

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 725**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12P 7/62** (2006.01)

**C12P 17/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10821065 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2483292**

54 Título: **Polipéptidos LovD variantes y sus usos.**

30 Prioridad:

**30.09.2009 US 247253 P**

**30.09.2009 US 247274 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.12.2014**

73 Titular/es:

**CODEXIS, INC. (100.0%)  
200 Penobscot Drive  
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**GILSON, LYNNE;  
COLLIER, STEVEN JAMES;  
SUKUMARAN, JOLY;  
YEO, WAN LIN;  
ALVISO, OSCAR;  
TEO, EE LING;  
WILSON, ROBERT JOHN y  
XU, JUNYE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 524 725 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos LovD variantes y sus usos.

## 5 1. ANTECEDENTES

10 La simvastatina es un análogo semisintético del policétido fúngico natural lovastatina que puede aislarse del caldo de fermentación de *Aspergillus terreus*. La simvastatina y la lovastatina son comercializadas por Merck Co. como fármacos reductores del colesterol que reducen el riesgo de enfermedad cardíaca: la simvastatina como ZOCOR® y la lovastatina como MEVACOR®.

15 La lovastatina (ilustrada en la figura 1) es un potente inhibidor de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa, la enzima que limita la velocidad en la ruta de biosíntesis del colesterol (Xie *et al.*, 2006, Chemistry & Biology 13:1161-1169). El análogo simvastatina (también ilustrado en la figura 1) es más eficaz en el tratamiento de la hipercolesterolemia (Manzoni y Rollini, 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:555-564; Istan y Diesenhofer, 2001, Science 292:1160-1164). La sustitución de la cadena lateral  $\alpha$ -metilbutirato de la lovastatina con la cadena lateral  $\alpha$ -dimetilbutirato que se encuentra en la simvastatina aumenta significativamente sus propiedades inhibitoras al tiempo que reduce los efectos secundarios no deseados (Klotz, Ulrich, 2003, Arzneimittel-Forschung 53: 605-611).

20 Dada la importancia clínica de la simvastatina, se han descrito diversas síntesis en varias etapas partiendo de la lovastatina (véase, por ejemplo, el documento WO 2005/066150, la solicitud de EE.UU. Nº 2005/0080275, la solicitud de EE.UU. Nº 2004/0068123; la patente de EE.UU. Nº 6.833.461; el documento WO 2005/040107; Hoffman *et al.*, 1986, J. Med. Chem. 29:849-852; Schimmel *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:1307-1311).

25 El clúster génico para la biosíntesis de lovastatina se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.391.583; Kennedy *et al.*, 1999, Science 284:1368-1372; Hutchinson *et al.*, 2000, Antonie Van Leeuwenhoek 78:287-295). Codificada en este clúster génico se encuentra la enzima de 46 kD LovD, que cataliza la última etapa de la biosíntesis de la lovastatina.

30 En resumen, los restos HMG-CoA y núcleo de la decalina que imitan porciones del compuesto lovastatina son sintetizados *in vivo* por la lovastatina nonacétido sintasa (LNKS) y tres enzimas accesorias. La cadena lateral 2-metilbutirato de la lovastatina es sintetizada *in vivo* por la lovastatina dicétido sintasa (LDKS) y fijada covalentemente al dominio transportador de acilo de LovF mediante un enlace tioéster. La LovD, una aciltransferasa, es entonces capaz de transferir selectivamente el grupo 2-metilbutirato de LDKS al grupo hidroxilo C8 de la monacolina J en una sola etapa para producir lovastatina (Xie *et al.*, 2006, Chemistry & Biology 13: 1161-1169).

35 Recientemente se ha descubierto que la aciltransferasa LovD tiene una amplia especificidad de sustrato hacia el transportador de acilo, el sustrato acilo y el aceptor de acilo decalina (Xie *et al.*, 2006, Chem. Biol. 13:1161-1169). Por ejemplo, LovD puede catalizar de manera eficaz la transferencia de acilo desde tioésteres de CoA o tioésteres de N-acetilcisteamina ("SNAC") hasta la monacolina J (*id.*). Significativamente, cuando se utilizó  $\alpha$ -dimetilbutiril-SNAC como donador de acilo, la LovD era capaz de convertir la monacolina J y la 6-hidroxi-6-desmetil monacolina J en simvastatina y huvastatina, respectivamente (*id.*). Mediante una cepa de *E. coli* obtenida por ingeniería genética para que sobreexpresara LovD como biocatalizador de célula completa, se sintetizaron cantidades preparativas de simvastatina en una sola etapa de fermentación (*id.*).

