



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106479990 B

(45)授权公告日 2020.09.18

(21)申请号 201610911937.3

(22)申请日 2012.11.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106479990 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(30)优先权数据
61/561,665 2011.11.18 US

(62)分案原申请数据
201280067329.9 2012.11.14

(73)专利权人 科德克希思公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 法比安·卡比罗尔 陈海滨
阿努潘·苟呵尔
史蒂文·J·科利尔
德里克·史密斯
波吉特·科斯耶克 雅各布·杰恩

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 9/04(2006.01)
C12N 15/53(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12P 41/00(2006.01)
C12P 13/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 2009046153 A4,2009.06.25
WO 2010025085 A2,2010.03.04
WO 2010025238 A2,2010.03.04

审查员 田颖

权利要求书8页 说明书76页
序列表132页

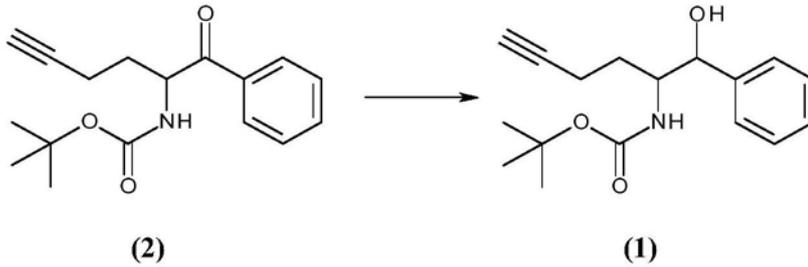
(54)发明名称

用于制备羟基取代的氨基甲酸酯的生物催化剂

(57)摘要

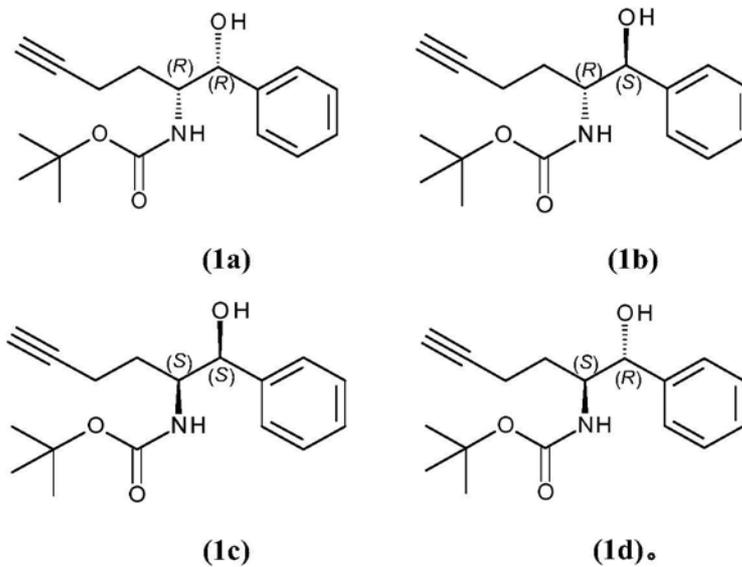
本申请涉及用于制备羟基取代的氨基甲酸酯的生物催化剂。本公开内容涉及用于制备羟基取代的氨基甲酸酯化合物的工程化酮还原酶多肽、和多核苷酸、载体、宿主细胞,以及制备和使用该酮还原酶多肽的方法。

1. 一种工程化酮还原酶多肽, 所述工程化酮还原酶多肽能够将底物化合物 (2), (1-氧代-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯, 转化为产物化合物 (1), (1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯,



所述工程化酮还原酶多肽的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 28、30、34、36、38、42、82、86、92、106、110、114、116、118、120、122、124、126、130、132、134、144、146、150、162、164、166、170 和 172。

2. 如权利要求 1 所述的工程化酮还原酶多肽, 所述工程化酮还原酶多肽能够形成非对映体过量于反式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯化合物 (1b) 和 (1d) 的产物顺式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯化合物 (1a) 和 (1c)



3. 如权利要求 1 所述的工程化酮还原酶多肽, 所述工程化酮还原酶多肽能够以相比于化合物 (1b) 和 (1d) 的至少 50% 的非对映体比形成产物化合物 (1a) 和 (1c)。

4. 如权利要求 1 所述的工程化酮还原酶多肽, 其中所述工程化酮还原酶多肽的氨基酸序列是选自由以下组成的组的序列: SEQ ID NO: 28、30、34、36、38、42、82、86、92、106、110、114、116、118、120、122、124、126、130、132、134、144、146、150、162、164、166、170 和 172。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的工程化酮还原酶多肽, 其中所述工程化酮还原酶多肽固定在固体支持物上。

6. 一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码如权利要求 1 至 4 中任一项所述的工程化酮还原酶多肽。

7. 如权利要求 6 所述的多核苷酸, 所述多核苷酸是选自由以下组成的组的核苷酸序列: 27、29、33、35、37、41、81、85、91、105、109、113、115、117、119、121、123、125、129、131、133、

143、145、149、161、163、165、169和171。

8. 一种表达载体,所述表达载体包含如权利要求6所述的多核苷酸。

9. 如权利要求8所述的表达载体,所述表达载体包含控制序列。

10. 如权利要求9所述的表达载体,其中所述控制序列为启动子。

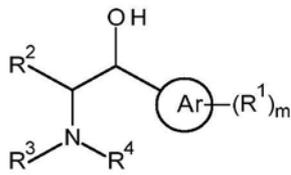
11. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包括如权利要求6所述的多核苷酸。

12. 如权利要求11所述的宿主细胞,所述宿主细胞为大肠杆菌(E.coli)。

13. 一种用于制备如权利要求1至4中任一项所述的工程化酮还原酶多肽的方法,包括在适合于表达所述工程化酮还原酶多肽的培养条件下培养权利要求11所述的宿主细胞。

14. 如权利要求13所述的方法,所述方法还包括分离所表达的工程化酮还原酶多肽。

15. 一种用于制备式(I)的产物化合物的方法



(I)

其中

Ar是5至7元碳环或杂环;

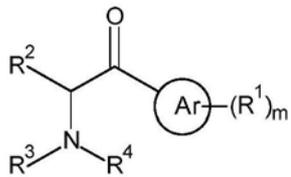
R¹的每次出现是H;

R²是炔基;

R³和R⁴,彼此独立地,选自H和烷氧基羰基,以及

m为0至10;

所述方法包括使式(II)的底物化合物,



(II)

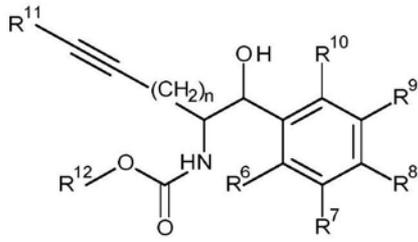
其中R¹、R²、R³、R⁴和m如以上定义,

在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求1至4中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

16. 如权利要求15所述的方法,其中Ar为5至7元芳基或杂芳基。

17. 如权利要求16所述的方法,其中Ar选自噻吩基、苯基和吡啶基。

18. 如权利要求15所述的方法,其中所述式(I)的产物化合物包括式(Ib)的产物化合物



(Ib)

其中

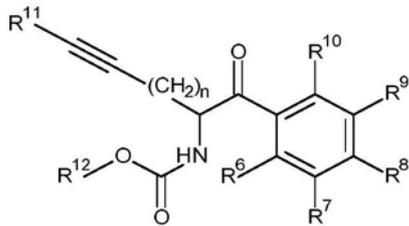
R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 各自独立地是H；

n 为1至4，

R^{11} 是H；以及

R^{12} 是烷基；

所述方法包括使式 (Ib) 的底物化合物



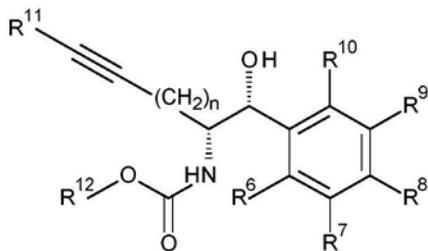
(IIb)

其中

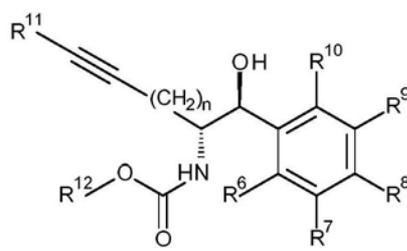
其中 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上定义，

在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求1至4中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

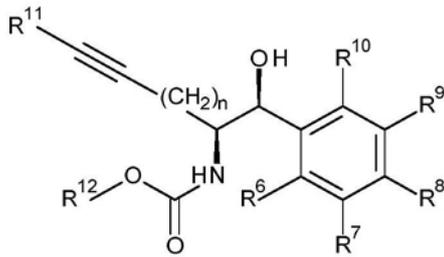
19. 如权利要求18所述的方法，其中所述式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物，并且所述方法形成非对映体过量于式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物，



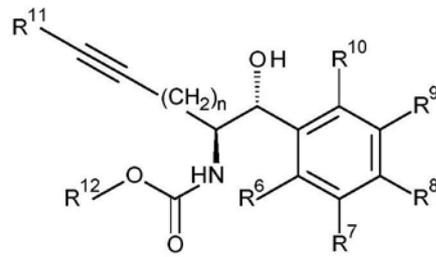
(Ib1)



(Ib2)



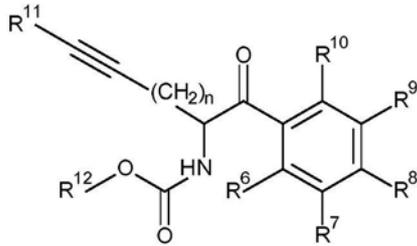
(Ib3)



(Ib4)

其中

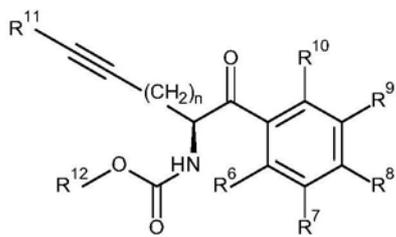
所述方法包括使式 (IIb) 的底物化合物



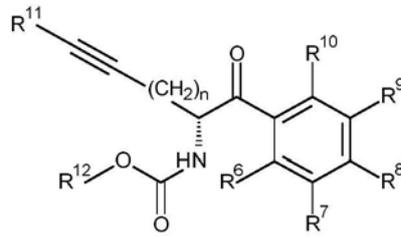
(IIb)

在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求2至3中任一项目的工程化酮还原酶多肽接触。

20. 如权利要求18至19中任一项所述的方法, 其中所述式 (IIb) 的底物化合物包括式 (IIb1) 和 (IIb2) 的化合物的混合物



(IIb1)

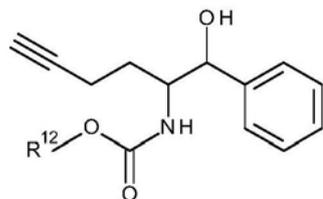


(IIb2)

21. 如权利要求20所述的方法, 其中所述混合物包括式 (IIb1) 和 (IIb2) 化合物的外消旋混合物。

22. 如权利要求18-19和21中任一项所述的方法, 其中n为2。

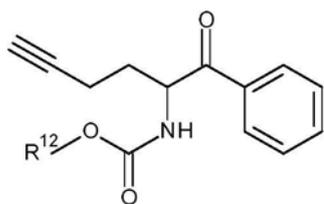
23. 如权利要求18所述的方法, 其中所述式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Id) 的化合物



(Id)

其中

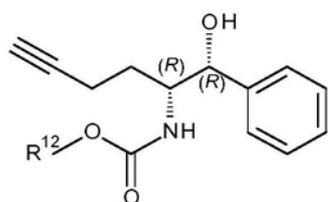
所述方法包括使式 (IId) 的底物化合物



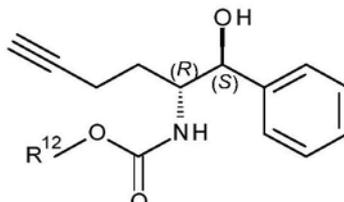
(II d)

在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求1至4中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

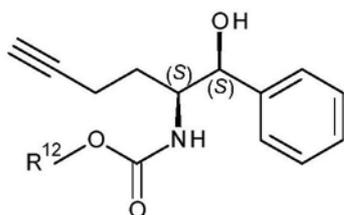
24. 如权利要求18所述的方法, 其中所述式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物, 并且所述方法形成非对映体过量于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物,



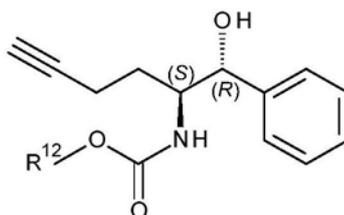
(Id1)



(Id2)



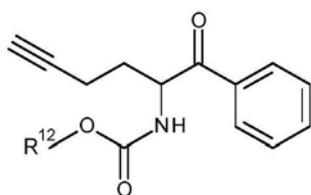
(Id3)



(Id4)

其中

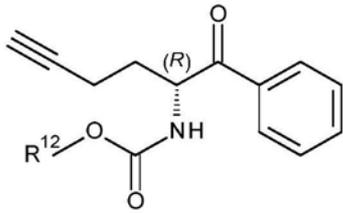
所述方法包括使式 (II d) 的底物化合物



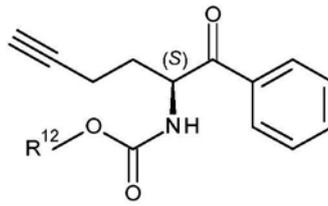
(II d)

在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求2至3中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

25. 如权利要求23或24所述的方法, 其中所述式 (II d) 的底物化合物包括式 (II d1) 和 (II d2) 的化合物的混合物



(IIId1)



(IIId2)

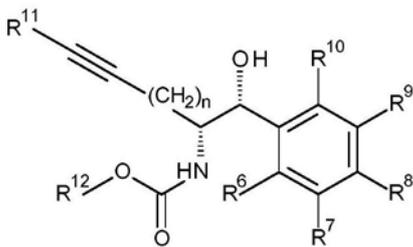
26. 如权利要求25所述的方法,其中所述混合物是式(IIId1)和(IIId2)的化合物的外消旋混合物。

27. 如权利要求18-19、21、23-24和26中任一项所述的方法,其中 R^{12} 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、和叔丁基。

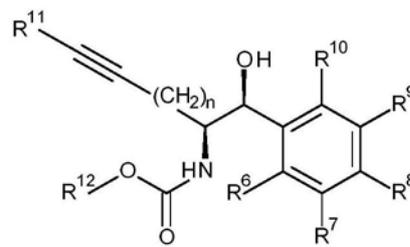
28. 如权利要求27所述的方法,其中 R^{12} 是叔丁基。

29. 如权利要求24所述的方法,其中以相比于式(Id2)和(Id4)的化合物的至少50%的非对映体比形成所述式(Id1)和(Id3)的产物化合物,所述方法包括使所述式(IIId)的底物化合物在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与权利要求3的工程化酮还原酶多肽接触。

30. 一种用于制备非对映体过量于式(Ib3)的化合物的式(Ib1)的产物化合物的方法,



(Ib1)



(Ib3)

其中,

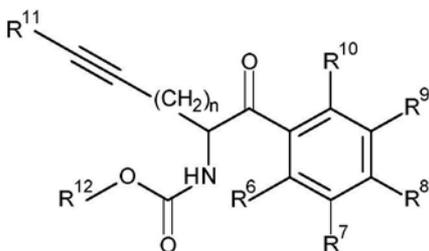
R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 各自独立地是H;

n 为1至4,

R^{11} 是H;以及

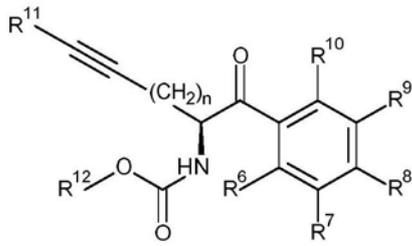
R^{12} 选自烷基;

所述方法包括使式(IIb)的底物化合物

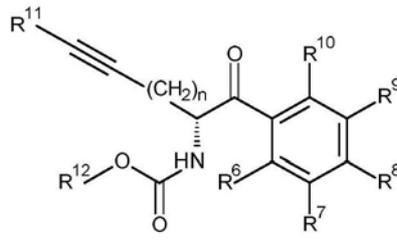


(IIb)

其中 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上定义,在用于平衡式(IIb1)和(IIb2)的底物化合物的适当的反应条件下在NADPH或NADH的存在下与权利要求2至3中任一项的工程化酮还原酶接触



(IIb1)



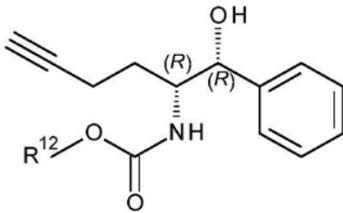
(IIb2)

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述底物化合物(IIb)包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的混合物。

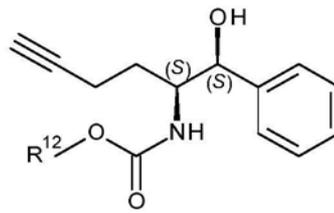
32. 如权利要求31所述的方法,其中所述混合物包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的外消旋混合物。

33. 如权利要求30至32中任一项所述的方法,其中n为2。

34. 如权利要求30所述的方法,其中所述式(Ib1)的产物化合物包括式(Id1)的化合物,并且形成非对映体过量于式(Id3)的化合物的式(Id1)的化合物,

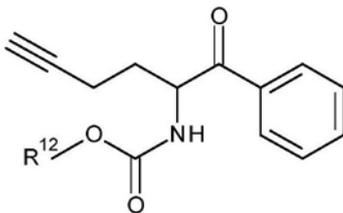


(Id1)



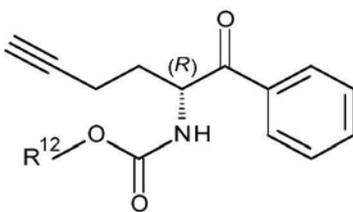
(Id3)

所述方法包括使式(IIId)的底物化合物

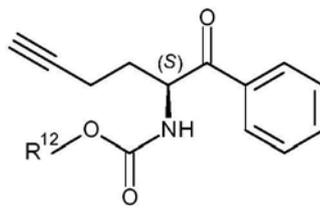


(IIId)

在用于平衡式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的适当的反应条件下在NADPH或NADH的存在下与权利要求2至3中任一项的工程化酮还原酶多肽接触



(IIId1)



(IIId2)

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述式(IIId)的化合物包括式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的混合物。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述混合物包括式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物

的外消旋混合物。

37. 如权利要求30-32和34-36中任一项所述的方法,其中用于平衡底物化合物的反应条件包括9至12的pH和45°C至60°C的温度。

38. 如权利要求34所述的方法,其中所述适当的反应条件包括以下底物化合物载量浓度:1g/L、10g/L、20g/L、40g/L、50g/L、75g/L、100g/L、125g/L、150g/L、175g/L、或200g/L。

39. 如权利要求34所述的方法,其中所述适当的反应条件包括以下工程化酮还原酶多肽浓度:20g/L、10g/L、5g/L、4g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.2g/L或0.1g/L。

40. 如权利要求15-19、21、23-24、26、28-32、34-36和38-39中任一项所述的方法,所述方法还包括用辅因子再生系统将NAD⁺或NADP⁺转化为NADH或NADPH。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述辅因子再生系统包括酮还原酶和仲醇。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述仲醇为异丙醇(IPA)。

43. 如权利要求42所述的方法,所述方法还包括除去由酮还原酶介导的将所述IPA至丙酮的转化形成的丙酮的步骤。

44. 如权利要求41所述的方法,其中所述辅因子再生系统的所述酮还原酶为权利要求1至4中任一项所述的工程化酮还原酶多肽。

45. 如权利要求41所述的方法,其中所述辅因子再生系统的所述酮还原酶为与权利要求1至4中任一项所述的工程化酮还原酶多肽不同的酮还原酶。

46. 如权利要求34所述的方法,其中所述反应条件包括共溶剂系统,所述共溶剂系统包括水性缓冲溶液和IPA,其中所述IPA浓度为5% (v/v)、10% (v/v)、20% (v/v)、30% (v/v)、40% (v/v)、45% (v/v)、50% (v/v)、55% (v/v)、60% (v/v)、65% (v/v)、70% (v/v)、75% (v/v)、80% (v/v)、85% (v/v)、或90% (v/v)。

47. 如权利要求15所述的方法,其中所述反应条件包括:

(a) 1g/L至10g/L的工程化酮还原酶多肽浓度;

(b) 50g/L至200g/L的载量浓度下的底物化合物;

(c) 0.1g/L至0.5g/L的NADPH浓度;

(d) 水性缓冲液和30%至70% (v/v) 的IPA的共溶剂溶液;以及

(e) 35°C至60°C的温度。

48. 如权利要求15-19、21、23-24、26、28-32、34-36、38-39和41-47中任一项所述的方法,所述方法还包括选自以下的一个或多个步骤:提取所述产物化合物;分离所述产物化合物;纯化所述产物化合物;和结晶所述产物化合物。

49. 如权利要求15-19、21、23-24、26、28-32、34-36、38-39和41-47中任一项所述的方法,其中所述式(II)的底物化合物是所述化合物的氘化形式。

用于制备羟基取代的氨基甲酸酯的生物催化剂

[0001] 本申请是申请日为2012年11月14日,申请号为201280067329.9,发明名称为“用于制备羟基取代的氨基甲酸酯的生物催化剂”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开内容涉及用于生产手性化合物的生物催化剂介导的方法和在该方法中使用的生物催化剂。

[0003] 参考序列表、表格或计算机程序

[0004] 序列表的正式复本作为ASCII格式化文本文件与说明书经EFS-Web同时被提交,文件名为“CX2-103W01_ST25.txt”,创建日期为2012年11月13日,且大小为290,640字节。相对于2011年11月18日随母案美国临时申请61/561,665提交的具有文件名“CX2-103USP1_ST25.txt”的序列表,该序列表仅有较少的格式更改。经EFS-Web提交的序列表为本说明书的一部分,并且据此通过引用整体并入本文。

背景技术

[0005] β -肾上腺素能受体为G蛋白偶联受体超家族的成员,并通过将 $G_{\alpha s}$ 的刺激与腺苷酸环化酶的激活偶联,介导对外部配体,特别是肾上腺素和去甲肾上腺素的响应,导致增加的细胞内第二信使cAMP。已知 β -肾上腺素能受体有三个亚型。 β_1 -受体主要表达于心脏、冠状动脉、肾、肌肉和中枢神经系统,并影响心脏刺激、冠状血管扩张以及结肠和食管的松弛。在 β_1 -受体中的多态性与几种形式的高血压和心脏衰竭相关并影响静息心率。 β_2 -肾上腺素能受体发现于肺、胃肠道、肝、子宫、血管平滑肌、心脏和骨骼肌中,在那里其部分地调节平滑肌松弛(例如,支气管扩张)。 β_3 -肾上腺素能受体主要表达于脂肪组织(棕色和白色)、膀胱、胆囊、结肠和心脏。

[0006] 各个肾上腺素能受体亚型的种间特异性表达存在差异,提示不同亚型在不同物种的相同组织中的作用。在人中, β_3 -肾上腺素能受体表达于膀胱逼尿肌,且 β_3 -肾上腺素能受体mRNA是遭受根治性膀胱切除术的患者中的主要mRNA。此外, β_1 和 β_2 选择性激动剂对逼尿肌功能无影响,而 β_3 -选择性激动剂产生浓度依赖性舒张(Igawa Y.等人,1999,Br J Pharmacol.126:819-25)。这些观察结果导致了开发 β_3 -肾上腺素能受体激动剂用于治疗各种形式的膀胱过度活动综合征(参见,例如,Igawa Y.等人,2010,Korean J Urol.51:811-818)。基于羟甲基吡咯烷的 β_3 -肾上腺素能受体特异性激动剂描述于W02009124167和W02009124166中。羟基吡咯烷药物的合成可使用具有结构(a)和(b)的中间体,其中Ar表示芳基基团,且 R^{10} 和 R^{11} 表示保护基团。

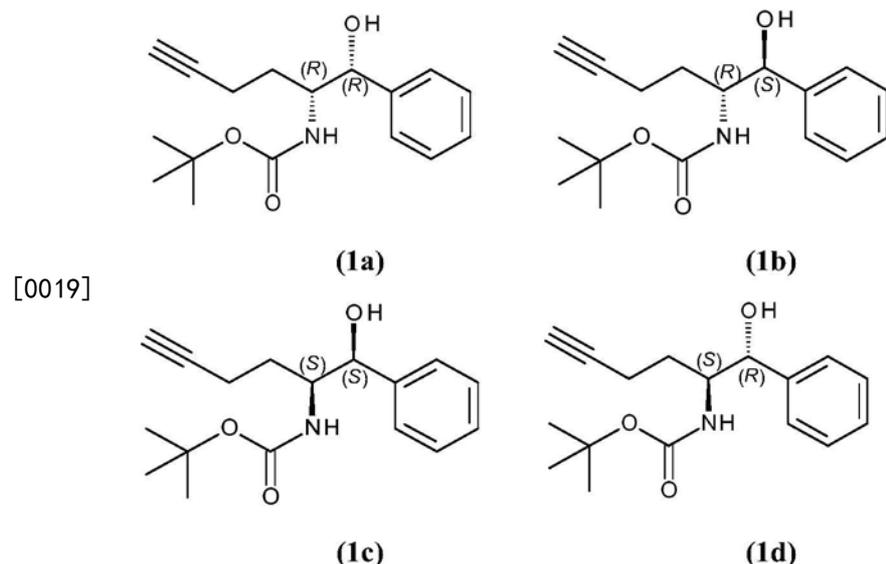
142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、168、170和172,以及与SEQ ID NO: 2或4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X40R; X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R; X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A; X195G;X196M;X198S;X199H;X206F;X206L;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F; X249G;和X249Y。如本文所提供,在一些实施方案中,公开的氨基酸差异可单独使用或以各种组合使用以产生具有改进的酶特性的工程化酮还原酶多肽。

[0015] 在一些实施方案中,酮还原酶多肽包括具有与SEQ ID NO:4的至少80%序列同一性和特征X40R和X206L或F的氨基酸序列,条件是当X206为F时,序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V; X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V; X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M; X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0016] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F或L,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的至少一个或多个残基差异的氨基酸序列:X17Q/R/M;X64V;X94P; X144V;X147Q/I/L;X157C;和X196M。

[0017] 在一些实施方案中,在将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)中具有改进特性的工程化酮还原酶多肽包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、 22、24、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、 74、76、78、80、82、84、86、88、96、98、102、104、106、108、110、114、116、122、124、126、128、 130、132、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、168、170和 172,以及特别是选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、 38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、 98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、 136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0018] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下形成非对映体 过量于(in diastereomeric excess of)化合物(1b)和(1d)的产物化合物(1a)和(1c)



[0020] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下形成非对映体过量于化合物(1c)的产物化合物(1a)。

[0021] 在一些实施方案中,能够形成非对映体过量于化合物(1b)和(1d)的产物化合物(1a)和(1c),或能够形成非对映体过量于化合物(1c)的产物化合物(1a)的工程化酮还原酶多肽包括,具有特征X40R和206F或L,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的至少一个或多个残基差异的氨基酸序列:X17Q;X64V;X71P;X87L;X147I;X157C;X196M;和X249F。

[0022] 展示相关立体选择性的示例性多肽可选自SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

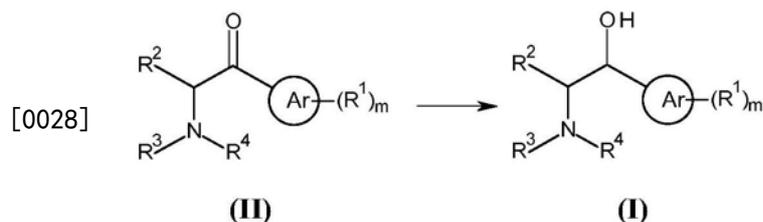
[0023] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶能够在适当的反应条件下形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的化合物(1b)和(1d)。在一些实施方案中,能够形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的化合物(1b)和(1d)的工程化酮还原酶包括具有特征X195G的氨基酸序列。展示该立体选择性的示例性多肽可选自SEQ ID NO:50和74的多肽。

[0024] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽被固定在固体支持物上。在一些实施方案中,固体支持物是包括具有环氧官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有氨基环氧官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有十八烷基官能团的苯乙烯/DVB共聚物或聚甲基丙烯酸酯的珠或树脂。

[0025] 在另一个方面,本公开内容提供了编码工程化酮还原酶的多核苷酸,以及包括该多核苷酸的表达载体,以及能够表达编码该多肽的多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中,本公开内容还提供了制备工程化酮还原酶多肽的方法。编码工程化酮还原酶的示例性多核苷酸序列包括以下的序列:SEQ ID NO:5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171,特别是以下的序列:SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171。

[0026] 在另一个方面,工程化酮还原酶多肽可在用于制备式(I)的羟基化合物的方法中被使用,式(I)的羟基化合物可用于合成药物化合物。因此,在一些实施方案中,工程化酮还原酶可用于将式(II)的底物化合物转化为式(I)的产物化合物,如方案2中所示

[0027] 方案2



[0029] 其中

[0030] Ar是5至7元碳环或杂环；

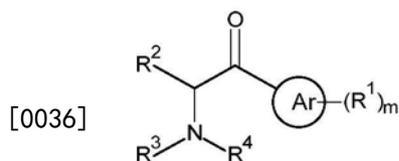
[0031] R^1 的每次出现独立地选自卤素、 $-\text{COOR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^c$ 、 $-\text{SO}_2$ 、 $-\text{SR}^d$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^e$ 、 $-\text{NR}^f\text{R}^g$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^h\text{R}^i$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，其中 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 和 R^i 独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；

[0032] R^2 选自任选地取代的烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、环烷基烯基、环烷基炔基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂环烷基烯基、杂环烷基炔基、芳基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、烷基硫代、烷基亚磺酰基和芳基亚磺酰基；

[0033] R^3 和 R^4 ，彼此独立地，选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、烷氧基羰基、芳基烷氧基羰基、杂芳基烷氧基羰基、和保护基团，或 R^3 和 R^4 中的一个与 R^2 形成任选地取代的5至7元杂环，以及

[0034] m为0至10。

[0035] 因此，用于制备式(I)的化合物的方法可包括使式(II)的化合物

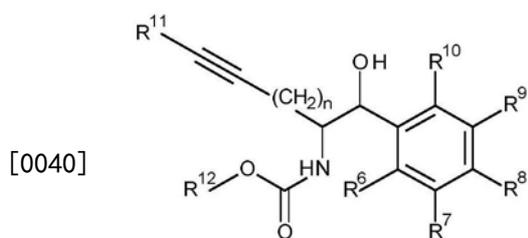


(II)

[0037] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和m如以上定义，

[0038] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与工程化酮还原酶多肽接触。

[0039] 在方法的一些实施方案中，式(I)化合物包括式(Ib)的化合物



(Ib)

[0041] 其中

[0042] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、和 R^{10} 各自独立地选自H、卤素、 $-\text{COOR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^b$ 、 $-\text{OR}^c$ 、 $-\text{SO}_2$ 、 $-\text{SR}^d$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^e$ 、 $-\text{NR}^f\text{R}^g$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^h\text{R}^i$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，其中 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 和 R^i 独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；

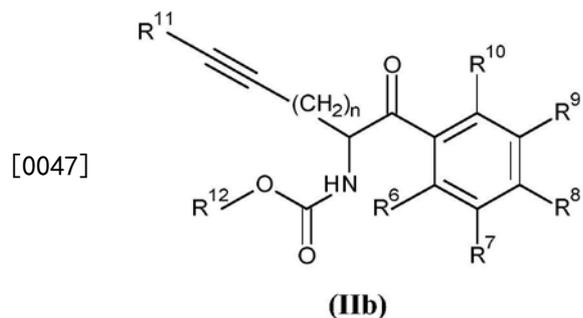
[0043] n为1至4，

[0044] R^{11} 选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳

基、和杂芳基烷基；以及

[0045] R^{12} 选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和保护基团。

[0046] 式 (Ib) 的化合物可通过使式 (IIb) 的底物化合物

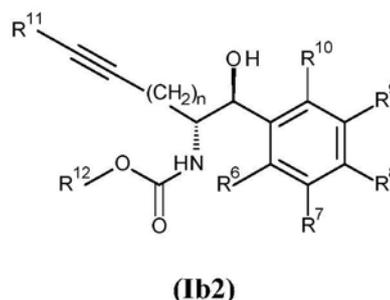
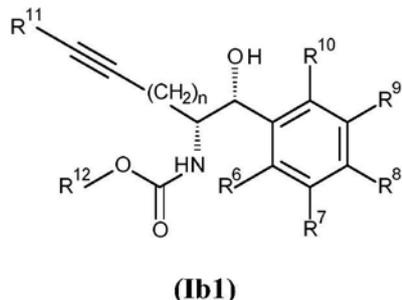


[0048] 其中

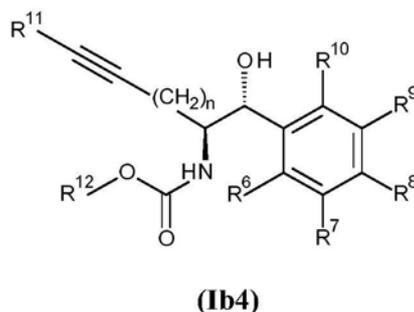
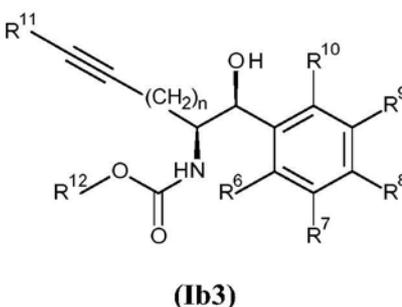
[0049] 其中 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上定义，

[0050] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与公开内容的工程化酮还原酶多肽接触而制备。

[0051] 在一些实施方案中，式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Ib1) 和 (Ib3) 的化合物，并且该方法形成非对映体过量于式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物



[0052]



[0053] 因此，在一些实施方案中，用于制备非对映体过量于式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物的方法包括，使式 (IIb) 的底物化合物与相比于对式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物具有对式 (Ib1) 和 (Ib3) 的化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

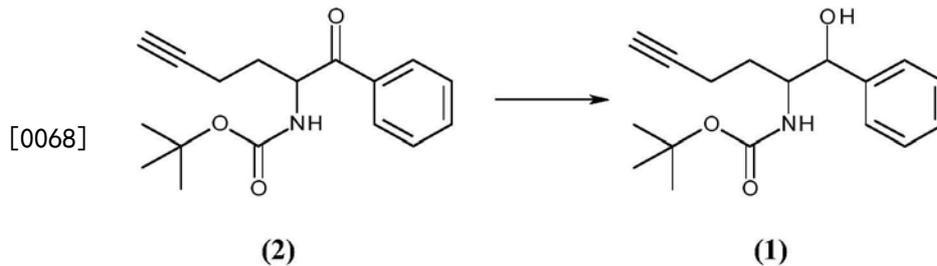
[0054] 在一些实施方案中，式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Ib1) 的化合物，并且该方法形成非对映体过量于式 (Ib3) 的化合物的式 (Ib1) 的产物化合物。因此，在一些实施方案中，用于制备非对映体过量于式 (Ib3) 的化合物的式 (Ib1) 的产物化合物的方法包括，使式 (IIb) 的底物化合物与相比于对式 (Ib3) 的化合物具有对式 (Ib1) 的化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

[0064] 在一些实施方案中,用于动态动力学拆分的用于平衡式 (IIb1) 和 (IIb2) 的底物化合物的反应条件可包括约9至约12的pH和约45°C至约60°C的温度。

[0065] 各种实施方案以及关于制备和使用工程化多肽、编码多肽的多核苷酸的指导,和用于生物催化转化的方法将在以下详述中提供。

[0066] 本申请提供了以下内容:

[0067] 项目1.一种工程化酮还原酶多肽,所述工程化酮还原酶多肽能够将底物化合物(2), (1-氧代-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯,转化为产物化合物(1), (1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基) 氨基甲酸叔丁酯,



[0069] 所述酮还原酶多肽包括具有与SEQ ID NO:4的至少80%序列同一性和特征X40R和X206L或F的氨基酸序列,条件是当X206为F时,所述序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0070] 项目2.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述氨基酸序列包括X40R和X206F,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0071] 项目3.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述氨基酸序列包括X40R和X206F或L,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的至少一个或多个残基差异:X17Q/R/M;X64V;X94P;X144V;X147Q/I/L;X157C;和X196M。

[0072] 项目4.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述氨基酸序列包括至少与SEQ ID NO:4相比选自以下的残基差异组合:

[0073] (a) X40R、X196M、和X206F/L;

[0074] (b) X40R、X144V、和X206F/L;

[0075] (c) X40R、X17H/R/Q、和X206F/L;

[0076] (d) X40R、X94P、和X206F/L;

[0077] (e) X40R、X198S、和X206F/L;

[0078] (f) X40R、X17H/R/Q、X94P和X206F/L;

[0079] (g) X40R、X71P、X157C和X206F/L;

[0080] (h) X40R、X94P、X144V、X196M和X206F/L;

[0081] (i) X17H/R/Q、X40R、X64V、X147I/Q/L、和X206F/L;

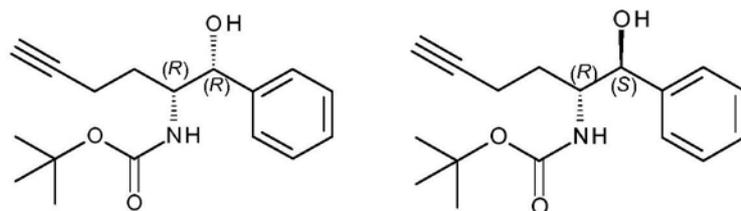
[0082] (j) X17H/R/Q、X40R、X64V、X94P、X144V、X147I/Q/L、X157C、X196M和X206F/L;以及

[0083] (k) X17Q、X40R、X64V、X71P、X94P、X144V、X147I、X157C、X196M、X206F、和X249F。

[0084] 项目5.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,所述工程化酮还原酶多肽能够以至少10倍的SEQ ID NO:4的参考多肽的活性将所述底物化合物(2)转化为所述产物化合物(1),其中所述氨基酸序列包括所述特征X40R和X206L或F,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X60I;X71P;X94P;X94A;X95M;X96L;X96Y;X127R;X144V;X145I;X150Y;X152G;X153G;X157C;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X206F;X216R;X245I;X245F;X249Y;和X249F。

[0085] 项目6.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,所述工程化酮还原酶多肽具有与SEQ ID NO:4或32的参考多肽相比增加的热稳定性,其中所述氨基酸序列包括所述特征X40R和X206L或F,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X17Q;X17R;X17W;X64V;X71P;X87L;X94S;X94P;X147Q;X147I;X147L;X157C;X198S;X249Y;和X249F。

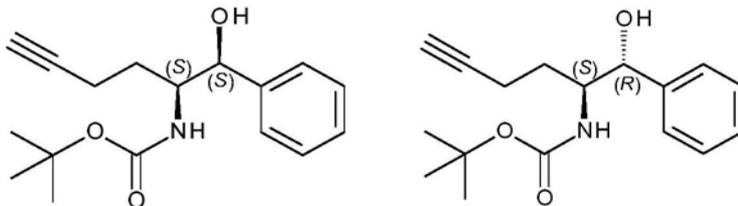
[0086] 项目7.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,所述工程化酮还原酶多肽能够形成非对映体过量于反式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯化合物(1b)和(1d)的产物顺式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯化合物(1a)和(1c)



(1a)

(1b)

[0087]



(1c)

(1d).

