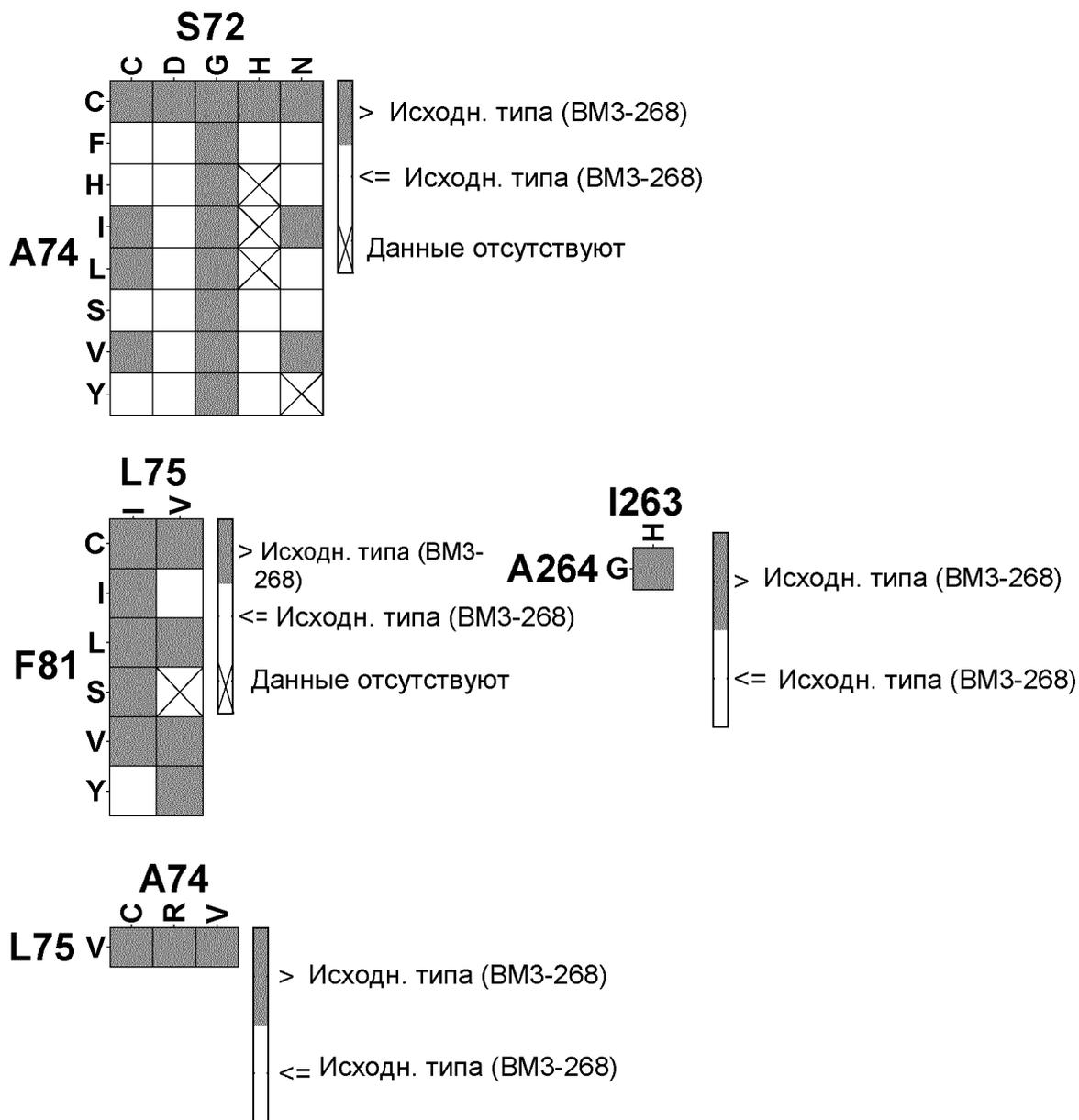
	L78	E82	A87
A			Выявлен эстрадиол
C			
D			
E		Выявлен эстрадиол	
F			
G			
H			
I	Выявлен эстрадиол		
K			
L	Выявлен эстрадиол		
M	Выявлен эстрадиол		
N			
P			
Q			
R			
S			
T			
V	Выявлен эстрадиол		
W			
Y			