40 Los estudios anteriores demuestran que la aciltransferasa LovD es una enzima atractiva para la biosíntesis de fármacos reductores del colesterol farmacéuticamente importantes tales como la simvastatina. Sin embargo, en posteriores experimentos llevados a cabo con la enzima LovD aislada, la estabilidad y la velocidad de reacción resultaron problemáticas (Xie y Tang, 2007 Appl. Environ. Microbiol. 73:2054-2060). Concretamente, se descubrió que LovD precipita fácilmente (horas) a altas concentraciones de proteína (~ 100  $\mu$ M) y lentamente (días) a concentraciones más bajas (~ 10  $\mu$ M) (*id.*). Además, se descubrió que el tan deseado producto, la simvastatina, compite por la enzima LovD, impidiendo significativamente la velocidad de acilación neta global (*id.*).

45 La enzima LovD también es muy propensa al plegamiento anómalo y a los agregados cuando se sobreexpresa en *E. coli*, haciendo que incluso los sistemas de biocatálisis de célula completa no sean tan ideales para la producción comercial (Xie *et al.*, 2009, Biotech. Bio. Eng. 102:20-28).

50 En un esfuerzo por aumentar la solubilidad de LovD sin pérdida de actividad catalítica, se han estudiado mutantes de LovD de *A. terreus* de tipo silvestre. La sustitución de los residuos de cisteína en las posiciones 40 y 60 (Cys40 y Cys60) con residuos de alanina produjo mejoras tanto en la solubilidad de la enzima como en la actividad biocatalítica de célula completa (*id.*). Experimentos adicionales de mutagénesis que convertían estos dos residuos en aminoácidos pequeños o polares demostraron que las mutaciones Cys40  $\rightarrow$  Ala ("C40A") y Cys60  $\rightarrow$  Asn ("C60N") son las más beneficiosas, produciendo aumentos de un 27% y un 26%, respectivamente, en la actividad biocatalítica de célula completa (*id.*). Cuando se combinan, estas mutaciones resultaron ser aditivas, presentando el doble mutante C40A/C60N aumentos de aproximadamente un 50% tanto en la solubilidad como en la actividad biocatalítica de célula completa.

A pesar de sus propiedades mejoradas, estos mutantes de LovD no son adecuados para la producción de simvastatina a gran escala en sistemas libres de células. Resultarían deseables variantes o mutantes adicionales de enzimas LovD de *A. terreus* de tipo silvestre que presentasen propiedades mejoradas en comparación con el tipo silvestre y/o los mutantes conocidos .

5

## 2. RESUMEN

La invención proporciona un polipéptido LovD variante que tiene al menos dos veces mayor actividad catalítica que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido LovD variante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que incluye las dos siguientes mutaciones: L174F y A178L, y opcionalmente de aproximadamente 1 a 30 mutaciones adicionales y opcionalmente de aproximadamente 1 a 20 mutaciones conservadoras adicionales.

10

La invención también proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante según la invención que es opcionalmente un vector de expresión adecuado para expresar el polipéptido LovD variante en una célula hospedadora, y vector de expresión en el que la secuencia codificante utiliza opcionalmente codones optimizados para la expresión en la célula hospedadora.

15

La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante según la invención.

20

La invención también proporciona un método de fabricación de un polipéptido LovD variante que comprende cultivar una célula hospedadora según la invención en condiciones en las que se expresa el polipéptido LovD variante y opcionalmente recuperar el polipéptido LovD variante.

25

La invención también proporciona un método de fabricación de simvastatina que comprende poner en contacto un sustrato monacolina J con un polipéptido LovD variante según la invención en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo y en condiciones en las que la monacolina J se convierte en simvastatina.

30

La invención también proporciona un método de fabricación de simvastatina que comprende poner en contacto un sustrato lovastatina con un polipéptido LovD variante según la invención en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo y en condiciones en las que el sustrato lovastatina se convierte en simvastatina.