[0088] 项目8.如项目7所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述氨基酸序列包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X17Q;X64V;X71P;X87L;X147I;X157C;X196M;和X249F。

[0089] 项目9.如项目7所述的工程化酮还原酶多肽,所述工程化酮还原酶多肽能够以相比于化合物(1b)和(1d)的至少50%的非对映体比形成产物化合物(1a)和(1c)。

[0090] 项目10.如项目1所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述氨基酸序列包括选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0091] 项目11.如项目1至10中任一项所述的工程化酮还原酶多肽,其中所述肽固定在固

体支持物上。

[0092] 项目12.一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如项目1至10中任一项所述的工程化酮还原酶多肽。

[0093] 项目13.如项目12所述的多核苷酸,所述多核苷酸包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171。

[0094] 项目14.一种表达载体,所述表达载体包含如项目12所述的多核苷酸。

[0095] 项目15.如项目14所述的表达载体,所述表达载体包含控制序列。

[0096] 项目16.如项目15所述的表达载体,其中所述控制序列为启动子。

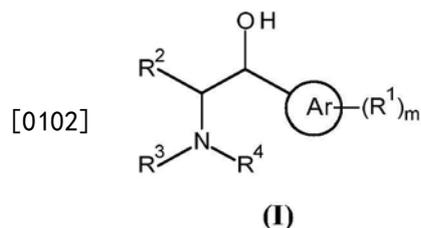
[0097] 项目17.一种宿主细胞,所述宿主细胞包括如项目12所述的多核苷酸。

[0098] 项目18.如项目17所述的宿主细胞,所述宿主细胞为大肠杆菌(E.coli)。

[0099] 项目19.一种用于制备如项目1至10中任一项所述的工程化酮还原酶多肽的方法,包括在适合于表达所述工程化酮还原酶多肽的培养条件下培养项目17所述的宿主细胞。

[0100] 项目20.如项目19所述的方法,所述方法还包括分离所表达的多肽。

[0101] 项目21.一种用于制备式(I)的产物化合物的方法



[0103] 其中

[0104] Ar是5至7元碳环或杂环;

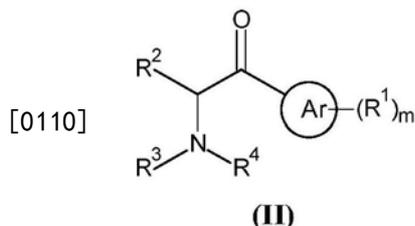
[0105] R¹的每次出现独立地选自卤素、-COOR^a、-C(O)R^b、-OR^c、-SO₂、-SR^d、-S(O)R^e、-NR^fR^g、-C(O)NR^hRⁱ、-NO₂、-CN、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基,其中R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g、R^h和Rⁱ独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基;

[0106] R²选自任选地取代的烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、环烷基烯基、环烷基炔基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂环烷基烯基、杂环烷基炔基、芳基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、烷基硫代、烷基亚磺酰基和芳基亚磺酰基;

[0107] R³和R⁴,彼此独立地,选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、烷氧基羰基、芳基烷氧基羰基、杂芳基烷氧基羰基、和保护基团,或R³和R⁴中的一个与R²形成任选地取代的5至7元杂环,以及

[0108] m为0至10;

[0109] 所述方法包括使式(II)的底物化合物,



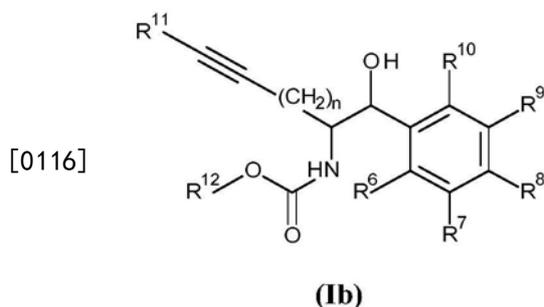
[0111] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 m 如以上定义，

[0112] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目1至10中任一项目的工程化酮还原酶多肽接触。

[0113] 项目22.如项目21所述的方法，其中Ar为5至7元芳基或杂芳基。

[0114] 项目23.如项目22所述的方法，其中Ar选自噻吩基、苯基和吡啶基。

[0115] 项目24.如项目21所述的方法，其中所述式(I)的产物化合物包括式(Ib)的产物化合物



[0117] 其中

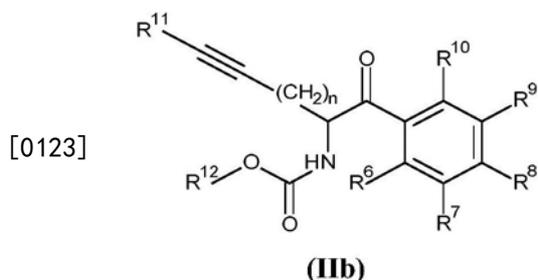
[0118] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 各自独立地选自H、卤素、 $-COOR^a$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-OR^c$ 、 $-SO_2$ 、 $-SR^d$ 、 $-S(O)R^e$ 、 $-NR^fR^g$ 、 $-C(O)NR^hR^i$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，其中 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、 R^f 、 R^g 、 R^h 和 R^i 独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；

[0119] n 为1至4，

[0120] R^{11} 选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；以及

[0121] R^{12} 选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基和保护基团；

[0122] 所述方法包括使式(Ib)的底物化合物



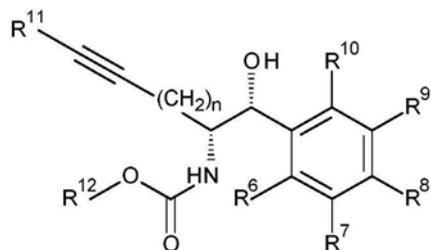
[0124] 其中

[0125] 其中 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上定义，

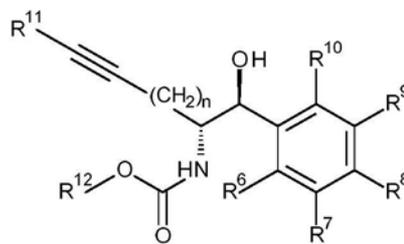
[0126] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目1至10中任一项目的工程化酮还原酶多肽接触。

[0127] 项目25.如项目24所述的方法,其中R¹¹是任选地取代的苯基。

[0128] 项目26.如项目24所述的方法,其中所述式(Ib)的产物化合物包括式(Ib1)和(Ib3)的产物化合物,并且所述方法形成非对映体过量于式(Ib2)和(Ib4)的化合物的式(Ib1)和(Ib3)的产物化合物,

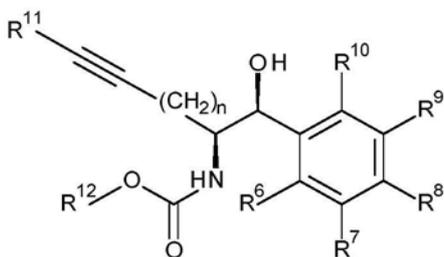


(Ib1)

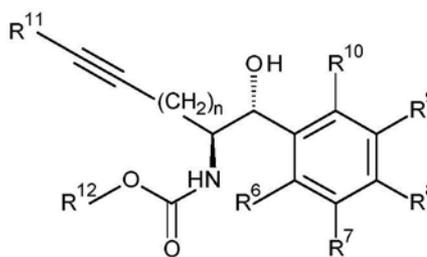


(Ib2)

[0129]



(Ib3)

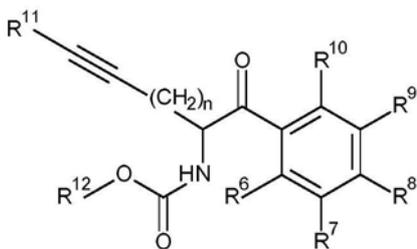


(Ib4)

[0130] 其中

[0131] R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²和n如项目24中所定义;

[0132] 所述方法包括使式(IIb)的底物化合物

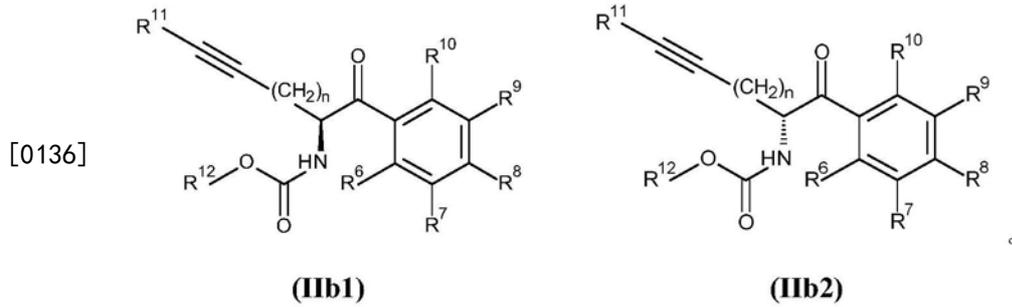


[0133]

(IIb)

[0134] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目7至9中任一项目的工程化酮还原酶多肽接触。

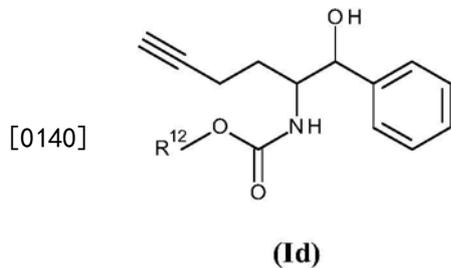
[0135] 项目27.如项目24至26中任一项所述的方法,其中所述式(IIb)的底物化合物包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的混合物



[0137] 项目28.如项目27所述的方法,其中所述混合物包括式(IIb1)和(IIb2)化合物的外消旋混合物。

[0138] 项目29.如项目24至28中任一项所述的方法,其中n为2。

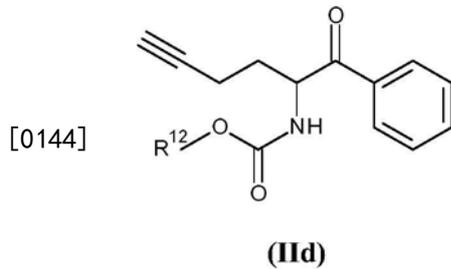
[0139] 项目30.如项目24所述的方法,其中所述式(Ib)的产物化合物包括式(Id)的化合物



[0141] 其中

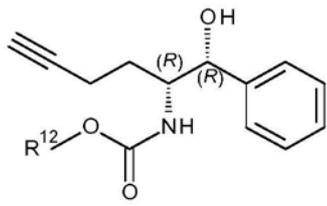
[0142] R^{12} 如项目24所定义;

[0143] 所述方法包括使式(IIId)的底物化合物

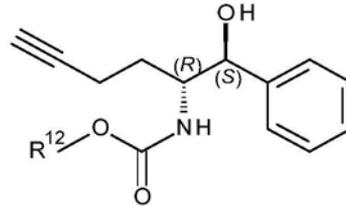


[0145] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目1至10中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

[0146] 项目31.如项目24所述的方法,其中所述式(Ib)的产物化合物包括式(Id1)和(Id3)的产物化合物,并且所述方法形成非对映体过量于式(Id2)和(Id4)的化合物的式(Id1)和(Id3)的产物化合物,

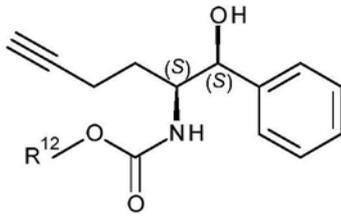


(Id1)

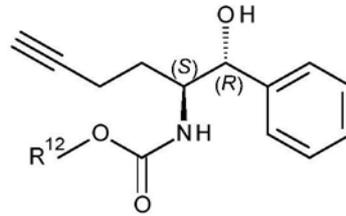


(Id2)

[0147]



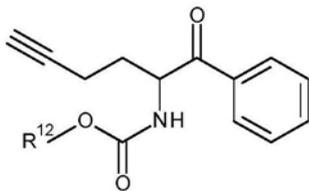
(Id3)



(Id4)

[0148] 其中R¹²如在项目24中所定义；

[0149] 所述方法包括使式 (IIId) 的底物化合物

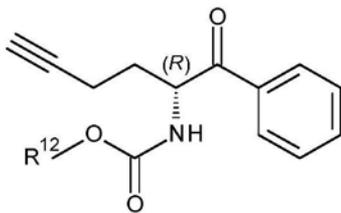


[0150]

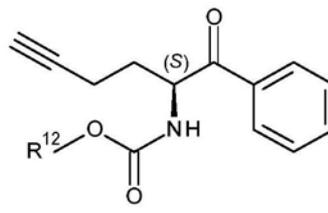
(IIId)

[0151] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目7至9中任一项的工程化酮还原酶多肽接触。

[0152] 项目32.如项目30或31所述的方法,其中所述式 (IIId) 的底物化合物包括式 (IIId1) 和 (IIId2) 的化合物的混合物



(IIId1)



(IIId2)

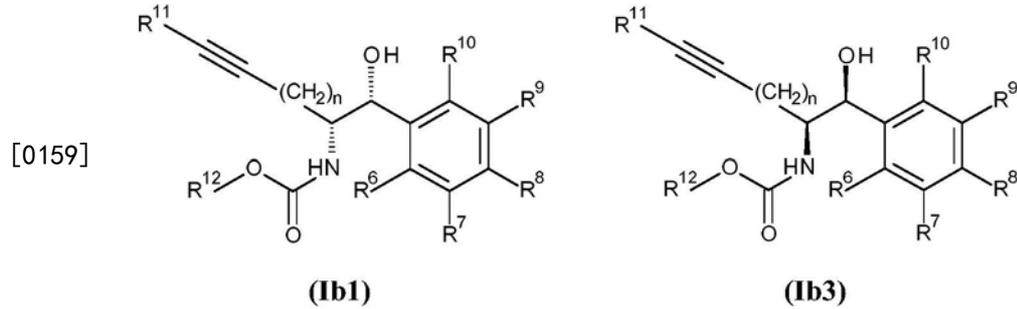
[0154] 项目33.如项目32所述的方法,其中所述混合物是式 (IIId1) 和 (IIId2) 的化合物的外消旋混合物。

[0155] 项目34.如项目24至33中任一项所述的方法,其中R¹²选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、和叔丁基。[0156] 项目35.如项目34所述的方法,其中R¹²是叔丁基。

[0157] 项目36.如项目31所述的方法,其中以相比于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的至少50的非对映体比形成所述式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物,所述方法包括使所述式 (IIId) 的底物化合物在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与项目9的工程化酮还原酶

多肽接触。

[0158] 项目37.一种用于制备非对映体过量于式 (Ib3) 的化合物的式 (Ib1) 的产物化合物的方法，



[0160] 其中，

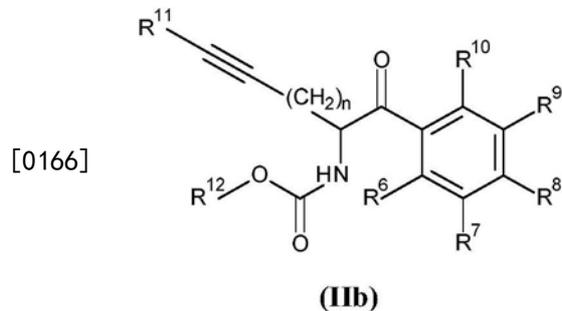
[0161] R^6, R^7, R^8, R^9 和 R^{10} 各自独立地选自H、卤素、 $-COOR^a$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-OR^c$ 、 $-SO_2$ 、 $-SR^d$ 、 $-S(O)R^e$ 、 $-NR^fR^g$ 、 $-C(O)NR^hR^i$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，其中 $R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g, R^h$ 和 R^i 独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；

[0162] n 为1至4，

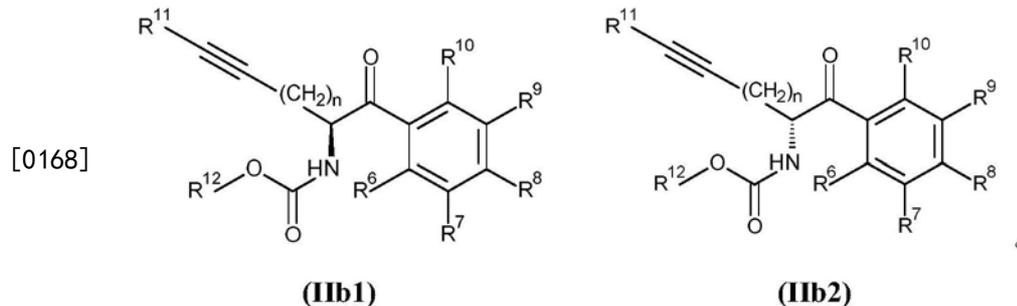
[0163] R^{11} 选自H或任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；以及

[0164] R^{12} 选自H、任选地取代的烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基和保护基团；

[0165] 所述方法包括使式 (IIb) 的底物化合物



[0167] 其中 $R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{12}$ 和 n 如以上定义，在用于平衡式 (IIb1) 和 (IIb2) 的底物化合物的适当的反应条件下在NADPH或NADH的存在下与项目7至9中任一项目的工程化酮还原酶接触



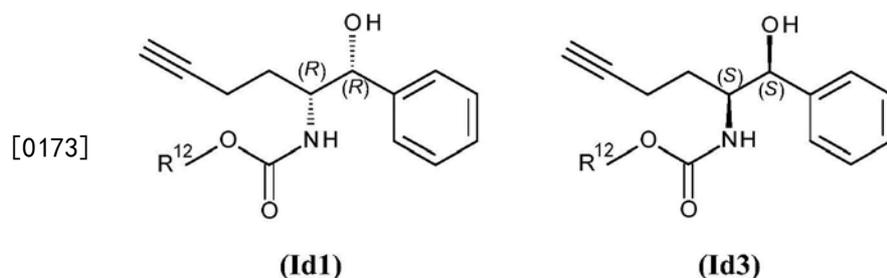
[0169] 项目38.如项目37所述的方法，其中所述底物化合物 (IIb) 包括式 (IIb1) 和 (IIb2)

的化合物的混合物。

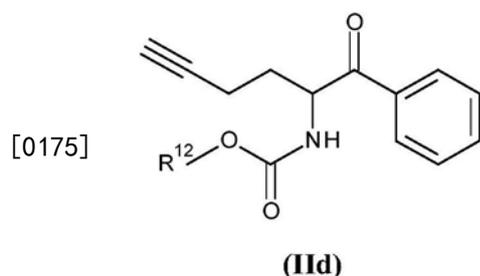
[0170] 项目39.如项目38所述的方法,其中所述混合物包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的外消旋混合物。

[0171] 项目40.如项目37至39中任一项所述的方法,其中n为2。

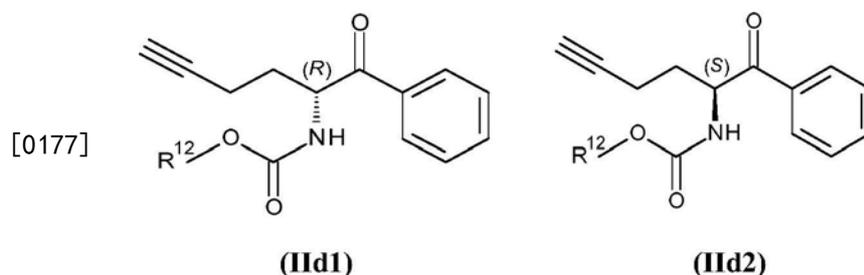
[0172] 项目41.如项目37所述的方法,其中所述式(Ib1)的产物化合物包括式(Id1)的化合物,并且形成非对映体过量于式(Id3)的化合物的式(Id1)的化合物,



[0174] 所述方法包括使式(IIId)的底物化合物



[0176] 在用于平衡式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的适当的反应条件下在NADPH或NADH的存在下与项目7至9中任一项的工程化酮还原酶接触



[0178] 项目42.如项目41所述的方法,其中所述式(IIId)的化合物包括式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的混合物。

[0179] 项目43.如项目42所述的方法,其中所述混合物包括式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的外消旋混合物。

[0180] 项目44.如项目37至43中任一项所述的方法,其中用于平衡底物化合物的反应条件包括约9至约12的pH和约45℃至约60℃的温度。

[0181] 项目45.如项目41所述的方法,其中所述适当的反应条件包括以下底物化合物载量浓度:约1g/L、约10g/L、约20g/L、约40g/L、约50g/L、约75g/L、约100g/L、约125g/L、约150g/L、约175g/L、或约200g/L。

[0182] 项目46.如项目41所述的方法,其中所述适当的反应条件包括以下工程化酮还原酶多肽浓度:约20g/L、约10g/L、约5g/L、约4g/L、约2g/L、约1g/L、约0.5g/L、约0.2g/L或约

0.1g/L。

[0183] 项目47.如项目21至46中任一项所述的方法,所述方法还包括用辅因子再生系统将NAD⁺或NADP⁺转化为NADH或NADPH。

[0184] 项目48.如项目47所述的方法,其中所述辅因子再生系统包括酮还原酶和仲醇。

[0185] 项目49.如项目48所述的方法,其中所述仲醇为异丙醇(IPA)。

[0186] 项目50.如项目49所述的方法,所述方法还包括除去由酮还原酶介导的将所述IPA至丙酮的转化形成的丙酮的步骤。

[0187] 项目51.如项目48所述的方法,其中所述辅因子再生系统的所述酮还原酶为项目1至10中任一项所述的酮还原酶。

[0188] 项目52.如项目48所述的方法,其中所述辅因子再生系统的所述酮还原酶为与项目1至10中任一项所述的酮还原酶不同的酮还原酶。

[0189] 项目53.如项目41所述的方法,其中所述反应条件包括共溶剂系统,所述共溶剂系统包括水性缓冲溶液和IPA,其中所述IPA浓度为约5% (v/v)、约10% (v/v)、约20% (v/v)、约30% (v/v)、约40% (v/v)、约45% (v/v)、约50% (v/v)、约55% (v/v)、约60% (v/v)、约65% (v/v)、约70% (v/v)、约75% (v/v)、约80% (v/v)、约85% (v/v)、或约90% (v/v)。

[0190] 项目54.如项目21所述的方法,其中所述反应条件包括:

[0191] (a) 约1g/L至约10g/L的工程化酮还原酶多肽浓度;

[0192] (b) 约50g/L至约200g/L的载量浓度下的底物化合物;

[0193] (c) 约0.1g/L至约0.5g/L的NADP(H)浓度;

[0194] (d) 水性缓冲液和约30%至约70% (v/v)的IPA的共溶剂溶液;以及

[0195] (e) 35°C至约60°C的温度。

[0196] 项目55.如项目21至54中任一项所述的方法,所述方法还包括选自以下的一个或多个步骤:提取所述产物化合物;分离所述产物化合物;纯化所述产物化合物;和结晶所述产物化合物。

[0197] 项目56.如项目21至55中任一项所述的方法,其中所述式(II)的底物化合物是所述化合物的氧化形式。

具体实施方式

[0198] 除非上下文另外清楚地指明,否则对于本文中该说明书和所附的权利要求书中的单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“一种多肽”包括多于一种多肽,以及提及“一种化合物”是指多于一种化合物。

[0199] 还应理解的是,当各个实施方案的描述使用术语“包括(comprising)”时,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,一种实施方案可替代地利用措辞“基本上由…组成”或“由…组成”来描述。

[0200] 并且,除非另有说明,使用“或”意指“和/或”。类似地,“包括(comprise)”、“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包括(include)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有(has)”、“具有(have)”和“具有(having)”是可互换的,且不意图为限制性的。

[0201] 上述的一般说明和详述都只是示例性和说明性的,而不是限制本公开内容。

[0202] 本文所用的章节标题仅用于组织目的,且不当被解释为限制所描述的主题。

[0203] 缩写

[0204] 用于遗传编码的氨基酸的缩写是常规的,并如下:

	氨基酸	三个字母的缩写	一个字母的缩写
	丙氨酸	Ala	A
	精氨酸	Arg	R
	天冬酰胺	Asn	N
	天冬氨酸	Asp	D
	半胱氨酸	Cys	C
	谷氨酸	Glu	E
	谷氨酰胺	Gln	Q
[0205]	甘氨酸	Gly	G
	组氨酸	His	H
	异亮氨酸	Ile	I
	亮氨酸	Leu	L
	赖氨酸	Lys	K
	蛋氨酸	Met	M
	苯丙氨酸	Phe	F
	脯氨酸	Pro	P
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
[0206]	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	Y
	缬氨酸	Val	V

[0207] 当使用三个字母缩写时,除非前面明确加有“L”或“D”或从使用缩写的上下文明显,否则氨基酸可为关于 α -碳(C_{α})成L-构型或D-构型。例如,尽管“Ala”表示丙氨酸,而没有规定关于 α -碳的构型,但“D-Ala”与“L-Ala”分别表示D-丙氨酸与L-丙氨酸。当使用单字母缩写时,大写字母表示关于 α -碳成L-构型的氨基酸类,而小写字母表示关于 α -碳成D-构型的氨基酸类。例如,“A”表示L-丙氨酸而“a”表示D-丙氨酸。当多肽序列被呈现为一串单个字母或三个字母缩写(或其混合)时,根据通常惯例,序列以氨基(N)至羧基(C)方向呈现。

[0208] 用于基因编码的核苷的缩写是常规的,并且是如下:腺苷(A);鸟苷(G);胞苷(C);胸苷(T);以及尿苷(U)。除非特别描绘,否则缩写的核苷可为核糖核苷或2'-脱氧核糖核苷。核苷可以单个计或以聚集体计被指定为核糖核苷或2'-脱氧核糖核苷。当核酸序列被呈现为一串一个字母缩写时,根据通常惯例,序列以5'至3'方向呈现,且没有显示磷酸盐。

[0209] 定义

[0210] 关于本公开内容,除非另外具体指明,否则本文的说明书中使用的技术术语和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。因此,以下术语意为具有以下含义:

[0211] “蛋白”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,表示通过酰胺键共价连接的至少两个氨基酸的聚合物,而不论长度或翻译后修饰(例如,糖基化、磷酸化、脂化、肉豆蔻化(myristylation)、泛素化等等)。包括在这一定义中的是D-氨基酸和L-氨基酸,以及D-氨基

酸和L-氨基酸的混合物。

[0212] “多核苷酸”或“核酸”是指共价地连接在一起的两个或更多个核苷。多核苷酸可完全由核糖核苷(即,RNA)组成,完全由2'脱氧核糖核苷酸(即,DNA)组成或由核糖核苷和2'脱氧核糖核苷的混合物组成。尽管核苷将通常通过标准磷酸二酯键合连接在一起,但多核苷酸可包括一个或多个非标准的键合。多核苷酸可以是单链的或双链的,或可包括单链区和双链区两者。此外,虽然多核苷酸将通常由天然存在的编码核碱基(即,腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)组成,但其可包括一个或多个修饰的和/或合成的核碱基,诸如,例如,肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤等。优选地,这种修饰的或合成的核碱基将为编码核碱基。

[0213] “编码序列”是指编码蛋白的氨基酸序列的核酸(例如,基因)的那部分。

[0214] “天然存在的”或“野生型”是指天然发现的形式。例如,天然存在的或野生型多肽或多核苷酸序列是生物体中存在的序列,其可从天然来源分离且未通过人为操纵而被有意识地修改。

[0215] 当关于例如细胞、核酸或多肽在本公开内容使用时,“非天然存在的”或“工程化的”或“重组的”指将以天然不存在其他方式被修饰或与其相同但由合成的材料产生或衍生和/或通过使用重组技术处理产生的材料或与该材料的自然或天然形式相应的材料。非限制性实例包括,表达在细胞的天然(非重组的)形式中未发现的基因或以与天然基因本来表达的水平不同的水平表达天然基因的重组细胞以及其他。

[0216] “序列同一性的百分比”、“百分比同一性”和“百分比同一”在本文使用以指多核苷酸序列或多肽序列之间的对比,并通过在比较窗上比较两个最佳比对序列来确定,其中多核苷酸或多肽序列在比较窗中的部分与用于两个序列的最佳比对的参考序列相比可以包括添加或缺失(即,缺口)。百分比如下计算,通过确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基或者核酸碱基或氨基酸残基与缺口对齐的位置的数目,以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数目,并将结果乘以100以得到序列同一性的百分比。最佳比对和百分比序列同一性的确定使用BLAST和BLAST 2.0算法来进行(参见,例如,Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410以及Altschul等人,1977,Nucleic Acids Res.3389-3402)。用于进行BLAST分析的软件为通过美国国家生物技术信息中心网站公共可获得的。

[0217] 简言之,BLAST分析涉及首先通过确定查询序列(query sequence)中长度W的短字来确定高分序列对(HSP),当其与数据库序列中相同长度的字比对时,所述短字匹配或满足一些正值阈值评分T。T被称为邻近字评分阈值(Altschul等人,如上)。这些最初的邻近字击中(word hit)用作启动检索以找到更长的包括它们的HSP的种子。然后字击中沿着每个序列的两个方向延伸到累积比对评分不能增加的程度。对于核苷酸序列,累积评分使用参数M(用于一对匹配残基的奖励评分;总是>0)和N(用于错配残基的惩罚评分;总是<0)来计算。对于氨基酸序列,使用评分矩阵以计算累积评分。当:累积比对评分从其最大获得的值跌落量X时;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积评分变成零或以下时;或达到任一序列的末端时,字击中在每个方向的延伸被停止。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用11的字长(W)、10的期望值(E)、M=5、N=-4、以及两个链的比较作为缺省参数。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用3的字长(W)、10的期望值(E),和BLOSUM62评分矩阵作为缺省参数(参见Henikoff和Henikoff,1989,Proc Natl

Acad Sci USA 89:10915)。

[0218] 在提供两个序列的百分比同一性中与BLAST类似地起作用的许多其他算法是可用的。用于比较的最佳序列比对可如下进行,例如,通过Smith和Waterman,1981, Adv. Appl. Math. 2:482的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch,1970, J. Mol. Biol. 48:443的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444的相似度检索方法,通过这些算法的计算机化执行(在GCG Wisconsin软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA),或通过目测(通常参见, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等人编著, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc., (1995增刊) (Ausubel))。另外,序列比对与百分比序列同一性的确定可使用GCG Wisconsin软件包 (Accelrys, Madison WI) 中的BESTFIT或GAP程序,使用提供的缺省参数。

[0219] “参考序列”是指与另一个序列比较的确定的序列。参考序列可以是更大序列的子集,例如,全长基因或多肽序列的区段。通常,参考序列为至少20个核苷酸或氨基酸残基的长度,至少25个残基的长度,至少50个残基的长度,或核酸或多肽的全长。因为两种多核苷酸或多肽可以各自(1)包括两个序列之间相似的序列(即,完整序列的一部分),且(2)还可包括在两种序列之间不同的序列,所以两种(或更多种)多核苷酸或多肽之间的序列比较通常通过在比较窗内比较两种多核苷酸的序列来进行以确定和比较具有序列相似性的局部区域。术语“参考序列”并非意图限于野生型序列,而可包括工程化或改变的序列。例如,在一些实施方案中,“参考序列”可以是先前工程化或改变的氨基酸序列。

[0220] “比较窗”是指至少约20个连续核苷酸位置或氨基酸残基的概念性片段,其中序列可与至少20个连续的核苷酸或氨基酸的参考序列进行比较,并且其中在比较窗中序列的一部分与用于两个序列的最佳比对的参考序列(其不包括添加或缺失)相比,可以包括20%或更少的添加或缺失(即,缺口)。比较窗可以比20个连续的残基更长,并任选地包括30、40、50、100或更长的窗。

[0221] 当在给定的氨基酸或多核苷酸序列的编号的上下文中使用时,“相应于”、“参考”或“相对于”指当给定的氨基酸或多核苷酸序列与参考序列相比时,指定的参考序列的残基的编号。换句话说,给定的聚合物的残基编号或残基位置是关于参考序列被指定的,而不是通过给定的氨基酸或多核苷酸序列内的残基的实际数值位置被指定的。例如,给定的氨基酸序列,诸如工程化酮还原酶的氨基酸序列,可以通过引入缺口以优化两个序列之间的残基匹配而与参考序列进行比对。在这些情况中,虽然存在缺口,给定的氨基酸或多核苷酸序列中残基的编号是关于与其比对的参考序列作出的。如本文所用,除非另外特别说明,否则提及残基位置,诸如,如下面进一步描述的“X_n”,将被解释为是指“相应于...的残基”。

[0222] “立体选择性”是指在化学反应或酶促反应中一种立体异构体比另一种立体异构体或另一组立体异构体优先形成。立体选择性可以是部分的,其中一种立体异构体的形成优于另一种立体异构体的形成,或立体选择性可以是完全的,其中只形成一种立体异构体。当立体异构体是对映体时,立体选择性被称为对映体选择性,即一种对映体在两种对映体的总和中的分数(通常被报告为百分比)。它在本领域通常可选择地被报告为(通常为百分比)对映体过量(e.e.),其中根据以下式计算[主要对映体-次要对映体]/[主要对映体+次要对映体]。当立体异构体是非对映异构体时,立体选择性被称为非对映选择性,即一种非