Выявлен эстрадиол

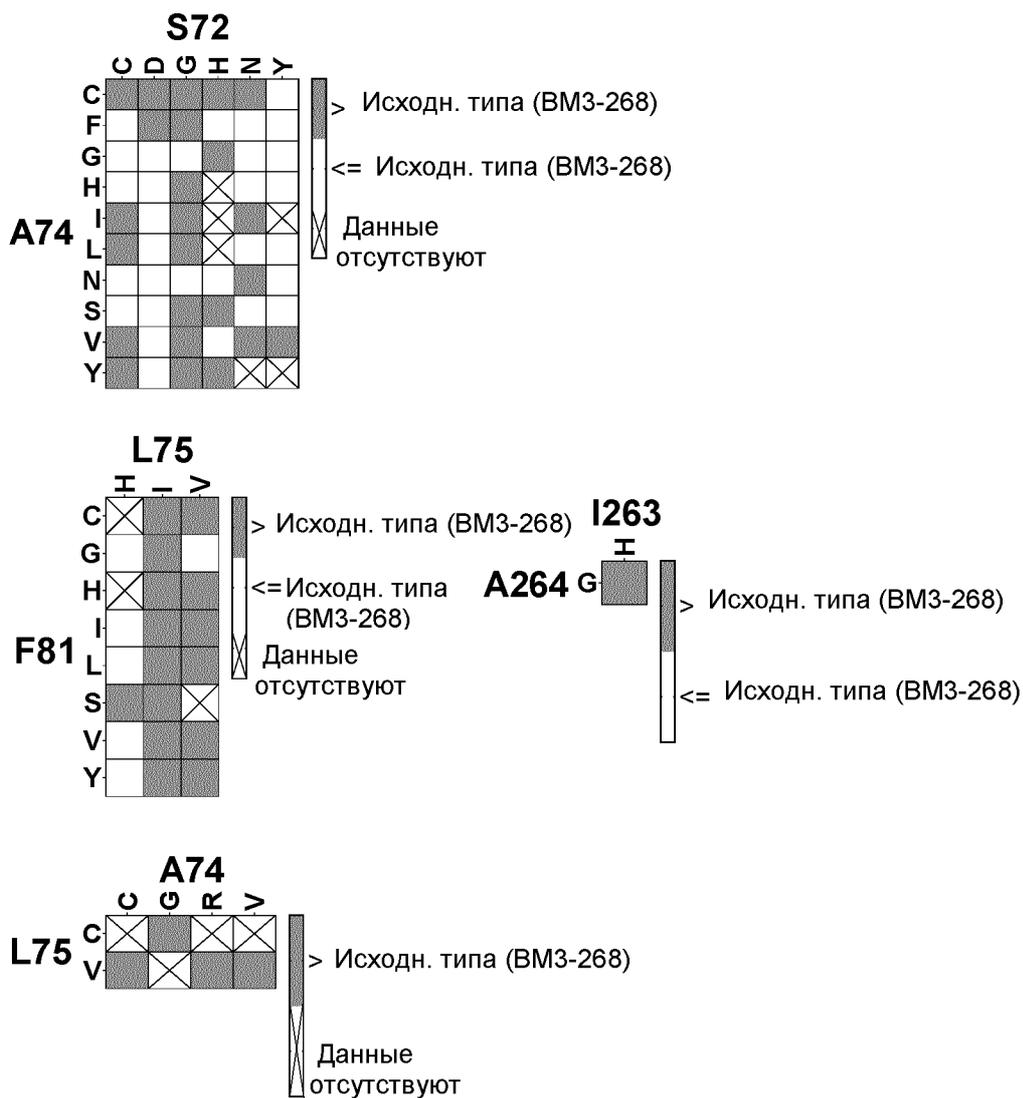
Эстрадиол не выявлен

Данные отсутствуют

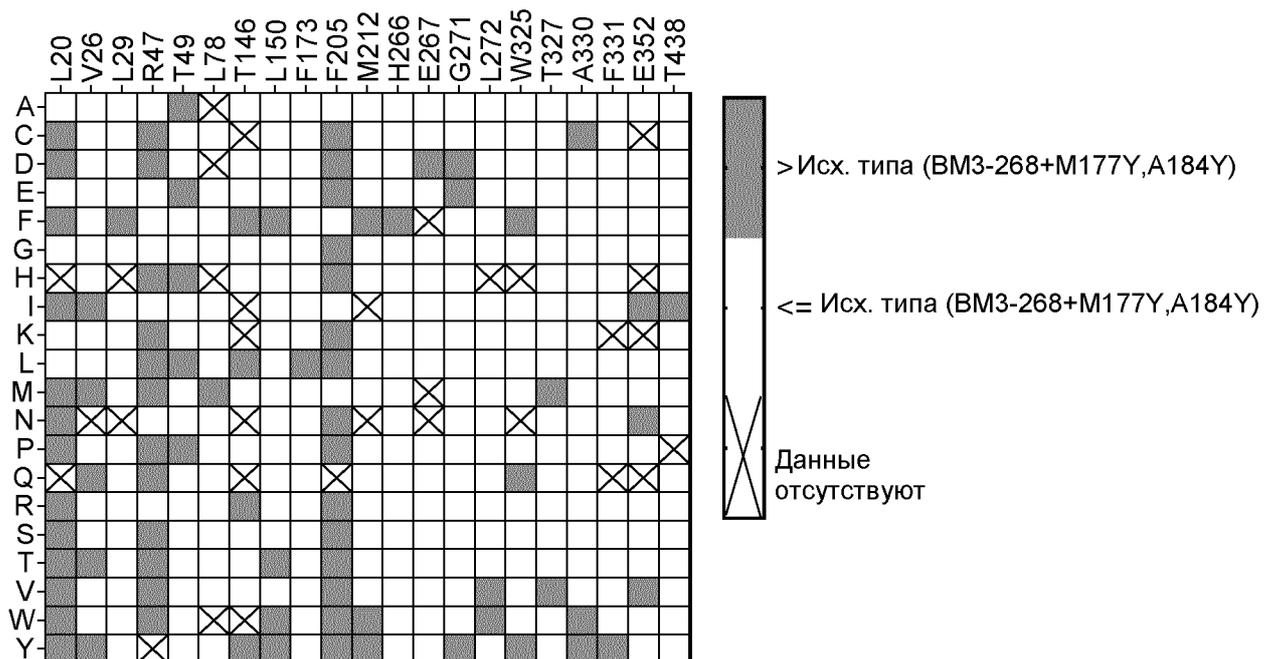
Фиг. 2 а



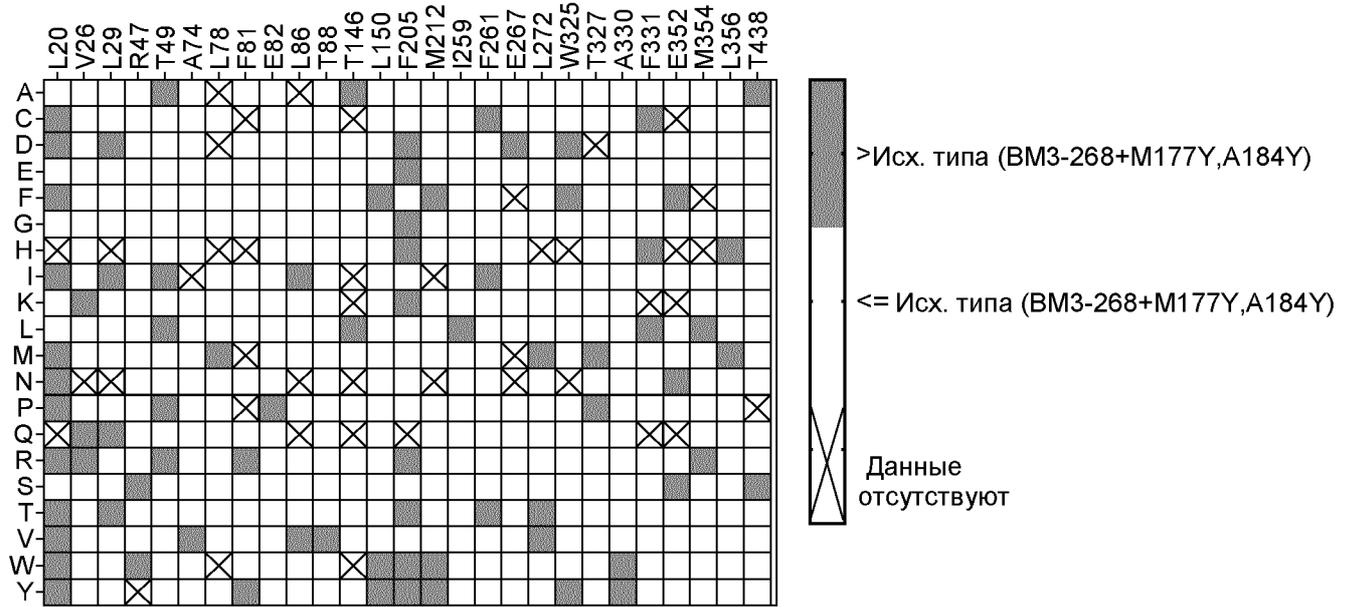
Фиг. 2 б



Фиг. 3 а

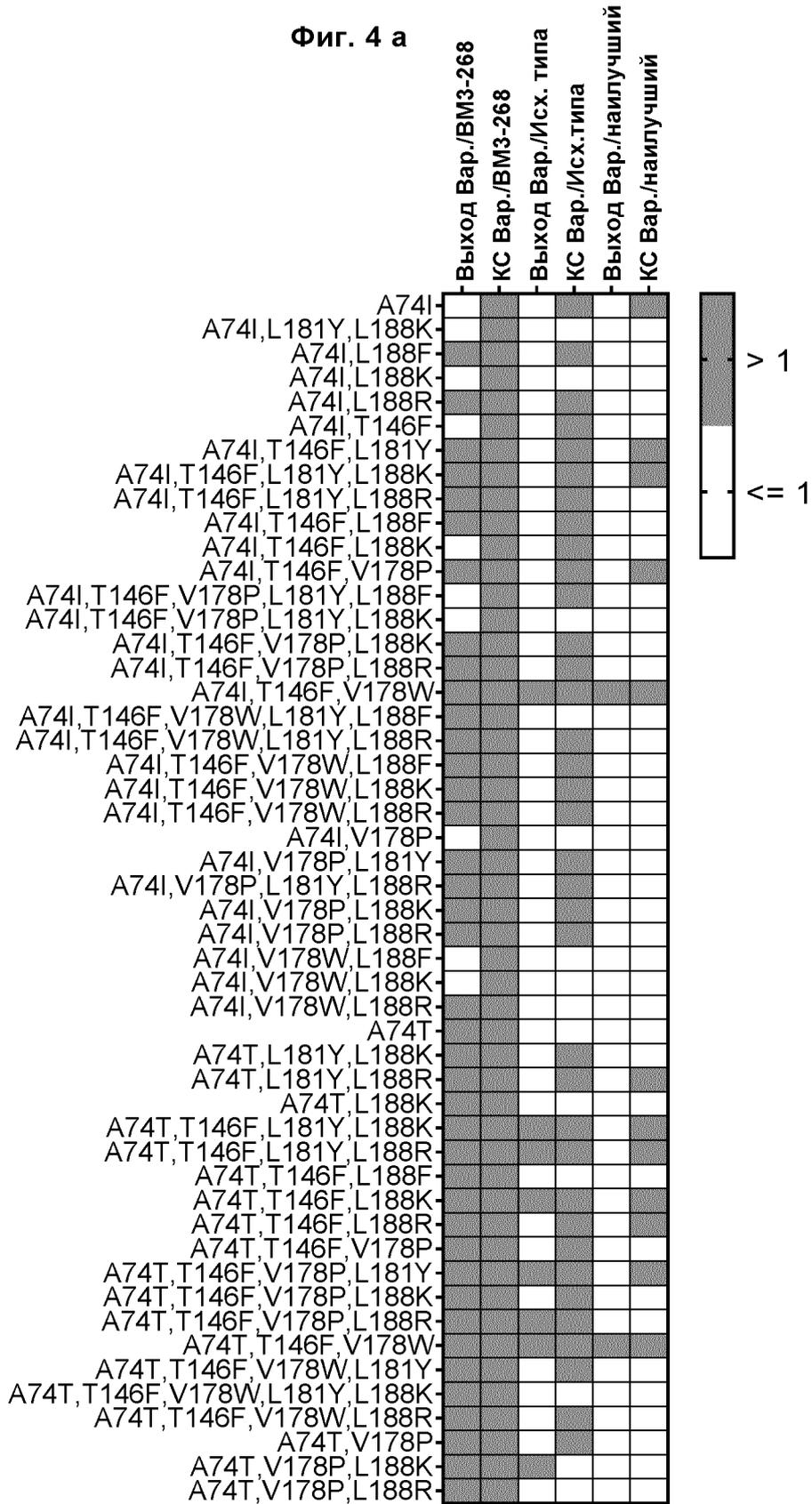


Фиг. 3 б

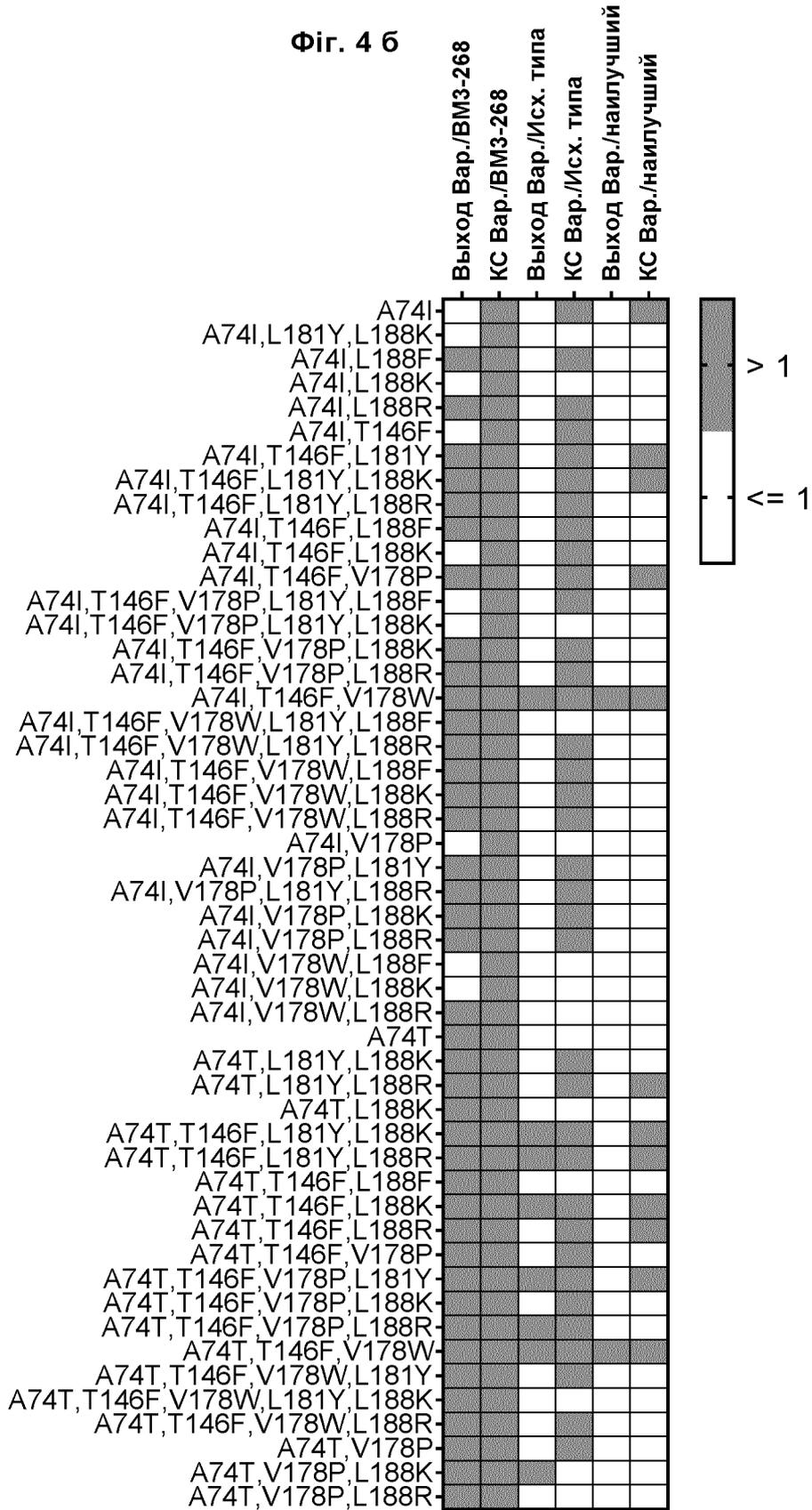


Фиг. 3 В

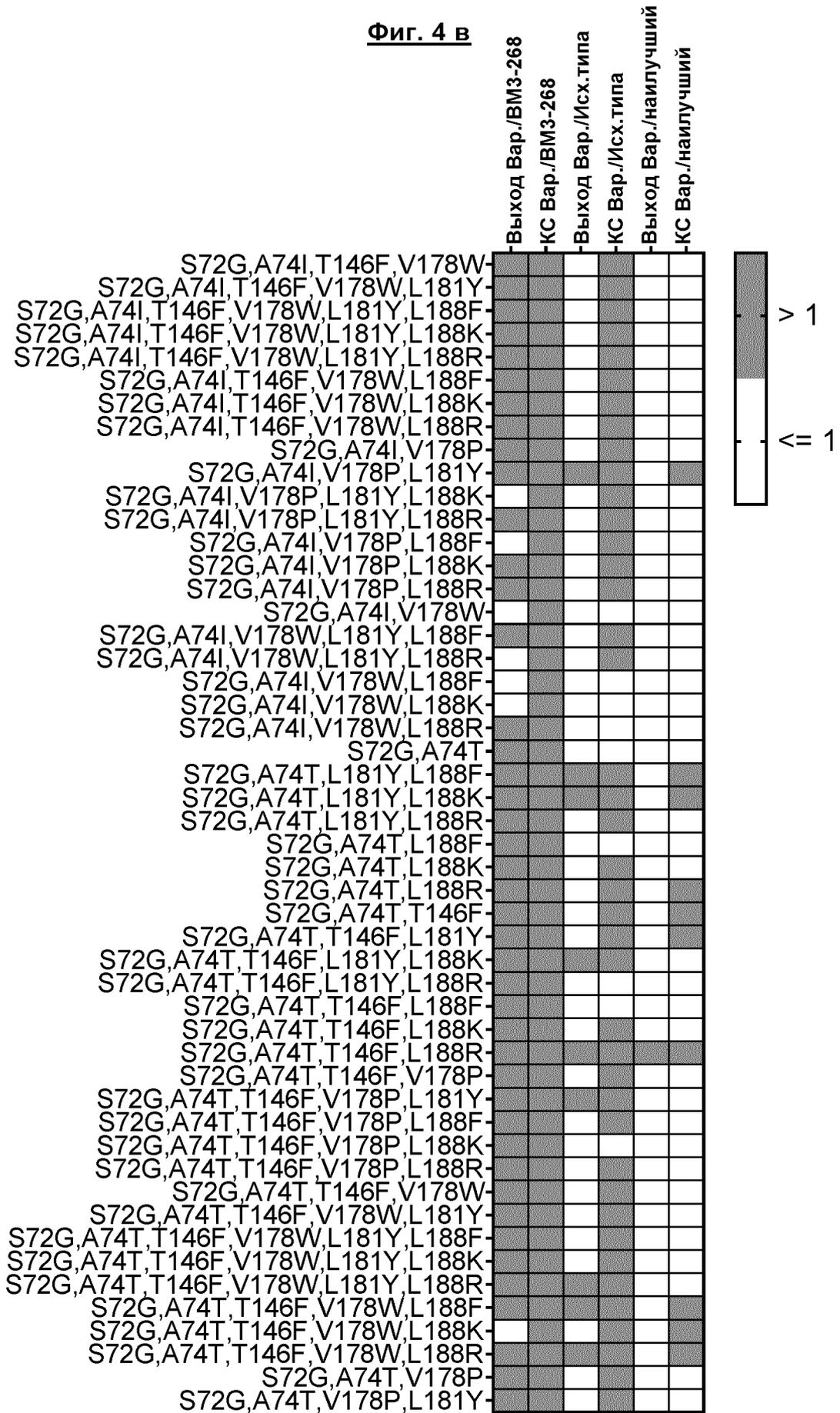
Фиг. 4 а



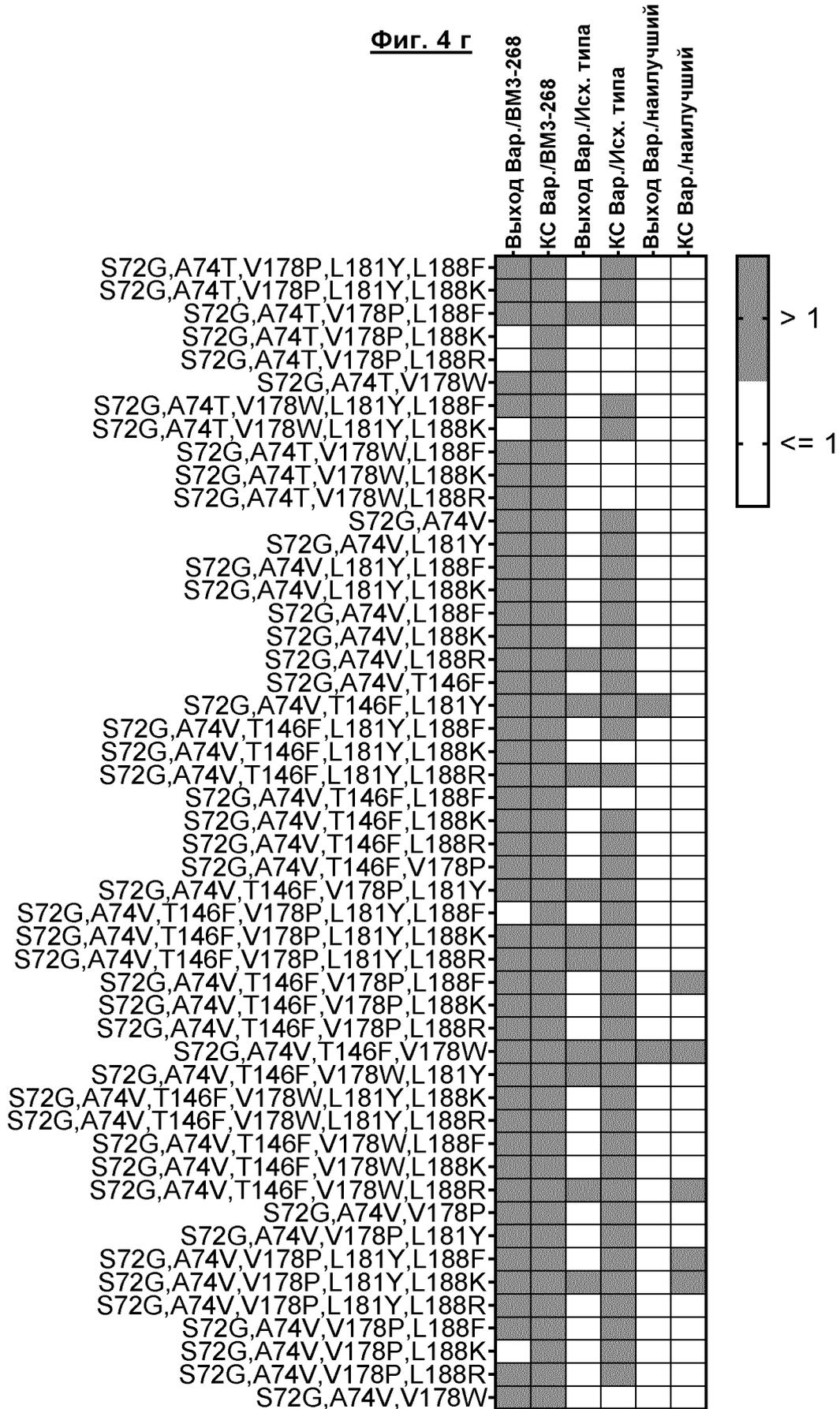
Фиг. 4 б



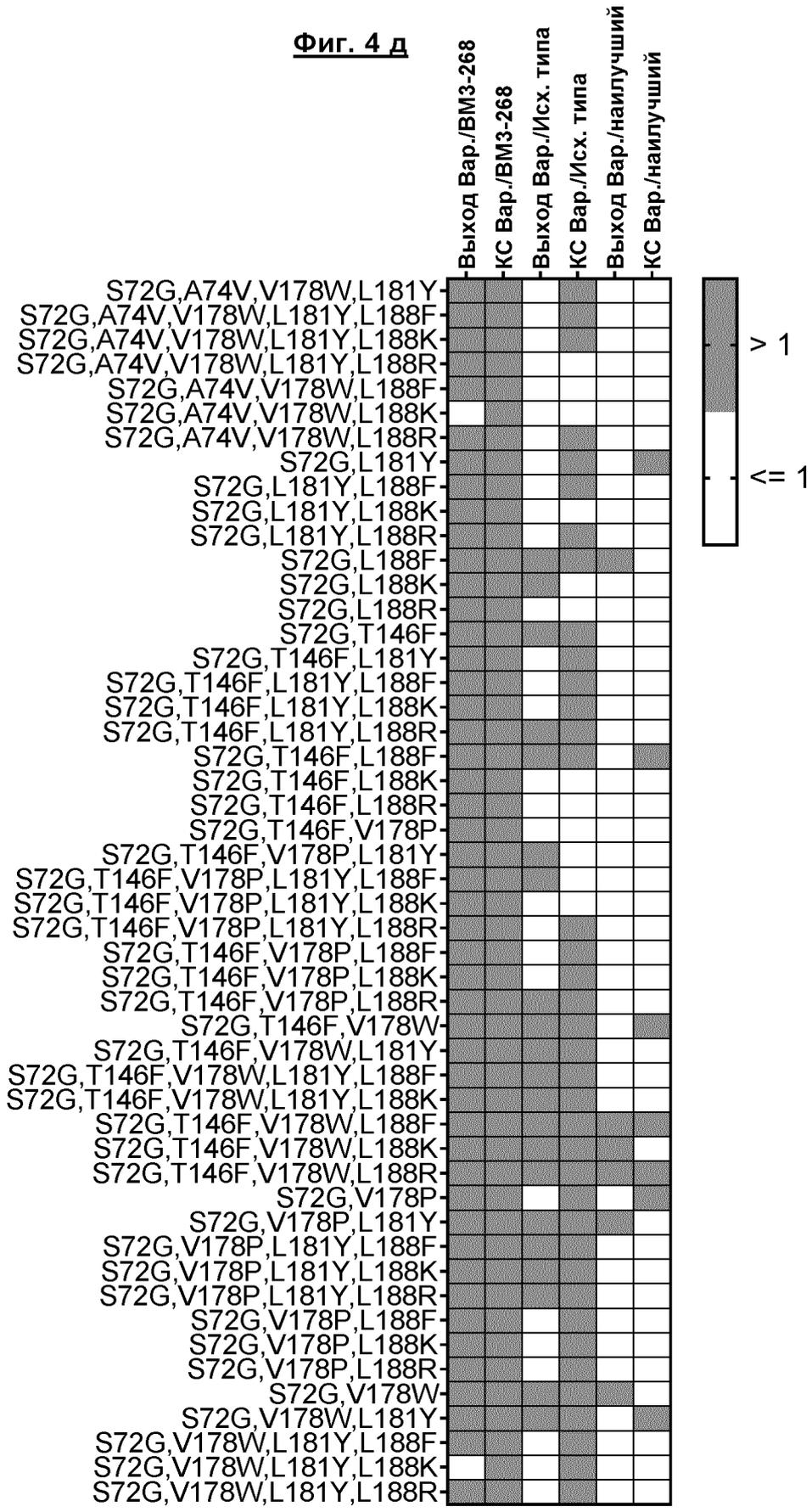