Como se ha analizado anteriormente, el gen *LovD* de *A. terreus* codifica una aciltransferasa (en lo sucesivo denominada "polipéptido LovD", "enzima LovD", "aciltransferasa LovD" o "LovD") capaz de convertir la monacolina J, el producto de hidrólisis del producto natural lovastatina, en simvastatina. Los inventores de la presente descripción han descubierto que los polipéptidos LovD que incluyen mutaciones en determinadas posiciones de residuos presentan propiedades mejoradas en comparación con el polipéptido LovD de tipo silvestre producido por *A. terreus* (SEQ ID NO: 2).

35

Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona polipéptidos LovD variantes que tienen una o más propiedades mejoradas en comparación con el polipéptido LovD de tipo silvestre de *A. terreus* (SEQ ID NO: 2). En general, las variantes de LovD incluyen una o más mutaciones en las posiciones seleccionadas que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como una mayor actividad catalítica, una mayor estabilidad térmica, una menor agregación y/o una mayor estabilidad frente a condiciones de lisis celular. Los polipéptidos LovD variantes pueden incluir una o más mutaciones de una sola categoría (por ejemplo, una o más mutaciones que aumentan la actividad catalítica) o mutaciones de dos o más categorías diferentes. Mediante la selección de mutaciones que se correlacionan con propiedades específicas, pueden obtenerse fácilmente polipéptidos LovD variantes adecuados para su uso en condiciones especificadas.

40

45

Las posiciones en la secuencia del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 en las que se han descubierto mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tal como una mayor actividad catalítica incluyen, pero no se limitan a, A123, M157, S164, S172, L174, A178, N191, L192, A247, R250, S256, A261, G275, Q297, L361, V370 y N391. Las posiciones adicionales en las que se han descubierto mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tal como la estabilidad térmica, incluyen, pero no se limitan a, Q241, A261, Q295 y Q412. Otras posiciones en las que se han descubierto mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tal como una menor agregación, incluyen, pero no se limitan a, N43, D96 y H404. Las posiciones en las que se han descubierto mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tal como una mayor estabilidad, incluyen pero no se limitan a, C40, C60 y D254.

55

60

Las posiciones en la secuencia del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 en las que se han descubierto mutaciones sin efectos perjudiciales (o en las que las mutaciones mejoraban las propiedades de la enzima LovD) resultaron incluir, pero no se limitan a, I4, A9, K26, R28, I35, C40, S41, N43, C60, S109, S 142, A184V, N191S, A261, L292, Q297, L335, A377, A383, N391 y H404. Las formas de realización concretas de la descripción con propiedades mejoradas pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos LovD con mutaciones en las posiciones L174 y A178, y opcionalmente de cero a aproximadamente 30 mutaciones adicionales. En una forma

65

de realización específica de la descripción, las mutaciones adicionales están en posiciones seleccionadas de entre las posiciones identificadas anteriormente. En algunas formas de realización de la descripción, los polipéptidos LovD con propiedades mejoradas incluyen mutaciones en las posiciones A123, L174, A178, N191, A247 y L361, y de cero hasta aproximadamente 26 mutaciones adicionales. En una forma de realización específica de la descripción, las mutaciones adicionales están en posiciones seleccionadas de entre las posiciones identificadas anteriormente.

Las mutaciones ejemplares específicas del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una mayor actividad catalítica incluyen, pero no se limitan a, A123P, M157V, S164G, S172N, L174F, A178L, N191G, L192I, A247S, R250K, S256T, A261H, G275S, Q297G, L361M, V370I y N391S.

Las mutaciones ejemplares específicas del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una mayor estabilidad térmica incluyen, pero no se limitan a, Q241M, A261H, Q295R y Q412R.

Las mutaciones ejemplares específicas del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una menor agregación incluyen, pero no se limitan a, N43R, D96R y H404K.

Las mutaciones ejemplares específicas del polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una mayor estabilidad incluyen, pero no se limitan a, C40R, C60R y D254E.