对映体在两种非对映体的混合物中的分数(通常被报告为百分比),通常可选择地报告为非对映体过量(d.e.)。对映体过量和非对映体过量是立体异构体过量的类型。还应当理解,立体选择性不局限于单一立体异构体,而是可对立体异构体的组描述,例如相比于对化合物(1b)和(1d)对化合物(1a)和(1c)的立体选择性,如本文进一步描述的。

[0223] “高立体选择性”是指能够以至少约85%立体异构体过量将底物例如,化合物(2)转化为其相应手性醇产物例如化合物(1a)和(1c)的化学或酶促反应。

[0224] “增加的酶活性”或“增加的活性”是指工程化酶的改进特性,其可被表示为与参考酶相比,比活性(例如,产生的产物/时间/重量蛋白)的增加,或底物至产物的百分比转化率的增加(例如,在指定的时间段使用指定量的酮还原酶,起始量的底物至产物的百分比转化率)。确定酶活性的示例性方法被提供于实施例。可以影响与酶活性相关的任何特性,包括经典的酶特性 K_m 、 V_{max} 或 k_{cat} ,它们的改变能够导致增加的酶活性。酮还原酶活性可以通过用于测量酮还原酶的标准测定法,诸如在底物或产物浓度中的变化,或在辅因子的浓度(不存在辅因子再生系统)中的变化的任何一个来测量。酶活性的比较使用确定的酶制剂,一组条件下确定的测定,和一种或多种确定的底物来进行,如在本文中详细地进一步描述的。通常,当比较细胞溶解产物中的酶时,确定细胞的数目和测定的蛋白的量,以及使用相同表达系统和相同宿主细胞以最小化由宿主细胞产生并存在于溶解产物中的酶的量的变化。

[0225] “转化率”是指底物至相应的产物的酶促转化。“百分比转化率”是指在指定条件下一段时间内被转化为产物的底物的百分比。因此,例如,酮还原酶多肽的“酶活性”或“活性”可以表示为底物至产物的“百分比转化率”。

[0226] “热稳定的(thermostable)”或“热稳定的(thermal stable)”可互换使用,是指与未处理的酶相比当暴露于一组温度条件(例如,40–80°C)持续一段时间(例如,0.5–24小时)时耐失活,因此在暴露于高温后保留某些水平的残留活性(例如,诸如高于60%至80%)的多肽。

[0227] “溶剂稳定的”指与未处理的酶相比,多肽在暴露于不同浓度(例如5–99%)的溶剂(例如,异丙醇、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、丙酮、甲苯、乙酸丁酯、甲基叔丁基醚等)持续一段时间(例如,0.5–24小时)之后维持相似的活性(例如,多于例如,60%至80%)的能力。

[0228] “氨基酸差异”或“残基差异”是指相对于参考序列中在相应位置上的氨基酸残基,在多肽序列的位置上的氨基酸残基中的差异。氨基酸差异的位置通常在本文中称为“Xn”,其中n是指残基差异所基于的参考序列中的相应位置。例如,“与SEQ ID NO:4相比在位置X40上的残基差异”是指相应于SEQ ID NO:4的位置40的多肽位置上的氨基酸残基的差异。因此,如果SEQ ID NO:4的参考多肽在位置40上具有组氨酸,那么“与SEQ ID NO:4相比在位置X40上的残基差异”指相应于SEQ ID NO:4的位置40的多肽位置上除组氨酸之外的任何残基的氨基酸置换。在本文大多数情况下,位置上的特定氨基酸残基差异表示为“XnY”,其中“Xn”指定如上所述的相应位置,且“Y”是工程化多肽中发现的氨基酸的单字母标识符(即,与参考多肽相比的不同残基)。在一些情况下(例如,在表2A、2B、和2C中),本公开内容还提供了由常规符号“AnB”表示的特定氨基酸差异,其中A是参考序列中残基的单字母标识符,“n”是参考序列中的残基位置的数目,且B是工程化多肽的序列中的残基置换的单字母标识符。在一些情况下,本公开内容的多肽相对于参考序列可以包括一个或多个氨基酸残基差异,这由相对于参考序列存在残基差异的特定位置的列表指示。在一些实施方案中,当多于

一个氨基酸可以在多肽的特定残基位置中被使用时,可被使用的各种氨基酸残基由“/”隔开(例如,X192A/G)。本公开内容包括工程化多肽序列,该工程化多肽序列包括一个或多个氨基酸差异,该氨基酸差异包括任一种和/或两种保守和非保守的氨基酸置换。包括在本公开内容的序列表中的特定重组碳酸酐酶多肽的氨基酸序列包括起始蛋氨酸(M)残基(即,M表示残基位置1)。然而,技术人员理解该起始蛋氨酸残基可通过生物学加工机制除去,诸如在宿主细胞内或体外翻译系统中,以产生缺乏起始蛋氨酸残基,但在其他方面保留了酶的性能的成熟蛋白。因此,术语“相对于SEQ ID NO:4在位置Xn的氨基酸残基差异”,如本文使用的,可指位置“Xn”或已被加工以缺乏起始蛋氨酸的参考序列中的相应位置(例如,位置(X-1)n)。

[0229] “保守氨基酸置换”指具有相似侧链的残基的可互换性,并且因此,通常涉及用在相同或相似定义类别的氨基酸内的氨基酸置换多肽中的氨基酸。通过示例的方式而非限制,具有脂族侧链的氨基酸可被另一个脂族氨基酸置换,例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有羟基侧链的氨基酸被具有羟基侧链的另一个氨基酸置换,例如,丝氨酸和苏氨酸;具有芳香族侧链的氨基酸被具有芳香族侧链的另一个氨基酸置换,例如,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸;具有碱性侧链的氨基酸被具有碱性侧链的另一个氨基酸置换,例如,赖氨酸和精氨酸;具有酸性侧链的氨基酸被具有酸性侧链的另一个氨基酸置换,例如,天冬氨酸或谷氨酸;且疏水性氨基酸或亲水性氨基酸分别被另一个疏水性氨基酸或亲水性氨基酸置换。示例性保守置换被提供在下面的表1中。

[0230] 表1

残基	可能的保守置换
A、L、V、I	其它脂族残基 (A、L、V、I) 其它非极性残基 (A、L、V、I、G、M)
G、M	其它非极性残基 (A、L、V、I、G、M)
[0231] D、E	其它酸性残基 (D、E)
K、R	其它碱性残基 (K、R)
N、Q、S、T	其它极性残基
H、Y、W、F	其它芳香族残基 (H、Y、W、F)
C、P	无

[0232] “非保守置换”是指用具有显著差异侧链性质的氨基酸置换多肽中的氨基酸。非保守置换可以利用限定组之间,而不是它们之内的氨基酸,并影响(a)置换的区域中肽骨架的结构(例如,脯氨酸置换甘氨酸)(b)电荷或疏水性,或(c)侧链的体积。通过示例的方式而非限制,示例性的非保守置换可以是酸性氨基酸被碱性或脂族氨基酸置换;芳香族氨基酸被小氨基酸置换;以及亲水性氨基酸被疏水性氨基酸置换。

[0233] “缺失”是指通过从参考多肽除去一个或多个氨基酸而对多肽进行的修饰。缺失可以包括除去1个或多个氨基酸、2个或更多个氨基酸、5个或更多个氨基酸、10个或更多个氨基酸、15个或更多个氨基酸、或20个或更多个氨基酸、多至组成多肽氨基酸总数的10%、多至氨基酸总数的20%而同时保留酶活性和/或保留工程化酶的改进特性。缺失可以涉及多肽的内部和/或端部。在各个实施方案中,缺失可以包括连续的区段或可以是不连续的。

[0234] “插入”是指通过向参考多肽添加一个或多个氨基酸而对多肽进行的修饰。在一些

实施方案中,改进的工程化酮还原酶类包括一个或多个氨基酸插入天然存在的酮还原酶多肽,以及一个或多个氨基酸插入工程化酮还原酶多肽。插入可以是在多肽的内部或到羧基或氨基末端。如本文所用的插入包括如本领域已知的融合蛋白。插入可以是氨基酸的连续区段或由天然存在的多肽中的一个或多个氨基酸分隔。

[0235] 如本文所用的“片段”是指如下多肽:所述多肽具有氨基端和/或羧基端缺失,但剩余的氨基酸序列与该序列中相应位置相同。片段通常可具有全长酮还原酶多肽例如SEQ ID NO:4的多肽的约80%、90%、95%、98%和99%。

[0236] “分离的多肽”是指如下多肽:所述多肽基本上与其天然伴随的其它污染物,例如,蛋白、脂质和多核苷酸分离。术语包括已从它们天然存在环境或表达系统(例如,宿主细胞或体外合成)中除去或纯化的多肽。改进的酮还原酶类可以存在于细胞内,存在于细胞培养基中,或以各种形式制备,诸如溶解产物或分离的制剂。因此,在一些实施方案中,本公开内容的工程化酮还原酶多肽可以是分离的多肽。

[0237] “基本上纯的多肽”是指如下组合物,在所述组合物中多肽物质是存在的优势物质(即,在摩尔基础或重量基础上,它比在该组合物中的任何其它个体大分子物质更丰富),并且当目标物质构成存在的大分子物质的按摩尔或%重量计至少约50%时,一般是基本上纯化的组合物。一般而言,基本上纯的工程化酮还原酶多肽组合物将构成该组合物中存在的所有大分子物质的按摩尔或%重量计约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约95%或更多以及约98%或更多。溶剂物质、小分子(<500道尔顿)、以及元素离子物质不被认为是大分子物质。在一些实施方案中,分离的改进的酮还原酶多肽是基本上纯的多肽组合物。

[0238] “异源的”多核苷酸是指通过实验室技术引入宿主细胞中的任何多核苷酸,并且包括从宿主细胞中除去,经历实验室操作且然后再引入到宿主细胞中的多核苷酸。

[0239] “密码子优化的”是指编码蛋白的多核苷酸的密码子变为特定生物体中优先使用的那些密码子,以致所编码的蛋白在感兴趣的生物体中被有效表达。在一些实施方案中,可以对编码酮还原酶类的多核苷酸进行密码子优化,以用于从被选择用于表达的宿主生物体优化生产。

[0240] “控制序列”在本文中定义为包括对本公开内容的多核苷酸和/或多肽的表达是必要的或有利的所有组分。每个控制序列对感兴趣的多核苷酸来说可以是天然的或外源的。此类控制序列包括但不限于,前导序列、聚腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列和转录终止子。

[0241] “可操作地连接的”在本文中定义为如下一种配置:在所述配置中控制序列相对于感兴趣的多核苷酸被适当放置(即,以功能关系)的位置使得控制序列指导或调整感兴趣的多核苷酸和/或多肽的表达。

[0242] “辅因子再生系统”或“辅因子再循环系统”是指一组参与还原辅因子的氧化形式的反应(例如,NADP⁺到NADPH)的反应物。由酮基底物的酮还原酶催化的还原而氧化的辅因子由辅因子再生系统的还原形式再生。辅因子再生系统包括化学计量的还原剂,其是还原氢等同物的来源并且能够还原辅因子的氧化形式。辅因子再生系统还可包括催化剂,例如酶催化剂,其催化还原剂对辅因子的氧化形式的还原。分别从NAD⁺或NADP⁺再生NADH或NADPH的辅因子再生系统,是本领域已知的并且可在本文描述的方法中使用。

[0243] “仲醇脱氢酶”在本文中用来指NAD⁺或NADP⁺依赖性酶,其催化仲醇(例如,异丙醇)和NAD⁺或NADP⁺分别转化为酮和NADH或NADPH。

[0244] “适当的反应条件”是指在生物催化反应溶液中的那些条件(例如,酶载量、底物载量、辅因子载量、温度、pH、缓冲液、共溶剂等的范围),在上述条件下本公开内容的酮还原酶多肽能够将底物化合物转化为产物化合物(例如,将化合物(2)转化为化合物(1))。示例性的“适当的反应条件”被提供在本公开内容中,并通过实施例说明。

[0245] “载量”,诸如在“化合物载量”或“酶载量”或“辅因子载量”中,是指在反应开始时反应混合物中组分的浓度或量。

[0246] 在生物催化剂介导的方法的上下文中的“底物”是指生物催化剂所作用于的化合物或分子。例如,在本文所公开的方法中的酮还原酶生物催化剂的示例性底物是化合物(2)。

[0247] 在生物催化剂介导的方法的上下文中的“产物”是指由生物催化剂的作用产生的化合物或分子。例如,在本文所公开的方法中的酮还原酶生物催化剂的示例性产物是化合物(1)。

[0248] 本文所用的“平衡”是指导致化学物质在化学或酶促反应(例如,两种物质A和B的互变)中的稳态浓度的方法,包括立体异构体的互变,如由化学或酶促反应的正向速率常数和逆向速率常数确定的。

[0249] “烷基(alkyl)”是指1个至18个包含1个和18个碳原子,直链的或支链的,更优选地1个至8个包含1个和8个碳原子,且最优选地1个至6个包含1个和6个碳原子的饱和烃基。具有指定数目的碳原子的烷基被表示在括号中,例如,(C₁-C₄)烷基是指1个至4个碳原子的烷基。

[0250] “烯基”是指含有至少一个双键,但任选地含有多于一个双键的2个至12个包含2个和12个碳原子的直链或支链的基团。

[0251] “炔基”是指含有至少一个三键,但任选地含有多于一个三键,并且另外任选地含有一个或多个双键部分的2个至12个包含2个和12个碳原子的直链或支链的基团。

[0252] “杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”是指其中一个或多个碳原子各自独立地被相同或不同的杂原子或杂原子基团代替的如本文所定义的烷基、烯基和炔基。可代替碳原子的杂原子和/或杂原子基团包括,但不限于,-O-、-S-、-S-O-、-NR^α-、-PH-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)NR^α-、-S(O)₂NR^α-以及类似的,包括其组合,其中每一R^α独立地选自氢、烷基、杂烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基。

[0253] “烷氧基”是指基团-OR^β,其中R^β是如上面定义的烷基基团,包括如也在本文中定义的任选地取代的烷基。

[0254] “芳基”是指具有单环(例如,苯基)或多个稠环(例如,萘基或蒽基)的6个至12个包含6个和12个碳原子的不饱和芳香族碳环基团。示例性芳基包括苯基、吡啶基、萘基以及类似的。

[0255] “芳基烷基”是指被芳基取代的烷基,即芳基-烷基-基团,优选地具有在烷基部分的1个至6个包含1个和6个碳原子和在芳基部分的6个至12个包含6个和12个碳原子。此类芳基烷基基团由苯甲基、苯乙基以及类似的举例说明。

[0256] “芳基烯基”是指被芳基取代的烯基,即,芳基-烯基-基团,优选地具有在烯基部分

的2个至6个包含2个和6个碳原子和在芳基部分的6个至12个包含6个和12个碳原子。

[0257] “芳基炔基”是指被芳基取代的炔基,即,芳基-炔基-基团,优选具有在炔基部分的2个至6个碳原子包含2个和6个和在芳基部分的6个至12个包含6个和12个碳原子。

[0258] “碳环”和“碳环的”在本文中可互换使用,以指3个至12个原子的环结构,其中所有环原子是碳原子。碳环包括环烷基和芳基基团。示例性的碳环包括,但不限于,环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环戊烯基、环己烯基、环己二烯基和苯基。

[0259] “环烷基”是指具有可任选地被1个至3个烷基基团取代的单环或多个稠环的3个至12个包含3个和12个碳原子的环状烷基基团。示例性的环烷基基团包括,但不限于,单环结构诸如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基、1-甲基环丙基、2-甲基环戊基、2-甲基环辛基以及类似的,或多环结构,包括桥环系统,诸如金刚烷基以及类似的。

[0260] “环烷基烷基”是指被环烷基取代的烷基,即,环烷基-烷基-基团,优选具有在烷基部分中的1个至6个包含1个和6个碳原子和在环烷基部分中的3个至12个包含3个和12个碳原子。此类环烷基烷基基团由环丙基甲基、环己基乙基以及类似的举例说明。

[0261] “环烷基烯基”是指被环烷基取代的烯基,即,环烷基-烯基-基团,优选具有在烯基部分中的2个至6个包含2个和6个碳原子和在环烷基部分中的3个至12个包含3个和12个碳原子。

[0262] “环烷基炔基”是指被环烷基取代的炔基,即,环烷基-炔基-基团,优选具有在炔基部分中的1个至6个包含1个和6个碳原子和在环烷基部分中的3个至12个包含3个和12个碳原子。

[0263] “氨基”是指基团-NH₂。取代的氨基是指基团-NHR^δ、NR^δR^δ和NR^δR^δR^δ,其中各R^δ独立地选自取代的或未被取代的烷基、环烷基、环杂烷基、烷氧基、芳基、杂芳基、杂芳基烷基、酰基、烷氧基羰基、硫酰基、亚磺酰基、磺酰基,以及类似的。典型的氨基基团包括但不限于二甲基氨基、二乙基氨基、三甲基铵、三乙基铵、甲基磺酰基氨基(methylsulfonylamino)、呋喃基-氧基-磺氨基以及类似的。

[0264] “烷基氨基”是指-NHR^δ基团其中R^δ是烷基,N-氧化物衍生物,或其保护的衍生物,例如,甲氨基、乙氨基、正丙氨基、异丙基氨基、正丁基氨基、异丁基氨基、叔丁基氨基、或甲氨基-N-氧化物以及类似的。

[0265] “氨基烷基”是指其中氢原子中的一个或多个被如本文定义的氨基(包括取代的氨基)取代的烷基基团。

[0266] “氧代”是指=O。

[0267] “氧基”是指二价基团-O-,其可具有各种取代基以形成不同的氧基基团,包括醚和酯。

[0268] “羧基”是指-COOH。“羰基”是指-C(O)-,其可具有多种取代基以形成不同的羰基基团,包括酸、酰基卤、醛、酰胺、酯和酮。

[0269] “羰基”是指-C(O)-,其可具有各种取代基以形成不同的羰基,包括酯和酮。

[0270] “烷氧基羰基”是指-C(O)OR^ε,其中R^ε是如本文所定义的烷基,其可任选地被取代。

[0271] “芳氧基羰基”是指-C(O)OR^ζ,其中R^ζ是如本文所定义的芳基,其可任选地被取代。

[0272] “芳基烷氧基羰基”是指-C(O)OR^ρ,其中R^ρ为如本文所定义的芳基-烷基-基团,其可任选地被取代。

[0273] “杂芳氧基羰基”是指 $-C(O)OR^{\sigma}$ ，其中 R^{σ} 为如本文所定义的杂芳基基团，其可任选地被取代。

[0274] “杂芳基烷氧基羰基”是指 $-C(O)OR^{\omega}$ ，其中 R^{ω} 为如本文所定义的杂芳基烷基基团，其可任选地被取代。

[0275] “氨基羰基”是指 $-C(O)NH_2$ 。取代的氨基羰基是指 $-C(O)NR^{\delta}R^{\delta}$ ，其中氨基 $NR^{\delta}R^{\delta}$ 如本文所定义。

[0276] “卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴和碘。

[0277] “羟基”是指 $-OH$ 。

[0278] “氰基”是指 $-CN$ 。

[0279] “烷基硫代”是指 $-S-R^{\eta}$ 。其中 R^{η} 是烷基，典型的烷基硫代包括，但不限于，甲基硫代、乙基硫代、正丙基硫代，以及类似的。

[0280] “磺酰基”是指 $-SO_2-$ 。取代的磺酰基是指 $-SO_2R^k$ ，其中 R^k 是烷基、芳基或如下文所述的其它适合的取代基。

[0281] “烷基磺酰基”是指 $-SO_2R^k$ ，其中 R^k 是如本文所定义的烷基基团。

[0282] “芳基磺酰基”是指 $-SO_2R^k$ ，其中 R^k 是如本文所定义的芳基基团。

[0283] “亚磺酰基”是指 $-S(O)R^{\lambda}$ ，其中 R^{λ} 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合的)和杂环(通过环碳键合的)。

[0284] “烷基亚磺酰基”是指 $-S(O)R^{\lambda}$ ，其中 R^{λ} 为如本文所定义的烷基基团。

[0285] “芳基亚磺酰基”是指 $-S(O)R^{\lambda}$ ，其中 R^{λ} 为如本文所定义的芳基基团。

[0286] “氨基磺酰基”是指 $-SO_2NH_2$ 。取代的氨基磺酰基是指 $-SO_2NR^{\delta}R^{\delta}$ ，其中氨基基团 $-NR^{\delta}R^{\delta}$ 如本文所定义。

[0287] “卤代烷基”是指其中氢原子中的一个或多个被卤素代替的烷基基团。因此，术语“卤代烷基”意指包括单卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基等，直至全卤代烷基。例如，表述“(C₁-C₂)卤代烷基”包括1-氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、1-氟乙基、1,1-二氟乙基、1,2-二氟乙基、1,1,1-三氟乙基、全氟乙基等。

[0288] “杂芳基”是指1个至10个包含1个和10个碳原子和在环内的选自氧、氮和硫的1个至4个包含1个和4个杂原子的芳族杂环基团。此类杂芳基基团可具有单个环(例如，吡啶基或呋喃基)或多个稠环(例如，吡啶基或苯并噻吩基)。

[0289] “杂芳基烷基”是指被杂芳基取代的烷基，即，杂芳基-烷基-基团，优选具有在烷基部分中的1个至6个包含1个和6个碳原子和在杂芳基部分中的5个至12个包含5个和12个环原子。此类杂芳基烷基由吡啶基甲基以及类似的举例说明。

[0290] “杂芳基烯基”是指被杂芳基取代的烯基，即，杂芳基-烯基基团，优选具有在烯基部分中的2个至6个包含2个和6个碳原子和在杂芳基部分中的5个至12个包含5个和12个环原子。

[0291] “杂芳基炔基”是指被杂芳基取代的炔基，即，杂芳基-炔基-基团，优选具有在炔基部分中的2个至6个包含2个和6个碳原子和在杂芳基部分中的5个至12个包含5个和12个环原子。

[0292] “杂环”、“杂环的”和可互换的“杂环烷基”是指具有单环或多个稠环，2个至10个包含2个和10个碳环原子和在环内的选自氮、硫或氧的1个至4个包含1个和4个杂环原子的饱

[0299] “保护基团”是指当连接到分子中的反应性官能团时掩蔽、减少或阻止该官能团的反应性的原子团。通常,保护基团可在合成过程中根据需要被选择性地除去。保护基团的实例可见于Wuts和Greene,“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis,”第4版,Wiley Interscience (2006),以及Harrison等人,Compendium of Synthetic Organic Methods,第1-8卷,1971-1996,John Wiley&Sons,NY。可以具有保护基团的官能团包括但不限于,羟基、氨基和羧基。代表性的氨基保护基团包括但不限于,甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基、苄基、苄氧羰基(“CBZ”)、叔丁氧羰基(“Boc”)、三甲基甲硅烷基(“TMS”)、2-三甲基甲硅烷基-乙烷磺酰基(“SES”)、三苯甲基和取代的三苯甲基、烯丙氧基羰基、9-芴基甲氧基羰基(“Fmoc”)、硝基-芴基氧基羰基(“Nvoc”)以及类似的。代表性的羟基保护基团包括但不限于,其中羟基被酰化的那些(例如,甲基和乙基酯、乙酸酯或丙酸酯基团或乙二醇酯)或其中羟基被烷基化的那些诸如苄基和三苯甲基醚,以及烷基醚、四氢吡喃醚、三烷基甲硅烷基醚(例如,TMS或TIPPS基团)和烯丙基醚。其它保护基团可以见于本文引用的参考文献。

[0300] 工程化酮还原酶多肽

[0301] 酮还原酶(KRED)或羰基还原酶生物催化剂(EC1.1.1.184)可用于由醛和酮合成醇,并且由相应的前立体异构的酮底物合成光学活性仲醇。KRED还可催化逆反应,即将醇底物氧化为相应醛/酮产物。通过KRED的醛和酮的还原以及醇的氧化使用辅因子,最常见的是用于氧化反应的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP+)。NADH和NADPH作为电子供体,而NAD⁺和NADP⁺作为电子受体。

[0302] KRED可发现于各种各样的细菌和酵母中(关于综述参见,例如,Kraus和Waldman, Enzyme catalysis in organic synthesis卷1&2.VCH Weinheim 1995;Faber,K., Biotransformations in organic chemistry,第4版,Springer,Berlin Heidelberg New York.2000;Hummel和Kula Eur.J.Biochem.1989 184:1-13)。已报告了很多KRED基因和酶序列,包括:木兰假丝酵母(*Candida magnoliae*) (Genbank登录号JC7338;GI:11360538);近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*) (Genbank登录号BAA24528.1;GI:2815409)、赭色掷孢酵母(*Sporobolomyces salmonicolor*) (Genbank登录号AF160799;GI:6539734);克菲尔乳杆菌(Genbank登录号AAP94029.1;GI:33112056);短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) (Genbank登录号1NXQ_A;GI:30749782);和布氏热厌氧菌(*Thermoanaerobium brockii*) (Genbank登录号P14941;GI:1771790)。

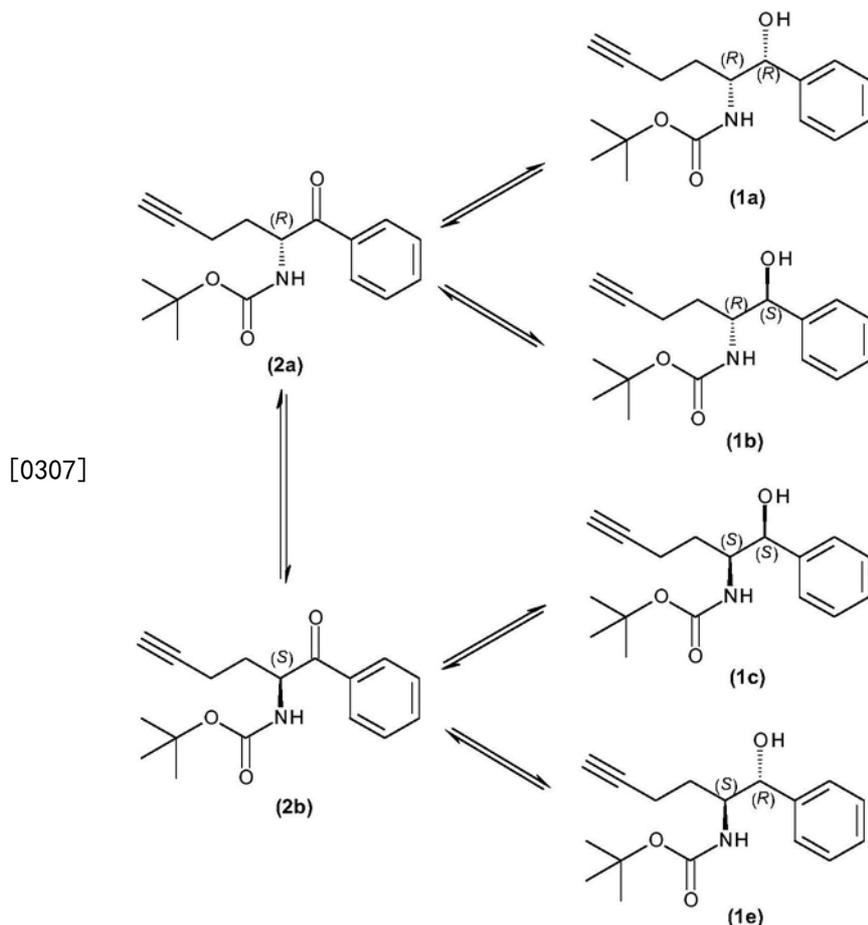
[0303] 酮还原酶的立体选择性已应用于制备重要的药物构建块(pharmaceutical building block)(参见例如Broussy等人,2009,Org Lett.11(2):305-308)。天然存在的或工程化的KRED在产生有用化合物的生物催化方法中的特定应用已针对以下被证明:4-氯乙酰乙酸酯的还原(Zhou,J.Am.Chem.Soc.1983 105:5925-5926;Santaniello,J.Chem.Res.(S)1984:132-133;美国专利号5,559,030;美国专利号5,700,670和美国专利号5,891,685)、二氧代羧酸的还原(例如,美国专利号6,399,339)、(S)-氯-5-羟基-3-氧代己酸叔丁酯的还原(例如,美国专利号6,645,746和WO 01/40450)、基于吡咯并三嗪的化合物的还原(例如,美国申请号2006/0286646);取代的苯乙酮的还原(例如,美国专利号6,800,477);以及酮基硫代坊的还原(WO 2005/054491)。

[0304] 如本文中讨论的,(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯为在基于羟甲

基吡咯烷的 β_3 -肾上腺素能受体激动剂的合成中的中间体(例如, W02009124167和W02009124166,通过引用并入本文)。天然存在的和先前工程化的KRED不能有效地将底物化合物(2), (1-氧代-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯, 转化为产物化合物(1), (1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯, 如在上述方案1所示。然而, 本公开内容描述了在进行方案1的转化中具有改进的特性的非天然存在的(即, 工程化的)KRED的开发。这些改进的特性包括, 增加的活性, 对某些非对映异构体的增加的选择性, 增加的稳定性(例如, 热和溶剂), 高百分比底物转化率(特别是, 在高底物载量的存在下), 增强的多肽表达, 及其各种改进组合以及其他。

[0305] 对于本文描述的目的, 对本领域技术人员来说化合物(2)具有两个手性中心, 并且可以至少两个不同的非对映异构形式(例如, 化合物(2a)和(2b))存在将是明显的。因此, 通过酮还原酶的还原可导致产物的至少四种不同的立体异构形式(例如, 化合物(1a)、(1b)、(1c)和(1d)), 如方案3中所示。

[0306] 方案3



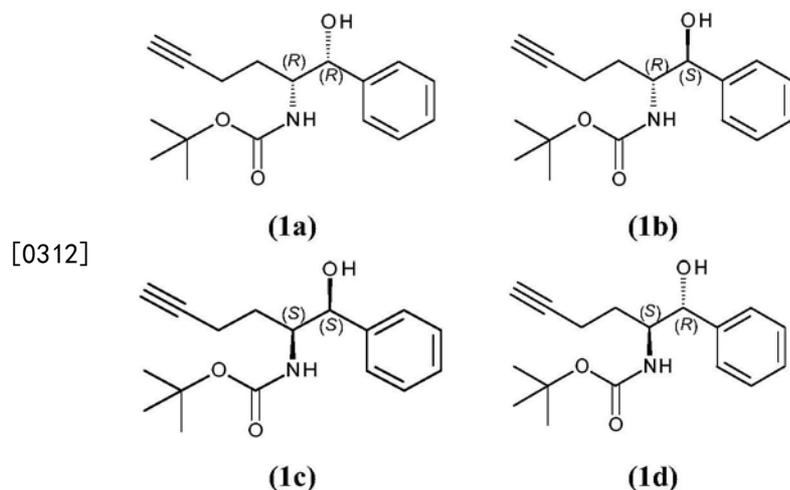
[0308] 因此, 如本文所用, 提及化合物(2)或其结构类似物而没有提及任何特定的立体异构结构, 是指为本文公开的工程化酮还原酶的底物的化合物(例如, 化合物(2a)和(2b))的立体异构体形式的任何混合物(包括外消旋混合物)或纯制剂。类似地, 提及任何指示的产物化合物(1)或其结构类似物而没有提及特定立体异构结构是指在酮还原酶反应中形成的产物化合物(1)(例如, 化合物(1a)、(1b)、(1c)、和(1d))的立体异构体形式的任何混合物。此外, 本公开内容的工程化酮还原酶还可进行逆反应, 以将化合物(1)转化为化合物(2)的相

应的酮,并且促进两种底物化合物(2a)和(2b)之间的平衡,如方案2中所示。

[0309] 本公开内容的非天然存在的多肽是与SEQ ID NO:2的天然存在的酮还原酶或SEQ ID NO:4的工程化酮还原酶相比具有改进的特性的工程化酮还原酶。工程化酮还原酶多肽适于将化合物(2)有效转化为化合物(1)且与SEQ ID NO:2的天然存在的酮还原酶或SEQ ID NO:4的参考工程化酮还原酶多肽相比具有一个或多个残基差异,其相对于来自克菲尔乳杆菌的SEQ ID NO:2的天然存在的酮还原酶具有以下11个氨基酸差异:A94G、S96V、E145F、F147M、L153T、Y190P、L195M、V196L、L199Y、I226V、和Y249W。这些残基差异与酶性能中的改进,特别是增加的活性、增加的立体选择性、增加的稳定性、以及对底物和/或产物浓度的增加的耐受性(例如,降低的产物抑制)相关。

[0310] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下将底物化合物(2)转化为化合物(1),具有相对于SEQ ID NO:4的参考多肽的活性增加至少约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍或更多倍的活性。在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下在约48小时、约36小时、约24小时或甚至更短时间长度的反应时间内将化合物(2)的底物转化为化合物(1),具有至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、或至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%的百分比转化率。

[0311] 在一些实施方案中,本文所描述的工程化酮还原酶多肽在适当的反应条件下相比于对反式化合物(1b)和(1d),展现对顺式化合物(1a)和(1c)的非对映选择性。



[0313] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够以相比于反式化合物(1b)和(1d)(即,[1b+1d])的大于10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、或100:1或更大的非对映体比将化合物(2)转化为顺式化合物(1a)和(1c)(即,[1a+1c])。在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下以相比于化合物(1b)和(1d)(即,[1b+1d])的大于50:1的非对映体比将底物化合物(2)转化为产物化合物(1a)和(1c)(即,[1a+1c])。

[0314] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶能够以相比于化合物(1c)的非对映体过量(in diastereomeric excess over compound(1c))将底物化合物(2)转化为产物化合物(1a)。在一些实施方案中,工程化酮还原酶能够在适当的反应条件下以相比于化合物(1c)的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大的非对映体过量将化合

物(2)转化为化合物(1a)。

[0315] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽相比于对化合物(1a)和(1c),展现对化合物(1b)和(1d)的非对映选择性。因此,在一些实施方案中,工程化酮还原酶能够在适当的反应条件下将化合物(2)转化为非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的化合物(1b)和(1d)。

[0316] 如下面进一步讨论的,工程化酮还原酶的非对映选择性和在底物化合物之间的平衡可用于动态动力学拆分方法以制备过量的某些非对映体,并且在一些情况下,制备非对映体或非对映体的基本上纯的制剂。

[0317] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下以相对于SEQ ID NO:4的参考多肽对底物存在的增加的耐受性将化合物(2)转化为化合物(1)。因此,在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够在适当的反应条件下在约72h、约48h、约36h、约24h或甚至更短的时间长度的反应时间内以至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%的百分比转化率在以下的底物载量浓度的存在下将化合物(2)的底物转化为化合物(1):至少约1g/L、5g/L、10g/L、20g/L、约30g/L、约40g/L、约50g/L、约70g/L、约100g/L、约125g/L、约150g/L、约175g/L或约200g/L或更多。

[0318] 工程化多肽的上面描述的改进特性在其下进行转化的适当的反应条件可关于多肽、底物、辅因子、缓冲液、共溶剂的浓度或量、pH和/或包括温度及反应时间的条件来确定,如下面和实施例中进行进一步描述的。

[0319] 用于将化合物(2)转化为化合物(1)的与其改进特性相关的示例性工程化多肽包括与SEQ ID NO:4相比在以下残基位置上的一个或多个残基差异:X7;X17;X23;X27;X29;X40;X60;X64;X71;X87;X94;X95;X96;X105;X113;X122;X127;X131;X144;X145;X147;X150;X152;X153;X157;X173;X195;X196;X198;X199;X206;X208;X216;X221;X243;X245;和X249。在与表2A、2B和2C的示例性多肽的改进特性相关的这些位置的每一个上的特定氨基酸差异包括:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X40R;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X206F;X206L;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0320] 本公开内容的示例性工程化酮还原酶多肽的结构与功能信息显示于下面表2A、2B和2C中。奇数序列标识符(即,“SEQ ID NO:”)是指编码由偶数的SEQ ID NO提供的氨基酸序列的核苷酸序列,并且该序列被提供在伴随该公开内容的电子序列列表文件中,该序列列表文件在此通过引用并入本文。氨基酸残基差异是基于与SEQ ID NO:4的参考多肽序列比较,SEQ ID NO:4的参考多肽序列为相对于克菲尔乳杆菌的天然存在的酮还原酶(SEQ ID NO:2)具有以下11个氨基酸差异的工程化酮还原酶多肽:A94G、S96V、E145F、F147M、L153T、Y190P、L195M、V196L、L199Y、I226V、和Y249W。“顺式:反式非对映体比”(本文中还称为“d.r.”)为两种可能的顺式非对映体产物化合物(1a)和化合物(1c)与两种可能的反式非对映体产物化合物(1b)和化合物(1d)的比。非对映体比可由式 $[1a+1c]/[1b+1d]$ 来计算。