Фиг. 4 в



Фиг. 4 г



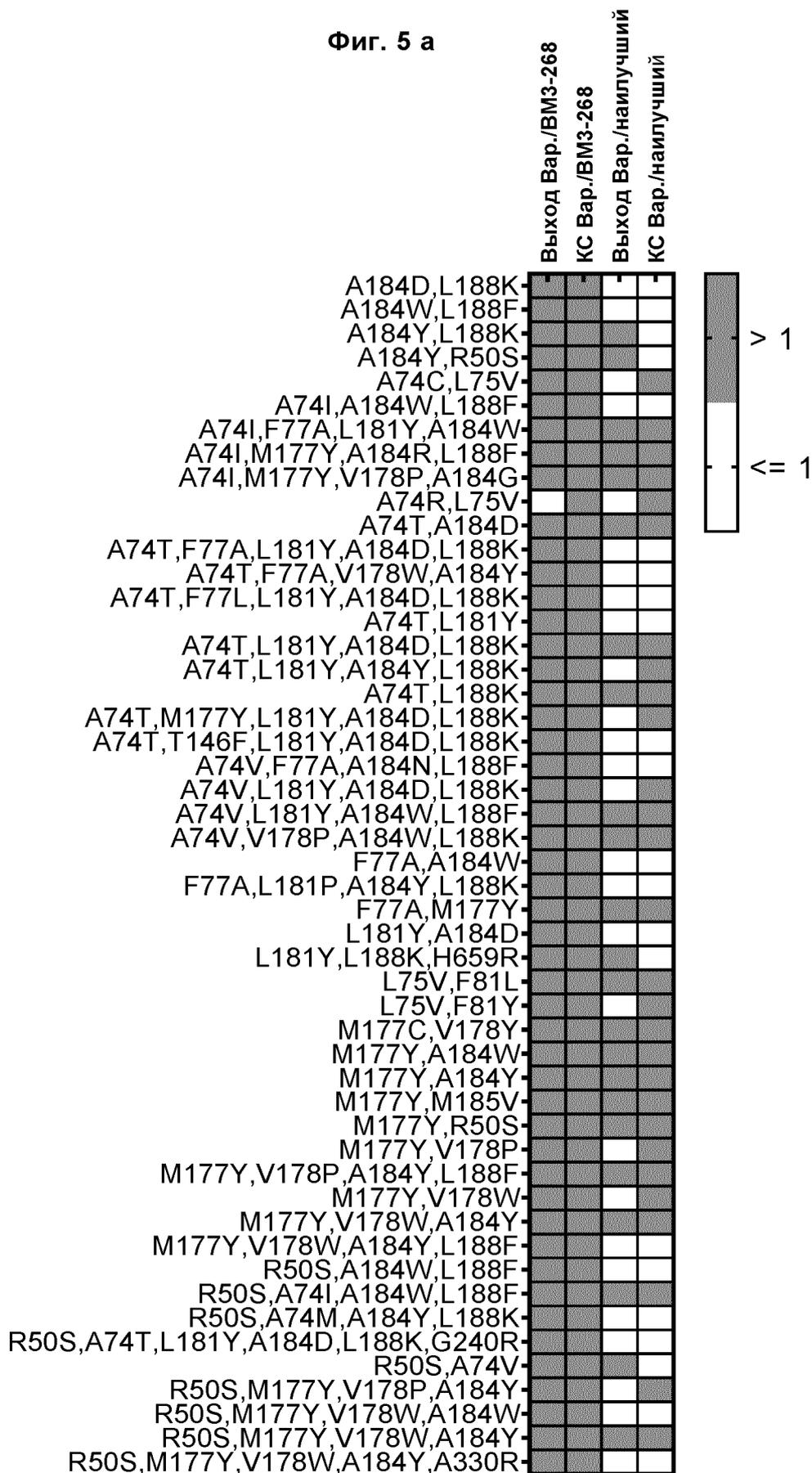
Фиг. 4 д



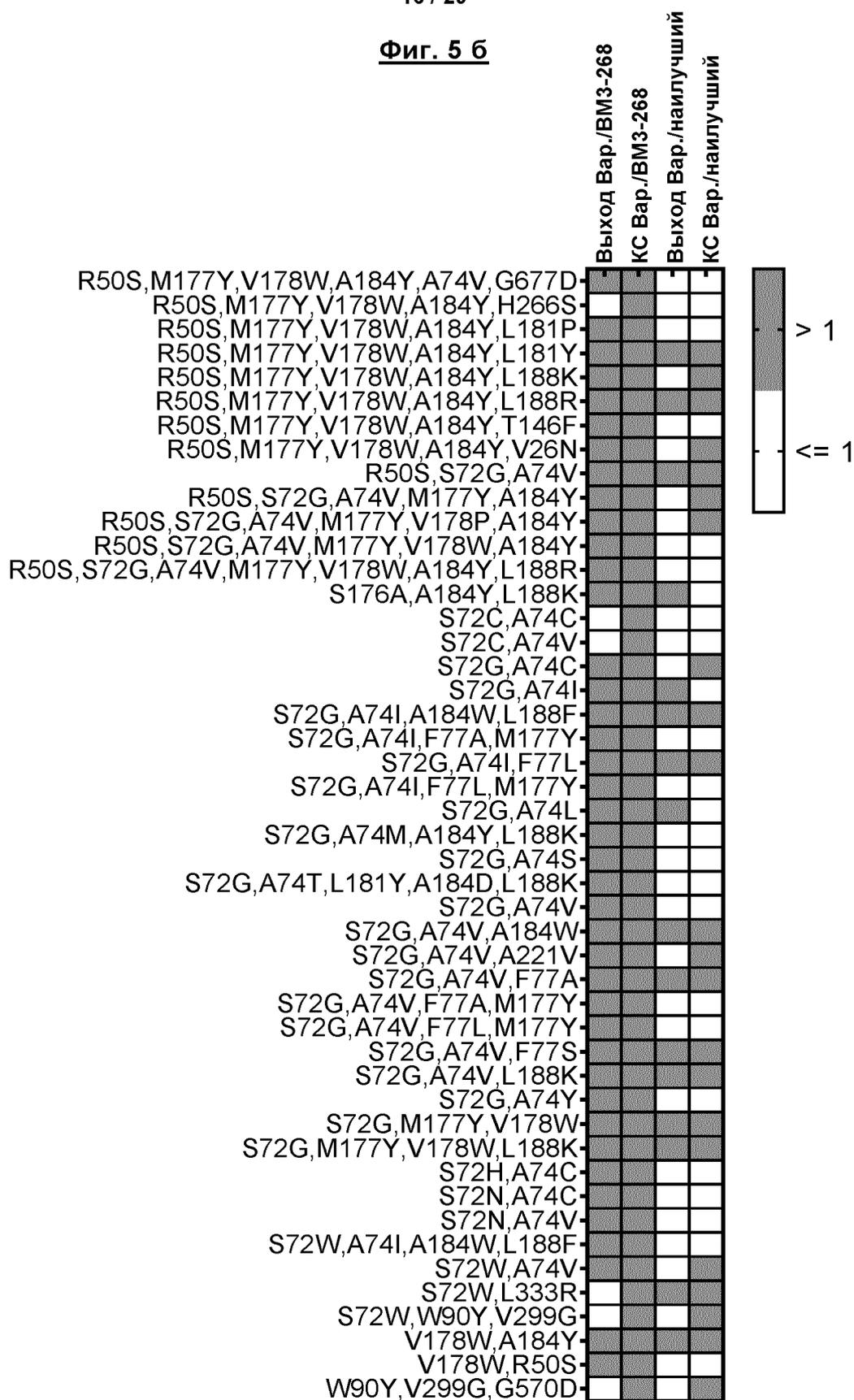
Фиг. 4 е



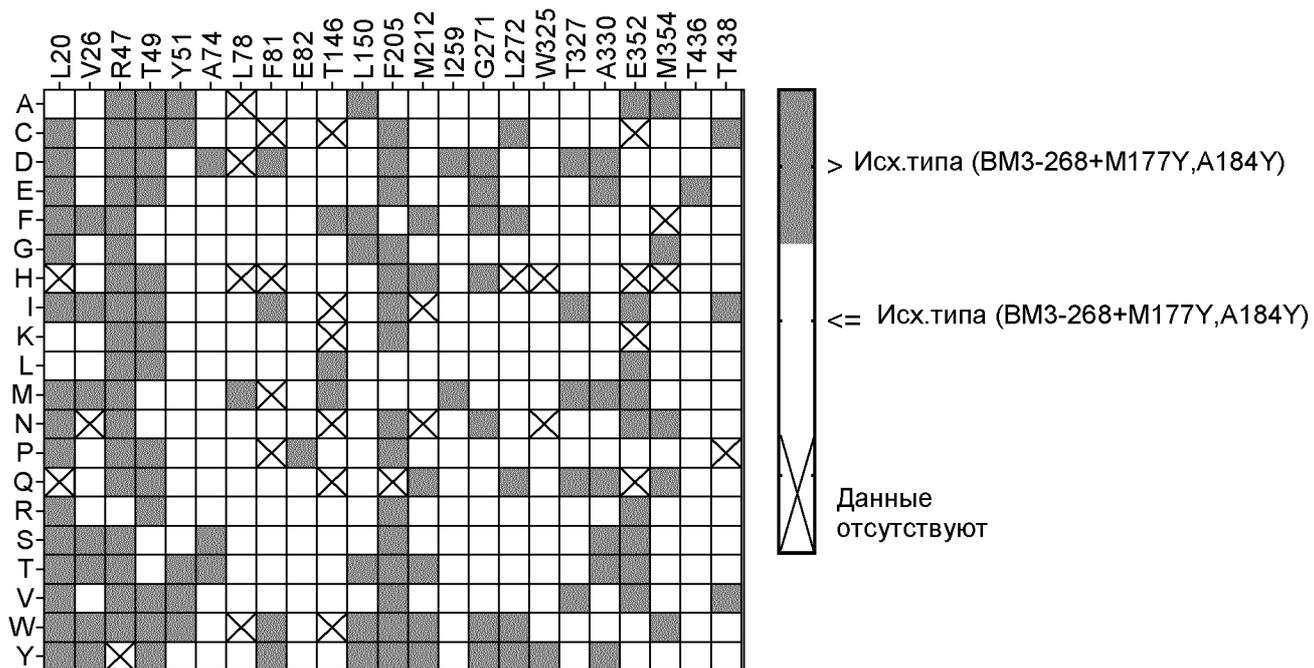
Фиг. 5 а



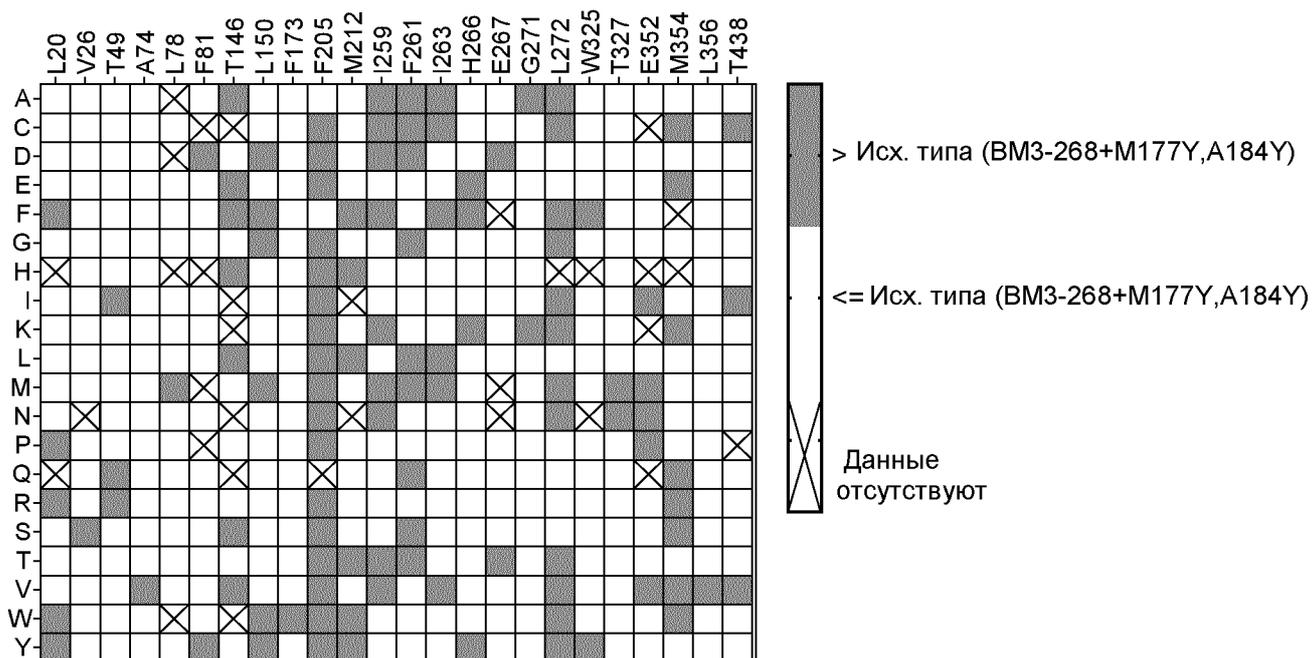
Фиг. 5 б



Фиг. 6 а

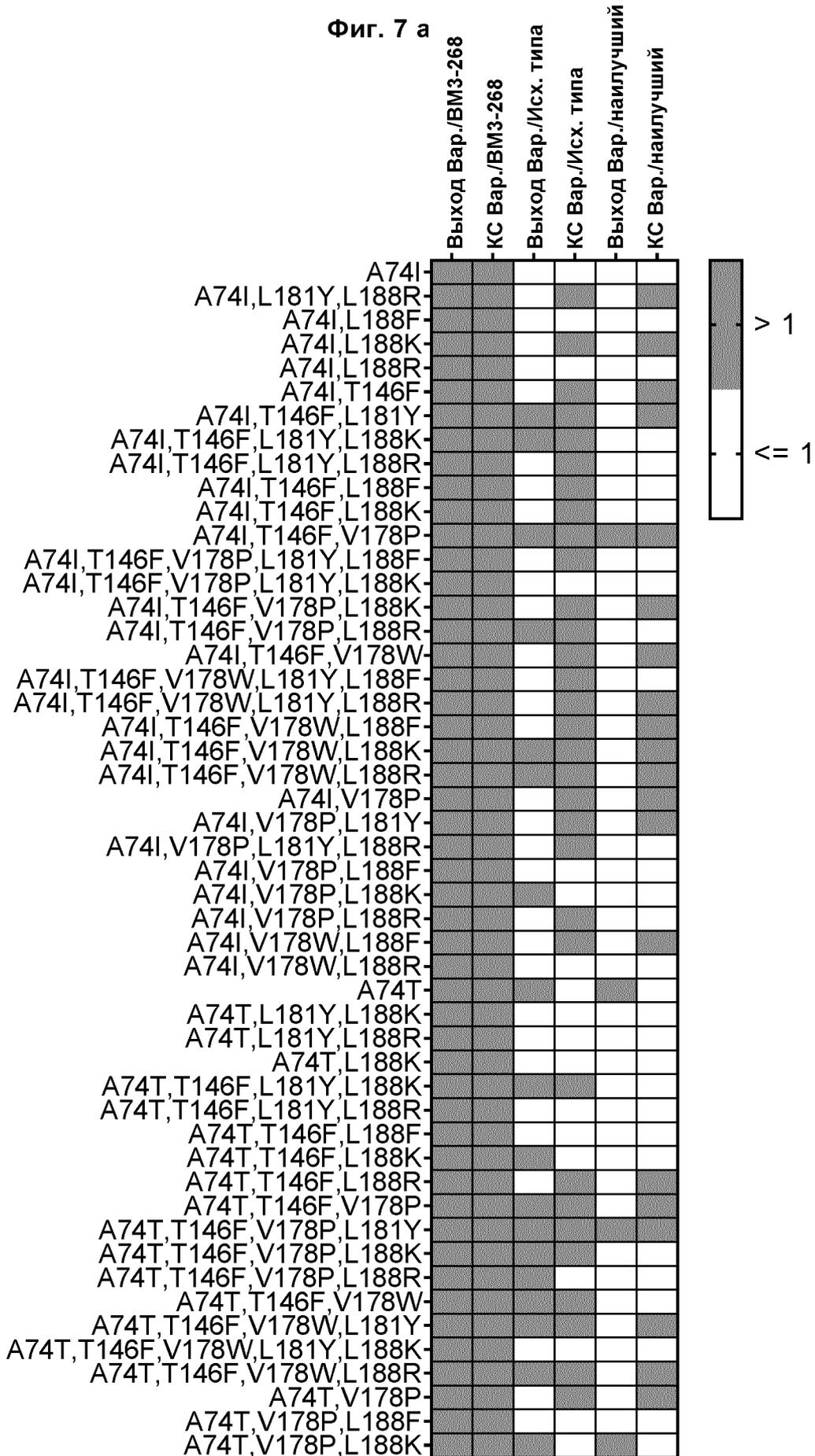


Фиг. 6 б

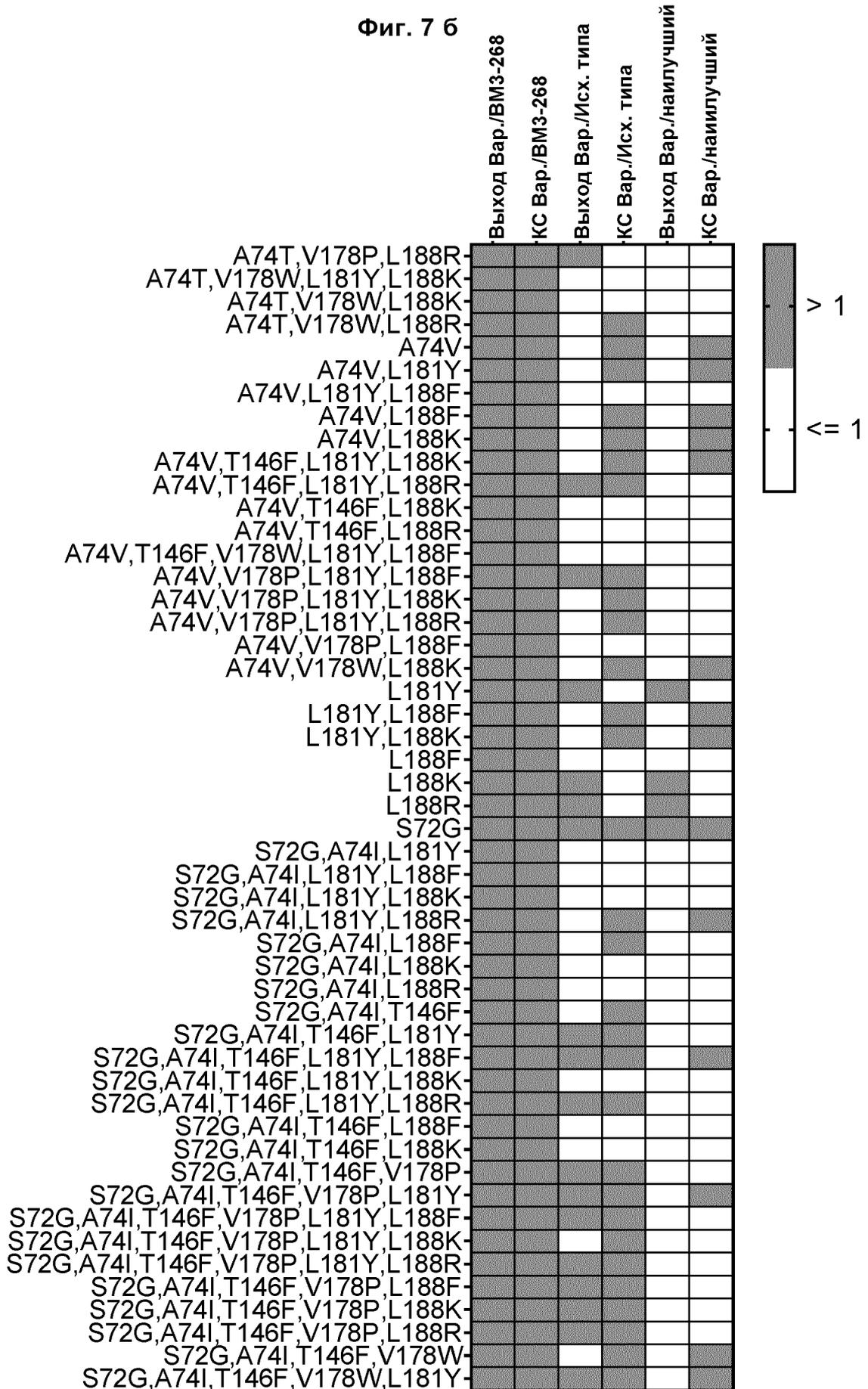


Фиг. 6 В

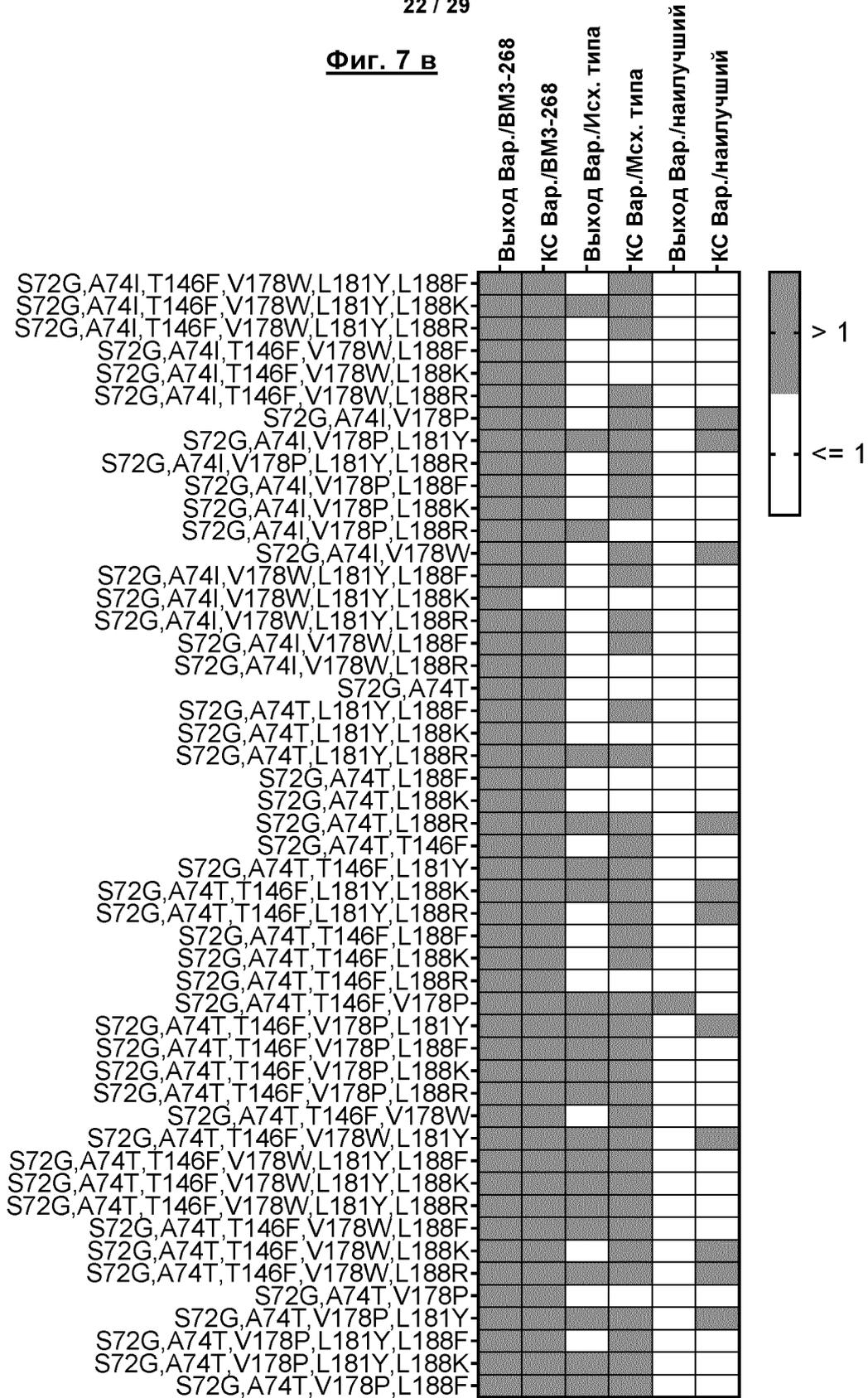
Фиг. 7 а



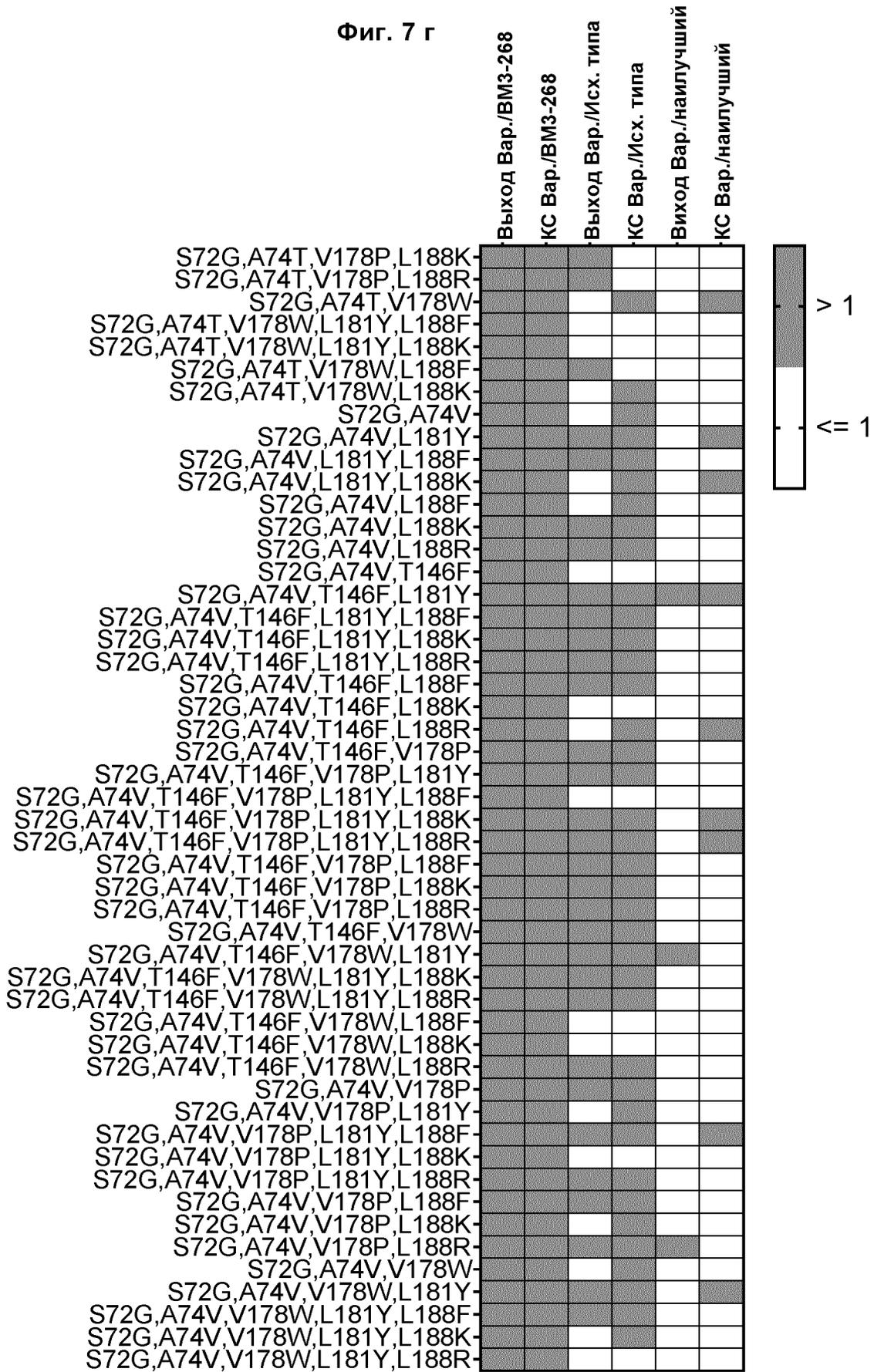
Фиг. 7 б