Además de las mutaciones ejemplares específicas descritas anteriormente, se ha descubierto que los polipéptidos LovD pueden tolerar una variedad de mutaciones específicas adicionales en otras posiciones, sin efectos perjudiciales. De hecho, en algunos casos, las mutaciones adicionales también confieren a los polipéptidos LovD propiedades beneficiosas o mejoradas. Estas mutaciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes mutaciones específicas y ejemplares: I4N, A9V, K26E, R28K, R28S, I35L, C40A, C40V, C40F, S41R, N43Y, C60F, C60Y, C60N, C60H, S109C, S142N, A184T, A184V, N191S, A261T, A261E, A261V, L292R, Q297E, L335M, A377V, A383V, N391D y H404R. Los polipéptidos LovD variantes pueden incluir una o más mutaciones en estas posiciones adicionales.

En algunas formas de realización de la descripción, los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento incluyen las dos mutaciones siguientes: L174F y A178L y opcionalmente de cero a aproximadamente 30 mutaciones adicionales. En una forma de realización específica de la descripción, las mutaciones adicionales opcionales están seleccionadas de entre las diversas mutaciones identificadas anteriormente.

En algunas formas de realización de la descripción, los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento incluirán al menos las siguientes mutaciones: A123P, L174F, A178L, N191 (S o G), A247S y L361M, y de cero a aproximadamente 26 mutaciones adicionales seleccionadas de entre las diversas mutaciones diferentes identificadas anteriormente.

En general, los polipéptidos LovD variantes que incluyen un mayor número de mutaciones presentan una mayor actividad catalítica. Por ejemplo, mientras que una variante específica que incluía mutaciones en dos posiciones de residuos (L174F y A178L) presentó una actividad aproximadamente dos veces mayor que la LovD de tipo silvestre, y una variante específica que incluía mutaciones en seis posiciones de residuos (VARIANTE NO: 120 en la Tabla 1) presentó una actividad catalítica aproximadamente 12 veces mayor que a LovD de tipo silvestre, una variante específica que incluía 28 mutaciones (VARIANTE NO: 114 en la Tabla 1), una variante específica que incluía 29 mutaciones (VARIANTE NO: 116 de la Tabla 1) y una variante específica que incluía 32 mutaciones (VARIANTE NO: 118 en la Tabla 1) presentaron una actividad catalítica aproximadamente 1.550 veces mayor que la LovD de tipo silvestre. En la Tabla 1 se describen numerosos polipéptidos LovD variantes que presentan una actividad de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.550 veces mayor que el polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2. Utilizando estos polipéptidos LovD variantes específicos ejemplares, pueden obtenerse fácilmente polipéptidos variantes de LovD adicionales con una actividad superior a aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700 veces, o incluso superior, que el polipéptido LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2.

Los polipéptidos LovD variantes específicos de la Tabla 1 también pueden utilizarse para obtener fácilmente polipéptidos LovD variantes con combinaciones especificadas de propiedades mejoradas.

Los diversos polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento también pueden incluir opcionalmente una o más mutaciones conservadoras además de las mutaciones descritas anteriormente. Por lo general, tales mutaciones conservadoras opcionales no comprenderán más de aproximadamente un 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 3%, 2% ó 1% de la secuencia global. Sin pretender limitarse a ninguna teoría concreta de operación, se cree que el aminoácido en la posición 76 puede estar implicado en la catálisis. Deben evitarse preferentemente las mutaciones en esta posición de residuo. También se cree que los aminoácidos en las posiciones 79, 148, 188 y/o 363 pueden contribuir a la catálisis. En algunas formas de realización de la descripción, los polipéptidos LovD variantes que incluyen mutaciones conservadoras opcionales contendrán de 1 a 20 de tales mutaciones. En formas de realización adicionales, los polipéptidos LovD variantes incluyen polipéptidos truncados en los que pueden omitirse de 1 a 15 aminoácidos del extremo N-terminal y pueden omitirse de 1 a 6 aminoácidos del extremo

C-terminal.

En otro aspecto, la descripción proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, los polinucleótidos codificantes son parte de un vector de expresión que comprende una o más secuencias de control adecuadas para dirigir la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedadora. En algunas formas de realización, el vector de expresión es adecuado para expresar polipéptidos LovD variantes en una bacteria, tal como, pero no limitada a, una *E. coli*, e incluye una secuencia de promotor, tal como una secuencia de promotor *lac*, unida operativamente a la secuencia codificante. En tales polinucleótidos, los codones de la secuencia codificante pueden optimizarse para la expresión en una célula hospedadora concreta de interés.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona células hospedadoras que comprenden un vector de expresión o polinucleótido que codifica una LovD variante. En algunas formas de realización, la célula hospedadora es una bacteria tal como, pero sin limitarse a *E. coli*. Las células hospedadoras pueden utilizarse para producir preparaciones en bruto o purificadas de polipéptidos LovD variantes específicos, o, como alternativa, pueden utilizarse como preparaciones de célula completa en los métodos descritos en el presente documento para producir simvastatina y huvastatina.