[0321] 在本文酮还原酶的筛选中,发现SEQ ID NO:4的工程化多肽以 >100 的d.r.(在反应条件E下)将化合物(2)转化为化合物(1a)和(1c),但具有比选择的在将底物化合物(2)转化为产物化合物(1a)和(1c)中具有改进特性的工程化酮还原酶更低的活性。因此,SEQ ID

NO:4的工程化多肽被用作在将底物化合物(2)转化为产物化合物(1a)和(1c)时具有增加的活性以及具有较高的d.r.的工程化多肽的进一步进化的起点。各工程化多肽的活性使用高通量(HTP)测定(作为初级筛选)来确定。表2A中的HTP测定值,使用大肠杆菌澄清细胞溶解产物以~200 μ L体积/孔的96孔板格式,根据如表中标注的测定反应条件来确定。在某些情况下,使用次级摇瓶粉(SFP)和/或下游处理(DSP)粉测定来评估工程化酮还原酶的特性。SFP和DSP形式提供工程化多肽的更纯的粉制剂。例如,SFP制剂中的工程化酮还原酶是总蛋白的约30%。表2B中的SFP测定值使用在2mL小瓶格式中的工程化多肽的SFP使用表中标注的反应条件来确定。表2C中的DSP测定值使用在2mL或5mL小瓶格式中的工程化多肽的DSP粉使用表中标注的反应条件来确定。HTP、SFP和DSP制备和测定的更多细节被描述于实施例中。

[0322] 表2A

SEQ ID NO: (nt/aa)	氨基酸差异 (相对于 SEQ ID NO: 4)	活性 (相对于 SEQ ID NO: 4)	测定 ¹
3/4	n/a	1.0	i
5/6	V96L	4.4	i
7/8	M195A	3.5	i
9/10	M206F	4.9	i
17/18	H40R; G94P; M206F	112.7	ii
19/20	H40R; V95M; M206F	81.3	ii
21/22	H40R; I144V; M206F	77.5	ii
23/24	H40R; L196M; M206F	77.0	ii
25/26	H40R; D198S; M206F;	323.8	ii
27/28	H40R; A64V; V87L; M147Q; Y199H; M206F;	137.8	ii
29/30	H40R; A64V; M147Q; Y199H; M206F	121.4	ii
33/34	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; T122A; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; W249Y	25190.1	iii
35/36	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; M206F; W249F	23882.6	iii
37/38	L17M; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; N157C; L196M; D198S; Y199H; M206F; W249F	22691.3	iii
39/40	L17R; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; D198S; M206F	10801.3	iii
41/42	L17Q; I23V; H40R; A64V; T71P; V87L; G94P; V95M; I144V; M147I; T153G; N157C; L196M; D198S; M206F; W249F	29528.6	iii
43/44	L17R; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; I144V; D150Y; L196M; D198S; M206F	11467.5	iii
45/46	V96Y	1.5	i

[0323]

[0324]

47/48	F145L	2.1	i
49/50	M195G	13.8 (相对 d.r.)	i
51/52	M206L	2.3	i
53/54	Y199H	2.4	i
55/56	L17Q; H40R; M206F	346.6	ii
57/58	L17R; H40R; M206F	248.1	ii
59/60	E29G; H40R; T71P; M206F	49.1	ii
61/62	H40R; G94A; M206F	68.9	ii
63/64	H40R; G94S; M206F	107.6	ii
65/66	H40R; N131S; M206F	35.5	ii
67/68	H40R; D150Y; M206F	48.7	ii
69/70	H40R; T152G; M206F	55.7	ii
71/72	H40R; N157C; M206F	313.9	ii
73/74	H40R; M195G; M206F	500.9 (相对 d.r.)	ii
75/76	H40R; V113I; M206F	19.0	ii
77/78	H40R; L196M; M206F	74.2	ii
79/80	H40R; M206F; W249G	27.5	ii
81/82	L17M; H40R; A64V; V87L; V96Y; M147L; Y199H; M206F	154.8	ii
83/84	L17M; H40R; V87L; M147L; D173L; Y199H; M206F	202.6	ii
85/86	L17M; H40R; A64V; V87L; M147Q; D173L; Y199H; M206F	587.4	ii
87/88	L17M; H40R; V87L; V96L; Y199H; M206F	147.9	ii
89/90	L17M; H40R; V96L; M147Q; M206F	90.5	ii
91/92	L17M; H40R; A64V; V87L; V96Y; M147Q; Y199H; M206F	71.4	ii
93/94	L17M; H40R; V87L; V96L; M147Q; Y199H; M206F	100.3	ii
95/96	H40R; V96L; M147Q; D173L; M206F	38.6	ii
97/98	H40R; Y199H; M206F	63.6	ii
99/100	H40R; V87L; M147Q; D173L; M206F	27.3	ii
101/102	H40R; M147Q; M206F	31.7	ii
103/104	L17M; H40R; V87L; V96Y; D173L; M206F	40.8	ii
105/106	L17M; H40R; A64V; Y199H; M206F; N221S	351.6	ii
107/108	L17M; H40R; M206F	101.0	ii
109/110	L17M; H40R; A64V; V96Y; M147I; D173L; Y199H; M206F	241.2	ii
111/112	L17M; H40R; V96L; M147Q; M206F; W249Y	213.1	ii
113/114	L17M; H40R; A64V; M147Q; D173L; Y199H; M206F	242.0	ii
115/116	L17M; H40R; A64V; V87L; V96Y; M147I; D173L; M206F	257.8	ii
117/118	H40R; A64V; V87L; V96Y; M147Q; Y199H; M206F; W249Y	91.7	ii
119/120	L17M; H40R; A64V; M147Q; Y199H; M206F; W249F	612.5	ii
121/122	L17M; H40R; A64V; M147Q; D173L; M206F	211.7	ii
123/124	H40R; A64V; M147Q; D173L; Y199H; M206F	89.7	ii
125/126	L17M; H40R; A64V; M147L; M206F	267.4	ii
127/128	L17M; H40R; V87L; M147Q; Y199H; M206F	170.2	ii
129/130	L17M; H40R; A64V; V96L; M147I; Y199H; M206F;	444.1	ii
131/132	G7S; H40R; V60I; A64V; Q127R; M206F; H216R; V245I	185.7	ii
133/134	L17R; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; F243S	8985.6	iii
135/136	L17R; H40R; A64V; T71P; V87L; G94P; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; D198S; M206F	11808.6	iii
137/138	L17Q; H40R; A64V; V87L; G94P; V95M; I144V; M147I;	11931.9	iii

[0325]

	D150Y; N157C; L196M; D198S; M206F		
139/140	L17R; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; D198S; M206F; Q208R	11538.1	iii
141/142	L17Q; H40R; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; W249Y	12100.3	iii
143/144	L17M; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; W249Y	11180.5	iii
145/146	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; I144V; M147I; N157C; L196M; M206F	5635.6	iii
147/148	L17R; H40R; A64V; G94P; I144V; M147Q; D150Y; N157C; L196M; M206F	9200.2	iii
149/150	L17M; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F	8707.5	iii
151/152	L17R; H40R; T71P; V87L; G94P; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; M206F	7487.5	iii
153/154	L17M; H40R; A64V; T71P; G94P; E105G; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; Y199H; M206F	6634.1	iii
155/156	L17R; H40R; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; Y199H; M206F	5827.1	iii
157/158	L17R; H40R; A64V; G94P; V95M; I144V; D150Y; L196M; M206F; W249Y	10168.4	iii
159/160	L17Q; H40R; G94P; V95M; I144V; M147Q; L196M; D198S; Y199H; M206F; W249F	5869.0	iii
161/162	L17Q; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; Y199H; M206F	6201.2	iii
163/164	L17Q; F27L; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; I144V; M147I; L196M; D198S; M206F; W249Y	5838.0	iii
165/166	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; N157C; L196M; M206F; W249Y	5883.6	iii
167/168	L17R; H40R; T71P; V87L; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; M206F; W249F	6007.8	iii
169/170	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; L196M; D198S; M206F	5487.0	iii
171/172	L17R; H40R; A64V; G94P; V95M; I144V; N157C; L196M; Y199H; M206F; W249F	8629.4	iii
¹ HTP 测定条件:			
i: 通过在 pH 10.5 下在 300 μ L 的含有 0.2 M 硼酸盐、0.5 g/L 溶菌酶以及 0.4 g/L 硫酸多粘菌素 B 的溶解缓冲液中在 250 rpm 以及室温摇动持续 1 h 来溶解细胞。反应条件包括: 20 g/L 的底物化合物 (2)、60 μ L 来自溶解在 300 μ L 溶解缓冲液中的含有酮还原酶多肽的细胞的澄清的细胞溶解产物、30% IPA (v/v)、0.5 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 9.5 且 35 $^{\circ}$ C 下温育 24 h。			
ii: 通过在 pH 10.5 下在 300 μ L 的含有 0.2 M 硼酸盐、0.5 g/L 溶菌酶以及 0.4 g/L 硫酸多粘菌素 B 的溶解缓冲液中在 250 rpm 以及室温摇动持续 1 h 来溶解细胞。反应条件包括: 50 g/L 的底物化合物 (2)、20 μ L 来自溶解在 300 μ L 溶解缓冲液中的含有酮还原酶多肽的细胞的澄清的细胞溶解产物、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10 且 45 $^{\circ}$ C 下温育 24 h。			
iii: 通过在 pH 10.5 下在 300 μ L 的含有 0.2 M 硼酸盐、0.5 g/L 溶菌酶以及 0.4 g/L 硫酸多粘菌素 B 的溶解缓冲液中在 250 rpm 以及室温摇动持续 1 h 来溶解细胞。反应条件包括: 50 g/L 的底物化合物 (2)、40 μ L 来自溶解在 300 μ L 溶解缓冲液中的含有酮还原酶多肽的细胞的澄清的细胞溶解产物、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10 且 55 $^{\circ}$ C 下温育 24 h。			

[0326] 表2B

SEQ ID NO: (nt/aa)	氨基酸差异 (相对于 SEQ ID NO: 4)	活性 (相对于 SEQ ID NO: 4)	d.r.	测定 ²
3/4	n/a	1.0	25	A
5/6	V96L	6.5	15	A
7/8	M195A	4.5	11	A
9/10	M206F	7.0	39	A
11/12	H40R; V96L	33.0	9	B
13/14	H40R; M206F	37.4	15	B
15/16	H40R; M195A	16.0	7	B
13/14	H40R; M206F	3.5	>100	C
17/18	H40R; G94P; M206F	28.3	>100	C
19/20	H40R; V95M; M206F	18.2	83	C
21/22	H40R; I144V; M206F	18.1	55	C
23/24	H40R; L196M; M206F	36.9	>100	C
25/26	H40R; D198S; M206F	51.9	>100	C
27/28	H40R; A64V; V87L; M147Q; Y199H; M206F	27.2	51	C
29/30	H40R; A64V; M147Q; Y199H; M206F	20.0	34	C
31/32	H40R; G94P; I144V; L196M; M206F	45°C 测定时无活性	n/a	D
33/34	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; T122A; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; W249Y	345.6	>100	D
35/36	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; I44V; M147I; N157C; L196M; M206F; W249F	341.7	>100	D
37/38	L17M; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; N157C; L196M; D198S; Y199H; M206F; W249F	343.1	78	D
39/40	L17R; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; M147I; D150Y; N157C; L196M; D198S; M206F	234.4	>100	D
41/42	L17Q; I23V; H40R; A64V; T71P; V87L; G94P; V95M; I144V; M147I; T153G; N157C; L196M; D198S; M206F; W249F	341.3	83	D
43/44	L17R; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; I144V; D150Y; L196M; D198S; M206F	203.4	>100	D

²SFP 测定条件:

A: 在 2 ml 小瓶中: 5 g/L 底物化合物(2)、5 g/L 酮还原酶多肽的 SFP、30% IPA (v/v)、0.5 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 9.5 (缓冲液)且 35°C 下温育 24 h。

B: 在 2 ml 小瓶中: 5 g/L 底物化合物(2)、5 g/L 酮还原酶多肽的 SFP、30% IPA (v/v)、0.5 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 9.5 (缓冲液)且 35°C 下温育 6 h。

C: 在 2 ml 小瓶中: 40 g/L 底物化合物(2)、5 g/L 酮还原酶多肽的 SFP、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10.2 (反应)且 35°C 下温育 24 h。

D: 在 2 ml 小瓶中: 40 g/L 底物化合物(2)、2 g/L 酮还原酶多肽的 SFP、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10 (缓冲液)且 45°C 下温育 22 h。

[0327]

[0328] 表2C

SEQ ID NO: (nt/aa)	氨基酸差异 (相对于 SEQ ID NO: 4)	活性 (相对于 SEQ ID NO: 4)	d.r.	测定 ³
3/4	n/a	1.0	>100	E
9/10	M206F	6.0	>100	E
13/14	H40R; M206F	29.7	30	E
13/14	H40R; M206F	80.7	14	F
17/18	H40R; G94P; M206F	73.5	>100	F
21/22	H40R; I144V; M206F	253.1	42	F
23/24	H40R; L196M; M206F	264.0	>100	F
25/26	H40R; D198S; M206F	74.9	>100	F
31/32	H40R; G94P; I144V; L196M; M206F	470.5 45°C 测定时无活性	51 n/a	F G
[0329] 33/34	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; V95M; T122A; I144V; M147I; N157C; L196M; D198S; M206F; W249Y	1629.1	>100	G
35/36	L17Q; H40R; A64V; T71P; G94P; I144V; M147I; N157C; L196M; M206F; W249F	1620.0	>100	G
37/38	L17M; H40R; A64V; V87L; G94P; I144V; N157C; L196M; D198S; Y199H; M206F; W249F	1660.0	87	G
41/42	L17Q; I23V; H40R; A64V; T71P; V87L; G94P; V95M; I144V; M147I; T153G; N157C; L196M; D198S; M206F; W249F	1669.1	88	G
³ DSP 测定条件: E: 100 g/L 底物化合物(2)、5 g/L 酮还原酶多肽的 DSP 粉、30% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 9.5 (缓冲液)、且 35°C 下温育 24 h。 F: 40 g/L 底物化合物(2)、1 g/L 酮还原酶多肽的 DSP 粉、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10.3 (反应)、且 35°C 下温育 22 h。 G: 100 g/L 底物化合物(2)、1 g/L 酮还原酶多肽的 DSP 粉、50% IPA (v/v)、0.1 g/L NADP、0.2 M 硼酸盐、pH 10 (缓冲液)、且 45°C 下温育 22 h。				

[0330] 根据示例性多肽的特性,酶特性中的改进(例如,将化合物(2)转化为化合物(1a)和(1c)中的活性)与相比于SEQ ID NO:4在以下残基位置上的残基差异相关:X7;X17;X23;X27;X29;X40;X60;X64;X71;X87;X94;X95;X96;X105;X113;X122;X127;X131;X144;X145;X147;X150;X152;X153;X157;X173;X195;X196;X198;X199;X206;X208;X216;X221;X243;X245;和X249。在与改进特性相关的这些位置的每一个上的特定残基差异包括:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X40R;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X206F;X206L;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。在酶活性中的增加与以下残基位置上的残基差异相关:X60;X71;X94;X95;X96;X127;X144;X152;X196;X199;X206;X216;和X245。部分地影响酶活性和非对映选择性,特别是相比于化合物(1b)和(1d)形成产物化合物(1a)和(1c)的底物结合功能与在以下残基位置上的残基差异相关:X40;X94;X95;X96;X144;X145;X150;X152;X153;X157;X195;X196;X198;X199;X206;和X249。辅因子NADP结合与残基位置X40上的残基差异相关,并影响酶活性。化合物(1a)和(1c)相比于化合物(1b)和(1d)的非对映体比的增加与以下残基位置上的残基差异相关:X17;X64;X71;X87;X147;X157;X196;X206和X249。非对映体比的少许减少与残基位置X144上的残基差异相关,但d.r.的减少由

显著增加的酶活性来补偿。以相比于化合物(1a)和(1c)的非对映体过量形成化合物(1b)和(1d)的非对映选择性中的变化与X195G相关。酶稳定性的增加,特别是在增加的温度下(例如35°C下的活性对45°C下的活性),与以下残基位置上的残基差异以及其他相关:X17;X64;X71;X87;X94;X147;X147;X147;X157;X198;和X249。如本领域技术人员将理解的,前述残基位置和每个残基位置的特定氨基酸残基,可以单独或以各种组合用于合成具有所需改进特性的工程化酮还原酶多肽,所需改进特性包括酶活性、立体选择性和稳定性以及其他。

[0331] 根据本文提供的指导,可进一步设想,以下的示例性工程化多肽的任何一种:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、96、98、102、104、106、108、110、114、116、122、124、126、128、130、132、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、168、170和172,并且特别是以下的工程化多肽:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172可用于作用于合成其他工程化酮还原酶多肽的起始氨基酸序列,例如,通过添加来自表2A、2B和2C中的其他多肽以及本文描述的其他残基位置的各种氨基酸差异的新组合通过随后几轮进化。进一步的改进可以通过包括在贯穿前几轮的进化中已被保持为不变的残基位置上的氨基酸差异而产生。

[0332] 因此,在一些实施方案中,能够以多肽SEQ ID NO:4的活性的至少1.5倍将底物化合物(2)(1-氧代-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯,转化为产物化合物(1)(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯的酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与参考序列SEQ ID NO:2的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性和特征X40R和X206L或F,条件是当X206为F时,该序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0333] 在一些实施方案中,能够以多肽SEQ ID NO:4的活性的至少1.5倍将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)的酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与参考序列SEQ ID NO:2的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性和特征X40R和X206L或F,条件是当X206为F时,该序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X249F;X249G;和X249Y。

[0334] 在一些实施方案中,能够以多肽SEQ ID NO:4的活性的至少1.5倍将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)的酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与选自以下的参考序列的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且具有特征X40R和X206L或F,条件是当X206为F时,该序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y,且特别是与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X249F;X249G;和X249Y。

[0335] 在一些实施方案中,参考序列选自SEQ ID NO:4、14、36、42、和130。在一些实施方案中,参考序列为SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,参考序列为SEQ ID NO:36。在一些实施方案中,参考序列为SEQ ID NO:42。在一些实施方案中,参考序列为SEQ ID NO:130。

[0336] 在一些实施方案中,与如以上描述的参考序列具有氨基酸序列同一性的工程化酮还原酶多肽包括特征X40R和X206L。

[0337] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0338] 在一些实施方案中,与如以上描述的参考序列具有氨基酸序列同一性的工程化酮还原酶多肽包括特征X40R和X206L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。

[0339] 在一些实施方案中,与如以上描述的参考序列具有氨基酸序列同一性的工程化酮还原酶多肽包括特征X40R和X206L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X249F;X249G;和X249Y。

[0340] 在一些实施方案中,具有特征X40R和X206F,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的工程化酮还原酶多肽:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;

X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X249F;X249G;和X249Y,还可包括与SEQ ID NO:4相比选自X60I,X144V;X145L;和X245I的一个或多个残基差异。

[0341] 在一些实施方案中,具有特征X40R和X206F,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的工程化酮还原酶:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0342] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F或L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的至少一个或多个残基差异的氨基酸序列:X17Q/R/M;X64V;X94P;X144V;X147Q/I/L;X157C;和X196M。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X17Q的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X64V的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X94P的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X144V的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X147I的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X157C的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F/L以及至少X196M的氨基酸序列。在前述实施方案中的每一个中,在本文描述的其他残基位置上的另外残基差异可存在于工程化酮还原酶中。

[0343] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶包括具有与SEQ ID NO:4相比至少选自以下的残基差异组合的氨基酸序列:(a) X40R、X196M、和X206F/L;(b) X40R、X144V、和X206F/L;(c) X40R、X17H/R/Q、和X206F/L;(d) X40R、X94P、和X206F/L;(e) X40R、X198S、和X206F/L;(f) X40R、X17H/R/Q、X94P和X206F/L;(g) X40R、X71P、X157C和X206F/L;(h) X40R、X94P、X144V、X196M和X206F/L;(i) X17H/R/Q、X40R、X64V、X147I/Q/L、和X206F/L;(j) X17H/R/Q、X40R、X64V、X94P、X144V、X147I/Q/L、X157C、X196M和X206F/L;和(k) X17Q、X40R、X64V、X71P、X94P、X144V、X147I、X157C、X196M、X206F、和X249F。

[0344] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽能够将底物化合物(2)(1-氧代-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯,转化为产物化合物(1)(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯,具有相对于SEQ ID NO:4的参考多肽的活性至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍或更多倍的活性。在一些实施方案中,能够将底物化合物(2)转化为产物化合物(1),具有相对于SEQ ID NO:4的参考多肽的活性至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍或更多倍的活性的工程化酮还原酶多肽,包括具有特征H40R和

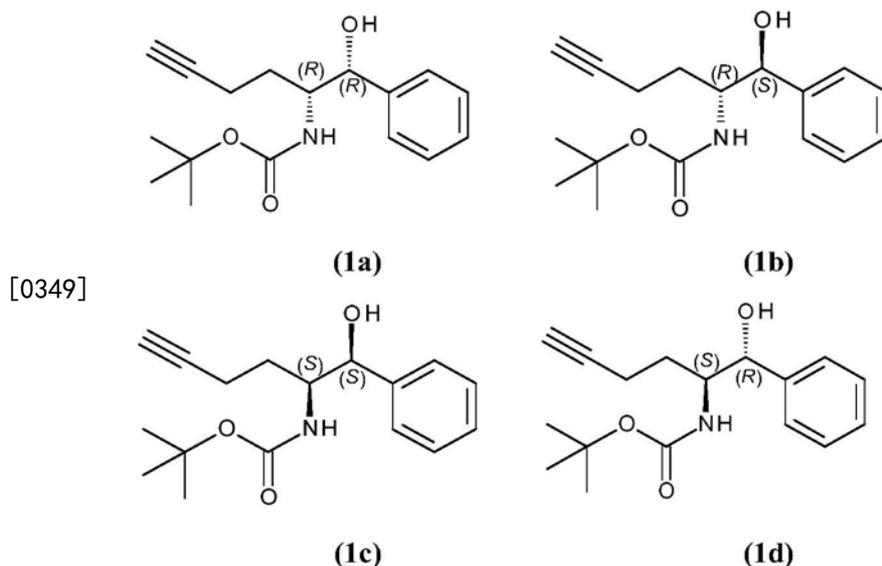
X206F或L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列:X60I; X71P; X94P; X94A; X95M; X96L; X96Y; X127R; X144V; X145I; X150Y; X152G; X153G; X157C; X195A; X195G; X196M; X198S; X199H; X206F, X216R, X245I, X245F; X249Y; 和X249F。

[0345] 在一些实施方案中,能够将底物化合物(2)转化为产物化合物(1),具有SEQ ID NO:4的参考多肽的活性的至少10倍活性的工程化酮还原酶多肽,当在HTP条件下测量时,包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、34、36、38、40、42、44、50、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0346] 在一些实施方案中,当在HTP条件下测量时,工程化酮还原酶能够以SEQ ID NO:4的活性的至少100倍活性将化合物(2)转化为化合物(1)。在一些实施方案中,能够以SEQ ID NO:4的活性的至少100倍活性将化合物(2)转化为化合物(1)的工程化酮还原酶,包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:34、36、38、40、42、44、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0347] 在一些实施方案中,能够将化合物(2)转化为化合物(1)的工程化酮还原酶与SEQ ID NO:4或32的参考多肽相比具有增加的热稳定性。在一些实施方案中,具有增加的热稳定性的工程化酮还原酶多肽包括具有与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列:X17Q; X17R; X17W; X64V; X71P; X87L; X94S; X94P; X147Q; X147I; X147L; X157C, X198S; X249Y; 和X249F。在一些实施方案中,具有增加的热稳定性的工程化酮还原酶包括具有特征H40R和X206F或L,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列:X17Q; X17R; X17W; X64V; X71P; X87L; X94S; X94P; X147Q; X147I; X147L; X157C, X198S; X249Y; 和X249F。

[0348] 在一些实施方案中,本文公开的工程化酮还原酶多肽能够形成非对映体过量于反式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯化合物(1b)和(1d)的产物顺式-(1-羟基-1-苯基己-5-炔-2-基)氨基甲酸叔丁酯化合物(1a)和(1c)



[0350] 在一些实施方案中,相比于对化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的工程化酮还原酶多肽包括具有特征X40R和X206F或L以及与SEQ ID NO:4相

比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列：X17Q；X64V；X71P；X87L；X147I；X157C；X196M；和X249F。

[0351] 如上面所提及，示例性工程化酮还原酶指示，X195G的存在改变了非对映选择性以相比于产物化合物(1a)和(1c)有利于形成产物化合物(1b)和(1d)。因此，在相比于对产物化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的工程化酮还原酶多肽的一些实施方案中，X195G的存在是不受欢迎的。

[0352] 在一些实施方案中，相比于对化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的工程化酮还原酶多肽包括选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0353] 在一些实施方案中，工程化酮还原酶能够以相比于化合物(1b)和(1d)的至少50的非对映体比形成产物化合物(1a)和(1c)。在一些实施方案中，能够以相比于化合物(1b)和(1d)的至少50的非对映体比形成产物化合物(1a)和(1c)的工程化酮还原酶包括选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、32、34、36、38、40、42和44。

[0354] 在一些实施方案中，工程化酮还原酶能够以相比于产物化合物(1c)的非对映体过量形成产物化合物(1a)。相比于对化合物(1c)具有对化合物(1a)的非对映选择性的酮还原酶的氨基酸序列具有与相比于对化合物(1b)和(1d)具有对化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的工程化酮还原酶类似的特征。因此，在一些实施方案中，相比于对化合物(1c)具有对产物化合物(1a)的非对映选择性的酮还原酶多肽包括具有特征X40R和X206F或L以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异的氨基酸序列：X17Q、X64V、X71P、X87L、X147I、X157C、X196M、和X249F。

[0355] 在一些实施方案中，能够以相比于化合物(1c)的非对映体过量形成产物化合物(1a)的工程化酮还原酶多肽包括选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0356] 在一些实施方案中，工程化酮还原酶多肽能够形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的产物化合物(1b)和(1d)。在一些实施方案中，能够形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的产物化合物(1b)和(1d)的工程化酮还原酶包括这样的氨基酸序列，该氨基酸序列具有与SEQ ID NO:4的参考序列至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性和具有特征X195G。

[0357] 在一些实施方案中，能够形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的产物化合物(1b)和(1d)的工程化酮还原酶包括具有特征X40R和X206F或L、以及X195G的氨基酸序列。

[0358] 在一些实施方案中，能够形成非对映体过量于化合物(1a)和(1c)的产物化合物(1b)和(1d)的工程化酮还原酶包括选自SEQ ID NO:50和74的氨基酸序列。

[0359] 在一些实施方案中，能够在适当的反应条件下将化合物(2)转化为化合物(1)的工

程化酮还原酶包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与以下中的一个至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性:SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,和与SEQ ID NO:4相比存在于以下中的任何一个中的氨基酸残基差异:SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。在一些实施方案中,存在于选自SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、46、48、50、52、和54的氨基酸序列中的一个或多个的残基差异明确地被排除在前述实施方案之外。

[0360] 因此,在一些实施方案中,能够在适当的反应条件下将化合物(2)转化为化合物(1)的工程化酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与以下之一的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,和与SEQ ID NO:4相比存在于以下中的任何一个中的氨基酸残基差异:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0361] 除上面指定的残基位置之外,本文所公开的任何工程化酮还原酶多肽还可以包括相对于SEQ ID NO:2或4的参考多肽序列,在其它残基位置即,除以下残基位置外的残基位置的残基差异:X7;X17;X23;X27;X29;X60;X64;X71;X87;X94;X95;X96;X105;X113;X122;X127;X131;X144;X145;X147;X150;X152;X153;X157;X173;X195;X196;X198;X199;X208;X216;X221;X243;X245;和X249。在这些其它残基位置上的残基差异可以提供氨基酸序列的另外变体而没有改变多肽将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)的能力,特别是关于用于形成化合物(1a)和(1c)的增加的活性;相比于对化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性;相比于对化合物(1c)具有对产物化合物(1a)的非对映选择性;和相比于对化合物(1a)和(1c)具有对产物化合物(1b)和(1d)的非对映选择性。因此,在一些实施方案中,除选自以下的工程化酮还原酶多肽的任何一个的氨基酸残基差异之外:SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,序列还可以包括与SEQ ID NO:4相比在其它氨基酸残基位置上的1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7

个、1-8个、1-9个、1-10个、1-11个、1-12个、1-14个、1-15个、1-16个、1-18个、1-20个、1-22个、1-24个、1-26个、1-30个、1-35个、1-40个、1-45个、或1-50个残基差异。在一些实施方案中,与参考序列相比氨基酸残基差异的数目可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、30个、30个、35个、40个、45个、或50个残基位置。在一些实施方案中,在其它氨基酸残基位置上的残基差异可以包括与SEQ ID NO:2的野生型多肽或SEQ ID NO:4的工程化酮还原酶多肽的参考序列相比的保守置换和/或非保守置换。

[0362] 相对于SEQ ID NO:2的野生型序列在其它位置上的氨基酸残基差异和这些差异对酶功能的影响针对其它工程化酮还原酶多肽被描述,该其它工程化酮还原酶多肽公开于已公布的PCT申请W02008103248、W02009029554、W02009036404、W02009042984、W02010027710、W02010025238、W02010025287、W02010025085、W0/2009/046153、W02011022548;和W02011/140219;以及2011年4月13日提交的美国临时申请号61/475,103;这些申请的每一个据此通过引用并入本文。因此,在一些实施方案中,与SEQ ID NO:2或4的序列相比的氨基酸差异中的一个或多个还可以在选自以下的残基位置上被引入到本公开内容的工程化酮还原酶多肽:X2;X3;X4;X8;X9;X10;X11;X12;X16;X19;X21;X25;X41;X42;X43;X45;X46;X49;X53;X54;X57;X60;X66;X68;X72;X74;X75;X76;X77;X78;X80;X82;X86;X93;X97;X99;X100;X101;X104;X106;X108;X109;X111;X112;X117;X120;X124;X125;X126;X129;X134;X141;X144;X145;X148;X149;X151;X155;X159;X163;X165;X169;X176;X177;X178;X179;X185;X186;X190;X192;X194;X197;X200;X201;X202;X203;X204;X205;X207;X210;X211;X212;X214;X217;X223;X225;X226;X228;X233;X235;X236;X245;X248;X250;和X251。特别地,在所述位置上的氨基酸残基的选择可以选自以下:X2A/S;X3Y/N/V;X4C;X8R/N;X9G;X10T;X11V/T/F/L;X12I;X16A/G/V/S;X19V;X21F/R;X25N/R/T;X41V/T;X42G;X43A/I/R;X45G;X46R;X49R;X53D/V;X54A;X57V;X60A/I;X66E;X68V;X72R/E/T;X74L;X75N;X76A/I;X77A;X78D;X80T/V;X82S;X86I;X93S/A/T;X97G/E/L/H/I/M/R/T/V;X99L;X100K;X101G/N;X104M;X106G/D;X108H/N/S/D/K;X109R/E;X111M;X112D;X117S/A/G;X120V;X124Q;X125S;X126V;X129T;X134M;X141V;X144V;X145D/S/L/Q/F/Y/A/M/V/K;X148I;X149F;X151A;X155C;X159T;X163I;X165T/N;X169C;X176V;X177R;X178G;X179F;X185S;X186I;X190A/C/P/H/G/F/N/L/E/I/V;X192E/R;X194D/G/N/L/Q/S/R;X197G/E/V/A;X200K/P;X201A/I/L;X202G/I/L/M/W/Y/V/F/N;X203G;X204A/V;X205T/R/V;X207C/I/N/T;X210R;X211R/I/L/T/V;X212S/V;X214T/V;X217F;X223V/G/I;X225V;X226L/T/V;X228A;X233A/G;X235W;X236R;X245I;X248K/R;X250I/Y;和X251T。对在残基位置上的氨基酸残基的选择的指导可以参见所引用的参考文献。

[0363] 在一些实施方案中,本公开内容还提供了包括本文描述的任何工程化酮还原酶多肽的片段的工程化酮还原酶多肽,该片段保留了该工程化酮还原酶的功能活性和/或改进特性。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了能够在适当的反应条件下将化合物(2)转化为化合物(1)的多肽片段,其中该片段包括本公开内容的工程化酮还原酶多肽的全长氨基酸序列的至少约80%、90%、95%、98%、或99%,工程化酮还原酶多肽诸如选自以下的示例性工程化酮还原酶多肽:SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、

84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是选自以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0364] 在一些实施方案中,本公开内容的工程化酮还原酶多肽可以具有包括本文描述的工程化酮还原酶多肽中的任一个的缺失的氨基酸序列,诸如以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是选自以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。因此,对于本公开内容的工程化酮还原酶多肽的每一个实施方案,当保留本文描述的工程化酮还原酶的相关功能活性和/或改进特性时,氨基酸序列可以包括酮还原酶多肽的一个或多个氨基酸、2个或更多个氨基酸、3个或更多个氨基酸、4个或更多个氨基酸、5个或更多个氨基酸、6个或更多个氨基酸、8个或更多个氨基酸、10个或更多个氨基酸、15个或更多个氨基酸、或20个或更多个氨基酸、多至氨基酸的总数的10%、多至氨基酸的总数的10%、多至氨基酸的总数的20%、或多至氨基酸的总数的30%的缺失。在一些实施方案中,缺失可以包括1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个、1-15个、1-20个、1-21个、1-22个、1-23个、1-24个、1-25个、1-30个、1-35个、1-40个、1-45个、或1-50个氨基酸残基。在一些实施方案中,缺失的数目可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、30个、30个、35个、40个、45个、或50个氨基酸残基。在一些实施方案中,缺失可以包括1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、18个、20个、21个、22个、23个、24个、或25个氨基酸残基的缺失。

[0365] 在一些实施方案中,本公开内容的工程化酮还原酶多肽可具有与本文描述的工程化酮还原酶多肽中的任何一个相比包括插入的氨基酸序列,工程化酮还原酶多肽诸如以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是选自以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、

128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。因此,对于本公开内容的酮还原酶多肽的每一个实施方案,当保留本文描述的工程化酮还原酶的相关功能活性和/或改进特性时,插入可以包括一个或多个氨基酸、2个或更多个氨基酸、3个或更多个氨基酸、4个或更多个氨基酸、5个或更多个氨基酸、6个或更多个氨基酸、8个或更多个氨基酸、10个或更多个氨基酸、15个或更多个氨基酸、20个或更多个氨基酸、30个或更多个氨基酸、40个或更多个氨基酸、或50个或更多个氨基酸。插入可以是酮还原酶多肽的氨基末端或羧基末端、或内部部分。

[0366] 在一些实施方案中,本公开内容提供能够在适当的反应条件下将化合物(2)转化为化合物(1)的工程化酮还原酶多肽,该工程化酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%的同一性,并且特别是选自以下的示例性工程化多肽:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,条件是,该氨基酸序列与公开于以下的示例性工程化酮还原酶多肽氨基酸序列不同(也就是,该氨基酸序列不包括公开于以下的示例性工程化酮还原酶多肽氨基酸序列):已公布的PCT申请W02008103248、W02009029554、W02009036404、W02009042984、W02010027710、W02010025238、W02010025287、W02010025085、W02009046153、W02011022548;和W02011/140219;和2011年4月13日提交的美国临时申请号61/475,103;这些申请的每一个据此通过引用并入本文。

[0367] 在上述实施方案中,用于工程化多肽的适当的反应条件可以是表2A、2B、和2C中所描述的那些条件。因此,在一些实施方案中,适当的反应条件是对HTP测定描述的那些条件,该条件包括:20或50g/L的底物化合物(2);60 μ L、20 μ L、或40 μ L含有工程化酮还原酶的细胞溶解产物;30%或50%(v/v)异丙醇;0.5g/L或0.1g/L NADP;0.2M硼酸盐;pH 9.5或pH 10;35 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C或55 $^{\circ}$ C的温育温度;和24h的反应时间。这些反应条件和酮还原酶多肽的使用的指导提供于表2A以及其他中。