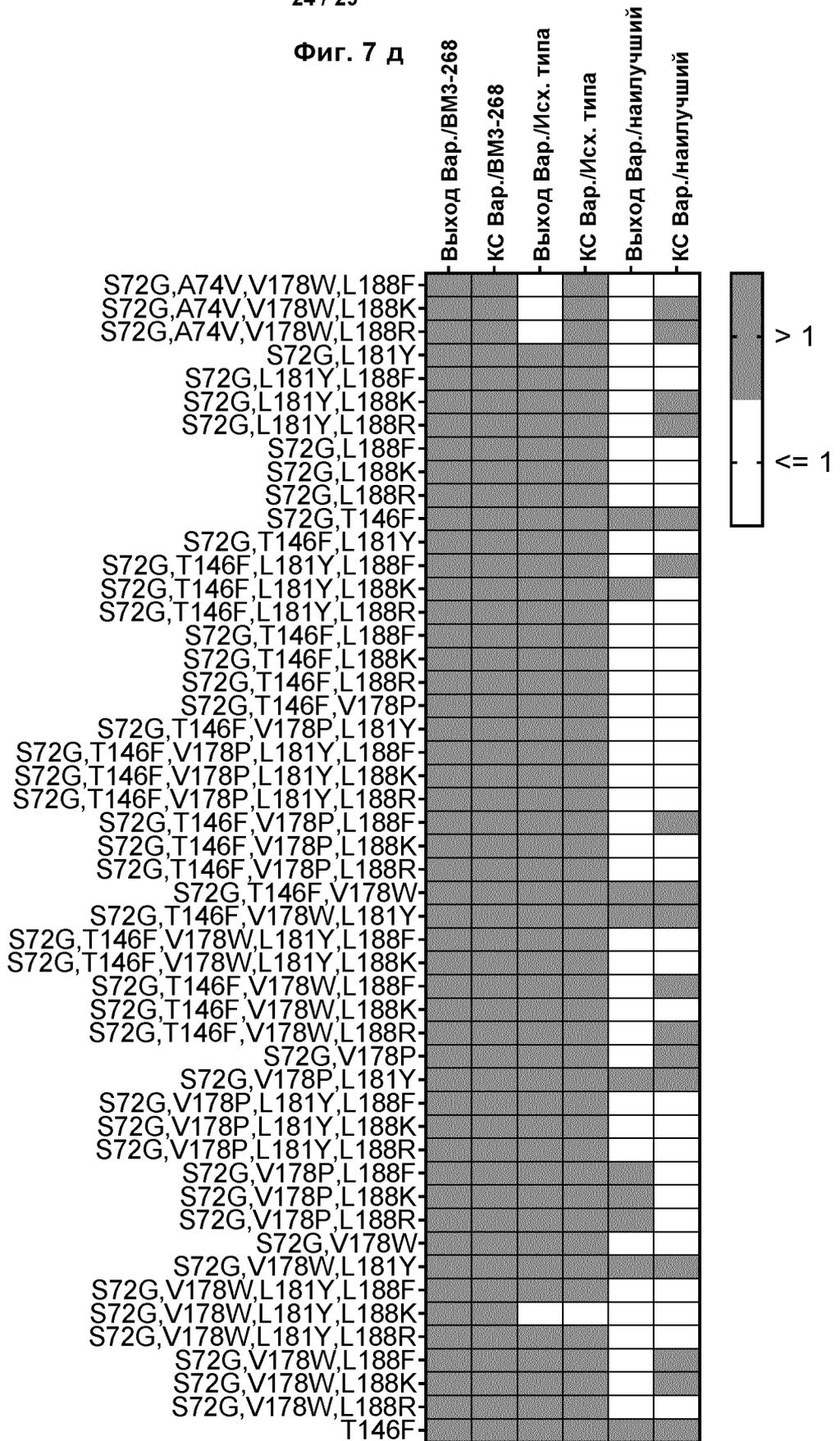
Фиг. 7 в



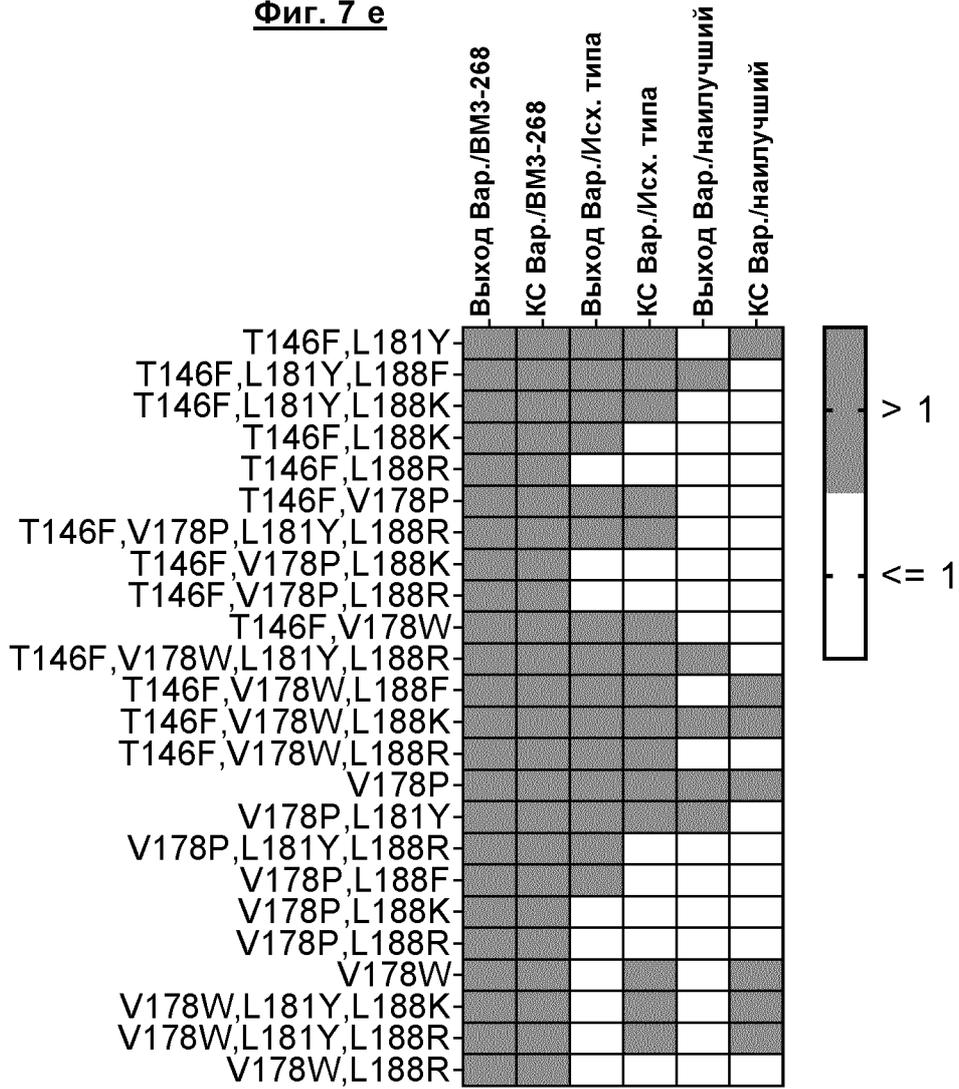
Фиг. 7 г



Фиг. 7 д

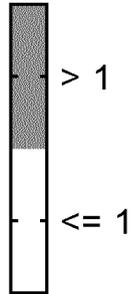


Фиг. 7 е

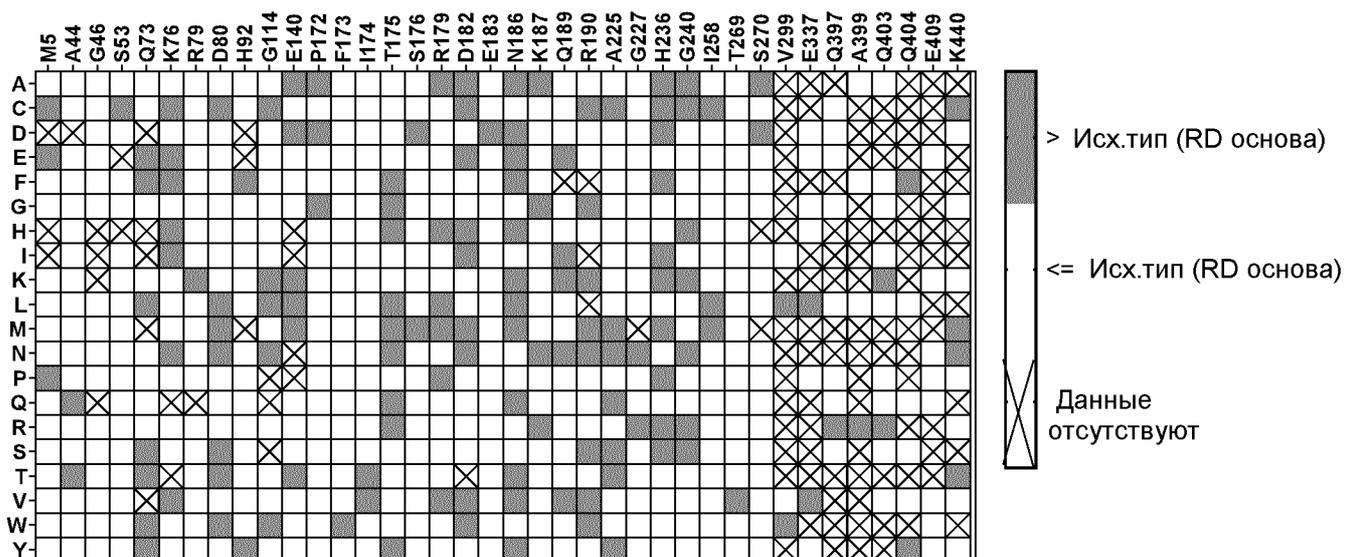


Фиг. 8

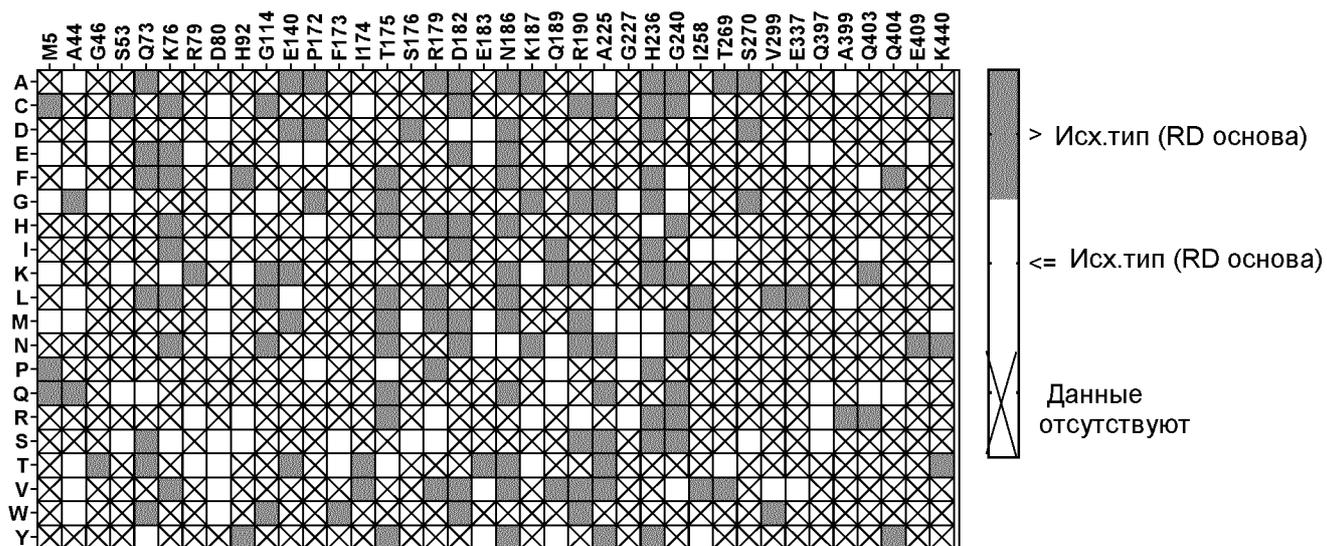
	Выход Вар./ВМЗ-268	КС Вар./ВМЗ-268	Выход Вар./наилучший	КС Вар./наилучший
A184D, L188K	■	■	■	■
A74I, M177Y, A184R, L188F	■	■	■	■
A74T, A184D	■	■	■	■
A74T, F77A, L181Y, A184D, L188K	■	■	□	□