Los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento esterifican el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo para producir simvastatina. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos de fabricación de simvastatina utilizando los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento. Los métodos comprenden generalmente poner en contacto monacolina J con un polipéptido LovD variante en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo en condiciones que producen simvastatina. En algunas formas de realización, pueden utilizarse análogos de monacolina J como sustratos precursores para la formación de otras estatinas, tales como, pero sin limitarse a, huvastatina.

Los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento reconocen varios cosustratos tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo diferentes, incluidos a modo de ejemplo y no de limitación,  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-N-acetilcisteamina ("DMB-S-NAC"),  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metilgliocolato ("DMB-S-MTG"), mercaptopropionato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metilo ("DMB-S-MMP"), mercaptopropionato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-etilo ("DMB-S-EMP"), mercaptobutirato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metilo ("S-DMB-MMB") y ácido  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-mercaptopropiónico ("DMB-S-AMP"). Puede utilizarse cualquiera de estos cosustratos tioéster, o mezclas de tales cosustratos tioéster, en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas formas de realización, la reacción se lleva a cabo *in vitro* con un polipéptido LovD variante aislado, que puede estar purificado o no purificado antes de su uso. En algunas formas de realización, pueden añadirse marcadores enzimáticos a cualquiera de los extremos terminales del polipéptido LovD a fin de posibilitar la unión a un transportador sólido. En algunas formas de realización específicas, el polipéptido LovD variante se aísla y purifica antes de su uso. En otras formas de realización específicas, el polipéptido LovD variante se suministra como lisado en bruto de células hospedadoras obtenidas por ingeniería genética para que expresen el polipéptido LovD variante, con o sin eliminación de los restos celulares del lisado celular.

El sustrato monacolina J puede incluirse en la mezcla de reacción en forma purificada, o, como alternativa, puede generarse *in situ* por hidrólisis de lovastatina. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la reacción se lleva a cabo en un solo recipiente como proceso de dos etapas partiendo de lovastatina.

Los métodos pueden llevarse a cabo en diversas condiciones, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del polipéptido LovD variante específico que se utilice. Una reacción típica incluye aproximadamente de 1 g/l a 250 g/l, también de 25 g/l a 200 g/l, y, con frecuencia de 1 g/l a 200 g/l, de sustrato monacolina J o análogo de la misma, exceso de cosustrato tioéster (por ejemplo, de aproximadamente 1,0 a 10,0 equivalentes, también de 1,0 a 5,0 equivalentes, y con frecuencia de 1,0 a 4,0 equivalentes) y aproximadamente de 0,1 g/l a 10 g/l de polipéptido variante de LovD. En algunas formas de realización, una reacción típica puede incluir de 20 g/l a 200 g/l, de 50 g/l a 200 g/l o de 50 g/l a 150 g/l de sustrato monacolina J o análogo de la misma. En algunas formas de realización, una reacción típica puede incluir de 1,0 a 2,0, de 1,0 a 1,5 o de 1,1 a 1,3 equivalentes de cosustrato tioéster. En algunas formas de realización, pueden utilizarse de 0,2 g/l a 10 g/l, de 0,5 g/l a 10 g/l, de 0,5 g/l a 5 g/l, de 0,75 g/l a 2,5 g/l o de 0,75 g/l a 1,5 g/l de polipéptido variante de LovD. El pH de la mezcla de reacción, la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción y la duración de la reacción dependerán, entre otros factores, del polipéptido variante de LovD específico que se utilice. La mayoría de las reacciones pueden llevarse a cabo a un pH en el intervalo de pH 7,5 a pH 10,5, también de pH 8,0 a pH 10,0 y con frecuencia de pH 8 a pH 9,5, y una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a 50°C, también de 20°C a 30°C y con frecuencia de 20°C a 40°C, durante aproximadamente 2 a 54 horas, de 5 a 48 horas o de 10 a 48 horas. Las reacciones llevadas a cabo con los polipéptidos LovD variantes que incluyen mutaciones que se correlacionan con una mayor estabilidad térmica pueden llevarse a cabo a temperaturas más altas, por lo general en un intervalo de aproximadamente 30°C a 40°C, dependiendo de la variante concreta que se utilice.

