



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/80 (2006.01); C12N 15/63 (2006.01); C12N 15/09 (2006.01); C07J 7/00 (2006.01); C12P 33/10 (2006.01); C12R 1/66 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017140038, 17.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.11.2017

Дата регистрации:  
16.01.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.11.2017

(45) Опубликовано: 16.01.2019 Бюл. № 2

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,  
Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное  
интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Савинова Татьяна Степановна (RU),  
Савинова Ольга Сергеевна (RU),  
Вавилова Екатерина Александровна (RU),  
Васина Дарья Владимировна (RU),  
Тяжелова Татьяна Владимировна (RU),  
Федорова Татьяна Васильевна (RU),  
Чулкин Андрей Михайлович (RU),  
Сольев Павел Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)  
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: Christensen U. et al. Unique  
regulatory mechanism for D-galactose  
utilization in *Aspergillus nidulans*. *Applied and  
environmental microbiology*, 2011. Савинова  
О.С. и др. Получение штаммов *Aspergillus  
nidulans* - продуцентов гетерологичной  
лактазы с повышенной активностью.

Микробные биотехнологии:  
фундаментальные и прикладные аспекты.  
Тезисы (см. прод.)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS NIDULANS* И ЕГО  
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ  
11 $\alpha$ -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
биотехнологии и биохимии, в частности к  
рекомбинантному штамму мицелиального гриба  
*Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).  
Указанный штамм обладает стероид-11 $\alpha$ -  
гидроксилирующей активностью, способностью  
конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -

ацетоксипрогестерон, ацетилирующей  
активностью и способностью этерифицировать  
11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон. Настоящий штамм  
получен путем трансформации штамма *A. nidulans*  
031 (argB<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) (AN031; CBS 129193) автономно  
реплицируемой плазмидой pDHG25-SgrDI,  
содержащей уникальный сайт рестрикции SgrDI.

Изобретение также относится к применению указанного штамма для 11 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона с образованием 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона и для ацетилирования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона с получением 11 $\alpha$ -

ацетоксипрогестерона. Настоящее изобретение позволяет получать 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон и 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон с помощью биокаталитических процессов. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 23 ил., 1 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

докладов X Международной научной конференции, Минск, 5-9 июня 2017 г. Gems D. et al. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene, 1991.

Игнатьева С.М. и др. Биологические особенности некоторых избранных *Aspergillus* spp. Проблемы медицинской микологии, 2009.

RU 2 6 7 7 3 3 2 C 1

RU 2 6 7 7 3 3 2 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 677 332**<sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.  
*C12N 1/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 15/80* (2006.01); *C12N 15/63* (2006.01); *C12N 15/09* (2006.01); *C07J 7/00* (2006.01); *C12P 33/10* (2006.01); *C12R 1/66* (2006.01)

(21)(22) Application: **2017140038**, **17.11.2017**

(24) Effective date for property rights:  
**17.11.2017**

Registration date:  
**16.01.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **17.11.2017**

(45) Date of publication: **16.01.2019** Bull. № 2

Mail address:

**119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,  
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni  
M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe  
intellektualnoe razvitie"**

(72) Inventor(s):

**Savinova Tatyana Stepanovna (RU),  
Savinova Olga Sergeevna (RU),  
Vavilova Ekaterina Aleksandrovna (RU),  
Vasina Darya Vladimirovna (RU),  
Tyazhelova Tatyana Vladimirovna (RU),  
Fedorova Tatyana Vasilevna (RU),  
Chulkin Andrej Mikhajlovich (RU),  
Solev Pavel Nikolaevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj  
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)  
(RU)**

(54) **RECOMBINANT STRAIN OF FILAMENTOUS FUNGUS ASPERGILLUS NIDULANS AND ITS USE FOR PROGESTERONE 11 $\alpha$ -HYDROXYLATION AND FOR ACETYLATION OF 11 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and biochemistry, namely to recombinant mycelial fungus *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) strain. This strain has steroid-11 $\alpha$ -hydroxylating activity, the ability to convert progesterone into 11 $\alpha$ -acetoxyprogesterone, acetylating activity and ability to esterify 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. Present strain was obtained by transforming strain *A. nidulans* 031 (argB<sup>-</sup>;

pyrG<sup>-</sup>) (AN031;CBS 129193) autonomously replicable plasmid pDHG25-SgrDI containing a unique SgrDI restriction site. Invention also relates to use of said strain for 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone to form 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and for acetylation 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to give 11 $\alpha$ -acetoxyprogesterone.

EFFECT: present invention allows to obtain 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 11 $\alpha$ -acetoxyprogesterone with the help of biocatalytic processes.

3 cl, 23 dwg, 1 tbl, 6 ex

## Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а также к генетике и молекулярной биологии, конкретно к клеткам живых культур, включая рекомбинантные, и касается создания и применения нового рекомбинантного штамма мицелиального гриба для гидроксилирования и ацетилирования стероидных соединений, в частности, соединений ряда прегнана (производных прогестерона), и может быть использовано в промышленной биотехнологии, а также в фармацевтической промышленности, для производства стероидных медицинских препаратов.

## Уровень техники

Введение гидроксильной группы в положение C<sup>11</sup> стероидной молекулы имеет большое промышленное значение, так как не только обеспечивает изменение биологической активности исходной молекулы в желаемом направлении, но и создает возможность для дальнейшей модификации молекулы, например, введения атома галогена в положение C<sup>9</sup>, с целью создания фармакологически более активных производных. Осуществление 11( $\alpha/\beta$ )-гидроксилирования стероидов микроорганизмами, особенно прогестерона, является экономически важным для производства кортикостероидов, так как одной из основных проблем их синтеза является введение кислородной функции в 11 положение, трудно осуществимое химическими методами. Так, например, химический синтез кортизона из желчных кислот включает ~30 стадий и общий выход составляет несколько десятых долей процента [Л. Физер, М. Физер. Стероиды. Пер. с англ. под ред. д.х.н. Н.Н. Суворова и д.х.н. И.В. Торгова. М.: Мир, 1964, с. 673]. Напротив, синтез ацетата кортизона из 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона состоит из 10 стадий и общий выход достигает 14,6% [SU 106380, 1956].

Известно, что 11-гидроксилирование стероидов в одну стадию с высокой степенью селективности возможно только биотехнологически с применением ферментной системы микроорганизмов, в основном, мицелиальных грибов, одним из которых является род *Aspergillus*. Однако этому роду присуща видовая специфичность трансформации стероидов ряда прегнана. Так, трансформация прогестерона у ряда видов (например, *A. terreus* [K. Yildirim, A. Uzuner, and E.Y. Gulcuoglu. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. Collect. Czech. Chem. Commun. 2010, Vol. 75(6), 665-673], *A. tamarii* [K. Yildirim, A. Uzuner and E.Y. Gulcuoglu. Baeyer-Villiger oxidation of some steroids by *Aspergillus tamarii* MRC 72400. Collect. Czech. Chem. Commun. 2011, Vol. 76(6), 743-754], *A. versicolor* [H.Y. Yang, H.L. Su, G. Du, G.J. Shen, J.X. Sun, and H.Y. Chen. Progesterone side-chain cleavage by *Aspergillus versicolor*. Advanced Materials Research. Advances in Chemical Engineering III. 2013. Vols. 781-784, 1164-1167; Abed Nosrat M. Side chain degradation of progesterone by *Aspergillus versicolor* 79. Pakistan Journal of Biochemistry, 1972, Vol. 5(1), 5-7], *A. flavus* [M.E. Mostafa, and A.A. Zohri. Progesterone side-chain degradation by some species of *Aspergillus flavus* group. Folia Microbiol (Praha). 2000; Vol. 45(3), 243-7]) может протекать не в направлении гидроксилирования, а в направлении элиминирования боковой прегнановой цепи с образованием соединений ряда андростана. Другие штаммы рода *Aspergillus* способны гидроксилировать прогестерон, вводя гидроксильную группу в различные положения молекулы, в том числе в 11 $\alpha$ -положение. При этом направление гидроксилирования может существенно зависеть не только от видовой принадлежности штамма, но и от условий проведения трансформации.

Биотрансформация прогестерона с образованием 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона наиболее изучена с применением грибов *Aspergillus ochraceus*, селективность 11 $\alpha$ -гидроксилирования у которых может достигать 90% и более [T.K. Dutta, and T.B. Samanta. Bioconversion of progesterone by the activated immobilized conidia of *Aspergillus ochraceus*

TS. Curr. Microbiol. 1999; Vol. 39(6), 309-312; P. Somal, and C.L. Chopra. Microbial conversion of steroids. III: 11 $\alpha$ -hydroxylation by fungal mycelium. Applied Microbiology and Biotechnology, 1985, Vol. 21(5), 267-269]. Штаммы *A. ochraceus* нашли применение в качестве промышленных культур.

5 Мицелиальный гриб *Aspergillus nidulans* является одной из наиболее известных эукариотических генетических систем и широко используется в качестве модельной системы для расшифровки биологии клеточного цикла, патогенности, лекарственной устойчивости, болезней человека, первичного и вторичного метаболизма других микроорганизмов. Несмотря на это, штаммы гриба *A. nidulans* как стероид-  
10 трансформирующие микроорганизмы мало изучены. Однако имеются сообщения, что этот вид обладает 11 $\alpha$ -монооксигеназной активностью и способен трансформировать прогестерон с образованием преимущественно 11 $\alpha$ -гидрокси-производного. Так, M.J. Henry и H.D. Sisler [M.J. Henry, and H.D. Sisler. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology, 15 1984, Vol. 22(3), 262-275], изучая влияние фунгицидов, ингибирующих биосинтез эргостерина в грибах, на цитохром-Р450-зависимое гидроксилирование прогестерона, сообщили, что гриб *A. nidulans* (Eidam) Winter (штамм 003) гидроксилирует прогестерон при начальной концентрации 100 мкг/мл с образованием смеси, содержащей 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон (50%), 6 $\beta$ -гидроксипрогестерон (5%), 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -  
20 дигидроксипрогестерон (14%) и неконвертированный прогестерон (31%). При этом лиазная активность (расщепление боковой цепи по связи C<sup>17</sup>-C<sup>20</sup>) у этого штамма не наблюдалась.

Также известно, что культура гриба *A. nidulans* (из коллекции Центра культур  
25 лаборатории микробиологической химии, National Research Centre, Каир, местная среда обитания), обладая стероид-11 $\alpha$ -гидроксилирующей активностью, может трансформировать прогестерон не только в 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, но и в 21-гидроксипрогестерон (он же 11-дезоксикортикостерон) [A.H. El-Refai, and K.M. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987, Vol. 22(2), 327-338; A.H. El-Refai, and K.M. Ghanem. Microbial response  
30 to steroids. Egyptian Journal of Microbiology, 1989, Vol. 23(1), 1-11]. Авторы вносили прогестерон в ростовую среду в растворе 96% этанола с финальной концентрацией растворителя 1%. Трансформацию прогестерона проводили с нагрузкой 1 г/л при температуре 30 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C на качалке (200 об/мин, амплитуда 7 см) в течение 48 ч. При этом наблюдалось образование дигидроксилированного производного - 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -  
35 дигидроксипрогестерона. Был сделан вывод, что при значениях pH среды, близких к нейтральным, 6 $\beta$ -гидроксилирование является вторичным процессом и 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерон образуется из первично образованного 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона [A.H. El-Refai, and K.M. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987, Vol. 40 22(2), 327-338].

Известно, что микроорганизмы способны ацетилировать стероидные вторичные спирты. Так, известна способность некоторых видов дрожжей и дрожжеподобных организмов (*Saccharomyces fragilis*, *S. lactis*, *Candida pseudotropicalis* и *Torulopsis sphaerica*)  
45 ацетилировать тестостерон [A. Čapek, M. Tadra, and J. Tůma. Microbial transformations of steroids XXIV. Separation of androstane 17-hydroxy-epimers. Folia Microbiol. 1964, Vol. 9(6), 380-382]. При этом отмечалось, что ацетилирование происходит только с 17 $\beta$ -гидроксипроизводным, тогда как соответствующий 17 $\alpha$ -эпимер остается нетронутым.

В этих условиях не происходит ацетилирования молекулы стероида с гидроксигруппой в положениях 11 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 20 $\beta$  и 21. Однако информация о способности мицелиальных грибов, к которым относится род *Aspergillus*, ацетилировать стероидные спирты, в литературных источниках отсутствует.

- 5 Из уровня техники известно, что ацетилирование 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона осуществляют химически, используя в качестве ацетилирующего агента уксусный ангидрид. Так, известным химическим методом [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister, and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc., 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936] получают 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон, ацетилируя 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон (20 мг) действием уксусного ангидрида (0,6 мл) в среде пиридина (0,6 мл). Смесь выдерживают в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании реакции реакцию массу разбавляют 25 мл воды, выдерживают в течение 1 ч, охлаждают для начала кристаллизации. Кристаллы отделяют фильтрацией, промывают 15 водой и сушат. Получают 16,1 мг 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона с т.пл. 176-177°C.