[0368] 在一些实施方案中,适当的反应条件是对摇瓶粉(SFP)测定描述的那些条件,该条件包括:5g/L或40g/L底物化合物(2);5g/L或2g/L的酮还原酶多肽;30%或50%(v/v)异丙醇;0.5或0.1g/L NADP;0.2M硼酸盐;pH 9.5、10、10.2;35 $^{\circ}$ C或45 $^{\circ}$ C的温育温度;和6h或24h的反应时间。这些反应条件和酮还原酶多肽的使用的指导提供于表2B以及其他中。

[0369] 在一些实施方案中,适当的反应条件是对下游处理粉(DSP)测定描述的那些条件,该条件包括:40g/L或100g/L底物化合物(2);5g/L或1g/L的酮还原酶多肽;30%或50%(v/v)异丙醇;0.1g/L NADP;0.2M硼酸盐;pH 9.5或10;35 $^{\circ}$ C或45 $^{\circ}$ C的温育温度;和22h至24h的反应时间。这些反应条件和酮还原酶多肽的使用的指导提供于表2C以及其他中。

[0370] 在一些实施方案中,本公开内容的多肽可以是融合多肽的形式,其中工程化多肽

与其它多肽融合,诸如通过举例的方式而非限制,抗体标签(例如,myc表位)、纯化序列(例如,用于结合至金属的His标签)和细胞定位信号(例如,分泌信号)。因此,本文描述的工程化多肽可与其它多肽融合或不与其它多肽融合使用。

[0371] 应理解的是,本文描述的工程化酮还原酶多肽不限于遗传编码的氨基酸。因此,除了遗传编码的氨基酸以外,本文描述的多肽可以完全或部分由天然存在的和/或合成的非编码氨基酸组成。本文描述的多肽可包括的某些常见非编码氨基酸包括但不限于:遗传编码的氨基酸的D-立体异构体;2,3-二氨基丙酸(Dpr); α -氨基异丁酸(Aib); ϵ -氨基己酸(Aha); δ -氨基戊酸(Ava);N-甲基甘氨酸或肌氨酸(MeGly或Sar);鸟氨酸(Orn);瓜氨酸(Cit);叔丁基丙氨酸(Bua);叔丁基甘氨酸(Bug);N-甲基异亮氨酸(MeIle);苯基甘氨酸(Phg);环己基丙氨酸(Cha);正亮氨酸(Nle);萘基丙氨酸(Nal);2-氯苯丙氨酸(Ocf);3-氯苯丙氨酸(Mcf);4-氯苯丙氨酸(Pcf);2-氟苯丙氨酸(Off);3-氟苯丙氨酸(Mff);4-氟苯丙氨酸(Pff);2-溴苯丙氨酸(Obf);3-溴苯丙氨酸(Mbf);4-溴苯丙氨酸(Pbf);2-甲基苯丙氨酸(Omf);3-甲基苯丙氨酸(Mmf);4-甲基苯丙氨酸(Pmf);2-硝基苯丙氨酸(Onf);3-硝基苯丙氨酸(Mnf);4-硝基苯丙氨酸(Pnf);2-氰基苯丙氨酸(Ocf);3-氰基苯丙氨酸(Mcf);4-氰基苯丙氨酸(Pcf);2-三氟甲基苯丙氨酸(Of);3-三氟甲基苯丙氨酸(Mtf);4-三氟甲基苯丙氨酸(Ptf);4-氨基苯丙氨酸(Paf);4-碘苯丙氨酸(Pif);4-氨基甲基苯丙氨酸(Pamf);2,4-二氯苯丙氨酸(Opef);3,4-二氯苯丙氨酸(Mpcf);2,4-二氟苯丙氨酸(Opff);3,4-二氟苯丙氨酸(Mpff);吡啶-2-基丙氨酸(2pAla);吡啶-3-基丙氨酸(3pAla);吡啶-4-基丙氨酸(4pAla);萘-1-基丙氨酸(1nAla);萘-2-基丙氨酸(2nAla);噻唑基丙氨酸(taAla);苯并噻吩基丙氨酸(bAla);噻吩基丙氨酸(tAla);呋喃基丙氨酸(fAla);高苯丙氨酸(hPhe);高酪氨酸(hTyr);高色氨酸(hTrp);五氟苯丙氨酸(5ff);苯乙烯基丙氨酸(sAla);葱基丙氨酸(aAla);3,3-二苯丙氨酸(Dfa);3-氨基-5-苯基戊酸(Afp);青霉胺(Pen);1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic); β -2-噻吩基丙氨酸(Thi);蛋氨酸亚砷(Mso);N(w)-硝基精氨酸(nArg);高赖氨酸(hLys);膦酰基甲基苯丙氨酸(pmPhe);磷酸丝氨酸(pSer);磷酸苏氨酸(pThr);高天冬氨酸(hAsp);高谷氨酸(hGlu);1-氨基环戊-(2或3)-烯-4-羧酸;哌可酸(PA);氮杂环丁烷-3-羧酸(ACA);1-氨基环戊烷-3-羧酸;烯丙基甘氨酸(aOly);炔丙基甘氨酸(pgGly);高丙氨酸(hAla);正缬氨酸(nVal);高亮氨酸(hLeu);高缬氨酸(hVal);高异亮氨酸(hIle);高精氨酸(hArg);N-乙酰赖氨酸(AcLys);2,4-二氨基丁酸(Dbu);2,3-二氨基丁酸(Dab);N-甲基缬氨酸(MeVal);高半胱氨酸(hCys);高丝氨酸(hSer);羟基脯氨酸(Hyp)和高脯氨酸(hPro)。本文描述的多肽可包括的另外的非编码氨基酸对本领域技术人员将是明显的(参见,例如,在Fasman,1989,CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,CRC Press,Boca Raton,FL,在第3-70页及其中引用的参考文献中提供的多种氨基酸,全部参考文献通过引用并入本文)。这些氨基酸可以是以L-构型或D-构型。

[0372] 本领域技术人员将认识到,带有侧链保护基的氨基酸或残基还可以构成本文所描述的多肽。在这种情况下属于芳香族类别的这些受保护的氨基酸的非限制性实例包括(在括号中列出的保护基)但不限于:Arg(tos)、Cys(苄基)、Cys(硝基吡啶亚磺酰基)、Glu(δ -苄基酯)、Gln(咕吨基)、Asn(N- δ -咕吨基)、His(bom)、His(苄基)、His(tos)、Lys(fmoc)、Lys(tos)、Ser(O-苄基)、Thr(O-苄基)和Tyr(O-苄基)。

[0373] 本文所述的多肽可包括的构型上受限制的非编码氨基酸包括但不限于,N-甲基氨

基酸(L-构型);1-氨基酸环戊-(2或3)-烯-4-羧酸;哌可酸;氮杂环丁烷-3-羧酸;高脯氨酸(hPro);以及1-氨基环戊烷-3-羧酸。

[0374] 在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽可以被提供在固体支持物上,诸如膜、树脂、固体载体(solid carrier)、或其它固相材料。固体支持物可以由有机聚合物如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氟乙烯、聚乙烯氧和聚丙烯酰胺以及其共聚物和接枝物组成。固体支持物还可以是无机的,诸如玻璃、二氧化硅、可控孔度玻璃(CPG)、反相二氧化硅或金属诸如金或铂。固体支持物的结构可以呈珠、球、粒子、颗粒、凝胶、膜或表面的形式。表面可以是平面的、基本上平面的或非平面的。固体支持物可以是多孔的或非多孔的,并且可以具有溶胀的或非溶胀的性质。固体支持物可以被配置成孔、凹部或其它容器、器皿(vessel)、特征(feature)或位置(location)的形式。

[0375] 在一些实施方案中,本公开内容的具有酮还原酶活性的工程化多肽可以被固定在固体支持物上,使得它们保留它们的相对于SEQ ID NO:4的参考多肽的改进活性、立体选择性、和/或其它改进特性。在这样的实施方案中,固定的多肽可以促进化合物(2)或其结构类似物的底物生物催化转化为化合物(1)或相应结构类似物的产物(例如,如本文描述的方案1、2和3的方法中所示的),并且在反应完全后很容易保留(例如,通过保留在其上固定多肽的珠),并且然后在后续反应中再利用或回收。这样的固定的酶的方法允许更高的效率和成本降低。因此,进一步设想,使用本公开内容的工程化酮还原酶多肽的方法中的任一种,可以使用结合或固定在固体支持物上的相同的工程化酮还原酶多肽来进行。

[0376] 酶固定的方法是本领域中熟知的。可非共价地或共价地结合工程化酮还原酶多肽。用于缀合和固定酶至固体支持物(例如,树脂、膜、珠、玻璃等等)的各种方法是本领域熟知的并描述于例如:Yi等人,“Covalent immobilization of ω -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 on chitosan beads,”*Process Biochemistry* 42(5):895-898(2007年五月);Martin等人,“Characterization of free and immobilized(S)-aminotransferase for acetophenone production,”*Applied Microbiology and Biotechnology* 76(4):843-851(2007年九月);Koszelewski等人,“Immobilization of ω -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix,”*Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*,63:39-44(2010年四月);Truppo等人,“Development of an Improved Immobilized CAL-B for the Enzymatic Resolution of a Key Intermediate to Odanacatib,”*Organic Process Research&Development*,在线公布:[dx.doi.org/10.1021/op200157c](https://doi.org/10.1021/op200157c);Hermanson,G.T.,*Bioconjugate Techniques*,第二版,Academic Press(2008);Mateo等人,“Epoxy sephabeads:a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment,”*Biotechnology Progress* 18(3):629-34(2002);以及*Bioconjugation Protocols:Strategies and Methods*,In *Methods in Molecular Biology*,C.M.Niemeyer 编著,Humana Press(2004);其每个的公开内容通过引用并入本文。可用于固定本公开内容的工程化酮还原酶的固体支持物包括但不限于,包括以下的珠或树脂:具有环氧官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有氨基环氧官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有十八烷基官能团的苯乙烯/DVB共聚物或聚甲基丙烯酸酯。可用于固定本公开内容的工程化酮还原酶的示例性固体支持物包括但不限于,壳聚糖珠、Eupergit C和SEPABEAD(Mitsubishi),包括以下不同类型的

SEPABEAD:EC-EP、EC-HFA/S、EXA252、EXE119和EXE120。

[0377] 在一些实施方案中,工程化多肽可以是各种形式,例如,诸如分离的制剂,作为基本上纯的酶、用编码酶的基因转化的整个细胞、和/或作为细胞提取物和/或此类细胞的溶解产物。酶可以冻干、喷雾干燥、沉淀、或为粗浆料的形式,如下面进一步讨论的。

[0378] 在一些实施方案中,工程化多肽可以试剂盒的形式被提供。试剂盒中的多肽可以单独地存在或作为多种多肽存在。试剂盒还可以包括用于进行酶促反应的试剂、用于评估多肽活性的底物、以及用于检测产物的试剂。试剂盒还可包括试剂分配器和试剂盒的使用说明书。

[0379] 在一些实施方案中,多肽可以以阵列的形式被提供在固体支持物上,其中多肽被布置在定位上不同的位置中。阵列可用于测试用于由多肽转化的各种底物化合物。多种支持物可以配置在阵列上的不同的位置,这对于试剂的机器人递送或通过检测方法和/或仪器是可寻址的。用于缀合底物,例如膜、珠、玻璃等等的各种方法描述于Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, 第2版, Academic Press; (2008), 以及 *Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods*, In *Methods in Molecular Biology*, C.M. Niemeyer 编著, Humana Press (2004), 以及其他; 这些的公开内容通过引用并入本文。

[0380] 在一些实施方案中,本公开内容的试剂盒包括以下的阵列,其包括在不同的可寻址的位置的本文公开的多种不同的工程化酮还原酶多肽,其中不同的多肽是参考序列的不同的变体,所述变体各自具有至少一种不同的改进的酶性质。包括多种工程化多肽的这样的阵列和它们的使用方法被描述在例如W02009008908中。

[0381] 可用于制备工程化酮还原酶多肽的多核苷酸、表达载体、和宿主细胞

[0382] 在另一个方面,本公开内容提供编码本文描述的非天然存在的酮还原酶多肽的多核苷酸。这些多核苷酸可以与控制基因表达的一个或多个异源的调节序列可操作地连接,以产生能够表达酮还原酶多肽的重组的多核苷酸。包括编码工程化酮还原酶多肽的异源的多核苷酸的表达构建体可以被引入适当的宿主细胞以表达相应的多肽。

[0383] 如对本领域技术人员将是明显的,蛋白序列的可用性和相应于各种氨基酸的密码子的知识提供了对能够编码该主题多肽的所有多核苷酸的描述。当相同氨基酸由替代的或同义的密码子编码时,遗传密码的简并性允许极大数目的核酸被制出,所有这些核酸编码改进的酮还原酶。因此,如果具有具体的氨基酸序列的知识,本领域技术人员能够以不改变蛋白的氨基酸序列的方式通过仅仅变更序列的一个或多个密码子来制出许多的不同核酸。在这点上,本公开内容明确涵盖可通过选择基于可能的密码子选择的组合制出的编码本文描述的多肽的多核苷酸的每一种可能的变体,并且所有这些变体将被认为针对本文描述的任何多肽被明确地公开,所述本文描述的任何多肽包括在表2A、2B和2C中呈现的以及作为以下通过引用并入本文的序列表中公开的氨基酸序列: SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是SEQ ID NO: 18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、

128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0384] 在一些实施方案中,可以选择和/或工程化多核苷酸以包括优选地选择的密码子以适合在其中产生蛋白的宿主细胞。例如,细菌中使用的优选的密码子被用于在细菌中表达基因,例如大肠杆菌;酵母中使用的优选的密码子被用于酵母中的表达;并且哺乳动物中使用的优选的密码子被用于哺乳动物细胞中的表达。因为不是所有的密码子需要被代替以优化酮还原酶的密码子使用(例如,因为天然序列可以有优选的密码子,并可以不需要对所有的氨基酸残基使用优选的密码子),编码酮还原酶多肽的密码子优化的多核苷酸可在全长编码区的密码子位置的约40%、50%、60%、70%、80%或大于90%处含有优选的密码子。

[0385] 在一些实施方案中,多核苷酸编码能够将化合物(2)或其结构类似物转化为化合物(1)或相应的结构类似物的非天然存在的多肽,其中多肽包括具有与参考序列的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的氨基酸序列,参考序列是选自以下的参考序列:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是选自以下的参考序列:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0386] 在一些实施方案中,多核苷酸编码能够将化合物(2)或其结构类似物转化为化合物(1)或相应的结构类似物并且具有与本文描述的任何参考多肽的任何指定序列同一性的工程化酮还原酶多肽,并且包括与SEQ ID NO:2或4相比在以下残基位置上的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X40R;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X206F;X206L;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y。因此,在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与以上描述的参考多肽的任何指定序列同一性并且包括指定残基差异,包括残基差异的组的酮还原酶多肽,如本公开内容中提供的。

[0387] 在一些实施方案中,多核苷酸编码能够以多肽SEQ ID NO:4的活性的至少1.5倍将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)的酮还原酶多肽,其中多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与参考序列SEQ ID NO:2或4的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性和特征X40R和X206L或F,条件是当X206为F时,该序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y;特别是与SEQ ID NO:4相比选自以下的

一个或多个残基差异: X7S; X17M; X17Q; X17R; X23V; X27L; X29G; X64V; X71P; X87L; X94A; X94P; X94S; X95M; X96L; X96Y; X105G; X113I; X122A; X127R; X131S; X147I; X147L; X147Q; X150Y; X152G; X153G; X157C; X173L; X195A; X195G; X196M; X198S; X199H; X208R; X216R; X221S; X243S; X249F; X249G; 和X249Y。

[0388] 在一些实施方案中,多核苷酸编码包括这样的氨基酸序列的酮还原酶多肽,该氨基酸序列具有至少与SEQ ID NO:4相比选自以下的残基差异组合:(a) X40R、X196M、和X206F/L;(b) X40R、X144V、和X206F/L;(c) X40R、X17H/R/Q、和X206F/L;(d) X40R、X94P、和X206F/L;(e) X40R、X198S、和X206F/L;(f) X40R、X17H/R/Q、X94P和X206F/L;(g) X40R、X71P、X157C和X206F/L;(h) X40R、X94P、X144V、X196M和X206F/L;(i) X17H/R/Q、X40R、X64V、X147I/Q/L、和X206F/L;(j) X17H/R/Q、X40R、X64V、X94P、X144V、X147I/Q/L、X157C、X196M和X206F/L;以及(k) X17Q、X40R、X64V、X71P、X94P、X144V、X147I、X157C、X196M、X206F、和X249F。

[0389] 在一些实施方案中,多核苷酸编码能够形成非对映体过量于化合物(1b)和(1d)的产物化合物(1a)和(1c)的酮还原酶多肽。在一些实施方案中,多核苷酸编码相比于对产物化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的酮还原酶多肽,其中酮还原酶多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有特征X40R和X206F或L,以及与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X17Q; X64V; X71P; X87L; X147I; X157C; X196M; 和X249F。

[0390] 在一些实施方案中,多核苷酸编码相比于对化合物(1b)和(1d)具有对产物化合物(1a)和(1c)的非对映选择性的酮还原酶多肽,其中酮还原酶多肽包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0391] 在一些实施方案中,多核苷酸编码能够将底物化合物(2)转化为产物化合物(1),具有相对于SEQ ID NO:4的参考多肽的活性增加了至少约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍或更多倍的活性的工程化多肽,其中多肽包括这样的氨基酸序列,该氨基酸序列具有与选自以下的任何一个的参考多肽的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,条件是氨基酸序列包括与SEQ ID NO:4相比在以下的任何一个的多肽序列中:SEQ ID NO:4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,并且特别是以下的多肽序列中含有的残基差异的组的任何一个:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、

82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172,如在表2A、2B和2C中列出的。如本文中所讨论的,在一些实施方案中,参考多肽选自SEQ ID NO:4、14、36、42、和130。

[0392] 在一些实施方案中,编码酮还原酶多肽的多核苷酸选自SEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171,特别是选自以下的多核苷酸:SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171。

[0393] 在一些实施方案中,多核苷酸能够在高度严格的条件下与选自以下的多核苷酸:3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171,或其互补物;特别是选自以下的多核苷酸杂交:SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171,或其互补物,其中高度严格杂交多核苷酸编码能够以相对于SEQ ID NO:4的多肽的活性的增加了至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、5000倍、10000倍或更多倍的活性,将化合物(2)转化为化合物(1)的非天然存在的多肽。

[0394] 在一些实施方案中,多核苷酸能够在高度严格的条件下与编码包括SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列的多肽的多核苷酸杂交,该氨基酸序列具有特征X40R和X206L或F,条件是当X206L为F时,该序列还包括与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X60I;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X144V;X145L;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X245I;X249F;X249G;和X249Y,特别是与SEQ ID NO:4相比选自以下的一个或多个残基差异:X7S;X17M;X17Q;X17R;X23V;X27L;X29G;X64V;X71P;X87L;X94A;X94P;X94S;X95M;X96L;X96Y;X105G;X113I;X122A;X127R;X131S;X147I;X147L;X147Q;X150Y;X152G;X153G;X157C;X173L;X195A;X195G;X196M;X198S;X199H;X208R;X216R;X221S;X243S;X249F;X249G;和X249Y。

[0395] 在一些实施方案中,多核苷酸编码本文描述的多肽,但具有在核苷酸水平上与编码本文描述的工程化酮还原酶多肽的参考多核苷酸的约80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%或更多的序列同一性。在

一些实施方案中,参考多核苷酸选自:SEQ ID NO:3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171;特别是选自以下的多核苷酸:SEQ ID NO:17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169和171。

[0396] 编码本文公开的非天然存在的多肽的分离的多核苷酸可以多种方式操作以提供多肽的表达。在一些实施方案中,编码多肽的多核苷酸可以被提供为表达载体,其中存在一个或多个控制序列以调控多核苷酸和/或多肽的表达。取决于表达载体,所分离的多核苷酸在其插入载体中之前的操作可能是令人期望的或必要的。利用重组DNA方法修饰多核苷酸和核酸序列的技术是本领域熟知的。在Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;以及Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel.F.编著,Greene Pub.Associates,1998,更新至2010中提供了指导。

[0397] 在一些实施方案中,控制序列包括启动子、前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、信号肽序列、和转录终止子以及其他。适合的启动子可以基于使用的宿主细胞来选择。示例性细菌启动子包括大肠杆菌的乳糖操纵子、大肠杆菌的色氨酸操纵子、噬菌体 λ 、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) 琼脂酶基因(dagA)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖酶基因(sacB)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶基因(amyL)、 β -内酰胺酶基因、和tac启动子;用于丝状真菌宿主细胞的示例性启动子,包括获自以下基因的启动子:米曲霉(*Aspergillus oryzae*) TAKA淀粉酶、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*) 天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定型 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*) 葡糖淀粉酶(glaA)、米黑根毛霉脂肪酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) 乙酰胺酶和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 胰蛋白酶样蛋白酶,以及其突变体、截短的、和杂合启动子,以及示例性酵母细胞启动子可以来自以下基因:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 烯醇化酶(ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母乙醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)和酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。用于酵母宿主细胞的其它有用的启动子由Romanos等人,1992,Yeast 8:423-488描述。

[0398] 控制序列还可以是适当的转录终止子序列,转录终止子序列是由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列可操作地连接到编码多肽的核酸序列的3'末端。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子可以用于本公开内容。例如,用于丝状真菌宿主细胞的示例性转录终止子可以获自以下的基因:米曲霉TAKA淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶和尖孢镰刀菌胰蛋白酶样蛋白酶。用于酵母宿主细胞的示例性终止子可以获自以下的基因:酿酒酵母烯醇化酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)和酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。用于酵母宿主细胞的其它有用的终止子由上述Romanos等人,1992描述。

[0399] 在一些实施方案中,控制序列还可以是信号肽编码区,其编码与多肽的氨基末端连接的氨基酸序列并将编码的多肽导入细胞的分泌通路。信号序列通常取决于用于表达多肽的宿主细胞的类型。用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码区是获自以下的基因的信号肽编码区:芽孢杆菌(*Bacillus*) NC1B 11837 麦芽糖淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT、nprS、nprM)和枯草芽孢杆菌prnA。用于丝状真菌宿主细胞的示例性信号肽编码区可以为获自以下的基因的信号肽编码区:米曲霉TAKA淀粉酶、黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、特异腐质霉(*Humicola insolens*)纤维素酶和柔毛腐质霉(*Humicola lanuginosa*)脂肪酶。用于酵母宿主细胞的有用的信号肽可以来自酿酒酵母 α 因子和酿酒酵母转化酶的基因。

[0400] 加入调节序列还可以是期望的,调节序列允许关于宿主细胞的生长调节多肽的表达。调节系统的实例是引起响应化学或物理刺激物(包括调节化合物的存在)而开启或关闭基因的表达的那些调节系统。在原核宿主细胞中,适当的调节序列包括lac、tac和trp操纵子系统。在酵母宿主细胞中,适当的调节系统包括,作为实例的ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,适当的调节序列包括TAKA α -淀粉酶启动子、黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子。调节序列的其它实例是允许基因扩增的那些。在真核系统中,这些包括二氢叶酸还原酶基因,其在氨甲喋呤的存在下被扩增;和金属硫蛋白基因,其用重金属扩增。在这些情况中,编码本公开内容的多肽的核酸序列将与调节序列可操作地连接。

[0401] 其他控制序列,诸如前导序列、聚腺苷酸化序列和转录终止子序列,可以使用本领域中可用的那些(参见Sambrook,同上,和Current Protocols in Molecular Biology,同上)。

[0402] 在另一方面,本公开内容还涉及重组表达载体,取决于它们被引入的宿主的类型,重组表达载体包括编码工程化酮还原酶多肽的多核苷酸,和一种或多种表达调节区诸如启动子和终止子,复制起点等。重组表达载体可以是任何载体(例如,质粒或病毒),其可以方便地经历重组DNA程序并且可以引起多核苷酸序列的表达。载体的选择将通常取决于载体与载体将被引入的宿主细胞的相容性。载体可以是线性的或闭合的环状质粒。

[0403] 表达载体可以是自主复制载体,即,作为染色体外的实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,自主复制载体例如质粒、染色体外元件、微型染色体或人工染色体。载体可以包含用于保证自身复制的任何工具(means)。可选地,载体可以是当被引入宿主细胞时,被整合进入基因组并与其被整合进入的染色体一起复制的载体。表达载体优选地含有一个或多个可选择的标记物,其使得容易选择转化细胞。可选择的标记物是其产物提供杀生物剂或病毒抗性,对重金属的抗性,营养缺陷型的原养型对化学试剂的抗性(例如抗生素)以及类似性质的基因。

[0404] 在另一个方面,本公开内容提供了包括编码本公开内容的工程化酮还原酶多肽的多核苷酸的宿主细胞,该多核苷酸与用于在该宿主细胞中表达酮还原酶多肽的一个或多个控制序列可操作地连接。在表达由本发明的表达载体编码的酮还原酶多肽中使用的宿主细胞是本领域熟知的并且包括但不限于:细菌细胞,诸如大肠杆菌、乳杆菌(*Lactobacillus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的细胞;真菌细胞,诸如酵母细胞;昆虫细胞诸如果蝇S2细胞和夜蛾(*Spodoptera*) Sf9细胞;动物细胞诸如

CHO、COS、BHK、293和Bowes黑色素瘤细胞；以及植物细胞。示例性宿主细胞是大肠杆菌BL21和W3110。

[0405] 用于上面描述的宿主细胞的适当培养基和生长条件是本领域熟知的。可以通过本领域已知的多种方法将用于表达酮还原酶的多核苷酸引入宿主细胞中(例如,电穿孔、生物射弹粒子轰击、脂质体介导的转染、氯化钙转染和原生质体融合)。

[0406] 在本文的实施方案中,非天然存在的工程化酮还原酶多肽和编码此类多肽的核苷酸,可以使用由本领域技术人员通常使用的方法来制备。如上所提及的,天然存在的氨基酸序列和编码在产生工程化酮还原酶中使用的克菲尔乳杆菌的酮还原酶的相应的多核苷酸是作为Genban登录号AAP94029.1;GI:33112056可获得的。在一些实施方案中,亲本多核苷酸序列是密码子优化的以增强特定的宿主细胞中酮还原酶的表达。

[0407] 工程化酮还原酶多肽可以通过使编码天然存在的酮还原酶的多核苷酸经历诱变和/或定向进化方法而获得(参见,例如,Stemmer,1994,Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751;PCT公布号WO 95/22625,WO 97/0078,WO 97/35966,WO 98/27230,WO 00/42651,和WO 01/75767;美国专利号6,537,746;6,117,679;6,376,246;和6,586,182;和美国专利公布号20080220990A1和20090312196A1;这些中每一个据此通过引用并入本文)。

[0408] 可以使用的其它定向进化程序包括交错延伸过程(StEP)、体外重组(Zhao等人,1998,Nat.Biotechnol.16:258-261)、诱变PCR(Caldwell等人,1994,PCR Methods Appl.3:S136-S140)、和盒式诱变(Black等人,1996,Proc Natl Acad Sci USA 93:3525-3529)以及其他。可用于本文目的的诱变和定向进化技术也被描述在以下文献中:例如,Ling等人,1997,Anal.Biochem.254(2):157-78;Dale等人,1996,Methods Mol.Biol.57:369-74;Smith,1985,Ann.Rev.Genet.19:423-462;Botstein等人,1985,Science 229:1193-1201;Carter,1986,Biochem.J.237:1-7;Kramer等人,1984,Cell,38:879-887;Wells等人,1985,Gene 34:315-323;Minshull等人,1999,Curr Opin Chem Biol 3:284-290;Christians等人,1999,Nature Biotech 17:259-264;Cramer等人,1998,Nature 391:288-291;Cramer等人,1997,Nature Biotech 15:436-438;Zhang等人,1997,Proc Natl Acad Sci USA 94:45-4-4509;Cramer等人,1996,Nature Biotech 14:315-319;Stemmer,1994,Nature 370:389-391。所有出版物通过引用并入本文。

[0409] 在一些实施方案中,诱变处理后获得的克隆被筛选用于具有期望的酶特性的工程化酮还原酶。使用标准技术,诸如分离产物(例如,通过HPLC或GC)和通过测量分离的底物和产物的UV吸光度检测和/或通过使用串联质谱(例如,MS/MS)检测产物,可以进行测量来自表达文库的酮还原酶的酶活性。然后包括编码期望的工程化多肽的多核苷酸的克隆被分离,测序以鉴定核苷酸序列变化(如果有的话),并且用于在宿主细胞中表达酶。示例性测定提供在以下实施例中。

[0410] 当多肽的序列是已知的时,编码酶的多核苷酸可以根据已知的合成方法,例如由Beaucage等人1981,Tet Lett 22:1859-69描述的经典的亚磷酰胺方法,或由Matthes等人,1984,EMBO J.3:801-05描述的方法,通过标准的固相方法被制备。在一些实施方案中,多至约100个碱基的片段可以被单独地合成,然后连接(例如,通过酶或化学连接方法(chemical ligation method)或聚合酶介导的方法)以形成任何期望的连续序列。

[0411] 在一些实施方案中,本公开内容还提供用于制备或制造能够将化合物(2)转化为

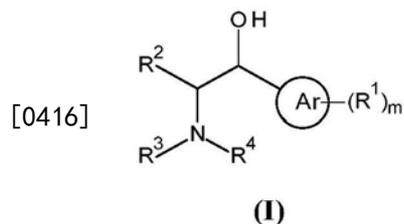
化合物(1)的非天然存在的多肽的方法,其中所述方法包括在适合表达多肽的培养条件下培养能够表达编码非天然存在的多肽的多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中,多肽可以在无细胞表达系统,例如描述于以下中的那些中表达:Kudlicki等人,Cell Free Expression,第1版,Landes Biosciences(2007)和Cell Free Protein Synthesis: Methods and Protocols,第1版,Spirin等人,编著,Wiley-VCH(2007),所有这些都通过引用并入本文。在一些实施方案中,用于制备或制造非天然存在的酮还原酶多肽的方法还包括分离多肽的步骤。非天然存在的多肽可在如以上描述的适当的细胞中表达,并使用用于蛋白纯化的熟知技术中的任何一种或多种从宿主细胞、培养基、和/或表达培养基分离(或回收),用于蛋白纯化的熟知技术包括溶菌酶处理、声处理、过滤、盐析、超离心和色谱法以及其他。用于分离酮还原酶多肽的色谱方法包括,反相色谱法、高效液相色谱法、离子交换色谱法、凝胶电泳和亲和色谱法以及其他。

[0412] 在一些实施方案中,本公开内容的非天然存在的多肽可以以各种形式来制备和使用,各种形式包括,但不限于:粗提取物(例如,无细胞溶解产物)、粉末(例如,摇瓶粉)、冻干产物、和基本上纯的制剂(例如,DSP粉),如在以下实施例中进一步阐述的。

[0413] 在一些实施方案中,非天然存在的多肽可以以纯化的方式,例如基本上纯化的方式来制备和使用。通常,用于纯化具体酶的条件将部分地取决于诸如净电荷、疏水性、亲水性、分子量、分子形状等的因素,并且对于本领域技术人员将是明显的。为了便于纯化,可以设想,在一些实施方案中,工程化酮还原酶多肽可以表达为具有纯化标签,诸如具有对金属的亲力的His-标签、或结合到抗体上的抗体标签,例如myc表位标签的融合蛋白。

[0414] 使用酮还原酶和产物化合物的方法

[0415] 在另一个方面,本文公开的工程化酮还原酶多肽可以在用于将底物化合物(2)或其结构类似物转化为化合物(1)的产物或相应的结构类似物的方法中使用。通常,化合物(1)的结构类似物包括在结构式(I)内,



[0417] 其中

[0418] Ar是5至7元碳环或杂环;

[0419] R¹的每次出现独立地选自卤素、-COOR^a、-C(O)R^b、-OR^b、-SO₂、-SR^c、-S(O)R^d、-NR^eR^f、-C(O)NR^gR^h、-NO₂、-CN、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基,其中R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g、和R^h独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基;

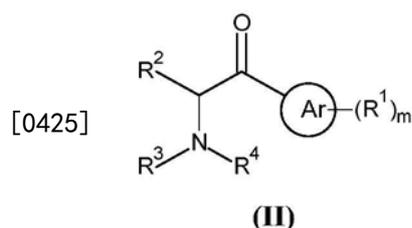
[0420] R²选自任选地取代的烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、环烷基烯基、环烷基炔基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂环烷基烯基、杂环烷基炔基、芳基、芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、杂芳基、杂芳基烷基、杂芳基烯基、杂芳基炔基、烷基硫代、烷基亚磺酰基和芳基亚磺酰基;

[0421] R^3 和 R^4 ,彼此独立地,选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、烷氧基羰基、芳基烷氧基羰基、杂芳基烷氧基羰基、和保护基团,或 R^3 和 R^4 中的一个与 R^2 形成任选地取代的5至7元杂环,以及

[0422] m 为0至10。

[0423] 在一些实施方案中,可以进行用于将化合物(2)的底物或其结构类似物转化为化合物(1)的产物或相应的结构类似物的方法,其中化合物(2)的底物为化合物(2)的氘化形式(例如,具有与化合物(2)相同的结构但化合物(2)的一个或多个氢原子被氘原子取代的分子)。药物化合物的氘化形式的一些实例描述于例如美国专利号5,846,514、6,503,921、6,613,739、和7,705,036中。类似地,用于本文描述的结构类似物的转化的方法,包括以下描述的将各种式(II)的化合物转化为相应的式(I)的化合物,可以使用这些化合物的氘化形式进行。

[0424] 因此,在一些实施方案中,用于制备式(I)的化合物的方法包括使式(II)的化合物



[0426] 其中

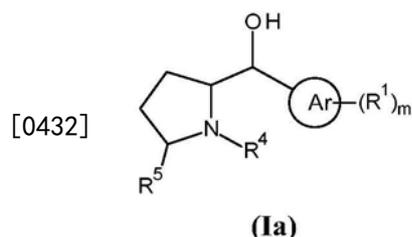
[0427] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 m 如以上定义,

[0428] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与本文公开的工程化酮还原酶多肽接触。

[0429] 在方法的一些实施方案中,Ar为5至7元芳基或杂芳基基团。在一些实施方案中,Ar选自噻吩基、苯基和吡啶基。

[0430] 在一些实施方案中, m 为1、2、3、或4。在一些实施方案中, R^1 为卤素,特别是溴或氟。在一些实施方案中,卤素基团为氟。

[0431] 在方法的一些实施方案中,式(I)的产物化合物包括式(Ia)的化合物,

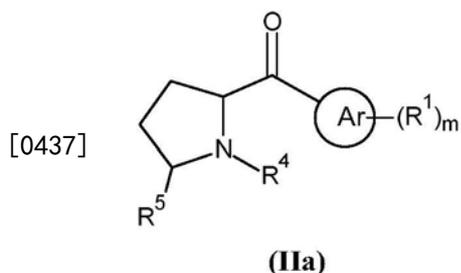


[0433] 其中

[0434] Ar、 R^1 、 R^4 和 m 如以上定义;

[0435] R^5 是任选取代的烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、环烷基烯基、环烷基炔基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基。

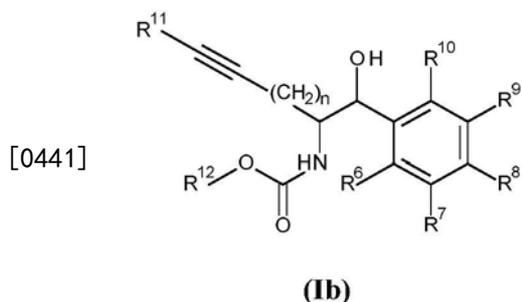
[0436] 因此,在一些实施方案中,用于制备式(Ia)的化合物的方法包括使式(IIa)的底物化合物,