El subproducto tiol de la reacción de transferencia de acilo puede inhibir los polipéptidos LovD. Por consiguiente, puede resultar deseable incluir en la mezcla de reacción uno o más agentes neutralizantes que puedan mejorar el rendimiento y/o la velocidad de la reacción eliminando o neutralizando estos subproductos tiol. La neutralización incluye, sin limitación, la modificación química de los subproductos tiol, tal como por oxidación. Los agentes neutralizantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, compuestos que reaccionan con el subproducto tiol y agentes capaces de quelar, adsorber, absorber o eliminar el subproducto tiol. En algunas formas de realización en las que se utiliza un agente neutralizante, el agente neutralizante es carbón vegetal activado. Cuando se utiliza, el carbón vegetal activado puede incluirse en la mezcla de reacción en cantidades que van de 1 g/l a 30 g/l, de 2 g/l a 20 g/l y de 5 g/l a 15 g/l.

El sustrato monacolina J puede estar en forma de sal, tal como una sal de amonio o de sodio. La reacción del sustrato monacolina J, tal como las sales de sodio o de amonio de monacolina J, puede llevarse a cabo opcionalmente en presencia de un neutralizante, tal como carbón vegetal activado. La monacolina J también puede estar en forma de sal de amonio. Cuando la sal de amonio de monacolina J se convierte en la sal de amonio de simvastatina, puede hacerse precipitar la sal de amonio de simvastatina a partir del medio de reacción, por ejemplo, a partir de agua.

Otros aspectos y ventajas de la descripción resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

### 3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 proporciona un diagrama que ilustra una ruta para la síntesis de simvastatina a partir de lovastatina o monacolina J;

La figura 2 proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica la enzima LovD de tipo silvestre de *Aspergillus terreus* sometida a optimización de codones para la expresión en *E. coli*. (SEQ ID NO: 1); y

La figura 3 proporciona la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de la figura 2 (SEQ ID NO: 2).

### 4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona polipéptidos variantes de LovD capaces de transferir un grupo acilo de determinados cosustratos tioéster a la monacolina J y análogos o derivados de la misma para producir compuestos de estatina terapéuticamente importantes, tales como, pero no limitados a, simvastatina y huvastatina. Las variantes de LovD tienen propiedades mejoradas en comparación con la aciltransferasa LovD de tipo silvestre que puede obtenerse de *A. terreus* (SEQ ID NO: 2), y pueden utilizarse en sistemas basados en células o libres de células para producir de manera eficaz y rentable estatinas tales como simvastatina a partir de materiales de partida fácilmente disponibles, tales como lovastatina y monacolina J.

#### 4.1. Abreviaturas

Para los fines de las descripciones del presente documento, las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos codificados genéticamente son convencionales y son las siguientes:

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Cuando las secuencias peptídicas o polipeptídicas se presentan en forma de cadena de abreviaturas de una letra o de tres letras (o mezclas de las mismas), las secuencias se presentan en la dirección N → C según la convención común.

#### 5 4.2. Definiciones

Los términos técnicos y científicos utilizados en las descripciones del presente documento tendrán los significados que entiende comúnmente un experto habitual en la materia, salvo que se defina específicamente lo contrario. Por consiguiente, los siguientes términos pretenden tener los siguientes significados.

10 "LovD de tipo silvestre", "enzima LovD de tipo silvestre", "polipéptido LovD de tipo silvestre" y/o "aciltransferasa LovD de tipo silvestre" se refiere a la enzima aciltransferasa que puede obtenerse a partir de *A. terreus* codificada por el gen *LovD* y que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2. Esta enzima puede utilizar un tioéster para acilar regioespecíficamente el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J o la 6-hidroxi-6-des-metil monacolina J a fin de producir simvastatina o huvastatina. Véase, por ejemplo, Xie *et al.*, 2006, "Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Aciltransferase", Chem. Biol. 13:1161-1169.