- Таким образом, из уровня техники следует, что образование 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона при трансформации прогестерона культурами мицелиальных грибов вообще, в частности, рода *Aspergillus*, конкретно *Aspergillus nidulans*, ранее не наблюдалось. О применении грибов *A. nidulans*, обладающих стероид-11 $\alpha$ -гидроксигруппой активностью и способных конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, для получения 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона сообщается впервые. При этом этерификация 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона грибом *A. nidulans* с образованием 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона является вторым этапом процесса трансформации прогестерона и может быть осуществлена как с выделением, так и без выделения 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона из культуральной жидкости, образованного на первом этапе биотрансформации.

- 11 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон (11 $\alpha$ -гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион, CAS №80-75-1) является физиологически активным производным прогестерона (прегн-4-ен-3,20-диона, CAS №57-83-0) - нативного стероидного гормона, синтезируемого желтым телом яичника, 30 корковым веществом (корой) надпочечников, семенными пузырьками и плацентой. Препараты на основе прогестерона применяются в качестве лекарственных средств в медицине и ветеринарии. 11 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон, как и его 11 $\beta$ -эпимер, обладает ингибирующей активностью в отношении фермента 11 $\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы, который окисляет 11-гидрокси-группу в 11-кето-группу, таким образом играя 35 регулятивную роль в поддержании электролитного баланса [G.W. Souness, S.A. Latif, J.L. Laurenzo, D.J. Morris. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. Endocrinology. 1995, Vol. 136(4), 1809-1812].

- 11 $\alpha$ -Ацетоксипрогестерон (11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона ацетат, CAS №2268-98-6) 40 обладает физиологической активностью, является активным фармацевтическим ингредиентом и относится к средствам, снижающим риск преждевременных родов [<http://www.imcopharma.cz/ru/api/11-alfa-gidroksiprogesteron-acetat>]. 11 $\alpha$ -Ацетоксипрогестерон также служит исходным субстратом в синтезе других стероидных соединений.

- 11 $\alpha$ -Ацетоксипрогестерон и 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, являясь производными 45 прогестерона, обладающими гестагенной активностью, могут быть использованы в комбинации с природными или синтетическими эстрогенами в качестве активного ингредиента как в препаратах для пероральной контрацепции, так и в препаратах для гормональной заместительной терапии женщин в постклимактерический период.

Кроме того, 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон и его ацетат могут быть использованы не только в качестве прогестагенных средств, как указано выше, но и в качестве антиандрогенных агентов для снижения сальных выделений у пациентов, страдающих себореей, аллопецией и другими заболеваниями кожи, связанными с гиперандрогенизацией [RU 2432952, 2011]. Также известны косметические композиции для ухода за волосами и кожей головы, содержащие 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон или 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон [DE 2757024, 1979]. При этом отмечено, что у этих соединений при местном применении гормональные побочные эффекты отсутствуют.

11 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон и 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон могут быть использованы как исходные продукты в синтезе других лекарственных средств для медицинского применения. Например, 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон может быть использован в синтезе 11-кетопрогестерона (кетогестина, CAS №516-15-4), который далее превращают в кортизон или 11 $\beta$ -гидроксипрогестерон - предшественник нативного гидрокортизона - методами, известными из уровня техники. Химический метод перехода от 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона к 11-кетопрогестерону с выходом более 90% и далее в 11 $\beta$ -гидроксипрогестерон описан в патенте [US 2015376225, 2015, примеры 1 и 7 соответственно]. Кроме того, 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон может быть использован в качестве исходного соединения в синтезе перспективных аналогов нейростероидного анестетика альфаксолона [P.Y. Savechenkov, D.C. Chiara, R. Desai, A.T. Stern, X. Zhou, A.M. Ziemba, A.L. Szabo, Y. Zhang, J.B. Cohen, S.A. Forman, K.W. Miller, K.S. Bruzik. Synthesis and pharmacological evaluation of neurosteroid photoaffinity ligands. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 136, P. 334-347].

#### Раскрытие изобретения

Технической задачей, решаемой с помощью настоящего изобретения, является расширение номенклатуры микроорганизмов, способных проводить 11 $\alpha$ -гидроксилирование прогестерона, а именно, создание нового рекомбинантного штамма аскомицета *A. nidulans*, содержащего новую автономно реплицируемую плазмиду, способного к 11 $\alpha$ -гидроксилированию прогестерона, а также расширение ассортимента методов ацетилирования вторичной гидроксильной группы при атоме C<sup>11</sup> молекулы прогестерона, благодаря наличию способности штамма по настоящему изобретению ацетилировать вторичную гидроксильную группу при атоме C<sup>11</sup> молекулы прогестерона, как альтернативы химическому методу ацетилирования.

Поставленная задача решалась путем использования штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), полученного трансформацией автономно реплицируемой плазмиды pDHG25-SgrDI с геном устойчивости к ампициллину AP<sup>r</sup>, геном *argB* и уникальным сайтом рестрикции SgrDI в штамм *A. nidulans* 031 (*argB*<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) - ауксотроф штамма дикого типа *A. nidulans* ВКПМ F-1069 ранее для биотрансформации стероидных соединений, в том числе прогестерона, не применялся. Штамм *A. nidulans* 031 (*argB*<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) (synonym FP-308.1; AN031; CBS 129193) - ауксотроф штамма *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 (synonym FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194), несущий мутации *argB2* (требующий аргинин) и pyrG89 (требующий уридин и урацил).

Штамм *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) - новый рекомбинантный штамм, получен впервые, его стероид-11 $\alpha$ -гидроксилирующая активность обнаружена впервые. Этот штамм впервые применен для биотрансформации прогестерона. Установлена способность этого штамма конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон и 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон.

Для получения штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) была создана новая плаزمида pDHG25-SgrDI. Плазмида pDHG25-SgrDI сконструирована на основе известной автономно реплицируемой плазмиды pDHG25 для организма *Aspergillus nidulans* [D. Gems, I.L. Johnstone, A.J. Clutterbuck. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, 1991, Vol. 98, 61-67] путем введения в нее уникального сайта SgrDI с помощью известных молекулярно-генетических методов [J. Sambrook, T. Maniatis, and E.F. Fritsch. *Molecular cloning a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989).

Для вставки уникального сайта SgrDI проводилась рестрикция известной автономной плазмиды pDHG25 по сайту BamHI с помощью рестриктазы BamHI. Затем проводили дефосфорилирование концов фрагмента с помощью щелочной фосфатазы. Олигонуклеотидный линкер Bam\_SgrDI (SEQ ID №1) фосфорилировали T4 полинуклеотидкиназой и с помощью T4 ДНК-лигазы лигировали дефосфорилированный фрагмент с линкером.

Полученная плазмида pDHG25-SgrDI содержит: репликон плазмиды pMB1; ген устойчивости к ампициллину AP<sup>r</sup>, что обеспечивает репликацию в *E. coli*; ген *argB* *A. nidulans*; участок AMA1, обеспечивающий автономное реплицирование в *A. nidulans*, представляющий собой обратный повтор, который является участком центromеры хромосомы *A. nidulans*. На фиг. 1 изображена карта кольцевой автономно реплицируемой плазмиды pDHG25-SgrDI.

Проведена трансформация мутантного штамма *A. nidulans* 031 (*argB*<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) полученной плазмидой pDHG25-SgrDI, несущей ген *argB*, с отбором на селективной среде. Из полученных трансформантов, способных расти на среде без аргинина, для дальнейшей работы был выбран штамм, обозначенный как *A. nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>). [Aleksenko, A.Y., Makarova, N.A., Nikolaev, I.V., and Clutterbuck, A.J., Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene, *Curr. Genet.*, 1995, vol. 28, pp. 474-478].

Техническим результатом является создание нового рекомбинантного штамма мицелиального гриба и применение его для биокаталитического получения стероидных спиртов и их этерификации без использования химических методов. Получение 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона биотрансформацией прогестерона в одну стадию имеет преимущества перед известным из уровня техники двухстадийным процессом, включающим следующие этапы: 1) микробиологическое 11 $\alpha$ -гидроксилирование прогестерона и 2) химическое ацетилирование вторичной 11 $\alpha$ -гидроксильной группы. Биотехнологическое 11 $\alpha$ -гидроксилирование прогестерона и ацетилирование образованного 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона с выделением или без выделения его из реакционной массы является экономически эффективным процессом, преимущества которого перед химическим методом ацетилирования состоят в следующем:

- процесс проводится без использования агрессивных химических реагентов, таких как уксусный ангидрид или хлорангидрид уксусной кислоты, без использования сильных минеральных кислот в качестве катализаторов ацетилирования, таких как 60% хлорная кислота;

- биокаталитическая этерификация 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона является альтернативой химическому методу ацетилирования, является экологически более чистым и безопасным методом;

- биокаталитическое ацетилирование протекает регионаправленно без образования побочного продукта енолацетилирования  $\Delta^4$ -3-кетогруппы молекулы 11 $\alpha$ -



гидроксипрогестерона - 3,11 $\alpha$ -диацетоксипрегна-3,5-диен-20-она, содержание которого при использовании химического метода ацетилирования может составлять 20-30%, что существенно осложняет очистку целевого 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона и приводит к потерям его выхода.

Для достижения указанного выше технического результата предлагается использовать новый штамм *Aspergillus nidulans* по заявляемому изобретению в качестве биокатализатора для биотехнологических процессов 11 $\alpha$ -гидроксирования и 11 $\alpha$ -ацетоксирования прогестерона, а также биокаталитической этерификации 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона.

11 $\alpha$ -Ацетоксипрогестерон при необходимости может быть гидролизован любым удобным способом с образованием 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона, известным из уровня техники. Так, например, известен химический метод получения 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона сольволизом 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона действием (бистрибутилово)оксида [M.G. Perez, and M.S. Maier. Mild deprotection of steroid esters by bis(tributyltin)oxide. Tetrahedron Letters, 1995. Vol. 36(19), 3311-3314] или традиционным способом химического сольволиза в условиях основного катализа: в среде метанола в присутствии KOH [T. Kubota, and F. Hayashi. Studies on A-norsteroids - VI. Directing effects of C<sub>11</sub> substituents on the addition of osmium tetroxide to steroidal  $\Delta^{1,4}$ -3-ketones. Tetrahedron, 1967. Vol. 23, 995-1006].

Культурально-морфологические особенности заявляемого штамма.

Штамм *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) на агаризованной среде образует круглые колонии диаметром 30-35 мм через 7 суток роста. Поверхность ровная, выпуклая, пушистая. Текстура средней плотности. Край колоний плотный, неровный. Цвет колоний в зоне спороношения зеленовато-белый. Обратная сторона палево-коричневая. Эксудат отсутствует. Характеризуются интенсивным спороношением. Цвет спор ярко-зеленый.

Основным свойством штамма по заявляемому изобретению является наличие стероид-11 $\alpha$ -гидроксильной активности и способности конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон, а также ацетилирующей активности и способности

этерифицировать 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон.

Схема создания нового штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) по настоящему изобретению, исходя из известного штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069, приведена на фиг. 2.

На фиг. 3 представлена схема трансформации прогестерона заявляемым штаммом *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Трансформация прогестерона протекает с первичным образованием 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона. Процессы ацетилирования гидроксильной группы образованного 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона и его 6 $\beta$ -гидроксирования с образованием 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерона являются вторичными, конкурентными процессами трансформации, причем процесс биокаталитической этерификации имеет преимущества. Этот вывод подтвержден экспериментально. При продолжительности трансформации 14 ч штаммом *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) в культуральной среде определено наличие только 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона и нетрансформированного исходного субстрата. Кроме того, используя 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон вместо прогестерона в качестве исходного субстрата в аналогичных условиях трансформации штаммом *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), было отмечено, что в течение 23 ч имеет место образование исключительно 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона.

Таким образом, сущность заявленного изобретения заключается в создании нового рекомбинантного штамма мицелиального гриба *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) трансформацией новой автономно реплицируемой плазмиды pDHG25-SgrDI в штамм *A. nidulans* 031 (argB<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) - ауксотроф штамма дикого типа *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 - и его применении для 11 $\alpha$ -гидроксирования прогестерона и ацетилирования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона с выделением или без выделения последнего из культуральной жидкости.

Преимущества применения штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) по настоящему изобретению состоят в способности конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон и ацетилировать гидроксильную группу в молекуле 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона с образованием 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона как с выделением 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона из культуральной среды, так и без выделения, *in situ*.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена карта кольцевой автономно реплицируемой плазмиды pDHG25-SgrDI.

На фиг. 2 представлена схема создания штамма *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) по настоящему изобретению, исходя из известного штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069.