[0438] 其中Ar、R¹、R⁴、R⁵和m如以上定义，

[0439] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与本文描述的工程化酮还原酶多肽接触。

[0440] 在方法的一些实施方案中，式(I)的产物化合物包括式(Ib)的化合物，



[0442] 其中

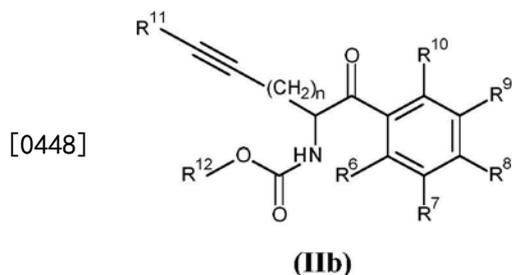
[0443] R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰各自独立地选自H、卤素、-COOR^a、-C(O)R^b、-OR^c、-SO₂、-SR^d、-S(O)R^e、-NR^fR^g、-C(O)NR^hRⁱ、-NO₂、-CN、烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，其中R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f、R^g、R^h和Rⁱ独立地选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；

[0444] n为1至4，

[0445] R¹¹选自H和任选地取代的烷基、杂烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、和杂芳基烷基；以及

[0446] R¹²选自H、任选地取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、和保护基团。

[0447] 因此，在一些实施方案中，用于制备式(Ib)的产物化合物的方法包括使式(IIb)的底物化合物，



[0449] 其中

[0450] R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²和n如以上定义，

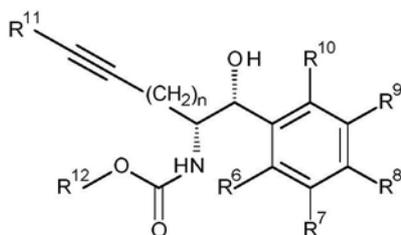
[0451] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与本文描述的工程化酮还原

酶多肽接触。

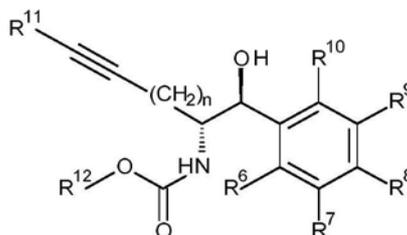
[0452] 在一些实施方案中,式 (IIb) 的化合物的 R^{11} 包括任选地取代的苯基。

[0453] 在一些实施方案中,式 (IIb) 的化合物的 n 包括2、3或4。

[0454] 在方法的一些实施方案中,式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Ib1) 和式 (Ib3) 的化合物,并且方法形成非对映体过量于式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物,

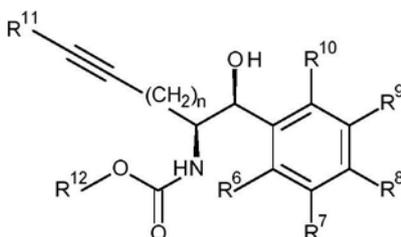


(Ib1)

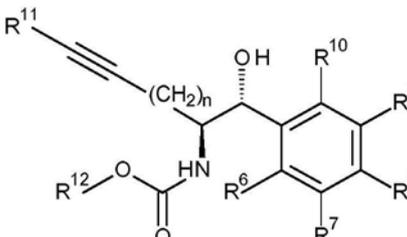


(Ib2)

[0455]



(Ib3)

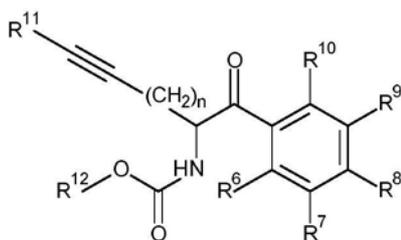


(Ib4)

[0456] 其中

[0457] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如关于式 (Ib) 中所定义。

[0458] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的化合物的方法包括使式 (IIb) 的底物化合物



[0459]

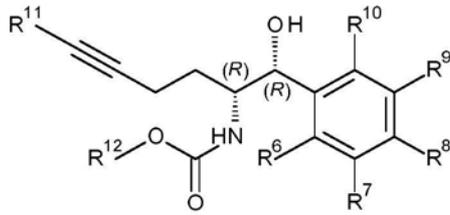
(IIb)

[0460] 其中

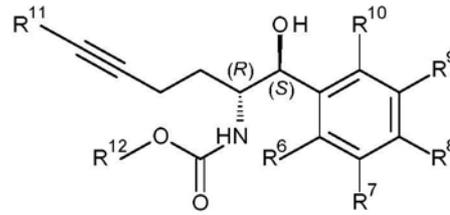
[0461] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如关于式 (Ib) 中所定义;

[0462] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物具有对式 (Ib1) 和 (Ib3) 的化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

[0463] 在方法的一些实施方案中,式 (IIb) 的化合物包括式 (IIb1) 和式 (IIb2) 的化合物的混合物

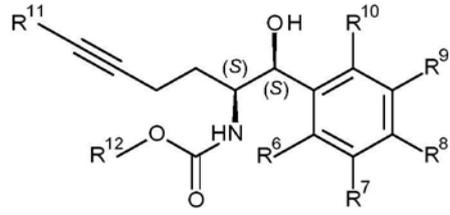


(Ic1)

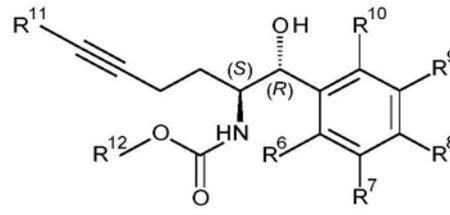


(Ic2)

[0477]



(Ic3)

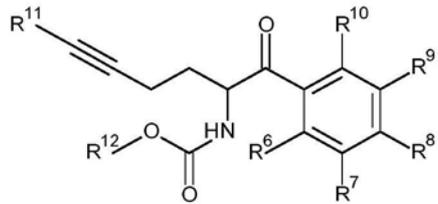


(Ic4)

[0478] 其中

[0479] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义。

[0480] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式 (Ic2) 和 (Ic4) 的化合物的式 (Ic1) 和 (Ic3) 的化合物的方法包括使式 (IIc) 的底物化合物



[0481]

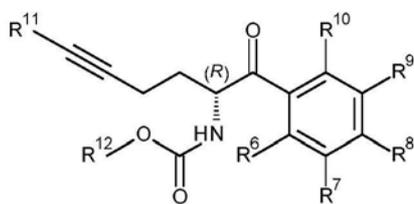
(IIc)

[0482] 其中

[0483] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义;

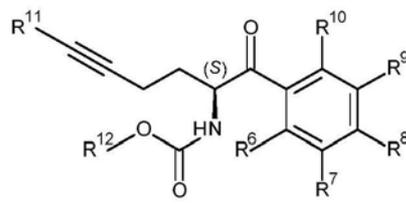
[0484] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Ic2) 和 (Ic4) 的化合物具有对式 (Ic1) 和 (Ic3) 的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶多肽接触。

[0485] 在方法的一些实施方案中,式 (IIc) 的化合物包括式 (IIc1) 和式 (IIc2) 的化合物的混合物,



[0486]

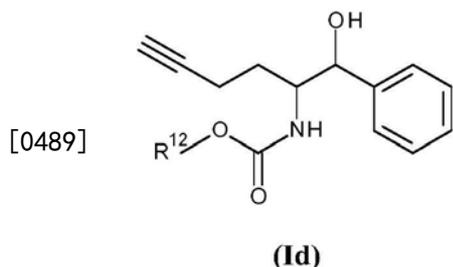
(IIc1)



(IIc2)

[0487] 在方法的一些实施方案中,式 (IIb) 的化合物包括式 (IIb1) 和式 (IIb2) 的化合物的外消旋混合物。

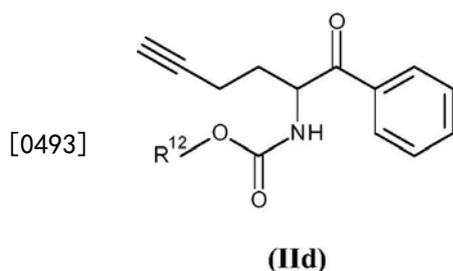
[0488] 在方法的一些实施方案中,式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Id) 的化合物,



[0490] 其中

[0491] R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义。

[0492] 因此, 在一些实施方案中, 用于制备式 (Id) 的产物化合物的方法包括使式 (IIId) 的底物化合物,

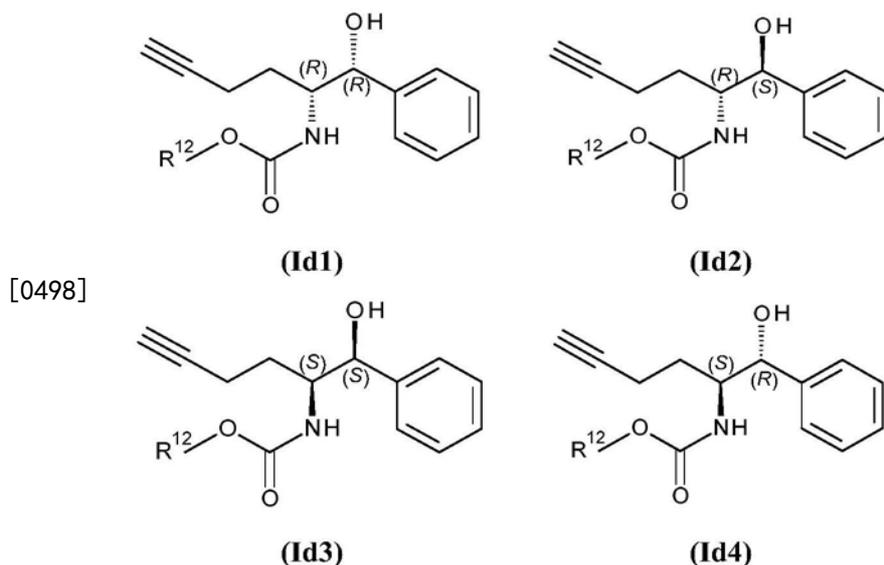


[0494] 其中

[0495] R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义;

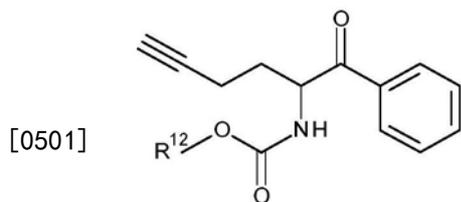
[0496] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与本文描述的工程化酮还原酶多肽接触。

[0497] 在方法的一些实施方案中, 式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Id1) 和 (Id3) 的化合物, 并且方法形成非对映体过量于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物,



[0499] 其中 R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义。

[0500] 因此, 在一些实施方案中, 用于制备非对映体过量于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物的方法包括使式 (IIId) 的底物化合物

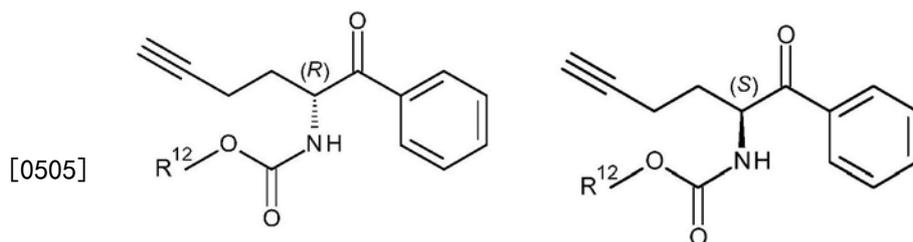


(IIId)

[0502] 其中R¹²如关于式 (Ib) 的化合物所定义；

[0503] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物具有对式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶多肽接触。

[0504] 在方法的一些实施方案中,式 (IIId) 的化合物包括式 (IIId1) 和 (IIId2) 的化合物的混合物。



(IIId1)

(IIId2)

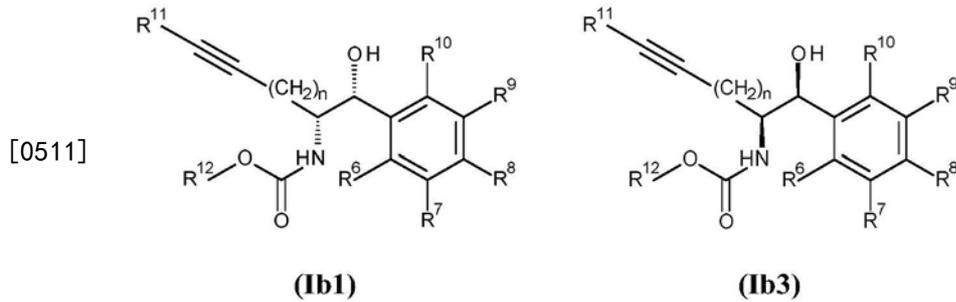
[0506] 在方法的一些实施方案中,式 (IIId) 的化合物包括式 (IIId1) 和 (IIId2) 的化合物的外消旋混合物。

[0507] 在用于以下的方法的一些实施方案中:制备非对映体过量于化合物 (Ib2) 和 (Ib4) 的式 (Ib1) 和 (Ib3) 的化合物、制备非对映体过量于化合物 (Ic2) 和 (Ic4) 的式 (Ic1) 和 (Ic3) 的化合物或制备非对映体过量于化合物 (Id2) 和 (Id4) 的式 (Id1) 和 (Id3) 的化合物,基团R¹²选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、和叔丁基。在一些实施方案中,R¹²为叔丁基。

[0508] 在一些实施方案中,相比于对式 (Ib2) 和 (Ib4) 的产物化合物具有对式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物的非对映选择性的示例性工程化酮还原酶包括这样的酮还原酶多肽,该酮还原酶多肽包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0509] 在以上方法的一些实施方案中,以相比于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的至少50的非对映体比形成式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物。在一些实施方案中,能够以相比于式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物的至少50的非对映体比形成式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物的示例性工程化酮还原酶包括这样的多肽,该多肽包括选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:18、20、22、24、26、28、32、34、36、38、40、42和44。

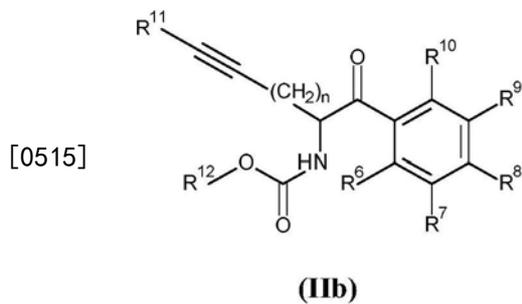
[0510] 在方法的一些实施方案中,式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Ib1) 的化合物,并且形成非对映体过量于式 (Ib3) 的化合物的式 (Ib1) 的产物化合物



[0512] 其中

[0513] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上提供的。在一些实施方案中, n 选自2、3或4。在一些实施方案中, n 为2。在一些实施方案中, n 为2且 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 为H。

[0514] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式(Ib3)的化合物的式(Ib1)的化合物的方法包括使式(IIb)的底物化合物

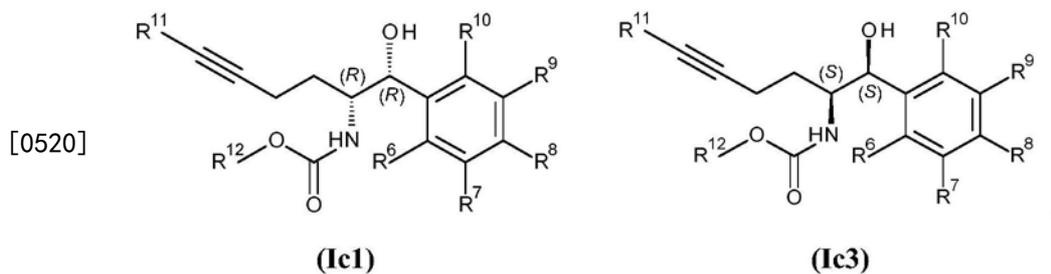


[0516] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式(Ib3)的化合物具有对式(Ib1)的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

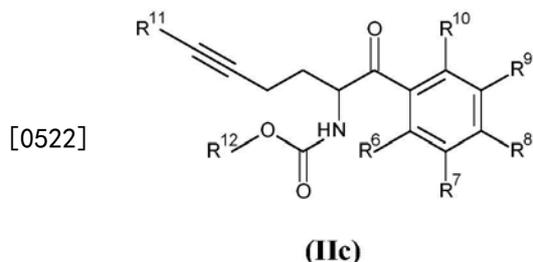
[0517] 在用于制备非对映体过量于式(Ib3)的化合物的式(Ib1)的化合物的方法的一些实施方案中,底物化合物(IIb)包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的混合物。

[0518] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物(IIb)包括式(IIb1)和(IIb2)的化合物的外消旋混合物。

[0519] 在方法的一些实施方案中,式(Ib1)的产物化合物包括式(Ic1)的化合物,并且形成非对映体过量于式(Ic3)的化合物的式(Ic1)的化合物



[0521] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式(Ic3)的化合物的式(Ic1)的化合物的方法包括使式(IIc)的底物化合物



[0523] 其中

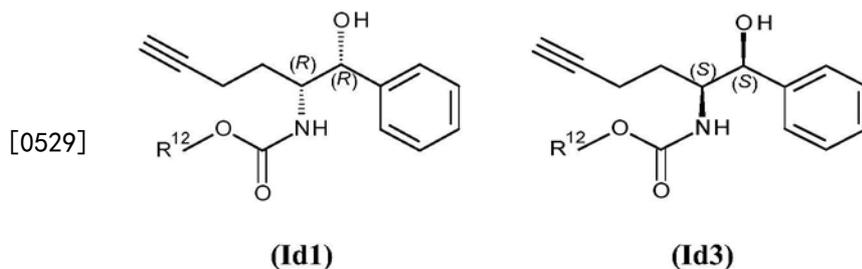
[0524] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、和 R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义；

[0525] 在适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Ic3) 的化合物具有对式 (Ic1) 的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

[0526] 在用于制备非对映体过量于式 (Ic3) 的化合物的式 (Ic1) 的化合物的方法的一些实施方案中,底物化合物 (IIc) 包括式 (IIc1) 和 (IIc2) 的化合物的混合物。

[0527] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物 (IIc) 包括式 (IIc1) 和 (IIc2) 的化合物的外消旋混合物。

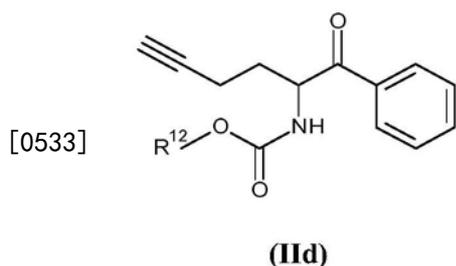
[0528] 在方法的一些实施方案中,式 (Ib) 的产物化合物包括式 (Id1) 的化合物,并且形成非对映体过量于式 (Id3) 的化合物的式 (Id1) 的化合物



[0530] 其中

[0531] R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义。

[0532] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式 (Id3) 的化合物的式 (Id1) 的化合物的方法包括使式 (IIId) 的底物化合物



[0534] 其中

[0535] R^{12} 如关于式 (Ib) 的化合物所定义；

[0536] 在适当的反应条件下在NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Id3) 的化合物具有对式 (Id1) 的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触。

[0537] 在用于制备非对映体过量于式 (Id3) 的化合物的式 (Id1) 的化合物的方法的一些实施方案中,式 (IIId) 的化合物包括式 (IIId1) 和 (IIId2) 的底物化合物的混合物。

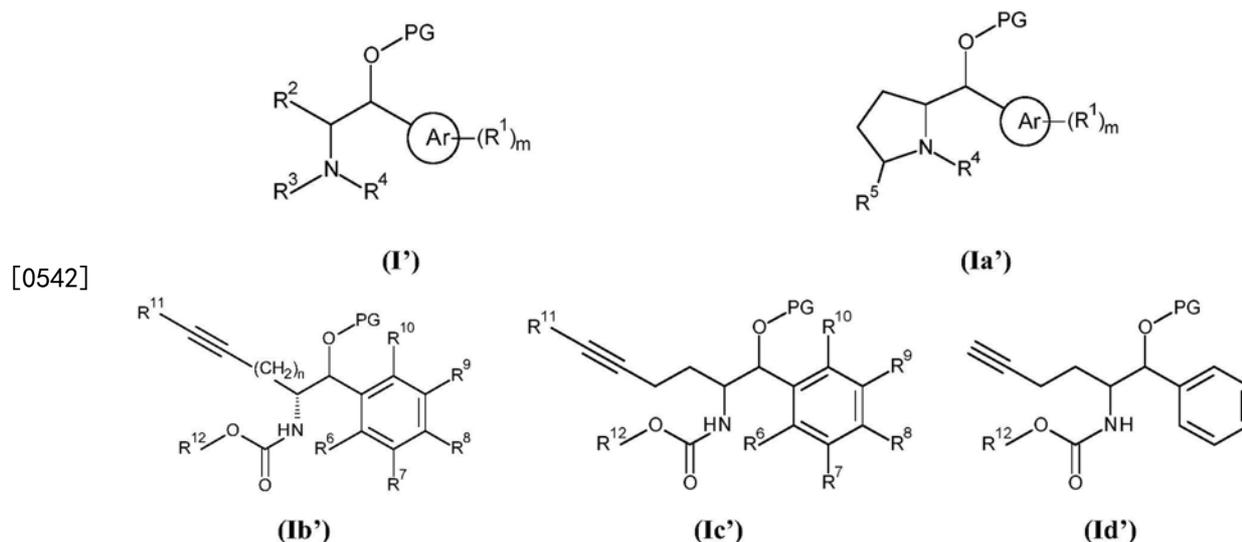
[0538] 在方法的一些实施方案中,式 (IIId) 的化合物包括式 (IIId1) 和 (IIId2) 的底物化合

物的外消旋混合物。

[0539] 在用于以下的方法的一些实施方案中：制备非对映体过量于式 (Ib3) 的化合物的式 (Ib1) 的化合物、制备非对映体过量于式 (Ic3) 的化合物的式 (Ic1) 的化合物、或制备非对映体过量于式 (Id3) 的化合物的式 (Id1) 的化合物，基团 R^{12} 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、和叔丁基。在一些实施方案中， R^{12} 为叔丁基。

[0540] 在一些实施方案中，相比于对式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物具有对式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物、相比于对式 (Ic2) 和 (Ic4) 的化合物具有对式 (Ic1) 和 (Ic3) 的产物化合物、相比于对式 (Id2) 和 (Id4) 的化合物具有对式 (Id1) 和 (Id3) 的产物化合物的非对映选择性的示例性工程化酮还原酶包括这样的多肽，该多肽包括选自以下的氨基酸序列：18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、56、58、60、62、64、66、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170和172。

[0541] 在一些实施方案中，可以修饰酮还原酶反应的产物化合物以在药物化合物合成中提供其他有用的中间体。因此，在一些实施方案中，可以加工产物化合物的羟基基团以具有保护基团。此类保护的产物化合物，包括以下式 (I')、(Ia')、(Ib')、(Ic')、和 (Id') 的化合物：



[0543] 其中

[0544] Ar 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、和 R^{12} 如先前所定义；且

[0545] PG 为保护基团。

[0546] 因此，在一些实施方案中，用于制备化合物 (I')、(Ia')、(Ib')、(Ic')、或 (Id') 的方法可包括分别用保护基团修饰产物化合物 (I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)、或 (Id) 的步骤。

[0547] 在以上的实施方案中，其中取代基包括保护基团，该保护基团可以是相关官能团的任何适合的保护基团。例如，胺保护基团可选自叔丁氧羰基 (Boc)、9-芴甲氧羰基 (Fmoc)、三氯乙基氯甲酸酯基 (Troc)、对甲氧基苄基羰基 (Moz)、3,4-二甲氧基苄基 (DMPM)、对甲氧基苄基 (Pmb)、甲苯磺酰基 (Ts) 和苄氧羰基 (Cbz) 以及其他。羧基保护基团可选自烷基酯 (例如，叔丁基酯)、芳基烷基酯 (例如，苄酯)、甲硅烷基酯、和噁唑啉以及其他。羟基保护基团可

选自烷氧基(例如,甲基醚)、烷氧基烷基(例如,甲氧基甲基醚:MOM)、甲氧基乙氧基甲基醚(MEM)、甲基硫甲基醚(MTM)、苄氧基甲基醚(BOM)、四氢吡喃基醚(THP)、对甲氧基苄基醚(PMB)甲基、三苯甲基醚、甲氧基三苯甲基醚和甲硅烷基醚(例如,三甲基甲硅烷基醚:TMS)以及其他。其他适合的保护基团描述于Wuts和Greene中,“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis,”第4版,Wiley Interscience (2006),通过引用并入本文。

[0548] 在本文和实施例中所示的实施方案中,本公开内容涵盖可以在方法中使用的适当的反应条件的范围,包括但不限于:pH、温度、缓冲液、溶剂系统、底物载量、底物化合物立体异构体的混合物、多肽载量、辅因子载量、压力和反应时间的范围。用于使用本文所述的工程化酮还原酶多肽进行用于将底物化合物生物催化转化为产物化合物的方法的另外的适当的反应条件可易于通过常规实验来优化,常规实验包括但不限于:使工程化酮还原酶多肽与底物化合物在浓度、pH、温度、溶剂条件的实验反应条件下接触,并且例如使用本文提供的实施例中描述的方法检测产物化合物。

[0549] 考虑到例如,产物化合物的需要量、底物浓度对酶活性的影响、酶在反应条件下的稳定性、以及底物至产物的百分比转化率,反应混合物中的底物化合物可以变化。在方法的一些实施方案中,适当的反应条件包括以下的底物化合物载量浓度:至少约1至约200g/L、约10g/L至约200g/L、约20g/L至约200g/L、约40g/L至约200g/L、约50g/L至约200g/L、约75g/L至约200g/L、约100g/L至约200g/L、约125g/L至约200g/L、约150g/L至约200g/L或约75g/L至约150g/L。在一些实施方案中,适当的反应条件包括以下的底物化合物载量浓度:至少约1g/L、约10g/L、约20g/L、约40g/L、约50g/L、约75g/L、约100g/L、约125g/L、约150g/L、约175g/L、或约200g/L、或甚至更大。本文中提供的底物载量的值是基于化合物(2)的分子量;然而还设想,等摩尔量的化合物(2)的各种水合物和盐还可以在方法中被使用。此外,由式(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)、和(II d)的化合物涵盖的底物化合物,还可以根据针对化合物(2)使用的量以及相关溶剂的条件以适当的量被使用。

[0550] 本公开内容的工程化酮还原酶多肽的改进的活性和/或立体选择性提供其中可以以工程化多肽的较低浓度实现较高百分比转化率的方法。其还降低残留蛋白的量,该残留蛋白可能需要在用于纯化产物化合物(例如,化合物(1))的随后步骤中被除去。在方法的一些实施方案中,适当的反应条件包括以下的工程化酮还原酶多肽浓度:约0.1至约20g/L、约0.1至约10g/L、约0.5至约10g/L、约1.0至约10g/L、约0.1至约5g/L、约0.1至约2g/L、约0.1至约1g/L。在方法的一些实施方案中,适当的反应条件包括以下的工程化酮还原酶多肽浓度:约20g/L或更少、约15g/L或更少、约10g/L或更少、约5g/L或更少、约4g/L或更少、约2g/L或更少、约1g/L或更少、约0.5g/L或更少、约0.2g/L或更少、或约0.1g/L。

[0551] 在酮还原酶反应的过程中,反应混合物的pH可以变化。反应混合物的pH可以被维持在期望的pH或在期望的pH范围内。这可以通过在反应的过程之前和/或期间加入酸或碱来实现。可选地,pH可以通过使用缓冲液来控制。因此,在一些实施方案中,反应条件包括缓冲液。用于维持期望的pH范围的适当的缓冲液是本领域已知的且包括,通过举例的方式而非限制,硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、三乙醇胺缓冲液和类似缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液是硼酸盐。在一些实施方案中,适当的反应条件包括硼酸盐的缓冲溶液,其中硼酸盐浓度是从约0.01至约0.4M、约0.05至约0.4M、约0.1至约0.3M、或约0.1至约0.2M。在一些实施方案中,反应条件包括以下的硼酸盐浓度:约0.01、约0.02、约0.03、约

0.04、约0.05、约0.07、约0.1、约0.12、约0.14、约0.16、约0.18、约0.2、约0.3、或约0.4M。在一些实施方案中，反应条件包括作为适当的溶剂的水，没有缓冲液存在。

[0552] 在方法的一些实施方案中，反应条件可以包括适当的pH。如上所提及的，期望的pH或期望的pH范围可以通过使用酸或碱、适当的缓冲液、或缓冲液和酸或碱添加的组合来维持。反应混合物的pH可以在反应的过程之前和/或期间被控制。在一些实施方案中，适当的反应条件包括约6至约12的pH、约6至约11的pH、约7至约11的pH、或约7至约10的pH、约8至约10的pH、约9至约10的pH、或约8至约9.5的pH、或约8至约9的pH的溶液pH。在一些实施方案中，反应条件包括约6、约6.5的pH、约7的pH、约7.5的pH、约8的pH、约8.5的pH、约9的pH、约9.5的pH、约10的pH、约10.5的pH、约11的pH、约11.5的pH、或约12的pH的溶液pH。本领域普通技术人员可以通过考虑，通过示例的方式而非限制，酮还原酶的稳定性和活性、底物和产物的稳定性、和辅因子的稳定性，使用适当的pH或pH范围。

[0553] 在本文方法的实施方案中，例如，考虑到：在较高的温度下反应速率的增加、对于反应中的酶的活性的增加、以及如下文进一步描述的，用于动态动力学拆分反应的底物非对映体的平衡（例如，消旋）的增加速率，适当的温度可以用于反应条件。例如，本公开内容的工程化多肽具有相对于天然存在的酮还原酶多肽例如SEQ ID NO:2的野生型多肽以及在一些实施方案中SEQ ID NO:32的工程化酮还原酶的增加的稳定性，其允许工程化多肽以较高的温度用于反应的增加的转化率和改进的底物可溶性特性。因此，在一些实施方案中，适当的反应条件包括以下的温度：约20℃至约60℃、约25℃至约60℃、约30℃至约60℃、约35℃至约60℃、约40℃至约60℃、约45℃至约60℃、约45℃至约55℃、或约50℃至约55℃。在一些实施方案中，适当的反应条件可包括环境温度（例如，25℃）或以下的温度：约27℃、约30℃、约32℃、约35℃、约37℃、约40℃、约45℃、约50℃、约55℃或约60℃的温度。在一些实施方案中，酶促反应过程中的温度可以在整个反应过程中保持在一个温度。在一些实施方案中，酶促反应过程中的温度可以在反应过程中按温度曲线调节。

[0554] 方法通常在溶剂中进行。适当的溶剂包括水、缓冲水溶液、有机溶剂、和/或共溶剂系统，共溶剂系统通常包括水性溶剂和有机溶剂。适当的溶剂包括水、缓冲水溶液、有机溶剂、和/或共溶剂系统，共溶剂系统通常包括水性溶剂和有机溶剂。水性溶剂（水或水性的共溶剂系统）可以是pH缓冲的或无缓冲的。在一些实施方案中，使用工程化酮还原酶多肽的方法通常在包括有机溶剂（例如，乙醇、异丙醇（IPA）、二甲基亚砜（DMSO）、乙酸乙酯、乙酸丁酯、1-辛醇烷、庚烷、辛烷、甲基叔丁基醚（MTBE）、甲苯以及类似物）、离子液体（例如，1-乙基-4-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓六氟磷酸盐以及类似物）的水性共溶剂系统中进行。水性共溶剂系统的有机溶剂组分可以是与水性组分易混溶的，提供单一的液相，或可以是与水性组分部分地易混溶的或不易混溶的，提供两个液相。示例性的水性共溶剂系统包括水和一种或多种有机溶剂。大体上，水性共溶剂系统的有机溶剂组分被选择为使得其不使酮还原酶完全失活。适当的共溶剂系统可以通过使用酶活性测定，如本文描述的那些，用确定的感兴趣的底物在候选溶剂系统中测量特定的工程化酮还原酶的酶促活性来容易地确定。

[0555] 在方法的一些实施方案中，适当的反应条件包括水性共溶剂，该水性共溶剂包括以下浓度的DMSO：约1%至约50%（v/v）、约1至约40%（v/v）、约2%至约40%（v/v）、约5%至约30%（v/v）、约10%至约30%（v/v）、或约10%至约20%（v/v）。在方法的一些实施方案中，

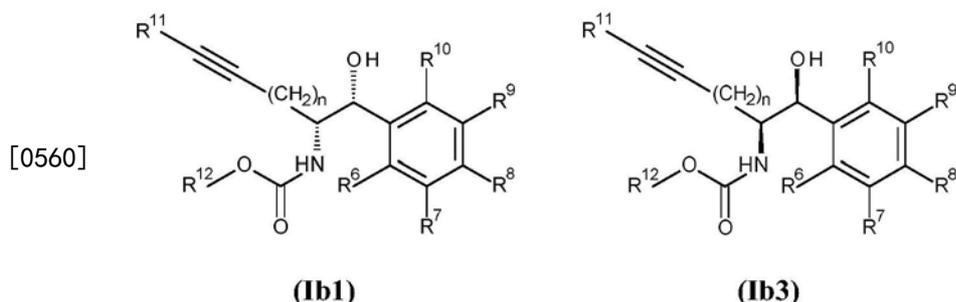
适当的反应条件包括水性共溶剂,该水性共溶剂包括至少约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、或约50% (v/v) 的浓度的DMSO。

[0556] 在一些实施方案中,方法可在包括缓冲水溶液、有机溶剂、或共溶剂系统的反应条件下进行。在一些实施方案中,缓冲溶液为,例如,约0.025M至约0.25M硼酸盐的硼酸盐。在一些实施方案中,共溶剂系统包括约95%至约5% (v/v) 的缓冲水溶液(例如,约0.2M硼酸盐),和约5% (v/v) 至约95% (v/v) 的有机溶剂溶液,例如,异丙醇。在一些实施方案中,共溶剂系统包含约30% (v/v) 至约70% (v/v) 的缓冲水溶液(例如,约0.2M硼酸盐),约70% (v/v) 至约30%的有机溶剂溶液(例如,IPA)。在一些实施方案中,反应条件包括作为适当的溶剂的水,没有缓冲液存在。

[0557] 在一些实施方案中,共溶剂系统包括缓冲水溶液和IPA,其中IPA浓度为约5%至约95% (v/v)、约10%至约90% (v/v)、约15%至约90% (v/v)、约20%至约90% (v/v)、约25%至约80% (v/v)、约25%至约75% (v/v)、约35%至约75% (v/v)、约45%至约75% (v/v)、约55%至约75% (v/v)、约60%至约70% (v/v)、或约60%至约65% (v/v)。在一些实施方案中,IPA浓度为至少约25% (v/v)、至少约35% (v/v)、至少约45% (v/v)、至少约55% (v/v)、约60% (v/v)、约65% (v/v)、约70% (v/v)、约75% (v/v)、约80% (v/v)、约85% (v/v)、约90% (v/v) 或约95% (v/v)。在一些实施方案中,反应条件包括0.2M硼酸盐缓冲剂和约60% (v/v) 至70% (v/v) IPA的共溶剂系统。在一些实施方案中,反应条件包括以下的共溶剂系统:约0.2M硼酸盐缓冲剂和约90% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约85% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约80% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约75% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约70% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约65% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约65% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约60% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约55% (v/v) IPA、约0.2M硼酸盐缓冲剂和约50% (v/v) IPA。

[0558] 如以上所描述,使用工程酮还原酶多肽将各种底物化合物转化为其相应产物化合物的方法可利用底物化合物,例如化合物(IIc1)和(IIc2)的立体异构体的平衡和本文公开的工程化酮还原酶多肽的高立体选择性以进行动态动力学拆分(DKR)动态,还称为动力学不对称转化(DKAT),由此形成的特定立体异构体或立体异构体的量比存在于反应开始时的相应立体异构体底物或底物,例如,化合物(IIc1)和化合物(IIc2)的量。

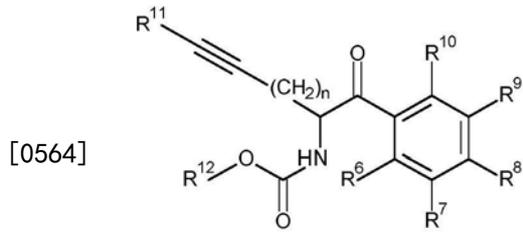
[0559] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式(Ib3)的化合物的式(Ib1)的化合物的方法



[0561] 其中

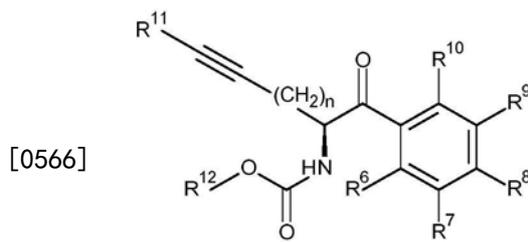
[0562] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 n 如以上关于式(Ib)的化合物所定义;