15 "Secuencia codificante" se refiere a aquella porción de un ácido nucleico o polinucleótido (por ejemplo, un gen, ARNm, ADNc, etc.) que codifica un péptido o polipéptido.

20 "De origen natural" o "de tipo silvestre" se refiere a la forma de un material o sustancia tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica de origen natural o de tipo silvestre es una secuencia presente en un organismo que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada por manipulación humana.

25 "Recombinante", cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, un ácido nucleico o un polipéptido, se refiere a un material, o a un material correspondiente a la forma natural o nativa del material, que ha sido modificado de manera que exista en la naturaleza, o sea idéntico a un material que existe en la naturaleza, pero que se produce o se deriva de materiales sintéticos y/o de materiales naturales que han sido manipulados de alguna manera. Los ejemplos no limitativos incluyen, entre otros, células obtenidas por ingeniería genética para que expresen secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran dentro de las formas nativas (no recombinantes) de la célula, o que expresen genes nativos que se encuentran dentro de la forma no recombinante de la célula a niveles que difieren de sus niveles de expresión nativos.

30 "Porcentaje de identidad de secuencia", "porcentaje de identidad" y/o "por ciento idéntico/a" se utilizan en el presente documento para referirse a las comparaciones entre secuencias polinucleotídicas o secuencias polipeptídicas, y se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia a fin de efectuar un alineamiento óptimo. El porcentaje de identidad se calcula dividiendo el número de porciones coincidentes en la ventana de comparación por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando por 100. El número de posiciones coincidentes en la ventana de comparación es la suma del número de posiciones del polinucleótido o polipéptido de comparación en la ventana que son idénticas en secuencia con respecto al polinucleótido o polipéptido de referencia y el número de posiciones del polinucleótido o polipéptido de referencia en la ventana de comparación que se alinean con un hueco en el polinucleótido o polipéptido de comparación. La determinación del alineamiento óptimo y el porcentaje de identidad de secuencia se realiza utilizando los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410 y Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402). El software para realizar el análisis BLAST está a disposición del público a través del sitio web del National Center for Biotechnology Information.

35 En resumen, el análisis BLAST implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coincidan con o satisfagan alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se conoce como umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul *et al.*, 1990, *supra*). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. A continuación, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación acumulativa de alineamiento. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulativa de alineamiento disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas

5 cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, 1989, Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 89:10915). Se dispone de numerosos otros algoritmos que funcionan de manera similar a BLAST que proporcionan un porcentaje de identidad entre secuencias.

10 El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, mediante aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el GCG Wisconsin Software Package) o mediante inspección visual (véase en general, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., 1995, suplemento).

15 Además, la determinación del alineamiento de secuencias y del porcentaje de identidad de secuencia puede emplear los programas BESTFIT o GAP en el paquete GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI), utilizando los parámetros por defecto proporcionados.

20 "Secuencia de referencia" se refiere a una secuencia especificada con la que se compara otra secuencia. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, un segmento de una secuencia polipeptídica o de un gen de longitud completa. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 20 residuos de aminoácidos o nucleótidos de longitud, al menos 25 residuos de longitud, al menos 50 residuos de longitud o la longitud completa del polipéptido o ácido nucleico. Dado que dos polinucleótidos o polipéptidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa) que sea similar entre las dos secuencias, y (2) pueden comprender adicionalmente una secuencia que sea divergente entre las dos secuencias, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos o polipéptidos se realizan por lo general comparando las secuencias de los dos polinucleótidos sobre una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia.

30 La expresión "secuencia de referencia" no pretende limitarse a las secuencias de tipo silvestre, y puede incluir secuencias modificadas, variantes y/u obtenidas por ingeniería genética.

35 "Ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o posiciones de nucleótidos contiguos en el que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia de al menos 20 aminoácidos o nucleótidos contiguos y en el que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de un 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La ventana de comparación puede tener una longitud superior a 20 residuos contiguos, e incluye, opcionalmente 30, 40, 50, 100, o ventanas más largas.

40 "Identidad sustancial" se refiere a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que tiene al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de referencia. En muchas formas de realización, las secuencias que comparten "identidad sustancial" serán al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o incluso un 99% idénticas a la secuencia de referencia.