На фиг. 3 представлена схема трансформации прогестерона штаммом *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

На фиг. 4, 7 и 15 представлены хроматограммы хромато-масс-спектрометрического анализа 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона, 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона и 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерона соответственно.

На фиг. 5 и 6 представлены <sup>1</sup>H ЯМР-спектры 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона.

На фиг. 8-14 представлены <sup>1</sup>H ЯМР-, <sup>13</sup>C ЯМР-, DEPT-ЯМР-, HSQC-ЯМР- и HMBC-ЯМР- спектры 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона.

На фиг. 16-23 представлены <sup>1</sup>H-ЯМР-, <sup>13</sup>C-ЯМР-, DEPT-ЯМР-, HSQC-ЯМР- и HMBC-ЯМР - спектры 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерона.

Осуществление изобретения

Ауксотроф штамм *A. nidulans* ВКПМ F-1069 - *A. nidulans* 031 (argB<sup>-</sup>, pyrG<sup>-</sup>) (synonym FP-308.1 [U. Christensen, B.S. Gruben, S. Madrid, H. Mulder, I. Nikolaev, and R.P. de Vries, Unique Regulatory Mechanism for d-Galactose Utilization in *Aspergillus nidulans*, Appl Environ Microbiol. 2011 Vol. 77(19), 7084-7087]; AN031 [J.V. Forment, D. Ramón, and A.P. MacCabe; Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system. Curr Genet. 2006. Vol. 50, 217-224]); депонирован в коллекции "The CBS-KNAW culture collection" (Нидерланды) под номером CBS 129193 [<http://www.westerdijknstitute.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>].

Прогестерон (I) (CAS №57-83-0, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон (II) (CAS №80-75-1, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>) и 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон (C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>, М.в. 372.5 являются коммерчески доступными и могут быть приобретены, например, у компании Steraloids Inc. (USA) или у других производителей.

Неорганические соли были приобретены у компании Fluka (Germany). Дрожжевой экстракт и агар - Difco Becton Dickinson and company (Sparks, USA).

Другие реагенты, растворители, и инертные газы являются коммерчески доступными, были приобретены у российских производителей.

Для приготовления сред для культивирования и трансформации, водных растворов кислот, солей и щелочей использовали дистиллированную воду. Для промывки экстрактов в органических растворителях использовали питьевую водопроводную воду, если не оговорено особо.

5 Все процедуры, если не оговорено особо, осуществляли при комнатной температуре или температуре окружающей среды, то есть в диапазоне от 20 до 25°C. Для процессов, требующих более низкие температуры, чем комнатная, охлаждение обеспечивали холодной водопроводной водой (в диапазоне от 10 до 20°C), или смесью колотого льда и холодной воды (в диапазоне от 5 до 10°C), или смесью колотого льда и хлорида кальция (при температуре ниже 5°C).

Культивирование микроорганизмов осуществляли на качалке New Brunswick™ Innova® 44/44R в термостатированном помещении при температуре 37°C (240-250 об/мин., амплитуда 5 см).

15 Упаривание растворителей в вакууме осуществляли с использованием ротационного вакуумного испарителя Rotavapor (Büchi Labortechnik AG), при остаточном давлении  $0,35 \pm 0,05$  кгс/см<sup>2</sup> (35±5 кПа) и температуре воды в бане в диапазоне от 35-50°C в зависимости от природы упариваемого растворителя.

20 Высушивание кристаллов продуктов до постоянного веса осуществляли при температуре 35-45°C при атмосферном давлении или с использованием вакуум-сушильного шкафа при остаточном давлении  $0,35 \pm 0,05$  кгс/см<sup>2</sup> (35±5 кПа).

Для определения pH промывных вод использовали универсальную индикаторную бумагу с диапазоном значений от 0 до 12 (Лахема, Чехия).

25 Колоночную хроматографию осуществляли на колонке (16×650 мм), используя силикагель марки Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck, Germany).

30 Контроль за ходом элюирования осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя пластины Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) и хроматографические системы растворителей: дихлорметан-ацетон 9:1 (v/v) или дихлорметан-ацетон 4:1 (v/v). Пластины просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм, затем опрыскивали 1% раствором ванилина в 10% водном растворе HClO<sub>4</sub>, проявляли при температуре 100-120°C.

35 Структуру и чистоту всех выделенных соединений подтверждали, по меньшей мере, одним из следующих методов: ТСХ (пластины для ТСХ Silica gel 60 F254 (Merck, Germany)), масс-спектрометрия, элементный анализ, ядерный магнитный резонанс (ЯМР), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Температуру плавления выделенных соединений определяли на приборе для определения точки плавления М-565 (Büchi Labortechnik AG).

40 <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C- ЯМР спектры были определены на спектрометре Bruker Avance-400 (Bruker BioSpin GmbH) с рабочей частотой 400 МГц и 100.6 МГц соответственно, используя дейтерированный хлороформ (99,8% D, Sigma-Aldrich), или дейтерированный диметилсульфоксид (99,9% D, Sigma-Aldrich) в качестве растворителя относительно тетраметилсилана (TMS NMR grade ≥99,9%, Sigma-Aldrich) в качестве внутреннего стандарта, в миллионных долях (м.д.).

45 Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II, используя электрораспылительную ионизацию (ESI). Измерения были получены в режиме положительных ионов со следующими параметрами: граничное напряжение капилляра 4500 В; диапазон масс от m/z 50 до 3000; внешняя калибровка (Electricpray Calibrant Solution, Fluka); давление распылителя 0,4 бар; скорость потока 3

мкл/мин; азот применяли в виде сухого газа (6 л/мин); температура интерфейса была установлена при 180°C. Образец вводили в камеру масс-спектрометра из системы HPLC Agilent 1260, снабженной колонкой Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0×50 mm; 2,7 μm) и защитой, используя автосамплер. Образец вводили в растворе 50% ацетонитрила (квалификация LC-MS) в воде (ультрачистая вода MilliQ, Merck Millipore KGaA, Germany), и колонку элюировали смесью ацетонитрила (А) и воды (В) в градиенте концентраций со скоростью потока 400 мкл/мин в следующих параметрах градиента: 0-15% А в течение 6 мин, 15% - 85% А в течение 1,5 мин, 85% - 0% А в течение 0,1 мин, 0% А в течение 2,4 мин. Время удерживания было следующим: 11α-гидроксипрогестерон - 5,2 мин; прогестерон - 6,7 мин; 11α-ацетоксипрогестерон - 6,0 мин; 6β,11α-дигидроксипрогестерон - 4,2 мин.

Образование 11α-ацетоксипрогестерона в результате трансформации прогестерона или 11α-гидроксипрогестерона культурой гриба *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) подтверждено данными спектров <sup>1</sup>H ЯМР, <sup>13</sup>C ЯМР, 2D ЯМР, хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. На фиг. №№5, 6, 7-14 и 16-23 приведены спектры и на фиг. №№4, 7 и 15 - хроматограммы полученных соединений.

Для подтверждения образования 11α-ацетоксипрогестерона в процессе трансформации прогестерона или 11α-гидроксипрогестерона культурой *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) 11α-ацетоксипрогестерон был получен химическим синтезом из 11α-гидроксипрогестерона с применением метода ацетилирования.

При осуществлении изобретения помимо методов, подробно раскрытых в нижеследующих примерах, использовали хорошо известные специалистам методики, описанные в руководствах по молекулярной биологии и генетической инженерии [J. Sambrook, T. Maniatis, and E.F. Fritsch. Molecular cloning a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989; F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, N.Y., 1997)].

Выходы 11α-гидроксипрогестерона и 11α-ацетоксипрогестерона, полученные биотрансформацией прогестерона и 11α-гидроксипрогестерона штаммом по настоящему изобретению и приведенные в примерах заявляемого изобретения, безусловно, ниже тех, которые необходимы для эффективного промышленного процесса. Однако примеры даны лишь для иллюстрации биокаталитической способности заявляемых штаммов конвертировать прогестерон не только в 11α-гидроксипрогестерон, но и в ацетат 11α-гидроксипрогестерона. Следует отметить, что указанная ацетилирующая способность выявлена нами впервые. Выходы могут быть значительно улучшены за счет оптимизации условий проведения биотрансформации с целью минимизации образования 6β,11α-дигидроксипрогестерона и сдвига направления вторичной модификации 11α-гидроксипрогестерона в сторону ацетилирования. Известно, что состав продуктов зависит от состава среды, pH среды, возраста культуры, от индукции исходным субстратом или продуктом [A.H. El-Refai, and K.M. Ghanem Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987. Vol. 22(2), 327-338]. Поэтому для снижения активности вторичного фермента 6β-гидроксилазы и уменьшения количества, образованного 6β,11α-дигидроксипрогестерона необходимо оптимизировать параметры проведения процесса трансформации, например, значение pH среды, возраст культуры, способ внесения субстрата, состав среды для трансформации, температурный режим и другие, известные из уровня техники. Для примера в таблице 1 приведено влияние состава среды на конверсию прогестерона

заявляемым штаммом, на его 11 $\alpha$ -монооксигеназную активность (суммарно) и на относительную селективность образования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона и 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона, при прочих одинаковых условиях.

Для трансформации мы использовали 2 варианта сред следующего состава:

5 1 - среда CM, использованная А. Čapek et al. [А. Čapek, М. Tadra, J. Tůma. Microbial transformations of steroids XXIV. Separation of androstane 17-hydroxy-epimers. Folia Microbiologica. 1964. Vol. 9(6), 380-382] для ацетилирования тестостерона дрожжами и описанная в статье А.Н. El-Refai и К.М. Ghanem [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by Aspergillus nidulans. Egyptian Journal of Microbiology, 1987. Vol. 22(2), 327-338] (среда II, pH 6,5), как наиболее благоприятная  
10 для конверсии прогестерона в 11 $\alpha$ -гидрокси-производное культурой *A. nidulans*. Состав среды, г/л: глюкоза - 40; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,74; пептон - 1; дрожжевой экстракт - 1; L-аспарагин - 0,7; уридин - 1,1; урацил - 1,2.

15 2 - минимальная синтетическая среда MM. Состав среды, г/л: глюкоза - 20; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,52; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,52; NaNO<sub>3</sub> - 0,85; CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,13; CaCl<sub>2</sub> - 0,11; KCl - 0,52, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 5×10<sup>-6</sup>; MnSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 1×10<sup>-3</sup>; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 0,8×10<sup>-3</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O - 0,8×10<sup>-3</sup>; FeSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O - 0,8×10<sup>-3</sup>; уридин - 1,1; урацил - 1,2; 0,5 М фосфатно-цитратный  
20 буфер (pH 6.6) - 200 мл/л.

Известно, что минеральные соли, добавленные в среду для культивирования, в частности, CuSO<sub>4</sub>, могут быть ингибиторами стероид-С21-монооксигеназы (ЕС №1.14.99.10 [Springer Handbook of Enzymes, Vol. 27, Class 1. Oxidoreductases XII. ЕС 1.14.15-1.97. Second edition. Springer. 2006, p. 302]). Однако результаты экспериментов показали,  
25 что на среде CM образование 21-гидроксипрогестерона как продукта трансформации не наблюдается. Следует отметить, что 21-гидроксипрогестерон наряду с 11 $\alpha$ -гидроксипрогестероном является одним из продуктов трансформации прогестерона в этой среде штаммом *A. nidulans* известным способом [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by Aspergillus nidulans. Egyptian Journal  
30 of Microbiology, 1987, Vol. 22(2), 327-338].

Возможность реализации заявляемого изобретения показана, но не ограничена, в примерах конкретного выполнения.

Пример 1. Конструирование плазмиды pDHG25-SgrDI

Для вставки уникального сайта SgrDI проводилась рестрикция известной автономной  
35 плазмиды pDHG25 по сайту BamHI с помощью рестриктазы BamHI (фирмы Thermo Fisher Scientific, согласно инструкции производителя [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0051]). Затем проводили дефосфорилирование концов фрагмента с помощью щелочной фосфатазы (Shrimp Alkaline Phosphatase фирмы Thermo Fisher Scientific, согласно инструкции производителя [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/783901000UN]). Олигонуклеотидный линкер Bam\_SgrDI (SEQ ID №1)  
40 фосфорилировали Т4 полинуклеотидкиназой (фирмы СибЭнзим, согласно инструкции производителя [http://russia.sibenzyme.com/service/protocols/protocol17]) и с помощью Т4 ДНК-лигазы (СибЭнзим, [http://russia.sibenzyme.com/service/protocols/protocol13]) лигировали дефосфорилированный фрагмент с линкером.

45 Использовали следующие условия лигирования: смесь, состоящую из 5 мкл дефосфорилированного фрагмента (500 нг), 10 мкл линкера, 1 мкл 10-кратного буфера BamHI (СибЭнзим), 2 мкл 50-кратного PEG400, 1 мкл 10 mM АТФ, 2 мкл Т4 ДНК лигазы (1 ед./мкл, Сибэнзим) инкубировали в течение 15 ч при 14°C, затем прогревали 10 мин

при 65°C, охлаждали во льду.