[0563] 包括使式(IIb)的底物化合物

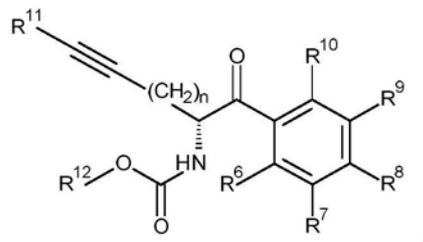


(IIb)

[0565] 在用于平衡式 (IIb1) 和 (IIb2) 的底物化合物的适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式 (Ib2) 和 (Ib4) 的化合物具有对式 (Ib1) 和 (Ib3) 的产物化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触



(IIb1)

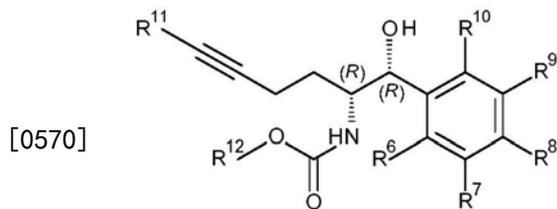


(IIb2)

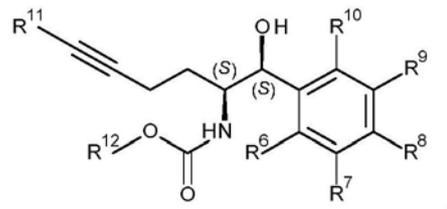
[0567] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物 (IIb) 包括式 (IIb1) 和 (IIb2) 的化合物的混合物。

[0568] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物 (IIb) 包括式 (IIb1) 和 (IIb2) 的化合物的外消旋混合物。

[0569] 在方法的一些实施方案中,式 (Ib1) 的产物化合物包括式 (Ic1) 的化合物,并且形成非对映体过量于式 (Ic3) 的化合物的式 (Ic1) 的产物化合物

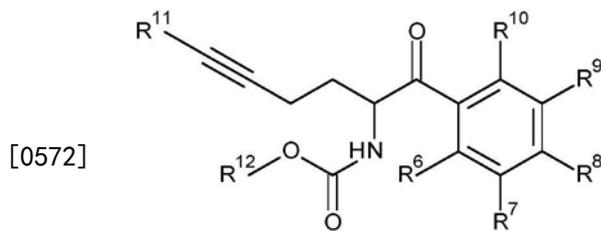


(Ic1)



(Ic3)

[0571] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式 (Ic3) 的化合物的式 (Ic1) 的化合物的方法包括使式 (IIc) 的底物化合物

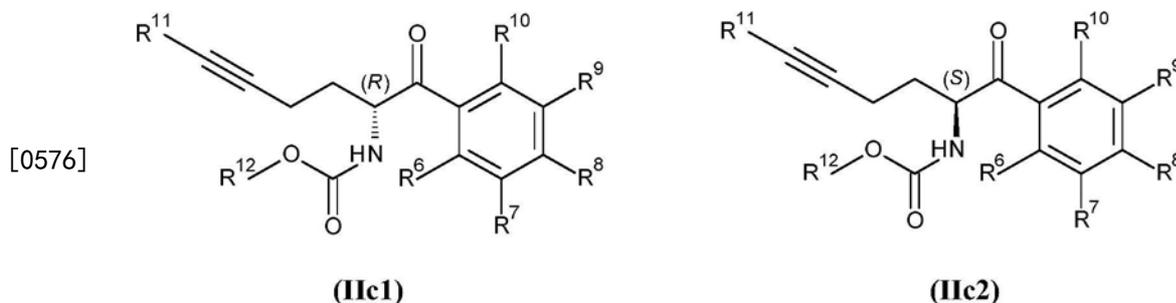


(IIc)

[0573] 其中

[0574] R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 如关于式(Ib)的化合物所定义；

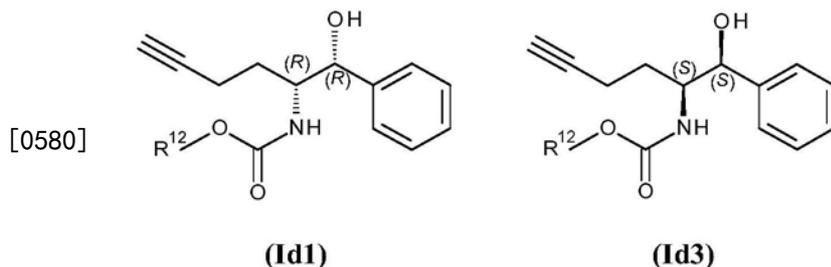
[0575] 在用于平衡式(IIc1)和(IIc2)的底物化合物的适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式(Ic2)和(Ic4)的化合物具有对式(Ic1)和(Ic3)的化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触



[0577] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物(IIc)包括式(IIc1)和式(IIc2)的化合物的混合物。

[0578] 在以上方法的一些实施方案中,底物化合物(IIc)包括式(IIc1)和式(IIc2)的化合物的外消旋混合物。

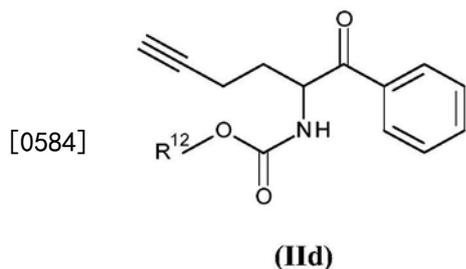
[0579] 在方法的一些实施方案中,式(Ib)的产物化合物包括式(Id1)的化合物,并且形成非对映体过量于式(Id3)的化合物的式(Id1)的产物化合物



[0581] 其中

[0582] R^{12} 如关于式(Ib)的化合物所定义。

[0583] 因此,在一些实施方案中,用于制备非对映体过量于式(Id3)的化合物的式(Id1)的化合物的方法包括使式(IIId)的底物化合物



[0585] 在用于平衡式(IIId1)和(IIId2)的底物化合物的适当的反应条件下在辅因子NADPH或NADH的存在下与相比于对式(Id2)和(Id4)的化合物具有对式(Id1)和(Id3)的化合物的非对映选择性的工程化酮还原酶接触

金属催化剂和还原剂(例如,分子氢或甲酸)的化学辅因子再生系统还可以是适合的。参见,例如,PCT公布WO 2000/053731,其通过引用并入本文。

[0594] 在一些实施方案中,辅因子再生系统包括葡萄糖脱氢酶(GDH),其是分别将D-葡萄糖和NAD⁺或NADP⁺催化转化为葡糖酸和NADH或NADPH的NAD⁺或NADP⁺-依赖性酶。适合于在实践本文方法中使用的葡萄糖脱氢酶包括天然存在的葡萄糖脱氢酶以及非天然存在的葡萄糖脱氢酶。编码天然存在的葡萄糖脱氢酶的基因已报告于文献中,例如,枯草芽孢杆菌61297GDH基因、蜡状芽孢杆菌ATCC14579和巨大芽孢杆菌。例如使用诱变、定向进化等产生的非天然存在的葡萄糖脱氢酶提供于PCT公布WO2005/018579,和美国公布号2005/0095619和2005/0153417中。所有这些序列通过引用并入本文。

[0595] 在一些实施方案中,辅因子再生系统包括甲酸脱氢酶,其是分别将甲酸盐和NAD⁺或NADP⁺催化转化为二氧化碳和NADH或NADPH的NAD⁺或NADP⁺-依赖性酶。适合于在本文描述的酮还原酶反应中用作辅因子再生系统的甲酸脱氢酶包括天然存在的甲酸脱氢酶以及非天然存在的甲酸脱氢酶。适合的甲酸脱氢酶描述于通过引用并入本文的PCT公布WO 2005/018579中。甲酸盐可以以盐,通常碱盐或铵盐的形式(例如,HCO₂Na、KHCO₂NH₄以及类似的),以甲酸,通常甲酸水溶液或其混合物的形式来提供。碱或缓冲液可以用于提供所需的pH。

[0596] 在一些实施方案中,辅因子再生系统包括仲醇脱氢酶,其是分别将仲醇和NAD⁺或NADP⁺催化转化为酮和NADH或NADPH的NAD⁺或NADP⁺-依赖性酶。适合于用作辅因子再生系统的仲醇脱氢酶包括天然存在的酮还原酶以及非天然存在的酮还原酶。天然存在的仲醇脱氢酶包括来自以下的已知的醇脱氢酶,例如并非限制:布氏热厌氧菌(*Thermoanaerobium brockii*)、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、克菲尔乳杆菌、和短乳杆菌,且非天然存在的仲醇脱氢酶包括由此衍生的工程化醇脱氢酶。在一些实施方案中,可以使用为了热稳定性或溶剂稳定性而工程化的非天然存在的酮还原酶。此类酮还原酶描述于本申请和专利申请US 20080318295A1、US 20090093031A1、US 20090155863A1、US 20090162909A1、US 20090191605A1、US 20100055751A1、WO/2010/025238A2、WO/2010/025287A2、和US 20100062499A1;其中每一个通过引用并入本文。

[0597] 如从本公开内容将是明显的,本文描述的工程化酮还原酶能够将IPA转化为丙酮以分别再生辅因子NADH/NADPH或NAD⁺/NADP⁺。因此,在用于进行将化合物(2)或其结构类似物转化为化合物(1)或其相应的结构类似物的方法的一些实施方案中,辅因子再生系统的酮还原酶是本公开内容的工程化酮还原酶多肽,并且使用仲醇作为还原剂以回收在反应混合物中的NADPH或NADH辅因子。

[0598] 辅因子再生系统中有用的适合的仲醇,包括低级仲烷醇和芳基烷基甲醇。示例性低级仲醇包括,但不限于,异丙醇、2-丁醇、3-甲基-2-丁醇、2-戊醇、3-戊醇、3,3-二甲基-2-丁醇,以及类似的。在一些实施方案中,仲醇是异丙醇(IPA)。适合的芳基-烷基甲醇包括未取代的和取代的1-芳基乙醇。

[0599] 在一些实施方案中,方法可以在反应过程中没有添加NADPH或NADH辅因子且没有任何其他酶系统存在(例如,葡萄糖脱氢酶或甲酸脱氢酶)时进行。

[0600] 在一些实施方案中,本公开内容的方法可以在其中除了工程化酮还原酶多肽之外不存在辅因子再循环酶下进行。例如,反应条件可以包括约45-75% (v/v)的IPA浓度、约0.01-0.5g/L的NADPH或NADH辅因子载量,且其中除了工程化酮还原酶多肽外不存在辅因子

再循环酶。

[0601] 在其中辅因子再循环系统产生挥发性产物,诸如来自异丙醇的丙酮的一些实施方案中,可以除去挥发性产物,例如,通过用非反应性气体喷射反应溶液或通过应用真空降低反应压力以除去气相中存在的挥发性产物。非反应性气体是不与反应组分反应的任何气体。各种非反应性气体包括氮气和稀有气体(例如,惰性气体)。在一些实施方案中,非反应性气体是氮气。例如,由异丙醇氧化形成的丙酮可以通过用氮气喷射反应溶液或对反应溶液应用真空且通过丙酮阱,诸如冷凝器或其他冷阱从气相中除去丙酮来除去。

[0602] 在本文的实施方案中,在方法中使用的酮还原酶多肽和任选的辅因子再生系统的任何另外的酶可以以纯化的酶、用编码酶的基因转化的全细胞、和/或细胞提取物和/或此类细胞的溶解产物的形式加入至反应混合物中。

[0603] 在一些实施方案中,编码酮还原酶多肽的基因和任选的辅因子再生酶可以单独转化进入宿主细胞或一起转化进入表达酶的相同宿主细胞。用编码工程化酮还原酶酶的基因转化的全细胞和/或任选的辅因子再生酶,或细胞提取物和/或其溶解产物,可以以各种不同的形式来被采用,包括固体(例如,低压冻干、喷雾干燥以及类似的)或半固体(例如,粗制糊)。在一些实施方案中,可将转化的细胞固定在固体支持物上,并通过使固定的细胞与底物化合物接触进行转化反应。

[0604] 通常,加入反应物(例如,底物、辅因子、多肽等)的顺序不是本公开内容的方法的关键。可以将反应物一起同时加入至溶剂(例如,单相溶剂、二相水性共溶剂系统、以及类似的溶剂),或可选地,可将反应物中的一些单独加入,以及在不同的时间点一起加入一些反应物。

[0605] 在一些实施方案中,可使用以上或本文其他处公开的混合物和反应条件的任何组合进行方法。因此,在一些实施方案中,本文描述的方法包括以下反应条件:(a)约1g/L至约10g/L的工程化酮还原酶多肽浓度;(b)约50g/L至约200g/L的载量浓度下的底物化合物;(c)约0.1g/L至约0.5g/L的NADP(H)浓度;(d)水性缓冲液和约30%至约70%(v/v)的IPA的共溶剂溶液;以及(e)35℃至约60℃的温度。

[0606] 在一些实施方案中,本文描述的方法包括以下的反应条件:(a)约0.1g/L至约1g/L的工程化酮还原酶多肽浓度;(b)约5g/L至约50g/L的载量浓度下的底物化合物;(c)约0.01g/L至约0.1g/L的NADP(H)浓度;(d)水性缓冲液和约30%至约70%(v/v)的IPA的共溶剂溶液;以及(e)约30℃至约45℃的温度。

[0607] 在一些实施方案中,在用于将底物化合物(2)转化为产物化合物(1)的方法中,化合物(2)为约50g/L至约200g/L的载量且方法在24h或更少时间内导致化合物(2)至化合物(1)的至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的转化率。

[0608] 在一些实施方案中,在用于将底物化合物(2)转化为产物化合物(1a)和(1c)的方法中,化合物(2)为约50g/L至约200g/L的载量且方法在24h或更少时间内导致以相比于化合物(1b)和(1d)的至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的非对映体过量形成化合物(1a)和(1c)。

[0609] 在一些实施方案中,还涵盖,包括使用工程化酮还原酶多肽将底物化合物生物催化转化为产物化合物的方法还包括以下的化学步骤:产物处理、提取、分离、纯化和/或结晶,其中的每一个可以在各种条件下进行。

[0610] 用于从通过如上公开的方法产生的生物催化反应混合物中提取、分离产物化合物、形成产物化合物的盐、纯化、和/或结晶产物化合物的方法、技术和试验方案是普通技术人员已知的和/或通过常规实验可获得的。另外，例证性的方法在下面的实施例中提供。

[0611] 本公开内容的各种特征和实施方案在以下代表性实施例中说明，代表性实施例意图是说明性的而非限制性的。

[0612] 实施例

[0613] 本公开内容的各种特征和实施方案在以下代表性实施例中说明，代表性实施例意图是说明性的而非限制性的。

[0614] 实施例1:野生型酮还原酶基因的获得和表达载体的构建。

[0615] 将来自克菲尔乳杆菌的野生型酮还原酶基因 (SEQ ID NO:1) 设计为使用标准密码子优化在大肠杆菌中表达。(密码子优化软件参见例如,“OPTIMIZER:a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences,”Puigbò等人,Nucleic Acids Res.2007年7月;35(Web Server issue):W126-31.Epub 2007年4月16)。基因使用寡核苷酸来合成并克隆进入表达载体pCK110900(如美国专利申请公布20060195947中的图3描述的载体,其据此通过引用并入本文)中的lac启动子的控制下。表达载体还含有P15a复制起点和氯霉素抗性基因。将产生的质粒使用标准方法转化进入大肠杆菌W3110(fhu-)。编码工程化酮还原酶多肽的多核苷酸还被克隆进入在大肠杆菌W3110中表达的载体pCK110900。

[0616] 编码SEQ ID NO:4的工程化酮还原酶多肽的多核苷酸(SEQ ID NO:3)通过编码克菲尔乳杆菌的野生型酮还原酶的密码子优化的基因(Genbank登录号AAP94029.1;GI:33112056)的定向进化来获得。与SEQ ID NO:2的天然存在的酮还原酶相比,SEQ ID NO:4具有11个氨基酸残基差异(A94G、S96V、E145F、F147M、L153T、Y190P、L195M、V196L、L199Y、I226V、和Y249W)。发现SEQ ID NO:4的多肽在SFP反应条件下(表2B)以相比于化合物(1b)和(1d)的约25的非对映体比将化合物(2)转化为化合物(1a)和(1c),且在DSP反应条件下(表2C)以相比于化合物(1b)和(1d)的>100的非对映体比但具有低酶活性将化合物(2)转化为化合物(1a)和(1c)。SEQ ID NO:3的多核苷酸被用作起始骨架用于随后几轮进化以产生具有改进特性的工程化酮还原酶。进行编码SEQ ID NO:4的基因(即,SEQ ID NO:3)的多轮定向进化。每轮使用来自每轮的编码最大改进的工程化多肽的基因作为用于随后轮进化的亲本“骨架”序列。产生的工程化酮还原酶多肽序列和具体突变以及相关活性列于表2A、2B和2C中。

[0617] 实施例2:生产工程化酮还原酶

[0618] 工程化酮还原酶多肽在大肠杆菌W3110中作为在lac启动子的控制下表达的细胞内蛋白产生。多肽主要累积为可溶性的细胞溶质的活性酶(soluble cytosolic active enzyme)。摇瓶程序用于产生工程化多肽粉,其可在本文公开的活性测定或生物催化方法中使用。

[0619] 摇瓶粉的发酵。将含有编码感兴趣的工程化酮还原酶的质粒的大肠杆菌的单个微生物菌落接种到含有30μg/ml氯霉素和1%葡萄糖的50mLLuria Bertani肉汤中。细胞在培养箱(incubator)中在30°C下以250rpm摇动生长过夜(至少16小时)。将培养物稀释到1升烧瓶中含有30μg/ml氯霉素的250mL Terrific Broth(12g/L细菌用胰蛋白胨、24g/L酵母提取物、4mL/L甘油、65mM磷酸钾、pH 7.0、1mM MgSO₄)中,至600nm的光密度(OD₆₀₀)为0.2,并允许

在30℃生长。当培养物的OD600是0.6至0.8时,通过加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(“IPTG”)至最终浓度1mM来诱导酮还原酶基因的表达。然后培养持续过夜(至少16小时)。通过离心(5000rpm、15min、4℃)收获细胞,并丢弃上清液。

[0620] 生产酮还原酶摇瓶粉:将细胞团块用等体积的冷(4℃)100mM磷酸盐缓冲液,pH 9.0(任选地含有2mM MgSO₄)再悬浮,并如以上通过离心来收获。洗涤的细胞再悬浮于2体积的冷磷酸盐缓冲液中,并且以12,000psi经过French Press两次,同时保持在4℃。通过离心(9000rpm、45min、4℃)除去细胞碎片。收集澄清的溶解产物上清液,并储存在-20℃。冷冻的澄清溶解产物的冷冻干燥提供了粗制酮还原酶多肽的干摇瓶粉。可选地,细胞团块(洗涤前或洗涤后)可储存在4℃或-80℃。

[0621] 用于生产下游处理(DSP)粉的发酵。用于生产DSP粉的工程化酮还原酶的较大规模(~100-120g)发酵可以作为短分批进行,随后根据标准生物加工方法通过进料分批法进行。简言之,通过添加IPTG至1mM的最终浓度来诱导酮还原酶表达。在发酵之后,收获细胞,并将其再悬浮在100mM三乙醇胺-H₂SO₄缓冲液中,然后通过匀化而被机械破裂。细胞碎片和核酸用聚乙烯亚胺(PEI)絮凝,并通过离心使悬浮液澄清。使用切向横流超滤膜浓缩所产生的澄清上清液以除去盐和水。然后浓缩的和部分纯化的酶浓缩物可在冷冻干燥器中干燥并被包装(例如,聚乙烯容器中)。

[0622] 高通量生长&表达。细胞被挑选并使用对于W3110的标准KRED方案以定向诱导来生长:(1)主生长-单个菌落通过Q-bot从琼脂Q-托盘来挑选并且在30℃,200rpm,85%湿度在含有1%葡萄糖和30μg/ml氯霉素(CAM)的LB培养基中生长过夜。(2)传代培养-将过夜生长的20μl转移至含有380μl的含有30μg/ml CAM、1mM IPTG、1mM MgSO₄的2xYT生长培养基的深孔板,且在30℃,200rpm,85%湿度下温育持续~18h。传代培养TB培养基由TB培养基(380μl/孔)、30μg/ml CAM、1mM MgSO₄、和1mM IPTG组成。细胞培养物以4000rpm、4℃离心10min,并丢弃培养基。细胞团块再悬浮在200-400μl溶解缓冲液(0.1M三乙醇胺(TEA)缓冲液、pH 9.0,含有1mM MgSO₄、400μg/ml PMBS和500μg/ml溶菌酶)中。

[0623] 实施例3:酮还原酶活性测定

[0624] HTP筛选测定。标准HTP反应测定在96-孔深孔板(反应测定块)中以200μl反应体积规模进行。每孔中的反应混合物通常由以下组成:20g/L或50g/L化合物(2);0.05g/L NADP⁺;30%或50%异丙醇(IPA);和10μl、20μl或60μl的澄清溶解产物,如表2A中进一步指定的。

[0625] 反应条件A、B、D、E和G:反应条件G通过将2.5mL的异丙醇加入20mL小瓶中的500mg化合物(2)中,随后加入2mL的pH 10.0含有1mM MgSO₄的0.2M硼酸盐来进行。将所得的混合物加热至反应温度,并搅拌约15min。10g/L酶和1g/L的NADP的储备溶液在含有1mM MgSO₄的pH 10的0.2M硼酸盐中新鲜制备。将储备溶液(500μl)加入反应混合物中以启动反应。将小瓶保持紧密封闭并允许反应在期望的温度下在搅拌(1200rpm)下进行。为了跟踪反应的过程,5μl样品被取出并稀释到730mL的乙腈(MeCN)中。激烈混合后,将悬浮液短暂离心以分离不溶性微粒。澄清上清液的样品通过HPLC使用以下描述的条件来分析。针对如表2B和2C中指定的测定条件A、B、D、E、和G中的每个调整试剂。

[0626] 反应条件C和F:预混合物测定溶液通过将22.5mL异丙醇加入33mL含有1mM MgSO₄的pH 9的0.2M硼酸盐来制备。将预混合物溶液的pH用浓HCl调至10.2。对于每个实验,3.7mL的新鲜制备的储备溶液放置在20mL螺帽玻璃小瓶中,紧密封闭,并在搅拌(1200rpm)下加热至

35°C。15min后,将250 μ l的在pH 9的0.2M硼酸盐中的100g/L酶粉储备溶液和50 μ l的在无菌水中的10g/L NADP储备溶液在35°C下以搅拌(1200rpm)加入每个小瓶中。加入酶和NADP后,立刻将1mL的在异丙醇中的200g/L化合物(2)储备溶液加入以启动反应。将小瓶紧密封闭并允许反应在35°C下在搅拌(1200rpm)下进行。为了跟踪反应的过程,15 μ l样品被取出并稀释到730 μ l的乙腈(MeCN)中。激烈混合后,将悬浮液短暂离心以分离不溶性微粒。澄清上清液的样品通过HPLC来分析。

[0627] HPLC分析:样品通过如下反相HPLC来分析。

[0628]	柱:	Chiralpak IC 柱(4.6 x 50 mm, 5 μ m)
	温度:	25°C
	流速:	1 mL/min
	流动相:	等度

[0629]		60%溶剂 A: 2 mM 甲酸铵, 用甲酸调 pH 3.5; 40%溶剂 B: 乙腈
	运行时间	15 min
	检测	210 nm

[0630] 底物和产物化合物具有以下保留时间:

[0631]	化合物(1c)/化合物(1d)	4.8min
	化合物(1a)	5.6min
	化合物(1b)	8.1min
	底物化合物(2a)、(2b)、(2c)、和(2d)	10min和12min

[0632] 在本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其它文件据此出于所有目的均通过引用以其整体并入,其程度如同分别指出将每个单独的出版物、专利、专利申请或其它文件出于所有目的通过引用并入一样。

[0633] 尽管已经阐释和描述了各种具体实施方案,但应理解可以作出各种改变而不背离本发明的精神和范围。

序列表

- <110> 科德克希思公司
 法比安·卡比罗尔
 陈海滨
 史蒂文·J·科利尔
 阿努潘·苟呵尔
 雅各布·杰恩
 波吉特·科斯耶克
 德里克·史密斯
- <120> 用于制备羟基取代的氨基甲酸酯的生物催化剂
- <130> CX2-103W01
- <150> 61/561,665
 <151> 2011-11-18
- <160> 172
- <170> PatentIn 3.5 版本

[0001]

- <210> 1
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 密码子优化的克菲尔乳杆菌酮还原酶基因

<400> 1

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggactct gggatcggg      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg catccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg cagtttccaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttgagggggt cgtaggcgat ccgacgctgg gggcatatac cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggctat atcaagaccc cgctggctga tgatctggaa      600
ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catggatctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaattt tgcgacgggt      720
gcgaattttg tggtcgacgg cgggtatacc gcacag
```

<210> 2
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 克菲尔乳杆菌 (Lactobacillus kefir)

<400> 2

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Ser
 85 90 95
 [0002] Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Glu Gly Phe Val Gly Asp Pro Thr Leu Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Tyr Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Leu Val Asp Asp Leu Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Ile Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

<210> 3
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 3
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
 ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
 ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0003]

<210> 4
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 4
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val

	85		90		95
Lys Ser Val	Glu Asp Thr Thr Thr	Glu Glu Trp Arg Lys	Leu Leu Ser		
	100		105		110
Val Asn Leu	Asp Gly Val Phe Phe	Gly Thr Arg Leu Gly	Ile Gln Arg		
	115		120		125
Met Lys Asn	Lys Gly Leu Gly Ala Ser	Ile Ile Asn Met	Ser Ser Ile		
	130		135		140
Phe Gly Met	Val Gly Asp Pro Thr Thr	Gly Ala Tyr Asn Ala	Ser Lys		
	145		150		155
Gly Ala Val	Arg Ile Met Ser Lys Ser	Ala Ala Leu Asp Cys	Ala Leu		
	165		170		175
Lys Asp Tyr	Asp Val Arg Val Asn Thr	Val His Pro Gly Pro	Ile Lys		
	180		185		190
Thr Pro Met	Leu Asp Asp Tyr Glu Gly	Ala Glu Glu Met Met	Ser Gln		
	195		200		205
Arg Thr Lys	Thr Pro Met Gly His Ile	Gly Glu Pro Asn Asp	Ile Ala		
	210		215		220
Trp Val Cys	Val Tyr Leu Ala Ser Asp	Glu Ser Lys Phe Ala	Thr Gly		
	225		230		235
Ala Glu Phe	Val Val Asp Gly Gly Trp	Thr Ala Gln			
	245		250		

[0004]

- <210> 5
 - <211> 756
 - <212> DNA
 - <213> 人工序列

 - <220>
 - <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

 - <400> 5
- ```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcac 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttcttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aatgatgtc acacgctacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720

```

gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag

756

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 252

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

&lt;400&gt; 6

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                   245                   250

[0005]

<210> 7  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 7  
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaaag tagttattac tggtcgtcac 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat gtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgcg gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540  
 gtgctgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cggctctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 cgcaaatgtg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0006]

<210> 8  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 8  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                    25                    30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                    40                    45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                    55                    60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Thr Pro Ala Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln                 |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |     |

[0007]

<210> 9

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 9

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcggg  | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtcgcgaaag tagttattac tggctgcac | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaagc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc  | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca | 240 |
| ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa | 300 |
| gacactacca cggaggaatg gcgtaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc  | 360 |
| ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat | 420 |
| atgagcagta ttttcgggat ggtagcgcg cgcactaccg gggcatacaa cgcttccaag  | 480 |
| ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat  | 540 |
| gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgetcga tgattatgaa | 600 |

```

ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 10  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 10  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240

[0008]

Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

<210> 11  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 11  
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggc 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaagc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttcttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaacctg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgcg gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgetcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggtccatc tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0009]

<210> 12  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 12  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
 20 25 30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln                 |     |     |
| 245                                                             | 250 |     |

[0010]

<210> 13

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 13

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcggc   | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcaaaag tagttattac tggcgcgcgt  | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgctc | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca  | 240 |
| ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa  | 300 |
| gacactacca cggaggaaat gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc  | 360 |
| ggcaccgcgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat | 420 |
| atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag  | 480 |

```

ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcattctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 14

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 14

[0011]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210 215 220

```





```

ggcacccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgettccaag 480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcattctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 18  
<211> 252  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 18

[0014]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205

```

Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

<210> 19  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0015]

<400> 19  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggc 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg ggatggttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaatc ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcatca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgetcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgaag aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 20  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 20  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala

|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | 20  |     | 25  |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys    | Val | Val | Ile | Thr | Gly | Arg | Arg | Ala | Asp | Val | Gly | Glu | Lys | Ala | Ala |
|        | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Lys    | Ser | Ile | Gly | Gly | Thr | Asp | Val | Ile | Arg | Phe | Val | Gln | His | Asp | Ala |
|        | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Ser    | Asp | Glu | Ala | Gly | Trp | Thr | Lys | Leu | Phe | Asp | Thr | Thr | Glu | Glu | Ala |
| 65     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Phe    | Gly | Pro | Val | Thr | Thr | Val | Val | Asn | Asn | Ala | Gly | Ile | Gly | Met | Val |
|        |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Lys    | Ser | Val | Glu | Asp | Thr | Thr | Thr | Glu | Glu | Trp | Arg | Lys | Leu | Leu | Ser |
|        |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val    | Asn | Leu | Asp | Gly | Val | Phe | Phe | Gly | Thr | Arg | Leu | Gly | Ile | Gln | Arg |
|        | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Met    | Lys | Asn | Lys | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ile | Ile | Asn | Met | Ser | Ser | Ile |
|        | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |
| Phe    | Gly | Met | Val | Gly | Asp | Pro | Thr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Asn | Ala | Ser | Lys |
| 145    |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Gly    | Ala | Val | Arg | Ile | Met | Ser | Lys | Ser | Ala | Ala | Leu | Asp | Cys | Ala | Leu |
|        |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |
| Lys    | Asp | Tyr | Asp | Val | Arg | Val | Asn | Thr | Val | His | Pro | Gly | Pro | Ile | Lys |
|        |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Thr    | Pro | Met | Leu | Asp | Asp | Tyr | Glu | Gly | Ala | Glu | Glu | Met | Phe | Ser | Gln |
| [0016] |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Arg    | Thr | Lys | Thr | Pro | Met | Gly | His | Ile | Gly | Glu | Pro | Asn | Asp | Ile | Ala |
|        | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Trp    | Val | Cys | Val | Tyr | Leu | Ala | Ser | Asp | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Thr | Gly |
| 225    |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Ala    | Glu | Phe | Val | Val | Asp | Gly | Gly | Trp | Thr | Ala | Gln |     |     |     |     |
|        |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |

<210> 21

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 21

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atgaccgatc | gtctgaaggg | caaagtagcc | atcgtaaccg | gcgggacact | gggtatcgg  | 60  |
| ttggcaatcg | ccgataaatt | tgtagaggag | ggtgcgaaag | tagttattac | tggtcgtcgt | 120 |
| gcggatgtag | gtgaaaaggc | cgccaaatca | atcgcgcgca | ctgatgttat | tcgctttgtc | 180 |
| cagcacgatg | cgtccgatga | agcaggctgg | acgaaactgt | tcgacaccac | cgaggaggca | 240 |

```

ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 22

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 22

[0017]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190

```

Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

<210> 23  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 23  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacaactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0018]

<210> 24  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 24  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr

1                    5                    10                    15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                          20                    25                    30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                          35                    40                    45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                          50                    55                    60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
                          85                    90                    95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                          100                    105                    110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                          115                    120                    125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                          130                    135                    140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                          165                    170                    175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                          180                    185                    190  
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                          195                    200                    205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                          210                    215                    220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                    230                    235                    240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                          245                    250

[0019]

<210> 25

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 25

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact ggttatcggc                    60  
 ttggcaatcg ccgataaatt thtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt                    120

```

gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga ttcgtatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 26

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 26

[0020]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175

```

Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

- <210> 27
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列
  
- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 27  
 [0021] atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg ttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaagget tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgctcga tgatcatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 28
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列
  
- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 28  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
 20 25 30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
 50 55 60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
 85 90 95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
 100 105 110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
 115 120 125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
 130 135 140  
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145 150 155 160  
 [0022] Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

<210> 29

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 29

```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaacccg gcgggacact gggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgatcatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 30

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0023]

<400> 30

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160

```

Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

- <210> 31
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0024]

<400> 31  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgct 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggtgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggatc cggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagtg tgttcgggat ggtagcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcgggtac gtatcatgct gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtea acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 32
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 32

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                   245                   250

[0025]

<210> 33

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 33  
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaca aggtatcggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt thtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaagca 240  
 ttcgccccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cgatggtaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcccccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagtg tgttcgggat thtagcgac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcga gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacce cgatgatgga tagctatgaa 600  
 ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcacttgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcgaatttg tggtcgacgg cgggtacacc gcacag 756

<210> 34  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0026] <220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 34  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
  
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Ala Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val

|                                                                 |     |     |     |  |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|--|
| 130                                                             | 135 | 140 |     |  |  |
| Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys |     |     |     |  |  |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |  |  |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |     |     |     |  |  |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |  |  |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |     |     |     |  |  |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |  |  |
| Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln |     |     |     |  |  |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |  |  |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |     |     |     |  |  |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |  |  |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |     |     |     |  |  |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |  |  |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln                 |     |     |     |  |  |
|                                                                 | 245 | 250 |     |  |  |

- <210> 35
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

[0027]

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 35

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cggtggttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaacct ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgatgga tgattatgaa 600
ggtgetgagg aatgtttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggegaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggttcacc gcacag 756

```

- <210> 36
- <211> 252
- <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 36

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val  
 130                   135                   140  
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln  
                   245                   250

[0028]

<210> 37

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

&lt;400&gt; 37

```

atgaccgatc gctcgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaagca 240
ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaagget tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat ggtaggcgac ccgactaccg gggcatactg tgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgatgga tagccatgaa 600
gggtgtgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaattt tgcgacgggt 720
gcgaattttg tggtcgacgg cgggttcacc gcacag 756

```

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 252

[0029]

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

&lt;400&gt; 38

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg

```

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Thr Pro Met Met Asp Ser His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln                 |     |     |
| 245                                                             | 250 |     |

[0030]

<210> 39

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 39

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaacgc gcgggacacg cggtatcggc 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcgccccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttcc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat tntaggttac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
ggagcggtac gtatcatgtc gaaaagcgcg gcgetggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgatgga tagctatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttcc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtegacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 40

<211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 40

[0031] Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                                   5                                   10                                   15  
 Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                                   20                                   25                                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                                   35                                   40                                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
                                   50                                   55                                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                                   70                                   75                                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val  
                                   85                                   90                                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                                   100                                   105                                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                                   115                                   120                                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val  
                                   130                                   135                                   140  
 Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys  
 145                                   150                                   155                                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                                   165                                   170                                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                                   180                                   185                                   190  
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                                   195                                   200                                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                                   210                                   215                                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                                   230                                   235                                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                                   245                                   250

<210> 41  
 <211> 756

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体  
  
 <400> 41  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggg 60  
 ttggcagtcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgtg 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cgatggttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactgggt gggcactactg tgcttccaag 480  
 ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgta acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tagctatgaa 600  
 ggtgctgagg aaatgttttc acacgctacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggttcacc gcacag 756

[0032]