A74T, L181Y	■	■	■	■
A74T, L181Y, A184D, L188K	■	■	□	□
A74T, L181Y, A184Y, L188K	■	■	□	□
A74T, L188K	■	■	■	■
A74T, M177Y, L181Y, A184D, L188K	■	■	□	□
A74T, T146F, L181Y, A184D, L188K	■	■	□	□
A74V, L181Y, A184D, L188K	■	■	■	■
A74V, V178P, A184W, L188K	■	■	■	■
F77A, M177Y	■	■	■	■
L181Y, A184D	■	■	■	■
L181Y, L188K, H659R	□	■	□	■
M177Y, A184W	■	■	■	■
M177Y, A184Y	■	■	■	■
M177Y, V178P, A184Y, L188F	■	■	□	□
M177Y, V178W, A184Y	■	■	□	□
M177Y, V178W, A184Y, L188F	■	■	□	□
R50S, A74T, L181Y, A184D, L188K, G240R	■	■	■	■
R50S, M177Y, V178W, A184W	■	■	□	□
R50S, M177Y, V178W, A184Y	■	■	□	□
R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188K	■	■	□	□
R50S, M177Y, V178W, A184Y, L188R	■	■	□	□
R50S, M177Y, V178W, L181Y, A184Y	■	■	□	■
R50S, T146F, M177Y, V178W, A184Y	■	■	□	□
S72G, A74I, F77A, M177Y	■	■	■	■
S72G, A74I, F77L	■	■	■	■
S72G, A74I, F77L, M177Y	■	■	■	■
S72G, A74T, L181Y, A184D, L188K	■	■	■	■
S72G, A74V, F77A	■	■	■	■
S72G, A74V, F77A, M177Y	■	■	□	□
S72G, A74V, F77L, M177Y	■	■	■	■
T49R, R50S, M177Y, V178W, A184Y	■	■	□	□
V26N, R50S, M177Y, V178W, A184Y	■	■	□	□



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

	Титр эстрогена	Соотношение целевого продукта	
A225V, H236K, G240V, T269V	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
D80I, D182H, A225V, G240V, T269V	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
F173W, R179L, T269V, K440C	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
F173W, R190V, H236K, T269V	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
H236K, G240V, T269V, K440C	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
Q73W, D80I, N186V, G240V	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
R179L, A225S	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
T175M, H236D	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	
T175M, R190V	Выше, чем наилучший	Ниже, чем наилучший	