5 мкл полученной лигазной смеси использовали для трансформации ультракомпетентных клеток штамма *E. coli* XL10Gold (Stratagene). Отбор ампициллин-устойчивых клонов осуществляли на среде LB с ампициллином. Дополнительную селекцию проводили с помощью рестрикционного анализа препаратов плазмидной ДНК. Для этого проводили рестрикцию по сайтам PstI, BglII и выбирали плазмидную конструкцию, образующую после рестрикции фрагменты размером 5272, 3954, 1578 пар нуклеотидов. Отобранные плазмидные конструкции секвенировали с помощью олигонуклеотида PrArgB\_seq (SEQ ID №2). Выбранную конструкцию (SEQ ID №3) обозначили как pDHG25-SgrDI и использовали в дальнейшей работе для получения штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Пример 2. Получение рекомбинантного штамма *Aspergillus nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>)

Для получения рекомбинантного штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), штамм *A. nidulans* 031 (argB<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) был трансформирован плазмидой pDHG25-SgrDI (полученной по примеру 1), несущей ген argB, с отбором по маркеру argB2. [Aleksenko, A.Y., Makarova, N.A., Nikolaev, I.V., and Clutterbuck, A.J., Integrative and replicative transformation of *Penicillium canescens* with a heterologous nitrate-reductase gene, *Curr. Genet.*, 1995, vol. 28, pp. 474-478]. Была получена серия трансформантов, из которой были отобраны штаммы, способные расти на среде без аргинина. Суммарную клеточную ДНК трансформантов выделяли стандартным методом, наличие плазмиды в выросших штаммах подтверждали секвенированием с использованием праймера PrArgB\_seq (SEQ ID №2). Выбрали клон, несущий плазмиду pDHG25-SgrDI. Отобранный штамм был назван *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Пример 3. Общий метод биотрансформации прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) на средах CM и MM в течение 66 ч.

Для получения споровой суспензии штамм выращивали на агаризованной среде МПА (мальт-экстракт - 3 г/л, пептон - 1 г/л, агар - 20 г/л, уридин - 1,1 г/л, урацил - 1,2 г/л) при температуре 37°C в течение 7-10 дней. Споровую суспензию высевали в качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл среды для культивирования, выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37°C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили прогестерон в виде раствора в диметилсульфоксиде до финальной концентрации 1 г/л, при этом концентрация растворителя не превышала 6% (об.). Трансформацию проводили в течение 66 ч в тех же условиях, параллельно культивируя штаммы без прогестерона в качестве контроля. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях.

Для извлечения продуктов трансформации прогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре. Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осветляли активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания. В качестве элюэнта

использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 25% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Результаты биотрансформации прогестерона штаммом *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) по настоящему изобретению приведены в таблице 1.

Пример 4. Трансформация прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) в течение 14 ч.

Споровую суспензию штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) высевали в 4 качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл среды MM для культивирования, выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37°C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили прогестерон в растворе диметилсульфоксида до финальной концентрации 1 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 4% (об.). Трансформацию проводили в течение 14 ч в тех же условиях.

Для извлечения продуктов трансформации прогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре. Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, осветляли активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания. В качестве элюэнта использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 25% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Одинаковые по составу стероидов фракции элюата объединяли и упаривали досуха. Кристаллизующийся остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, сушили до постоянного веса в вакуум-сушильном шкафу. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Из 400 мг прогестерона, загруженного на трансформацию, получили 392 мг прогестерона (98%) и 5,82 мг 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона с выходом 1,23% на загруженный субстрат (61,4% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

Пример 5. Биокаталитическое ацетилирование 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>)

Споровую суспензию штамма *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>) высевали в 4 качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл среды MM для культивирования, выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37°C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон в растворе диметилсульфоксида до финальной концентрации 0,5 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 2% (об.). Трансформацию проводили в течение 23 ч в тех же условиях.

Для извлечения продуктов трансформации 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре. Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного

объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,

осветляли активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания. В качестве элюэнта использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 20% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Одинаковые по составу стероидов фракции элюата объединяли и упаривали досуха. Кристаллизирующийся остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, сушили до постоянного веса в вакуум-сушильном шкафу. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Из 200 мг  $11\alpha$ -гидроксипрогестерона, загруженного на трансформацию, получили 168 мг  $11\alpha$ -гидроксипрогестерона (84%) и 29,48 мг  $11\alpha$ -ацетоксипрогестерона с выходом 13,08% на загруженный субстрат (81,73% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

ЯМР-спектры полученного  $11\alpha$ -ацетоксипрогестерона идентичны спектрам стандартного образца и спектрам образца, полученного химическим методом ацетилирования  $11\alpha$ -гидроксипрогестерона.

Пример 6. Получение  $11\alpha$ -ацетоксипрогестерона химическим методом

К раствору 34 мг  $11\alpha$ -гидроксипрогестерона в 0,2 мл уксусного ангидрида добавили 1 каплю 60% хлорной кислоты. Реакционную массу выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. По окончании реакции реакционную массу добавляли по каплям в 5 мл воды, содержащей 1 мл 25% раствора аммиака (pH ~7.5). Перемешивали 30 мин., затем реакционную массу экстрагировали дихлорметаном трижды, экстракт промыли водой до нейтральной реакции, упарили досуха. Получили 39 мг остатка, из которого препаративной хроматографией извлекли 27 мг  $11\alpha$ -ацетоксипрогестерона с выходом 70,45%. Т.пл. 173-174°C (лит. Т.пл. 176-177°C [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister, and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc., 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936]

Характеристика продуктов биотрансформации

$11\alpha$ -Гидроксипрогестерон, полученный биотрансформацией прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Т.пл. 164-166°C (лит. Т.пл. 164-165°C [K. Yildirim, and A. Kuru. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus candidus*. Journal of Chemical Research, 2015. Vol. 39(9), 546-549]). М.в. 330.46.

Масс-спектр высокого разрешения  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$  (m/z): рассчитано для  $[\text{M}+\text{H}]^+$  331.2268, найдено 331.2264; рассчитано для  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  353.2087, найдено 353.2088.

$^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.73 (с, 1H CH-4), 4.04 (ддд (псевдо-дт), 1H,  $^3\text{J}_{11,9}=10.3$  Гц,  $^3\text{J}_{11,12\alpha}$  4.8 Гц,  $^3\text{J}_{11,12\beta}$  4.6 Гц, CH-11), 2.66 (дт, 1H,  $^2\text{J}_{1\beta,1\alpha}$  13.7 Гц,  $^3\text{J}_{1\beta,2}$  4.4 Гц, CH-1 $\beta$ ), 2.55 (дд (псевдо-т), 1H,  $^3\text{J}_{17,16\alpha}$  8.7 Гц,  $^3\text{J}_{17,16\beta}$  9.1 Гц, CH-17), 2.48-2.26 (м, 5H, CH<sub>2</sub>-2 & CH<sub>2</sub>-6 & CH-12 $\beta$ ), 2.22-2.10 (м, 1H, CH-16 $\beta$ ), 2.13 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 2.02 (тд, 1H,  $^2\text{J}_{1\alpha,1\beta}$



13.7 Гц,  $^3J_{1\alpha, 2}$  4.5 Гц, CH-1 $\alpha$ ), 1.87-1.81 (м, 1H, CH-7 $\beta$ ), 1.78-1.64 (м, 3H, CH-8 & CH-15 $\alpha$  & CH-16 $\alpha$ ), 1.58-1.47 (2H (т, 1H,  $^3J_{12\alpha, 12\beta}$  11.3 Гц, CH-12 $\alpha$ ), 1.31 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 1.29-1.20 (м, 2H, CH-12 $\alpha$  & CH-14), 1.14 (т, 1H,  $^3J_{9, 8}$  10.3 Гц, CH-9), 1.14-1.04 (2хддд, 2H,  $^3J_{7\alpha, 7\beta}$  13.1 Гц,  $^3J_{7, 6}$  13.0 Гц,  $^3J_{7\alpha, 8}$  3.8 Гц, CH<sub>2</sub>-7 $\alpha$ ), 0.69 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-18).

11 $\alpha$ -Ацетоксипрогестерон, полученный биотрансформацией прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Т.пл. 172-174°C (лит. Т.пл. 176-177°C [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister, and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc., 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936]. М.в. 372.5;

Масс-спектр высокого разрешения C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (m/z): рассчитано для [M+H]<sup>+</sup> 373.2373, найдено 373.2361; рассчитано для [M+Na]<sup>+</sup> 395.2193, найдено 395.2183.

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 5.67 (с, 1H CH-4), 5.14 (дт, 1H,  $^3J_{11, 9}$ =10.6 Гц,  $^3J_{11, 10}$  5.0 Гц, CH-11), 2.62 (дд (псевдо-т), 1H,  $^3J_{17, 16\alpha}$  8.9 Гц,  $^3J_{17, 16\beta}$  9.1 Гц, CH-17), 2.47-2.35 (м, 2H, CH-2 $\beta$  & CH-6 $\beta$ ), 2.29-2.12 (м, 3H, CH-6 $\alpha$  & CH-12 $\beta$  & CH-2 $\alpha$ ), 2.10-1.96 (м, 1H, CH-16 $\beta$ ), 2.05 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 2.01 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-23), 1.91-1.78 (м, 3H, CH<sub>2</sub>-1 & CH-7 $\alpha$ ), 1.72-1.60 (м, 3H, CH-16 $\alpha$  & CH-15 $\alpha$  & CH-8), 1.50 (т, 1H,  $^3J_{12\alpha, 12\beta}$  11.6 Гц, CH-12 $\alpha$ ), 1.44 (т, 1H,  $^3J_{9, 8}$  10.6 Гц, CH-9), 1.39-1.29 (ддд, 1H,  $^3J_{14, 8}$  10.7 Гц,  $^3J_{14, 15\beta}$  6.4 Гц,  $^3J_{14, 15\alpha}$  5.6 Гц, CH-14) 1.29 (уш.с, 4H, CH<sub>3</sub>-19 & CH-15 $\beta$ ), 1.17-1.00 (2хддд, 2H,  $^3J_{7\alpha, 7\beta}$  12.6 Гц,  $^3J_{7, 6\alpha}$  ~  $^3J_{7, 6\beta}$  12.2 Гц,  $^3J_{7\alpha, 8}$  3.1 Гц, CH<sub>2</sub>-7), 0.64 (с, 3H, CH<sub>3</sub>-18).

<sup>13</sup>C-ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 208.61 (с, CO-20), 199.40 (с, CO-3), 170.14 (с, C-5), 170.10 (с, CO-22) 124.48 (с, CH-4), 70.58 (с, CHOH-11), 62.30 (с, CH-17), 55.34 (с, CH-9), 54.39 (с, CH-14), 45.02 (с, CH<sub>2</sub>-12), 43.54 (с, C-13), 39.75 (с, C-10), 36.79 (с, CH<sub>2</sub>-1), 34.72 (с, CH-8) 34.19 (с, CH<sub>2</sub>-2), 33.03 (с, CH<sub>2</sub>-6), 31.67 (с, CH<sub>2</sub>-7), 31.37 (с, CH<sub>3</sub>-21) 30.92 (с, CH<sub>3</sub>-21), 24.16 (с, CH<sub>2</sub>-15), 22.96 (с, CH<sub>2</sub>-16), 22.02 (с, CH<sub>3</sub>-21), 18.20 (с, CH<sub>3</sub>-19), 14.24 (с, CH<sub>3</sub>-18).

Спектры идентичны спектрам стандартного образца, а также спектрам образца, полученного методом биокаталитического ацетилирования штаммом *A. nidulans* 031/ pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), и образца, полученного химическим методом ацетилирования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона

6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Дигидроксипрогестерон, полученный биотрансформацией прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>).

Т.пл. 242-244°C (лит. т.пл. 244-246°C [Z. Habibi, M. Yousefi, Sh. Ghanian, M. Mohammadi, S. Ghasemi. Biotransformation of progesterone by *Absidia griseolla* var. *igachii* and *Rhizomucor pusillus*. Steroids, 2012, Vol. 77, p. 1446-1449]. М.в. 346.46;

Масс-спектр высокого разрешения C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> (m/z): рассчитано для [M+H]<sup>+</sup> 373.2373, найдено 373.2361; рассчитано для [M+Na]<sup>+</sup> 395.2193, найдено 395.2183.