<210> 42  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体  
  
 <400> 42  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Val Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 100 |     | 105 |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Asn | Leu | Asp | Gly | Val | Phe | Phe | Gly | Thr | Arg | Leu | Gly | Ile | Gln | Arg |
|     | 115 |     | 120 |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Lys | Asn | Lys | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ile | Ile | Asn | Met | Ser | Ser | Val |
|     | 130 |     | 135 |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Gly | Ile | Val | Gly | Asp | Pro | Thr | Gly | Gly | Ala | Tyr | Cys | Ala | Ser | Lys |
| 145 |     |     | 150 |     | 155 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 160 |
| Gly | Ala | Val | Arg | Ile | Met | Ser | Lys | Ser | Ala | Ala | Leu | Asp | Cys | Ala | Leu |
|     |     |     | 165 |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 175 |
| Lys | Asp | Tyr | Asp | Val | Arg | Val | Asn | Thr | Val | His | Pro | Gly | Pro | Ile | Lys |
|     | 180 |     | 185 |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Pro | Met | Met | Asp | Ser | Tyr | Glu | Gly | Ala | Glu | Glu | Met | Phe | Ser | Gln |
|     | 195 |     | 200 |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Lys | Thr | Pro | Met | Gly | His | Ile | Gly | Glu | Pro | Asn | Asp | Ile | Ala |
| 210 |     |     | 215 |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Val | Cys | Val | Tyr | Leu | Ala | Ser | Asp | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Thr | Gly |
| 225 |     |     | 230 |     | 235 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Glu | Phe | Val | Val | Asp | Gly | Gly | Phe | Thr | Ala | Gln |     |     |     |     |
|     |     |     | 245 |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

[0033]

<210> 43

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 43

```

atgaccgatc gctcgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacacg cggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cgatggttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaagget tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat ggtaggctac ccgactaccg gggcatacaa tgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacce cgatgatgga tagctatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcgaatttg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 44  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 44

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val  
 [0034]                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                   245                   250

<210> 45  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 45  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcac 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggtttataa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360  
 ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0035]

<210> 46  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 46  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
 20                    25                    30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
 35                    40                    45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
 50                    55                    60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr

|             |                         |                         |             |  |     |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------|--|-----|
|             | 85                      |                         | 90          |  | 95  |
| Lys Ser Val | Glu Asp Thr Thr Thr     | Glu Glu Trp Arg Lys     | Leu Leu Ser |  |     |
|             | 100                     |                         | 105         |  | 110 |
| Val Asn Leu | Asp Gly Val Phe Phe     | Gly Thr Arg Leu Gly     | Ile Gln Arg |  |     |
|             | 115                     |                         | 120         |  | 125 |
| Met Lys Asn | Lys Gly Leu Gly Ala Ser | Ile Ile Asn Met         | Ser Ser Ile |  |     |
|             | 130                     |                         | 135         |  | 140 |
| Phe Gly Met | Val Gly Asp Pro Thr Thr | Gly Ala Tyr Asn Ala     | Ser Lys     |  |     |
|             | 145                     |                         | 150         |  | 155 |
| Gly Ala Val | Arg Ile Met Ser Lys Ser | Ala Ala Leu Asp Cys     | Ala Leu     |  |     |
|             | 165                     |                         | 170         |  | 175 |
| Lys Asp Tyr | Asp Val Arg Val Asn Thr | Val His Pro Gly Pro     | Ile Lys     |  |     |
|             | 180                     |                         | 185         |  | 190 |
| Thr Pro Met | Leu Asp Asp Tyr Glu Gly | Ala Glu Glu Met Met     | Ser Gln     |  |     |
|             | 195                     |                         | 200         |  | 205 |
| Arg Thr Lys | Thr Pro Met Gly His Ile | Gly Glu Pro Asn Asp     | Ile Ala     |  |     |
|             | 210                     |                         | 215         |  | 220 |
| Trp Val Cys | Val Tyr Leu Ala Ser Asp | Glu Ser Lys Phe Ala Thr | Gly         |  |     |
|             | 225                     |                         | 230         |  | 235 |
| Ala Glu Phe | Val Val Asp Gly Gly Trp | Thr Ala Gln             |             |  |     |
|             | 245                     |                         | 250         |  |     |

[0036]

<210> 47

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 47

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggc  | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaaag tagttattac tggcgtcac | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca | 240 |
| ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa | 300 |
| gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc  | 360 |
| ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat | 420 |
| atgagcagta ttttggggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag | 480 |
| ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat  | 540 |
| gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgattatgaa | 600 |
| ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg   | 660 |

aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcacatgcag aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 48  
<211> 252  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 48  
Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
1                   5                   10                   15  
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                  20                   25                   30  
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                  35                   40                   45  
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
50                   55                   60  
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
65                   70                   75                   80  
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
                  85                   90                   95  
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
100                   105                   110  
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
115                   120                   125  
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
130                   135                   140  
Leu Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
145                   150                   155                   160  
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                  165                   170                   175  
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
180                   185                   190  
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln  
195                   200                   205  
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
210                   215                   220  
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
225                   230                   235                   240  
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln

[0037]

245

250

- <210> 49
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 49

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggc   | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcac   | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc  | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca  | 240 |
| ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa  | 300 |
| gacactacca cggaggaatg gcgtaaacct ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc   | 360 |
| ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat  | 420 |
| atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag  | 480 |
| ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat   | 540 |
| gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cggggetcga tgattatgaa   | 600 |
| ggtgctgagg aatgatgtc acagcgtacg aaaacccta tgggccacat tggcgaaccg    | 660 |
| aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt | 720 |
| gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                            | 756 |

[0038]

- <210> 50
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 50

|                                                                    |  |
|--------------------------------------------------------------------|--|
| Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr    |  |
| 1                    5                    10                    15 |  |
| Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala    |  |
| 20                    25                    30                     |  |
| Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala    |  |
| 35                    40                    45                     |  |
| Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala    |  |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Thr Pro Gly Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Met Ser Gln |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln                 |     |     |
| 245                                                             | 250 |     |

[0039]

<210> 51

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 51

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggc  | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcaaaag tagttattac tggctgcac  | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca | 240 |
| ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa | 300 |
| gacactacca cggaggaaat gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc | 360 |
| ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat | 420 |
| atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatataa cgcttccaag | 480 |

```

ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttgtc acagcgtacg aaaaccctta tgggccacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcattctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 52

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 52

[0040]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg His Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Leu Ser Gln
 195 200 205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210 215 220

```





```

ggcacccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgettccaag 480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcattctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 56

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 56

[0043]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205

```

Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

- <210> 57
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0044]

<400> 57  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacacg gggatcggc 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaatg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcatca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgetcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgaag aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 58
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 58  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala

|                                                                 |                                                     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                                 | 20                                                  |     | 25  |     | 30  |     |
| Lys Val Val                                                     | Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 35                                                  |     | 40  |     | 45  |     |
| Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 50                                                  |     | 55  |     | 60  |     |
| Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala |                                                     |     |     |     |     |     |
| 65                                                              |                                                     | 70  |     | 75  |     | 80  |
| Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 85                                                  |     | 90  |     | 95  |     |
| Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 100                                                 |     | 105 |     | 110 |     |
| Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 115                                                 |     | 120 |     | 125 |     |
| Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 130                                                 |     | 135 |     | 140 |     |
| Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys |                                                     |     |     |     |     |     |
| 145                                                             |                                                     | 150 |     | 155 |     | 160 |
| Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 165                                                 |     | 170 |     | 175 |     |
| Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 180                                                 |     | 185 |     | 190 |     |
| Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 195                                                 |     | 200 |     | 205 |     |
| Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 210                                                 |     | 215 |     | 220 |     |
| Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly |                                                     |     |     |     |     |     |
| 225                                                             |                                                     | 230 |     | 235 |     | 240 |
| Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln                 |                                                     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 245                                                 |     | 250 |     |     |     |

[0045]

<210> 59

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 59

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg  | 60  |
| ttggcaatcg ccgataaatt ttaggggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt | 120 |
| gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc | 180 |
| cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca | 240 |

```

ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
gggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 60

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 60

[0046]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Gly Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190

```

Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

<210> 61  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 61  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg ctgtttgtaa aagcgttgaa 300  
 gacaactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0047]

<210> 62  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 62  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr

1                    5                    10                    15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                          20                    25                    30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                          35                    40                    45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                          50                    55                    60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ala Val Val  
                          85                    90                    95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                          100                    105                    110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                          115                    120                    125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                          130                    135                    140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                          165                    170                    175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                          180                    185                    190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                          195                    200                    205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                          210                    215                    220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                    230                    235                    240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                          245                    250

[0048]

<210> 63

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 63

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact ggttatcgg                    60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt                    120

```

gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggatta gtgttgtaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 64

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 64

[0049]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Ser Val Val
85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165 170 175

```

Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

- <210> 65
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列
  
- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 65  
 [0050] atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa agtaaagget tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 66
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列
  
- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体



```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggctat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 68

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0052]

<400> 68

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160

```

Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

- <210> 69
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列
  
- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0053]

<400> 69  
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgct 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggtgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtagcgat ccggggaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcggtag gtatcatgct gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 70
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 70

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
                   115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Gly Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                   245                   250

[0054]

<210> 71

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 71  
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcggt 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggea ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttggccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgtat ccgactaccg gggcatactg tgcttccaag 480  
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgcg gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 72  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0055] <220>  
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 72  
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
 20 25 30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
 35 40 45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
 50 55 60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65 70 75 80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
 85 90 95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
 100 105 110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
 115 120 125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
 130 135 140





&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

&lt;400&gt; 75

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaa tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaatcg ctgtccatta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgcttga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 252

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

[0058]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

&lt;400&gt; 76

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
Ile Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125

```

Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
 130 135 140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
 165 170 175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
 195 200 205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
 210 215 220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
 245 250

[0059]

<210> 77

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 77

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60  
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120  
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180  
 cagcacgatg cgtccgatga agcagcgtgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240  
 ttcgcccggg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300  
 gacactacca cggagggaatg gcgtaaaactg ctgtccggtta atctggatgg tgttttttc 360  
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420  
 atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480  
 ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540  
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgatgga tgattatgaa 600  
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660  
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcattctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720  
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 78

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 78

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala  
                   35                   40                   45  
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala  
                   50                   55                   60  
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala  
 65                   70                   75                   80  
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val  
                   85                   90                   95  
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser  
                   100                   105                   110  
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg  
 115                   120                   125  
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile  
                   130                   135                   140  
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu  
                   165                   170                   175  
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys  
                   180                   185                   190  
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln  
                   195                   200                   205  
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala  
                   210                   215                   220  
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly  
 225                   230                   235                   240  
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln  
                   245                   250

[0060]

<210> 79

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 79

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgac aatcgaattt tgcgacgggt 720
cgagaatttg tggtcgacgg cgggggtacc gcacag 756

```

[0061]

<210> 80

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 80

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 100 |     | 105 |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Asn | Leu | Asp | Gly | Val | Phe | Phe | Gly | Thr | Arg | Leu | Gly | Ile | Gln | Arg |
|     | 115 |     | 120 |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Lys | Asn | Lys | Gly | Leu | Gly | Ala | Ser | Ile | Ile | Asn | Met | Ser | Ser | Ile |
|     | 130 |     | 135 |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Gly | Met | Val | Gly | Asp | Pro | Thr | Thr | Gly | Ala | Tyr | Asn | Ala | Ser | Lys |
| 145 |     |     | 150 |     | 155 |     |     |     |     |     |     |     |     | 160 |     |
| Gly | Ala | Val | Arg | Ile | Met | Ser | Lys | Ser | Ala | Ala | Leu | Asp | Cys | Ala | Leu |
|     |     |     | 165 |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Lys | Asp | Tyr | Asp | Val | Arg | Val | Asn | Thr | Val | His | Pro | Gly | Pro | Ile | Lys |
|     | 180 |     | 185 |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Pro | Met | Leu | Asp | Asp | Tyr | Glu | Gly | Ala | Glu | Glu | Met | Phe | Ser | Gln |
|     | 195 |     | 200 |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Lys | Thr | Pro | Met | Gly | His | Ile | Gly | Glu | Pro | Asn | Asp | Ile | Ala |
| 210 |     |     | 215 |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Val | Cys | Val | Tyr | Leu | Ala | Ser | Asp | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Thr | Gly |
| 225 |     |     | 230 |     | 235 |     |     |     |     |     |     |     |     | 240 |     |
| Ala | Glu | Phe | Val | Val | Asp | Gly | Gly | Gly | Thr | Ala | Gln |     |     |     |     |
|     |     |     | 245 |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

[0062]

- <210> 81
  - <211> 756
  - <212> DNA
  - <213> 人工序列
  
  - <220>
  - <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体
  
  - <400> 81
- ```

atgaccgatc gctcgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat ggtatcgggt      60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggtttacia aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggct ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacce cgatgctcga tgatcatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcgaatttg tggctgacgg aggggtggacc gcacag      756
    
```

<210> 82
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 82

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
 [0063] 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Leu Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

<210> 83
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 83
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
 ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggct ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctgttat gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgatcatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0064]

<210> 84
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 84
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val

	85	90	95
Lys Ser Val	Glu Asp Thr Thr Thr	Glu Glu Trp Arg Lys	Leu Leu Ser
	100	105	110
Val Asn Leu	Asp Gly Val Phe Phe	Gly Thr Arg Leu Gly	Ile Gln Arg
	115	120	125
Met Lys Asn	Lys Gly Leu Gly Ala Ser	Ile Ile Asn Met	Ser Ser Ile
	130	135	140
Phe Gly Leu	Val Gly Asp Pro Thr Thr	Gly Ala Tyr Asn Ala	Ser Lys
145	150	155	160
Gly Ala Val	Arg Ile Met Ser Lys Ser	Ala Ala Leu Leu Cys	Ala Leu
	165	170	175
Lys Asp Tyr	Asp Val Arg Val Asn Thr	Val His Pro Gly Pro	Ile Lys
	180	185	190
Thr Pro Met	Leu Asp Asp His Glu Gly	Ala Glu Glu Met Phe	Ser Gln
	195	200	205
Arg Thr Lys	Thr Pro Met Gly His Ile	Gly Glu Pro Asn Asp	Ile Ala
210	215	220	
Trp Val Cys	Val Tyr Leu Ala Ser Asp	Glu Ser Lys Phe Ala	Thr Gly
225	230	235	240
Ala Glu Phe	Val Val Asp Gly Gly Trp	Thr Ala Gln	
	245	250	

[0065]

<210> 85

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 85

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcgccccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctgttat gcgcactgaa ggactacgat      540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgatcatgaa      600
gggtctgagg aatgttttc acacgctacg aaaaccctta tgggtccatc tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaattc tgcgacgggt      720

```

gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag

756

<210> 86

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 86

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60

[0066]

Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln

Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0068]

<210> 89

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 89

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggc 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg cgtctgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttggccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttctgaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggca gtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcgggtac gtatcatgct gaaaagcgca gcctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540

```

gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgattatgaa      600
gggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccacct tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                                     756

```

<210> 90

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 90

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
          20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
          35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu
          85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
          100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
          115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
          130          135          140
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
          165          170          175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
          180          185          190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
          195          200          205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
          210          215          220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly

```

[0069]

Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0071]

<210> 93

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 93

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg 60
 ttggcaatcg ccgataaatt ttagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgcaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcagcatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttggccccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggttctgaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420

```

atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagegca gcgetggatt gcgcactgaa ggactacgat      540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgatcatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                                     756

```

<210> 94

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 94

[0072]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
           130          135          140
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
           165          170          175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
           180          185          190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
           195          200          205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala

```

210	215	220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly		
225	230	235
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln		
	245	250

<210> 95

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 95

[0073]

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg	60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcg	120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcggcccgg ttacaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttctgaa aagcgttgaa	300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaacct ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagta ttttcgggca agtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag	480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctgttat gcgcaactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa	600
gggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg	660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt	720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag	756

<210> 96

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 96

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr	
1	5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala	
	20 25 30

Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0074]

<210> 97

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 97

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcaccgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300

```

gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgatcacgaa 600
gggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 98

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 98

[0075]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10          15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20          25          30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35          40          45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50          55          60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65          70          75          80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
85          90          95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100         105         110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115         120         125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130         135         140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145         150         155         160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165         170         175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
180         185         190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln

```


Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0077]

<210> 101

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 101

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacact gggatcgggt 60

ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120

cgcgatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180

```

cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga tgattatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                                  756

```

<210> 102

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 102

[0078]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
           130          135          140
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
           165          170          175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys

```


Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0080]

- <210> 105
 - <211> 756
 - <212> DNA
 - <213> 人工序列

 - <220>
 - <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

 - <400> 105
- atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt

```

ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcgcgggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcaccctgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgatcatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtccatc tggcgaaccg 660
agtgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 106

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0081]

<400> 106

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
           130          135          140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu

```

	165	170	175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys			
	180	185	190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln			
	195	200	205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Ser Asp Ile Ala			
	210	215	220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly			
225	230	235	240
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln			
	245	250	

<210> 107

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0082]

<400> 107

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcggg	60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctgt	120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa	300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag	480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgattatgaa	600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg	660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt	720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag	756

<210> 108

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 108
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0083]

<210> 109

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 109
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggtttaca aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggat tntagcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgctc gaaaagcgca gcgctgttat gcgcaactgaa ggactacgat 540
 gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgatcatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 110

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

[0084]

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 110

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys

145	150	155	160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu			
	165	170	175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys			
	180	185	190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln			
	195	200	205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala			
	210	215	220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly			
225	230	235	240
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln			
	245	250	

<210> 111

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0085] <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 111

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt	60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt	120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttctgaa aagcgttgaa	300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag	480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgctcga tgattatgaa	600
gggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg	660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcacttgacg aatcgaatt tgcgacgggt	720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtacacc gcacag	756

<210> 112

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 112

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

[0086]

<210> 113

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 113

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaacgg gcgggacaat gggatcgggt      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaacgt ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctgttat gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga tgatcatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcctctgacg aatcgaattg tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag      756

```

<210> 114

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

[0087]

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 114

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10          15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
          20          25          30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
          35          40          45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
          50          55          60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65          70          75          80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
          85          90          95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
          100         105         110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
          115         120         125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile

```

130	135	140			
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys					
145	150	155	160		
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu					
	165	170	175		
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys					
	180	185	190		
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln					
	195	200	205		
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala					
210	215	220			
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly					
225	230	235	240		
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln					
	245	250			

- <210> 115
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

[0088]

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 115

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcgggt      60
ttggcaatcg cggataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcgccccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggtttaca aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggat tntagcgcat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctgttat gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgctcga tgattatgaa      600
ggtgetgagg aatgtttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggegaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaattt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                                     756
    
```

- <210> 116
- <211> 252
- <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 116

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0089]

<210> 117

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 117

```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcgggt      60
ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg ttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggtttaca aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaagget tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgctgttca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgatcatgaa      600
ggtgctgagg aatggttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcgaatttg tggcgcacgg cgggtacacc gcacag                                     756

```

<210> 118

<211> 252

[0090]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 118

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10          15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
          20          25          30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
          35          40          45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
          50          55          60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65          70          75          80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Tyr
          85          90          95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
          100         105         110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg

```

115	120	125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile		
130	135	140
Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys		
145	150	155
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu		
165	170	175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys		
180	185	190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln		
195	200	205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala		
210	215	220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly		
225	230	235
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln		
245	250	

[0091]

<210> 119

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 119

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg	60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt	120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcgccggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
cagcagcatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcgccccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa	300
gacactacca cggaggaaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
ggcaccgcgc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag	480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgctcga tgatcatgaa	600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtccatc tggcgaaccg	660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
gcagaatttg tggcgcacgg cgggttcacc gcacag	756

<210> 120

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

 <400> 121
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcggtag gtatcatgct gaaaagcgca gcgctgttat gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgta acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgctcga tgattatgaa 600
 ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0093]

<210> 122
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

 <400> 122
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser

	100		105		110										
Val	Asn	Leu	Asp	Gly	Val	Phe	Phe	Gly	Thr	Arg	Leu	Gly	Ile	Gln	Arg
	115		120		125										
Met	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ile	Asn	Met	Ser	Ser	Ile
	130		135		140										
Phe	Gly	Gln	Val	Gly	Asp	Pro	Thr	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys
145			150		155									160	
Gly	Ala	Val	Arg	Ile	Met	Ser	Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu
			165		170									175	
Lys	Asp	Tyr	Asp	Val	Arg	Val	Asn	Thr	Val	His	Pro	Gly	Pro	Ile	Lys
	180		185		190										
Thr	Pro	Met	Leu	Asp	Asp	Tyr	Glu	Gly	Ala	Glu	Glu	Met	Phe	Ser	Gln
	195		200		205										
Arg	Thr	Lys	Thr	Pro	Met	Gly	His	Ile	Gly	Glu	Pro	Asn	Asp	Ile	Ala
210			215		220										
Trp	Val	Cys	Val	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asp	Glu	Ser	Lys	Phe	Ala	Thr	Gly
225			230		235									240	
Ala	Glu	Phe	Val	Val	Asp	Gly	Gly	Trp	Thr	Ala	Gln				
			245		250										

[0094]

<210>	123					
<211>	756					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体					
<400>	123					
atgaccgatc	gtctgaaggg	caaagtagcc	atcgtaaccg	gcgggacact	gggtatcgg	60
ttggcaatcg	ccgataaatt	tgtagaggag	ggtgcgaaag	tagttattac	tggtcgtcgt	120
gcggatgtag	gtgaaaaggc	cgccaaatca	atcggcggca	ctgatgttat	tcgctttgtc	180
cagcacgatg	tttccgatga	agcaggctgg	acgaaactgt	tcgacaccac	cgaggaggca	240
ttcggcccgg	ttacgaccgt	cgtgaacaat	gcagggattg	gggttgtaa	aagcgttgaa	300
gacactacca	cggaggaatg	gcgtaaactg	ctgtccgtta	atctggatgg	tgtttttttc	360
ggcacccgtc	tgggcattca	gcgcatgaaa	aataaagget	tgggcgctag	catcatcaat	420
atgagcagta	ttttcgggca	ggtaggcgat	ccgactaccg	gggcatacaa	cgcttccaag	480
ggggcgggtac	gtatcatgtc	gaaaagcgca	gcgctgttat	gcgcactgaa	ggactacgat	540
gtgctgttca	acacagtaca	tccgggcccc	atcaagacce	cgatgctcga	tgatcatgaa	600
ggtgctgagg	aaatgttttc	acagcgtacg	aaaaccctta	tgggtcacat	tggcgaaccg	660
aatgacatcg	catgggtctg	tgtgtacctg	gcatctgacg	aatcgaaatt	tcgcacgggt	720
gcgaatttg	tggtcgacgg	cgggtggacc	gcacag			756

<210> 124
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 124

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
 [0095] 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

<210> 125
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 125
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360
 ggcaccgcgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggct ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctcga tgattatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0096]

<210> 126
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 126
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val

	85		90		95
Lys Ser Val	Glu Asp Thr Thr Thr	Glu Glu Trp Arg Lys	Leu Leu Ser		
	100		105		110
Val Asn Leu	Asp Gly Val Phe Phe	Gly Thr Arg Leu Gly	Ile Gln Arg		
	115		120		125
Met Lys Asn	Lys Gly Leu Gly Ala Ser	Ile Ile Asn Met	Ser Ser Ile		
	130		135		140
Phe Gly Leu	Val Gly Asp Pro Thr Thr	Gly Ala Tyr Asn Ala	Ser Lys		
	145		150		155
Gly Ala Val	Arg Ile Met Ser Lys Ser	Ala Ala Leu Asp Cys	Ala Leu		
	165		170		175
Lys Asp Tyr	Asp Val Arg Val Asn Thr	Val His Pro Gly Pro	Ile Lys		
	180		185		190
Thr Pro Met	Leu Asp Asp Tyr Glu Gly	Ala Glu Glu Met Phe	Ser Gln		
	195		200		205
Arg Thr Lys	Thr Pro Met Gly His Ile	Gly Glu Pro Asn Asp	Ile Ala		
	210		215		220
Trp Val Cys	Val Tyr Leu Ala Ser Asp	Glu Ser Lys Phe Ala	Thr Gly		
	225		230		235
Ala Glu Phe	Val Val Asp Gly Gly Trp	Thr Ala Gln			
	245		250		

[0097]

<210> 127

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 127

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcgccccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagta ttttcgggca ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag      480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat      540
gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgctcga tgatcatgaa      600
gggtctgagg aatgttttc acacgctacg aaaaccctta tgggtccatc tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720

```

gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag

756

<210> 128

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 128

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50 55 60Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80

[0098]

Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
85 90 95Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100 105 110Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115 120 125Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130 135 140Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165 170 175Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
180 185 190Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
195 200 205Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210 215 220Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
225 230 235 240Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
245 250

<210> 129
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 129
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tgtagaggag ggtgcgaaaag tagttattac tggctcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tttccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttctgaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagta ttttcgggat ttaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgcg gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
 gtgctgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgctega tgatcatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctc tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactgtacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 cgcaaatgtg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0099]

<210> 130
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 130
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala

65	70	75	80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Leu			
	85	90	95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser			
	100	105	110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg			
	115	120	125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile			
	130	135	140
Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys			
145	150	155	160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu			
	165	170	175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys			
	180	185	190
Thr Pro Met Leu Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln			
	195	200	205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala			
210	215	220	
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly			
225	230	235	240
Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln			
	245	250	

[0100]

<210> 131

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 131

atgaccgatc gtctgaagag caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacact gggatcggg	60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtcgt	120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttatc	180
cagcacgatg tgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattg gggttgttaa aagcgttgaa	300
gacactacca cggaggaaatg gcgtaaacct ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc	360
ggcaccgctc tgggcattcg ccgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagta ttttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcatacaa cgcttccaag	480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgetcga tgattatgaa	600

ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcgtat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcacctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tgatcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 132

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 132

[0101]

Met Thr Asp Arg Leu Lys Ser Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Leu Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Ile Gln His Asp Val
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Gly Val Val
85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Arg Arg
115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Ile
130 135 140
Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165 170 175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
180 185 190
Thr Pro Met Leu Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
195 200 205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly Arg Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210 215 220
Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
225 230 235 240

Ala Glu Phe Val Ile Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

- <210> 133
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 133
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacacg cggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgcgcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggatc cggtggttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac cgcactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
 gtgctgtgca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tagctatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtccatc tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatctg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

[0102]

- <210> 134
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 134
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val


```

ggagcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccc cgatgatgga tagctatgaa      600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag      756

```

<210> 136

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 136

[0104]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
           130          135          140
Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
           165          170          175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
           180          185          190
Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
           195          200          205
Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
210          215          220

```


35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0106]

<210> 139

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 139

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacacg cggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgtttttttc 360

```

ggcacccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat ttaggctac ccgactaccg gggcatactg tgettccaag 480
ggggcgggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgatgga tagctatgaa 600
ggtgctgagg aaatgttttc acggcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

```

<210> 140
<211> 252
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 140

[0107]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10          15
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
          20          25          30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
          35          40          45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
          50          55          60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65          70          75          80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
          85          90          95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
          100         105         110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
          115         120         125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
          130         135         140
Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
145         150         155         160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
          165         170         175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
          180         185         190
Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Arg
          195         200         205

```

Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

- <210> 141
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0108]

<400> 141
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg acgaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cgggtggttaa aagcgttgaa 300
 gaaactacca cggaggaatg gcgtaaatg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcatca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcatactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tagctatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactgaag aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtacacc gcacag 756

- <210> 142
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 142
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala


```

ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cgggtggttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagtg tgttcgggat ttaggcgac ccgactaccg gggcatactg tgettccaag      480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacct cgatgatgga tagctatgaa      600
ggtgctgagg aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaattt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtacacc gcacag                                     756

```

<210> 144

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 144

[0110]

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
           130          135          140
Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
145          150          155          160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
           165          170          175
Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
           180          185          190

```

Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

<210> 145
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 145
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 [0111] gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cgatggttaa aagcgttgaa 300
 gacaactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcatactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tgactatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcgaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 146
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 146
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr

gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cgggtggttaa aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggca agtaggctac ccgactaccg gggcatactg tgettccaag 480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tgactatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 148

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0113]

<400> 148

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
130 135 140
Phe Gly Gln Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
145 150 155 160
Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
165 170 175

Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

- <210> 149
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0114] <400> 149
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaat gggatcgggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcgcca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcgccccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggatc cgggtggtta aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaagget tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg ttttcgggat tntagggcgc cgcactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc ccatgatgga tagctatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgac aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 150
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 150
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 [0115] Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

<210> 151

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 151

```

atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacacg cggatcgggt    60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcg    120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc    180
cagcacgatg catccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca    240
ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa    300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc    360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat    420
atgagcagtg tgttcgggat tntaggtac ccgactaccg gggcatactg tgcttccaag    480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat    540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggccct atcaagacc cgatgatgga tgactatgaa    600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtccatc tggcgaaccg    660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgac aatcgaattt tgcgacgggt    720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag                                756

```

<210> 152

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0116]

<400> 152

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
           130          135          140
Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
145          150          155          160

```

Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

- <210> 153
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

[0117]

<400> 153
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaat gggatcggg 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgct 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggtgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcggggattc cgggtggttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cgggggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntaggttac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
 ggggcgggtac gtatcatgct gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtea acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tgaccatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 154
- <211> 252
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 154

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Met Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Gly Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Tyr Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0118]

<210> 155

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 155
atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacacg cggatcgggt 60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggea ctgatgttat tcgctttgtc 180
cagcacgatg cgtccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cgggtggtta aagcgttgaa 300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
ggcaccggtt tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
atgagcagtg tgttcgggat tntagggcgc ccgactaccg gggcatactg tgctccaag 480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgc gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tagccatgaa 600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 156

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

[0119] <220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 156

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1 5 10 15
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
20 25 30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
35 40 45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
50 55 60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65 70 75 80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
85 90 95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
100 105 110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
115 120 125
Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
130 135 140

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 159

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaaag tagttattac tggtcgctcg      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg catccgatga agcaggctgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgaccgt agtgaacaat gcagggattc cgatggttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaatcg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagtg tgttcgggca agtaggcgac ccgactaccg gggcatacaa tgcttccaag      480
ggggcggtag gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tagccatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactcgacg aatcgaaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggttcacc gcacag                                756

```

<210> 160

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

[0122]

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 160

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
           20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
           35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala
           50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val
           85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
           100          105          110
Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
           115          120          125

```

Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Gln Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln
 245 250

[0123]

- <210> 161
- <211> 756
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 161
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcagcgtgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggagggaatg gcgtaaactg ctgtccgta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tagccatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggtcgacgg cgggtggacc gcacag 756

- <210> 162
- <211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 162

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

[0124]

<210> 163

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 163

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggg      60
ttggcaatcg ccgataaact tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgtcgt      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc      180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cgatggtaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaaact ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagtg tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcatacaa tgcttccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tagctatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactgacg aatcgaatt tgcgacgggt      720
gcagaatttg tggtcgacgg cgggtacacc gcacag                                     756

```

[0125]

<210> 164

<211> 252

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 164

```

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
1           5           10           15
Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Leu Val Glu Glu Gly Ala
          20           25           30
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
          35           40           45
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
          50           55           60
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
65           70           75           80
Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val
          85           90           95
Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
          100          105          110

```

Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

[0126]

<210> 165

<211> 756

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 165

```

atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacaca aggtatcggc      60
ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgtct      120
gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgetttgtc      180
cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca      240
ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa      300
gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc      360
ggcaccgctc tgggcattca gcgatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat      420
atgagcagtg tgttcgggat ggtaggcgat ccgactaccg gggcactactg tgettccaag      480
ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat      540
gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagaccg cgatgatgga tgactatgaa      600
ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctc tgggtcacat tggcgaaccg      660
aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcatctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt      720
gcgaatttg tggctgacgg cgggtacacc gcacag      756

```

<210> 166
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 166
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Tyr Thr Ala Gln
 245 250

[0127]

<210> 167

<211>	756	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体	
<400>	167	
atgaccgatc	gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaacccg gcgggacacg cggatcgggt	60
ttggcaatcg	ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcg	120
gcggatgtag	gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc	180
cagcacgatg	catccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca	240
ttcggcccgg	ttacgacctt agtgaacaat gcagggattc cgggtggtaa aagcgttgaa	300
gacactacca	cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc	360
ggcacccgtc	tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat	420
atgagcagtg	tgttcgggat tntagcgac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag	480
ggggcggtag	gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat	540
gtgcgtgtca	acacagtaca tccgggcccc atcaagacc c gatgatgga tgactatgaa	600
ggtgctgagg	aaatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg	660
aatgacatcg	catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt	720
gcagaatttg	tggtcgacgg cgggttcacc gcacag	756

[0128]

<210>	168	
<211>	252	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体	
<400>	168	
Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr		
1 5 10 15		
Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala		
20 25 30		
Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala		
35 40 45		
Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Ala		
50 55 60		
Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala		
65 70 75 80		
Phe Gly Pro Val Thr Thr Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val		
85 90 95		

Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln
 245 250

[0129]

<210> 169
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 169
 atgaccgatc gtctgaaggc caaagtagcc atcgtaaccc gcgggacaca aggtatcggc 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggctcgcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggctgg cctaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cggttgttaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcaccgctc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg tgttcgggat tntaggcgac ccgactaccg gggcatataa tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcgca gcgctggatt gcgcaactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacce cgatgatgga tagctatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaacccta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaatt tgcgacgggt 720
 gcagaatttg tggctgacgg cgggtggacc gcacag 756

<210> 170
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 170

Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gln Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Pro Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Val Val
 [0130] 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Ile Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Asn Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Ser Tyr Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala Gln
 245 250

<210> 171
 <211> 756
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 171
 atgaccgatc gtctgaaggg caaagtagcc atcgtaaccg gcgggacacg cggtatcggt 60
 ttggcaatcg ccgataaatt tntagaggag ggtgcgaaag tagttattac tggtcgctcgt 120
 gcggatgtag gtgaaaaggc cgccaaatca atcggcggca ctgatgttat tcgctttgtc 180
 cagcacgatg tatccgatga agcaggetgg actaaactgt tcgacaccac cgaggaggca 240
 ttcggcccgg ttacgaccgt cgtgaacaat gcagggattc cgatgggtaa aagcgttgaa 300
 gacactacca cggaggaatg gcgtaaactg ctgtccgtta atctggatgg tgttttttc 360
 ggcacccgtc tgggcattca gcgcatgaaa aataaaggct tgggcgctag catcatcaat 420
 atgagcagtg ttttcgggat ggtaggcgac ccgactaccg gggcactactg tgcttccaag 480
 ggggcggtac gtatcatgtc gaaaagcga gcgctggatt gcgactgaa ggactacgat 540
 gtgcgtgtca acacagtaca tccgggcccc atcaagacc cgatgatgga tgaccatgaa 600
 ggtgctgagg aatgttttc acagcgtacg aaaaccctta tgggtcacat tggcgaaccg 660
 aatgacatcg catgggtctg tgtgtacctg gcactctgacg aatcgaaatt tgcgacgggt 720
 [0131] gcagaatttg tggtcgacgg cgggttcacc gcacag 756

<210> 172
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克菲尔乳杆菌酮还原酶的工程化变体

<400> 172
 Met Thr Asp Arg Leu Lys Gly Lys Val Ala Ile Val Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Arg Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Asp Lys Phe Val Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Thr Gly Arg Arg Ala Asp Val Gly Glu Lys Ala Ala
 35 40 45
 Lys Ser Ile Gly Gly Thr Asp Val Ile Arg Phe Val Gln His Asp Val
 50 55 60
 Ser Asp Glu Ala Gly Trp Thr Lys Leu Phe Asp Thr Thr Glu Glu Ala
 65 70 75 80

Phe Gly Pro Val Thr Thr Val Val Asn Asn Ala Gly Ile Pro Met Val
 85 90 95
 Lys Ser Val Glu Asp Thr Thr Thr Glu Glu Trp Arg Lys Leu Leu Ser
 100 105 110
 Val Asn Leu Asp Gly Val Phe Phe Gly Thr Arg Leu Gly Ile Gln Arg
 115 120 125
 Met Lys Asn Lys Gly Leu Gly Ala Ser Ile Ile Asn Met Ser Ser Val
 130 135 140
 Phe Gly Met Val Gly Asp Pro Thr Thr Gly Ala Tyr Cys Ala Ser Lys
 145 150 155 160
 [0132] Gly Ala Val Arg Ile Met Ser Lys Ser Ala Ala Leu Asp Cys Ala Leu
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Asp Val Arg Val Asn Thr Val His Pro Gly Pro Ile Lys
 180 185 190
 Thr Pro Met Met Asp Asp His Glu Gly Ala Glu Glu Met Phe Ser Gln
 195 200 205
 Arg Thr Lys Thr Pro Met Gly His Ile Gly Glu Pro Asn Asp Ile Ala
 210 215 220
 Trp Val Cys Val Tyr Leu Ala Ser Asp Glu Ser Lys Phe Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Ala Glu Phe Val Val Asp Gly Gly Phe Thr Ala Gln
 245 250