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 5.67 (с, 1H CH-4), 5.14 (дт, 1H,  $^3J_{11, 9}$ =10.6 Гц,  $^3J_{11, 10}$

5.0 Гц, СН-11), 2,62 (дд (псевдо-т), 1Н,  $^3J_{17, 16\alpha}$  8.9 Гц,  $^3J_{17, 16\beta}$  9.1 Гц, СН-17), 2.47-2.35 (м, 2Н, СН-2 $\beta$  & СН-6 $\beta$ ), 2.29-2.12 (м, 3Н, СН-6 $\alpha$  & СН-12 $\beta$  & СН-2 $\alpha$ ), 2.10-1.96 (м, 1Н, СН-16 $\beta$ ), 2.05 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>-21), 2.01 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>-23), 1.91-1.78 (м, 3Н, СН<sub>2</sub>-1 & СН-7 $\alpha$ ),

1.72-1.60 (м, 3Н, СН-16 $\alpha$  & СН-15 $\alpha$  & СН-8), 1.50 (т, 1Н,  $^3J_{12\alpha, 12\beta}$  11.6 Гц, СН-12 $\alpha$ ), 1.44 (т, 1Н,  $^3J_{9, 8}$  10.6 Гц, СН-9), 1.39-1.29 (ддд, 1Н,  $^3J_{14, 8}$  10.7 Гц,  $^3J_{14, 15\beta}$  6.4 Гц,  $^3J_{14, 15\alpha}$  5.6 Гц, СН-14) 1.29 (уш.с, 4Н, СН<sub>3</sub>-19 & СН-15 $\beta$ ), 1.17-1.00 (2хддд, 2Н,  $^3J_{7\alpha, 7\beta}$  12.6 Гц,  $^3J_{7, 6\alpha} \sim ^3J_{7, 6\beta}$  12.2 Гц,  $^3J_{7\alpha, 8}$  3.1 Гц, СН<sub>2</sub>-7), 0.64 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>-18).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (300 МГц, DMSO- $d_6$ ): 208.61 (с, СО-20), 199.40 (с, СО-3), 170.14 (с, С-5), 170.10 (с, СО-22) 124.48 (с, СН-4), 70.58 (с, СНОН-11), 62.30 (с, СН-17), 55.34 (с, СН-9), 54.39 (с, СН-14), 45.02 (с, СН<sub>2</sub>-12), 43.54 (с, С-13), 39.75 (с, С-10), 36.79 (с, СН<sub>2</sub>-1), 34.72 (с, СН-8) 34.19 (с, СН<sub>2</sub>-2), 33.03 (с, СН<sub>2</sub>-6), 31.67 (с, СН<sub>2</sub>-7), 31.37 (с, СН<sub>3</sub>-21) 30.92 (с, СН<sub>3</sub>-21), 24.16 (с, СН<sub>2</sub>-15), 22.96 (с, СН<sub>2</sub>-16), 22.02 (с, СН<sub>3</sub>-21), 18.20 (с, СН<sub>3</sub>-19), 14.24 (с, СН<sub>3</sub>-18).

Таблица 1. Влияние состава среды на конверсию прогестерона заявляемым штаммом *Aspergillus nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), его 11 $\alpha$ -монооксигеназную активность и относительную селективность (% mol) образования продуктов трансформации

Среда для культивирования	Конверсия прогестерона, %	11 $\alpha$ -монооксигеназная активность, % mol	Относительная селективность образования продуктов трансформации, % mol		
			11 $\alpha$ -Ацетокси-прогестерон	11 $\alpha$ -Гидрокси-прогестерон	6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Дигидрокси-прогестерон
ММ	77.9	96.79	10.9	44.3	44.8
СМ	94.09	90.19	31.36	23.6	45.04

Таким образом, общая селективность 11 $\alpha$ -гидроксилирования достигает 96% и более, а содержание 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона в смеси продуктов превышает 31%. Указанная способность заявляемого рекомбинантного штамма подтверждена не только с помощью физико-химических методов анализа структуры органических соединений (масс-спектрометрия высокого разрешения, ЯМР-спектроскопия  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и 2D ЯМР), но и встречным химическим синтезом.

#### (57) Формула изобретения

1. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *A. nidulans* 031/pDHG25-SgrDI (pyrG<sup>-</sup>), обладающий стероид-11 $\alpha$ -гидроксилирующей активностью, способностью конвертировать прогестерон в 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон, ацетилирующей активностью и способностью этерифицировать 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерон, полученный трансформацией штамма *A. nidulans* 031 (argB<sup>-</sup>; pyrG<sup>-</sup>) (AN031; CBS 129193), несущего мутации argB2 и pyrG89, автономно реплицируемой плазмидой pDHG25-SgrDI, содержащей ген устойчивости к ампициллину AP<sup>r</sup>, ген argB и уникальный сайт рестрикции SgrDI.

2. Рекомбинантный штамм по п. 1, характеризующийся тем, что *A. nidulans* 031 (*argB*<sup>-</sup>; *putG*<sup>-</sup>) (AN031; CBS 129193) представляет собой ауксотроф штамма *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069.

3. Применение штамма по п. 1 для 11 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона с образованием 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона и для ацетилирования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона с получением 11 $\alpha$ -ацетоксипрогестерона.

10

15

20

25

30

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)

<120> Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Aspergillus nidulans* и его применение для 11 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона и для ацетилирования 11 $\alpha$ -гидроксипрогестерона

<160> SEQ ID № 1

<210> 1

<211> 10

<212> Linker Bam\_SgrDI

<213> synthetic construction

<400> 1

1 gatcgctcgac

<160> SEQ ID № 2

<210> 2

<211> 24

<212> PrArgB\_seq

<213> synthetic construction

<400> 2

1 gccaaaggtag atccaggcct aaca

<160> SEQ ID № 3

<210> 3

<211> 10804

<212> pDHG25-SgrDI

<213> synthetic construction

<400> 3

1 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc  
51 gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat gccggggagca gacaagcccc  
101 tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg  
151 cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata  
201 ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt

251 caggctgcgc aactgttggg aaggcgcatc ggtgcgggcc tcttcgtat  
 301 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta  
 351 acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgccaa  
 401 gcttggtcgc agggctgcag gcgacggagc gcaagccctc aatgtcgcca  
 451 gcaatcaaat cggcttcgaa gtcaaggta ttacatggc cgttgccaat  
 501 gctaaccttg atggaaggca aggatgcaga tccaacaagg gcattttcgt  
 551 attccggtaa gcgtacaatt acttcagact ggccggtttc gaccttttc  
 601 ccaatccagg tgacgaaacg ccaatattt ctcgccgatt cacttttgac  
 651 tcgatcagca tcgaggacaa tatcccttg tacccttgcc ctgacacctt  
 701 cgcttggtgc cgacacgact gataggttg tcggtctaaa tatggctgct  
 751 tccttgacgt attgcttlac tacctcggga aaaaagaagg ccagaatgag  
 801 gatgacaatg acggaaccga cagcaaggag gccgcataat accgtccacc  
 851 aagctttatt tcgcggttt ttgggtagt catctaatga aacagacccg  
 901 gacgcagcag aggaagcccc cgatgactct ataccaccgt acgccgatat  
 951 atcatcatcg cggcgatgga gaagtggggg tgactccgaa gacacttcaa  
 1001 aggagcgacg ctgttgattt gtagacgacg ctgtagagg agaagcatta  
 1051 ttgtcgtgat gctcgcccaa cagaggccga ctgcctcat ccgtcataac  
 1101 gaacgctgtg taaagcggag tgggggggaa agtgtggatt gtggagagta  
 1151 tgcgatagtg ttgaggctga tcagacggcg aatcgggcca gatatgacca  
 1201 gtttagaggc ctcaattgac tataatttac ataaattaga taaatagaga  
 1251 tgaacgatg caataattgc agcaaatatt gatgaagcga gaggtaggac  
 1301 gatgaaggac tgtgagcagt tcaaggatc agcagagtca agggcctgat  
 1351 gcaatggcgg tgatccgtga tcagcgaacg gaaggggcgc taactctgtt  
 1401 tctttacca tgatcggaag ctctgctgg cggacttatg agtcattcac  
 1451 gaatcatttc tcagttattt gtggatgccc tcgttctgtc cacaatttct  
 1501 ttccgcecca agtcttttaa gttcttaac atctatattc ttgcacttcc  
 1551 aatggcatcc ctctgctccg tactcaagag ccagagcttg cgacacaccg  
 1601 tgcgatccta ctctcgcaa accatgcctc ccgcctcacc ctttgcctcc  
 1651 cgccacttcc tctccattgc ggacctctcg cctccgagt tcgcaaccct  
 1701 tgttcgcaat gctcctcac aaaaacgggc tatcaagtcg gggcgaatgc  
 1751 cccaaaactt gcagggatca ctcttgga aaactgtgac catgatcttc  
 1801 agcaaacgaa gcacaggac aagggtatct acagaagggg ccgttgtgca  
 1851 gatgggaggc catccgatgt tcttgggcaa ggatgatac caactagggtg  
 1901 tcaacgagtc cctatacga accctcggtg tcaattcgtc catggtatcc  
 1951 tgcattgtag cccgtgtcgg taaacatgca gaggtcgcag atctggcgaa

2001 gcactcttcg gtccagtc tcaatgcttt gtgtgactct ttccaccctc  
 2051 tccaagccgt ggccgatttc cagaccatct atgaagcatt ccccccaag  
 2101 gcgcaccacc ttcaagtct aggggttgaa ggattgaaga tcgcttgggt  
 2151 ggggtgacgc aacaacgtcc tgttcgatat ggccattgct gctacaaaaa  
 2201 tgggtgtcga caitgctgtc gctactccca aggggtacga aatccctcct  
 2251 cacatgctgg agctcatcaa gtctgctgga gaggggtgtct cgaaaccagg  
 2301 aaagcttctg caaaccaata ttcccgaaga agcgggtcaag gacgccgata  
 2351 ttctggtcac agacacctgg gtctctatgg gccaaagga agagaaggct  
 2401 cagaggctga aggagttaga tggtttccaa atcactgctg aactcgccaa  
 2451 gcgaggagga gctaaggagg gctggaagt catgcactgt ctcccgcgac  
 2501 accctgagga ggtcagcgac gaggtttct acagcaaccg gtcactgtc  
 2551 ttccctgagg ctgagaaccg gttatgggct gcgatttccg ccttgagggg  
 2601 ttctgtgtc aataaggga aaattgaata aatataacca ggcttccatt  
 2651 taaatatata gaggctggcg ttatcaact gatgagtga cgggtatgag  
 2701 atcatccgt ccctaaatat atttactcg atcacgtaaa agcctgttag  
 2751 tagaagcatt ttccaatta tctgaccaa ttcttctag catatatcaa  
 2801 ataactaatt gacatgttct ctgcttct tatattact agagtattgg  
 2851 aaatggggca aatcgaccc ggtgacttcc acatgtcacg aatcgaggat  
 2901 cgtcctagcc aaggtagatc caggcctaac acacccaac cctcgactct  
 2951 cctcattcca tactttgac ctctatccag cacattctc tgaggtttcg  
 3001 caatggctgt aggtcgacgc tctccctat gcgactcctg cattaggaag  
 3051 cagcccagta gtaggttag gccgttagc accgccgccg caaggaaatg  
 3101 tgcagtcaag gagatggcgc ccaacagtc cccggccacg gggcctgcca  
 3151 ccataccac gccgaaacaa gcgctcatga gccgaagtg gcgagccga  
 3201 tcttcccat cggtagtgc ggcgatatag gcgcagcaa ccgcacctgt  
 3251 ggcgccgggt atgcggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atcgtcgacg  
 3301 atccccagct tatttttgt atactgttt gtgatagcac gaagttttc  
 3351 cacgggtatc tgttaaaat atatattgt ggcgggctta cctacatcaa  
 3401 attaataaga gactaattat aaactaaca cacaagcaag ctactttagg  
 3451 gtaaaagtgt ataatgctt ttgacgtata aacgttgctt gtatttatta  
 3501 ttacaattaa aggtggatag aaaacctaga gactagttag aaactaatct  
 3551 cagggttgcg ttaactaaa tcagagcccg agaggtaac agaacctaga  
 3601 aggggactag atatccgggt agggaaacaa aaaaaaaaa caagacagcc  
 3651 acataatagg gagactagt agaagctagt tccaggacta ggaaaataaa  
 3701 agacaatgat accacagtct agtlgacaac tagatagatt ctagattgag

3751 gccaaagtct ctgagatcca ggtagttgc aactaatact agttagtata  
 3801 tagtctccta taactctgaa gctagaataa ettactacta ttatcctcac  
 3851 cactgttcag ctgcgcaaac ggagtgattg caaggtgttc agagactagt  
 3901 tattgactag tcagtgacta gcaataacta acaaggtatt aacctaccat  
 3951 gtctgccatc acctgcact tcctcgggct cagcagcctt ttctcctca  
 4001 tttcatgct catttctct gttaagact gtgactagtc aaagactagt  
 4051 ccagaaccac aaaggagaaa tgtcttacca ctttctcat tgcttgctc  
 4101 ttttgactta tccatgtctg caactagtta gactctagt agtgactagt  
 4151 ccgacgagga ctgcttgctc tcggattgt tggaggaact ctccagggcc  
 4201 tcaagatcca caacagagcc ttctagaaga ctggtcaata actagttggt  
 4251 ctttgtctga gtctgactta cgaggttgca tactcgctcc cttgcctcg  
 4301 tcaatcgatg agaaaaagcg ccaaaactcg caatatggct ttgaaccaca  
 4351 cgggtgctgag actagftaga atctagtccc aaactagctt ggatagctta  
 4401 cctttgccct ttgcgttgcg acaggtcttg cagggtatgg ttctttctc  
 4451 accagctgat ttagctgcct tgctaccctc acggcggatc tgccataaag  
 4501 agtggctaga ggtataaat tagcactgat cctaggtacg gggctgaatg  
 4551 taactgcct ttctttctc atcgcgcggc aagacaggct tgctcaaatt  
 4601 cctaccagtc acaggggtat gcacggcgta cggaccactt gaactagtca  
 4651 cagattagt agcaactagt ctgattgaa tggctgtact tacgggcct  
 4701 cgccattgct ctgacattt ccagcttcc cctcgttct gcaaagtagt  
 4751 tagtgactag tcaaggacta gttgaaatgg gagaagaaac tcacgaattc  
 4801 tcgactccct tagtattgtg gtcttggac ttggtgctgc tatatattag  
 4851 ctaataact agttagactc acagaaact acgcagctcg cttgccttc  
 4901 ttggtaggag tcgggggttg gagaacagt ccttcaaca agccttcata  
 4951 ccatgctact tgactagtca gggactagtc accaagtaat ctagatagga  
 5001 cttgcctttg gctccatca gttcctcat agtgggagga ccattgtgca  
 5051 atgtaaactc catgccgtgg gagttctgt ccttcaagt ctgaccaat  
 5101 atgtttctgt tggcagaggg aacctgtcaa ctagttaata actagtcaga  
 5151 aactatgata gcagtagact cactgtacgc ttgaggcacc cttcactcg  
 5201 gcagtagact tcatatggat ggatatcagg cacgccattg tcgtctgtg  
 5251 gactagtcag taactaggct taaagctagt cgggtcggct tactatctg  
 5301 aaatccggca gcgtaagctc cccgtccta actgctcga gatagtgaca  
 5351 gtactctggg gacttccga gatcgttat gttatcgca atgctcgca  
 5401 tactaactgt tgactagtct tggactagtc ccgagcaaaa aggattggag  
 5451 gaggaggagg aaggtgagag tgagacaaag agcgaaataa gagcttcaaa

5501 ggctatctct aagcagtatg aaggtaaagt atctagtctc tgactagatt  
 5551 taaagagatt tcgactagtt atgtacctgg agtttgata taggaatgtg  
 5601 ttgtggaac gaaatgtaag ggggaggaaa gaaaaagtcg tcaagaggta  
 5651 actctaagtc ggccattcct tttgggagg cgctaaccat aaacggcatg  
 5701 gtcgacttag agttagctca gggaaattag ggagttaact gcgaccaccg  
 5751 aggaacggcg gaatgcaaaa gaatcccgat ggagctctag ctggcggttg  
 5801 acaacccac ctttggcgt ttctgcggcg ttgcaggcgg gactggatac  
 5851 ttcgtagaac cagaaaggca aggcagaacg cgctcagcaa gagtgttga  
 5901 agtgatagca tgatgtcct tgttaactag gtaccaatct gcagtatgct  
 5951 tgatgttacc caaagtgtga gagaggaagg tccaaacata cacgattggg  
 6001 agagggccta ggtataagag ttttgagta gaacgcatgt gagcccagcc  
 6051 atctcgagga gattaacac gggccggcat ttgatggcta tgttagtacc  
 6101 ccaatggaaa cggtagaggt ccagtggcgc cagataactc cctaaattcc  
 6151 ctgagctaac tctaagtcga ccataccgtt tatggttagc gcctccaaa  
 6201 aaggaatggc cgacttagag ttacctttg acgactttt ctttctccc  
 6251 ccttacattt cgttaccaca acacattcct ataccaaaac tccaggtaca  
 6301 taactagtgc aaatctctt aaatctagtc aagaactaga tacttaacct  
 6351 tcatactgct tagagatagc cttgaagct ctatttcgc tcttctc  
 6401 actctcaact tctctcctc cctccaatcc ttttgctgc ggactagtcc  
 6451 aagactagtc aacagttagt atgccgagca ttccgataa cgataacgat  
 6501 ctccgaaagt cccagagta ctgtactat ctcgaggcag ttaaggacgg  
 6551 ggagcttacg ctgccggatt tcaagatagt aagccgacc gactagcttt  
 6601 aagcctagtt actgactagt ccacaggacg acaatggcgt gcctgatata  
 6651 catccatatg aagtctactg ccgagtgaag ggatgcctca agcgtacagt  
 6701 gagtctactg ctatcatagt ttctgactag ttattaacta gttgacaggt  
 6751 tccctctgcc aacagaaaca tattggtcaa gcactgaag gacaagaact  
 6801 cccacggcat ggagtttaca ttgcacaatg gtctccac tatgaaggaa  
 6851 ctgatggagg ccaaggcaa gtcctatcta gattacttg tgactagtcc  
 6901 ctgactagtc aagtagcatg gtatgaaggc ttgttgaag gcactgttct  
 6951 cccaaccccg actcctacca agaagcgcaa gcgagctgcg taagttctg  
 7001 tgagtctaac tagtgtatta gctaatalat agcagacca agtccaagga  
 7051 ccacaatact aaggagtcg agaattcgtg agtttctct ccaatttcaa  
 7101 ctagtcttg actagtcact aactacttg cagcaacgag ggtgaagctg  
 7151 gaaatgatca ggacaatggc gagggcccgt aagtacagcc attcaatgca  
 7201 gactagttgc taactaatct gtgactagtt caagtgggcc gtacgccgtg



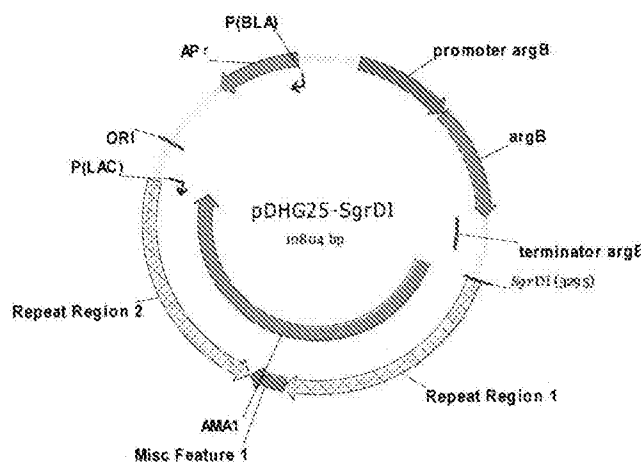
7251 cataccctg tgactgtag gaattgagc aagcctgtct tgccgcgca  
 7301 tgagaaagga aaggcaagt acattcagcc cegtacntag gatcagtgt  
 7351 aatttataac ctctagccac tctttatggc agatccgccg tgagggtagc  
 7401 aaggcagcta aatcagctgg tgagaaagga accataccct gcaagacctg  
 7451 tcgcaacgca aagggaag gtaagctatc caagctagt ttggactaga  
 7501 ttctaactag tctcagcacc gtgtgttca aagccatatt gcgagtttg  
 7551 gcgcttttc tcatcgattg acgaggcaaa gggagcgagt atgcaacctc  
 7601 gtaagtcaga ctacagacaa gaccaactag ttattgacca gtcttctaga  
 7651 aggtctgtt gtggacttg aggcctgga gagttctcc aacaatccgg  
 7701 agacaagcaa gtcctcgtc gactagtcac taactagact ctaactagt  
 7751 gcagacatgg ataatgcaaa agagacaagc aatgaagaaa gtggaagac  
 7801 atttctctt tgtggtctg gactagtct ttactagta cagtctaaa  
 7851 caagaaaat gagcatgaaa atgaggagga aaaggctgt gagcccagg  
 7901 aagtgcaggg tgatggcaga catggtaggt taatacctt ttagtattg  
 7951 ctagtactg actagtcaat aactagtct tgaacacct gcaatcactc  
 8001 cgtttgcga gctgaacagt ggtgaggata atagtagtaa gttattctag  
 8051 cttagaggt ataggagact agatactaac tagtattagt tgcaactaac  
 8101 ctggtatca gagactttg cctcaatcta gaatctatct agttgtcaac  
 8151 tagactgtg tatcattgtc tttatttc ctactctgg aactagctc  
 8201 taactagtct ccctaatag ttgctgtct tttttttt ttgtttcc  
 8251 taccggata tctagctccc tttaggttc tgtaacctc tcgggctctg  
 8301 atttagtta acgcaaacct gagattagt tctaactagt cttaggtt  
 8351 tctatccacc tttaattga ataataata caagcaact ttatagtc  
 8401 aaagcatta taaacttta ccctaaagta gcttctgt gtgttagt  
 8451 tataattagt ctctattaa ttgatgtg gtaagccgc cacaatat  
 8501 ttttttaac aagataccgt ggaaaaact cgtgctatc caaacagta  
 8551 tacaaaaat aagctgggaa ttcgtaatca tggcatagc tgttctgt  
 8601 gtgaaattg tatccgctc caattccac caacatacg gccggaagca  
 8651 taaagttaa agcctgggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt  
 8701 gcgttgctc cactgcccgc ttccagtcg gaaacctgt cgtgccagct  
 8751 gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggttg cgtattgggc  
 8801 gctttccgc ttctcgtc actgactgc tgcgtcgtt cgttcgctg  
 8851 cggcgagcgg tatcagctc ctcaaaggc gtaatacgt tatccacaga  
 8901 atcaggggat aacgcaggaa agaactgt agcaaaagg cagcaaaagg  
 8951 ccaggaaccg taaaaggcc gcgttctg cgttttcca taggctccgc

9001 cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa  
 9051 cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg  
 9101 tgcgctctcc tgtccgacc ctgccgctta ccggatacct gtcgccttt  
 9151 ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct  
 9201 cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc  
 9251 ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc  
 9301 aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag  
 9351 gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgtg  
 9401 ggctaacta cggtacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg  
 9451 ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa  
 9501 acaaaccacc gctggtagcg gtggttttt ttttgcaag cagcagatta  
 9551 cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg  
 9601 tctgacgctc agtggaaacg aaactcacgt taagggattt tggcatgag  
 9651 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt  
 9701 ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttacca  
 9751 tgcctaatca gtgagcacc tatctcagcg atctgtctat ttcttcac  
 9801 catagttgcc tgactcccc tegtgtagat aactacgata cgggaggggt  
 9851 taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctaccg  
 9901 gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag  
 9951 aagtggtcct gcaactttat ccgctccat ccagtctatt aattgttgc  
 10001 gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt  
 10051 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc  
 10101 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt  
 10151 tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgcagaagt  
 10201 aagttggccg cagtgttate actcatggtt atggcagcac tgcataattc  
 10251 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact  
 10301 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc  
 10351 ccggcgctca tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt  
 10401 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac  
 10451 cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct  
 10501 tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagcag aaacaggaag  
 10551 gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac  
 10601 tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt  
 10651 ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg  
 10701 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca

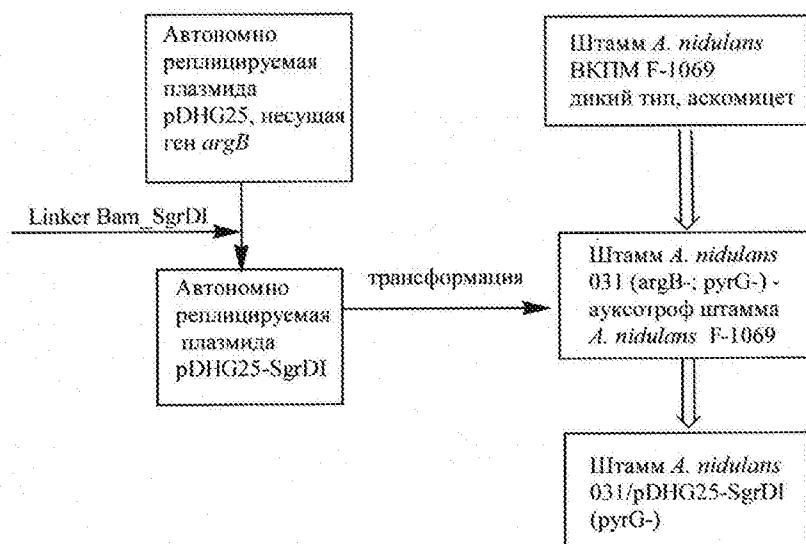
10751 ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccctt

10801 cgtc

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

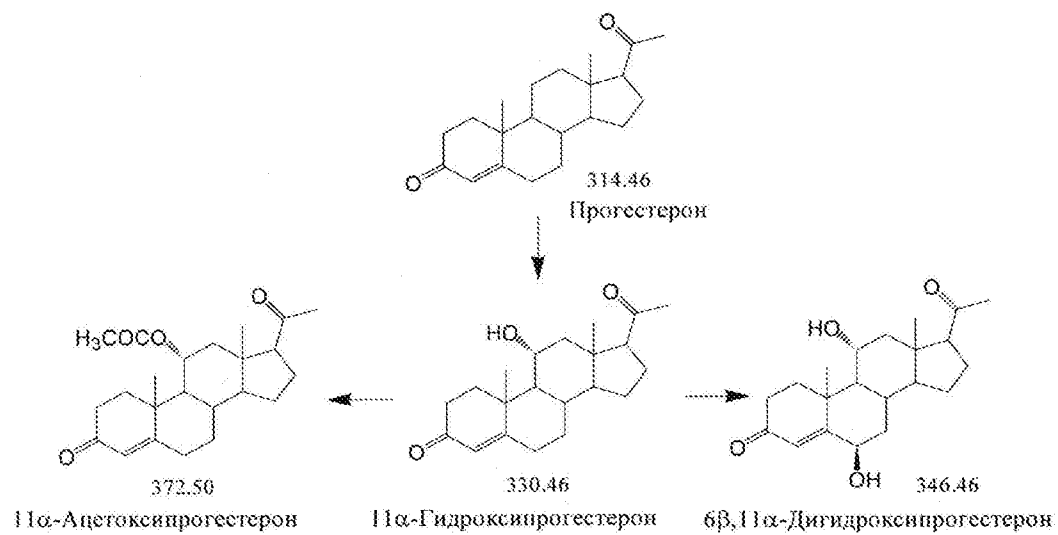


Фиг. 1



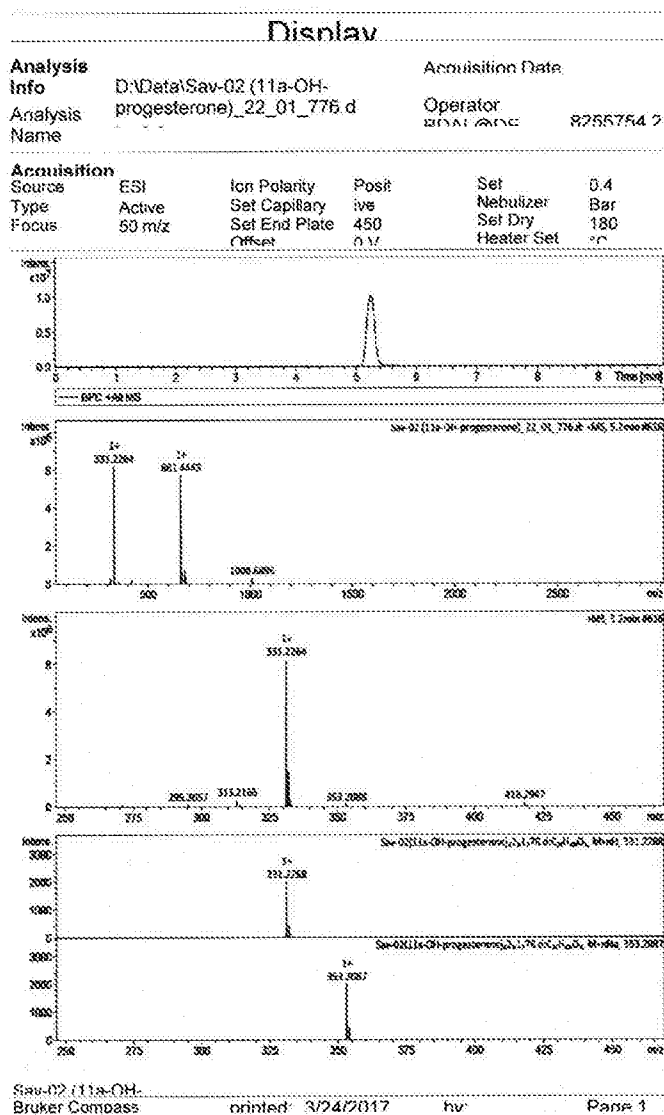
Фиг. 2

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА



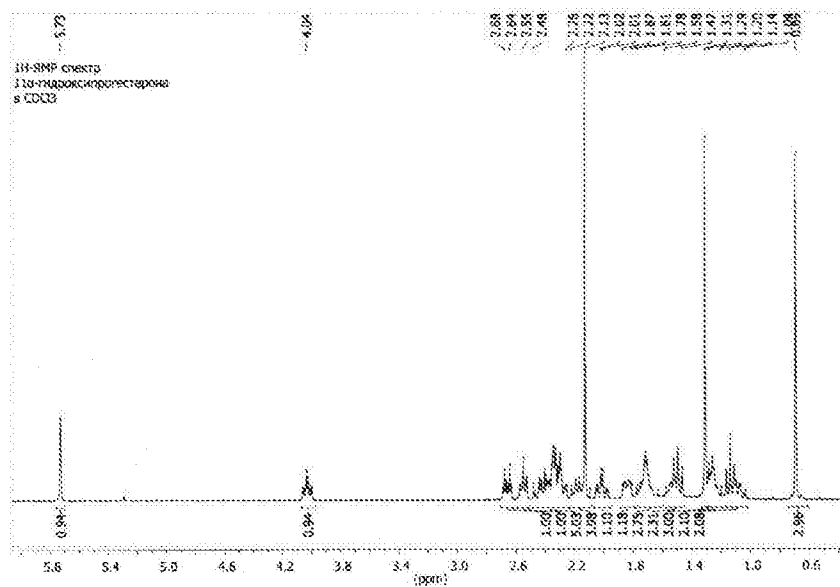
Фиг. 3

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS  
NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА**

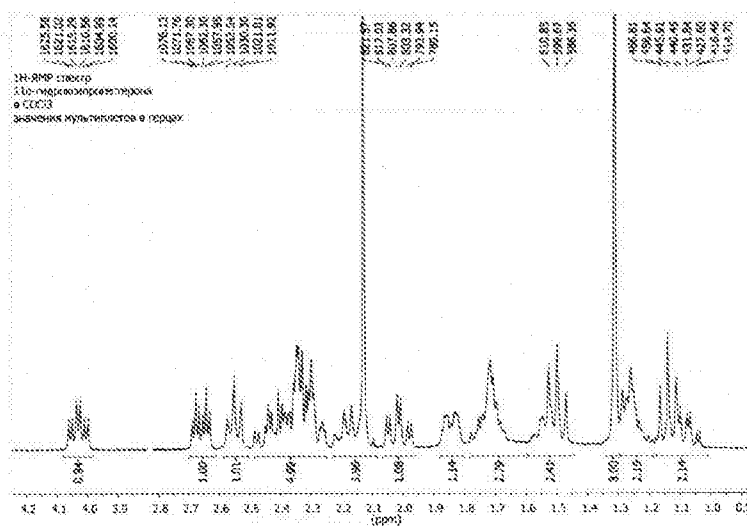


Фиг. 4

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

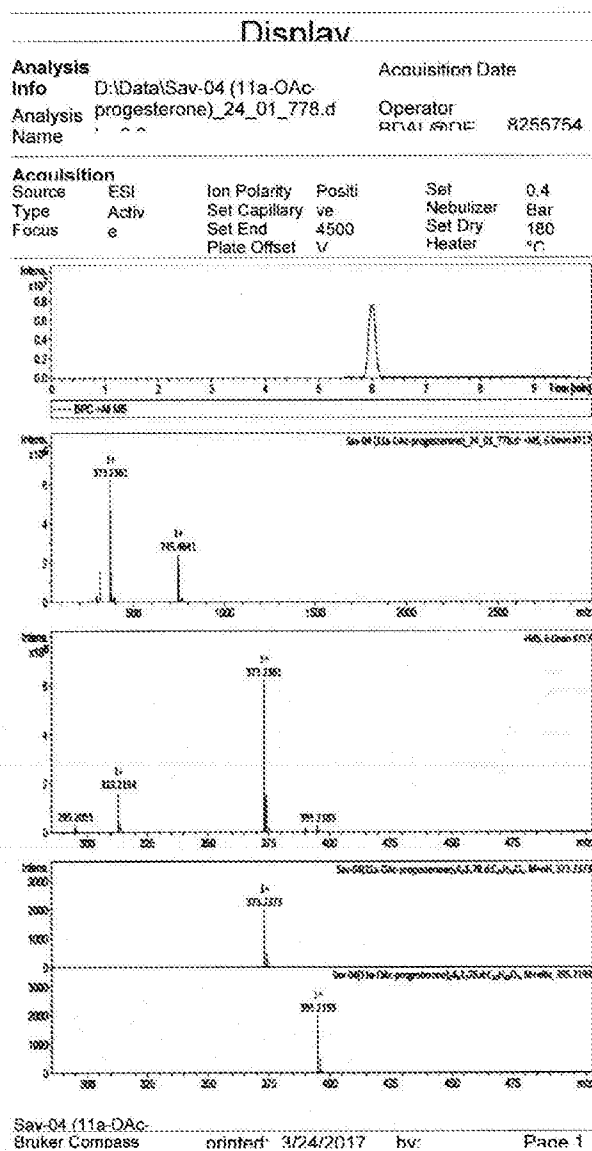


Фиг. 5



Фиг. 6

**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS  
NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА**



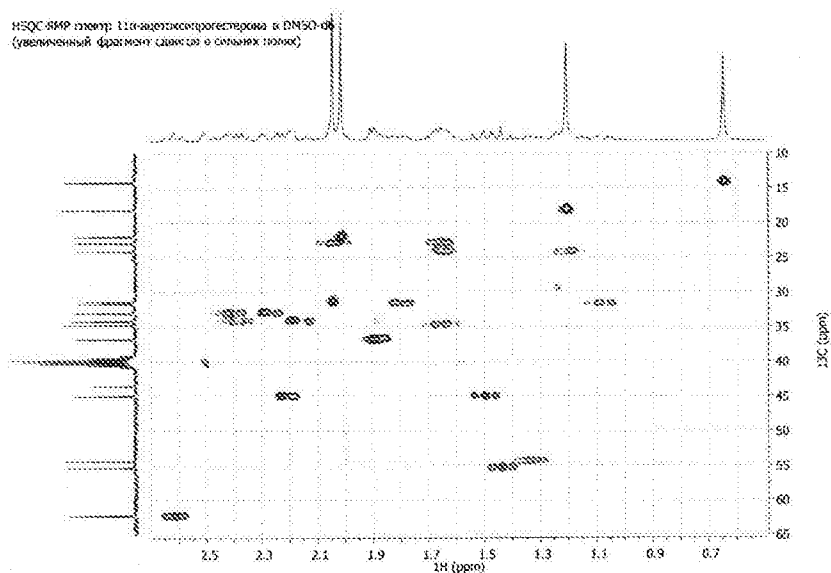
Фиг. 7



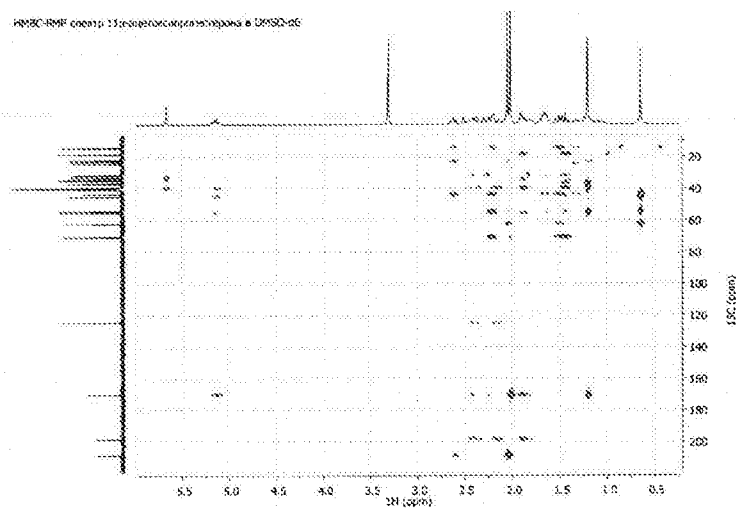




РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

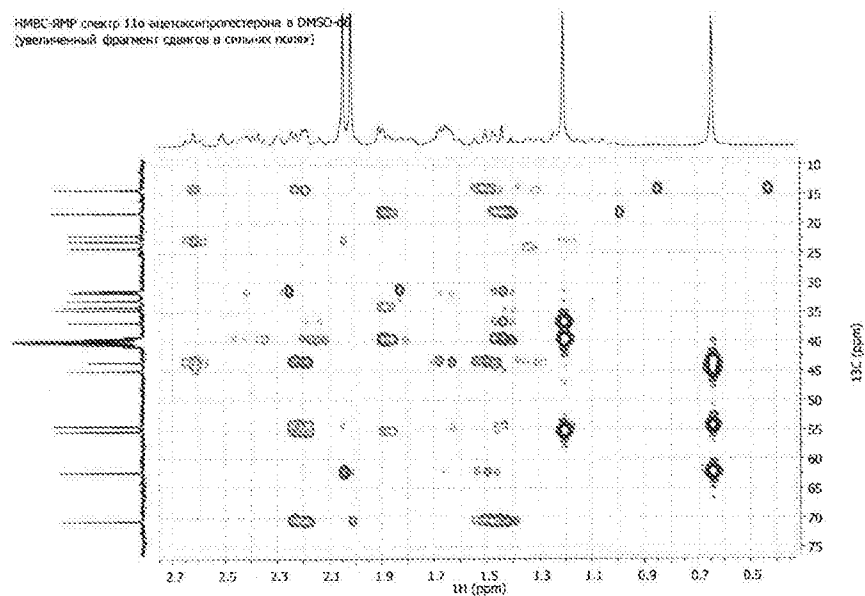


Фиг. 12



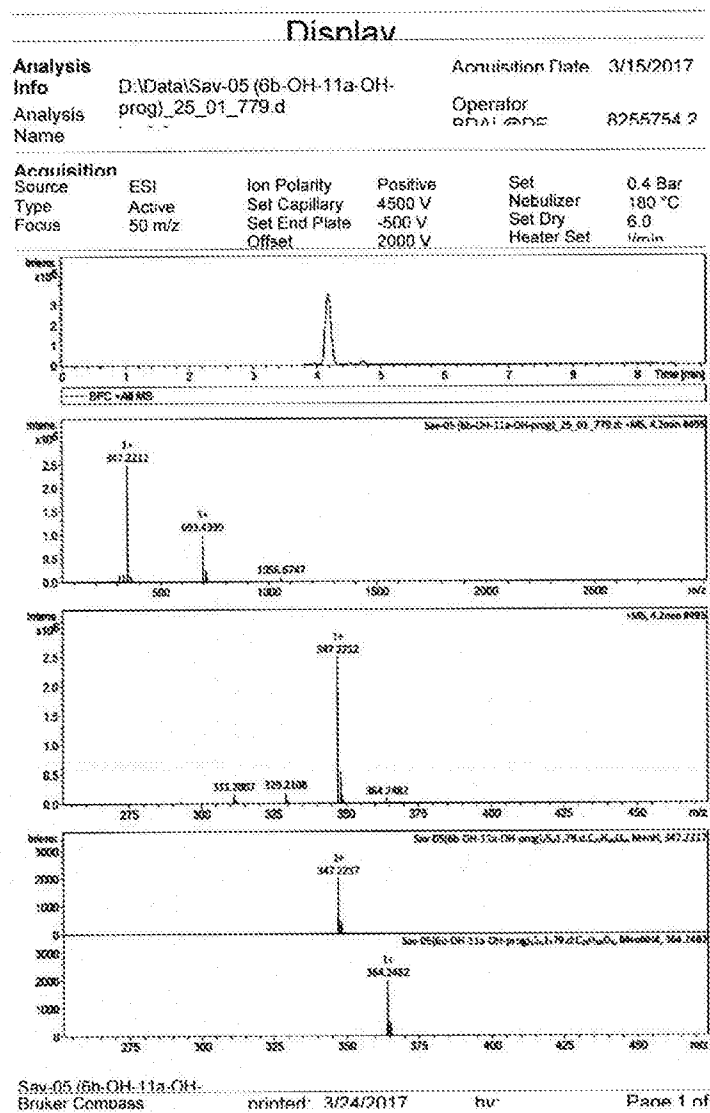
Фиг. 13

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

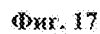


Фиг. 14

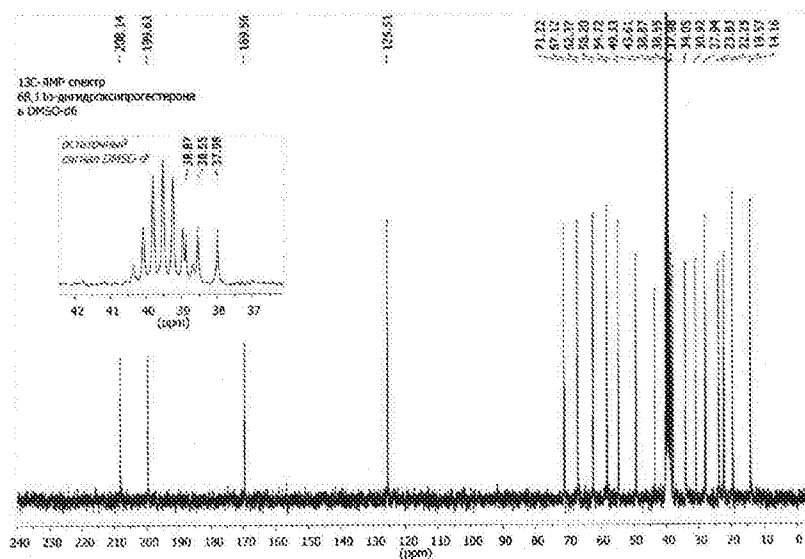
**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS  
NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА**



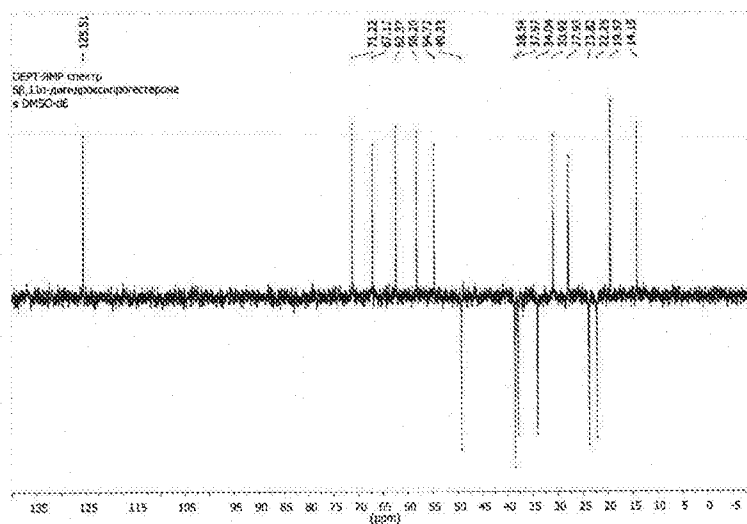
Фиг. 15



РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА



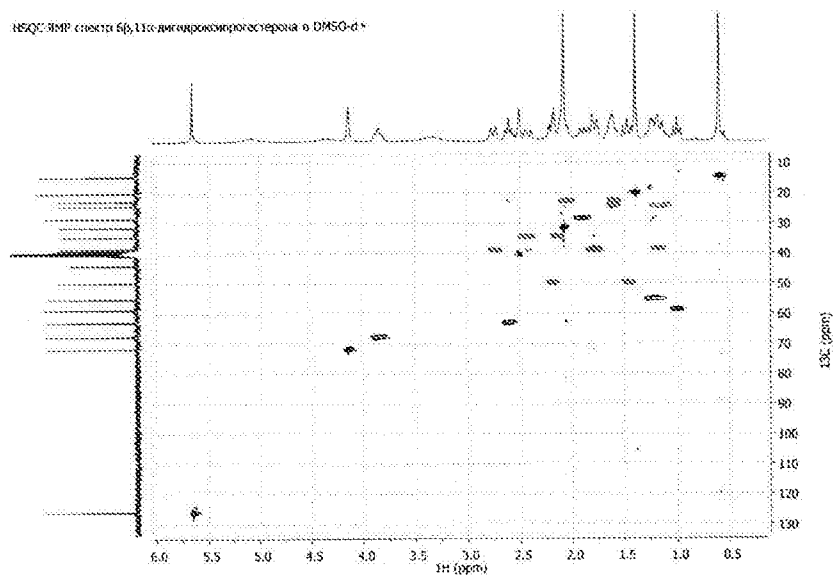
Фиг. 18



Фиг. 19

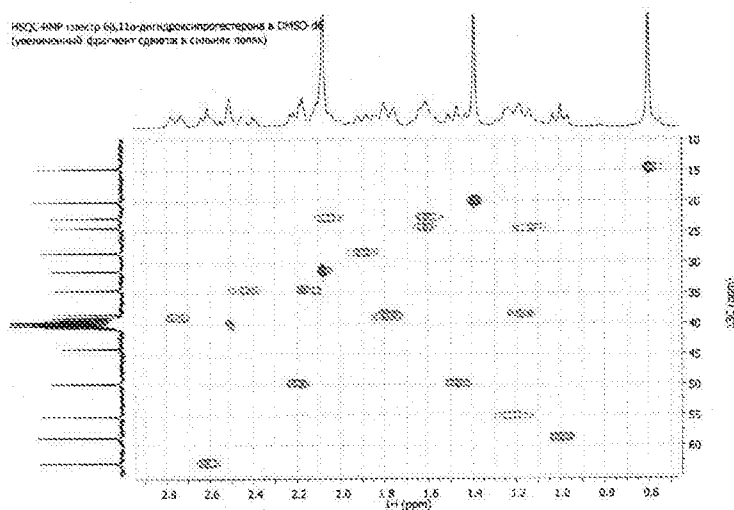
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

HSQC-4MP спектр 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерона в DMSO-d<sub>6</sub>



Фиг. 20

HSQC-4MP спектр 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидроксипрогестерона в DMSO-d<sub>6</sub>  
(усиленный) (фрагмент (фрагмент) в сильном поле)

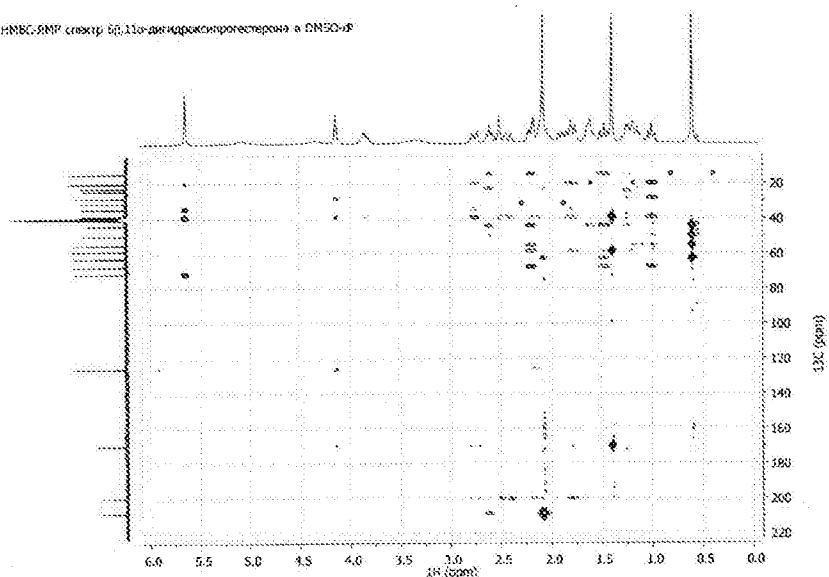


Фиг. 21



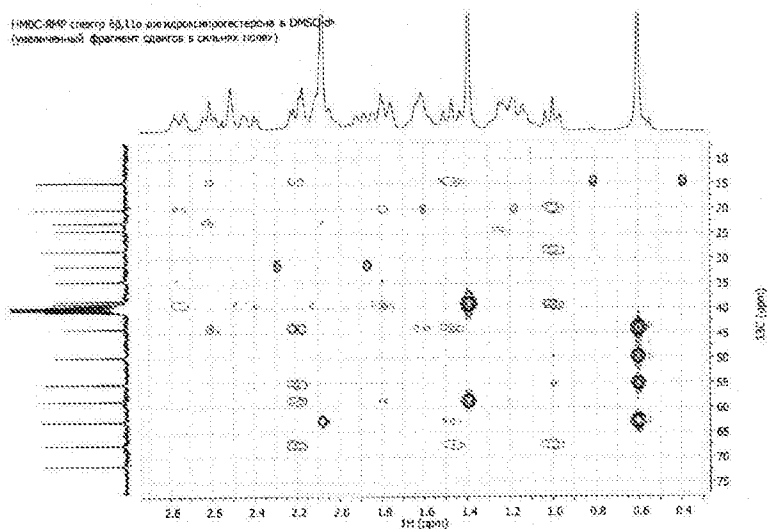
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ  
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА  
И ДЛЯ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ 11 $\alpha$ -  
ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

ЯМРС-ЯМР спектр 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-прогестерона в DMSO-d<sub>6</sub>



Фиг. 22

ЯМРС-ЯМР спектр 6 $\beta$ ,11 $\alpha$ -дигидрокси-прогестерона в DMSO-d<sub>6</sub>  
(увеличенный фрагмент данных в области 1.0-2.0 ppm)



Фиг. 23