45 La expresión "correspondiente a", "referencia a" o "relativa/s a" cuando se utiliza en el contexto de la numeración de una secuencia polinucleotídica o secuencia de aminoácidos dada se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia polinucleotídica o secuencia de aminoácidos dada se compara con la secuencia de referencia específica. En otras palabras, el número de residuo o la posición de residuo de un determinado polímero se indica con respecto a la secuencia de referencia más que por la posición numérica real de ese residuo dentro de la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos dada. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos dada, tal como la de un polipéptido LovD variante, puede alinearse con una secuencia de referencia introduciendo huecos para optimizar las coincidencias de residuos entre las dos secuencias. En estos casos, aunque hay huecos presentes, la numeración del residuo en la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos dada se hace con respecto a la secuencia de referencia con la que se ha alineado.

50 "Mayor actividad catalítica", cuando se utiliza en el contexto del polipéptido LovD variante descrito en el presente documento, se refiere a un polipéptido LovD que presenta un aumento de la conversión de sustrato (por ejemplo monacolina J o una sal de la misma) en producto (por ejemplo simvastatina o una sal de la misma) en comparación con un polipéptido LovD de referencia, tal como se mide en un ensayo *in vitro* o *in vivo*. El origen del aumento de la actividad catalítica no es crucial. Por lo tanto, el aumento podría deberse a cambios en una o más de  $K_m$ ,  $V_{max}$  o  $K_{cat}$  o deberse a una menor inhibición del sustrato. En algunas formas de realización, para fines comparativos, la actividad catalítica puede expresarse oportunamente en términos del porcentaje de sustrato convertido en producto por unidad de enzima en un período de tiempo especificado. Las enzimas que convierten un mayor porcentaje de sustrato en producto por unidad por período de tiempo que una enzima de referencia ensayada en condiciones idénticas tienen mayor actividad catalítica en comparación con la enzima de referencia.



Los métodos y ensayos para medir la actividad catalítica de enzimas son conocidos en la técnica. Los ejemplos específicos útiles para los polipéptidos LovD se proporcionan en la sección de Ejemplos. Para los ensayos comparativos llevados a cabo con lisados celulares en bruto, deben utilizarse células hospedadoras y sistemas de expresión idénticos. Además, deben determinarse el número de células y la cantidad de polipéptido LovD en cada preparación, como se conoce en la técnica.

"Termoestable" o "térmicamente estable" en el contexto de los polipéptidos LovD se refiere a polipéptidos LovD variantes que conservan al menos aproximadamente un 50% de su actividad catalítica cuando se exponen a una temperatura de 30°C durante un período de 3 horas en comparación con la actividad catalítica presentada por ese polipéptido LovD variante a 25°C en las mismas condiciones de reacción.

"Residuo" se refiere a un aminoácido cuando se utiliza en el contexto de los polipéptidos y un nucleótido cuando se utiliza en el contexto de los polinucleótidos.

"Aminoácido o residuo hidrófilo" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que presenta una hidrofobicidad inferior a cero según la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófilos codificados genéticamente incluyen Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) y Arg (R).

"Aminoácido o residuo ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que presenta un valor de pKa inferior a aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos ácidos tienen por lo general cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen Glu (E) y Asp (D).

"Aminoácido residuo o básico" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófilo que tiene una cadena lateral que presenta un valor de pKa superior a aproximadamente 6 cuando el aminoácido está incluido en un péptido o polipéptido. Los aminoácidos básicos tienen por lo general cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con un ion hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen Arg (R), His (H) y Lys (K).

"Aminoácido o residuo polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartidos en común por dos átomos se mantiene más cerca de uno de los átomos. Los aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen Asn (N), Gln (Q), Ser (S) y Thr (T).

"Aminoácido o residuo hidrófobo" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que presenta una hidrofobicidad superior a cero según la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg *et al.*, 1984, J. Mol. Biol. 179:125-142. Los aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M), Ala (A) y Tyr (Y).

"Aminoácido o residuo aromático" se refiere a un aminoácido hidrófilo o hidrófobo que tiene una cadena lateral que incluye al menos un anillo aromático o heteroaromático. Los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W). Debido a la pKa de su nitrógeno del anillo heteroaromático, His (H) se clasifica en el presente documento como residuo hidrófobo o básico. Se clasifica adicionalmente como residuo aromático debido a su cadena lateral heteroaromática.

"Aminoácido o residuo restringido" se refiere a un aminoácido que tiene una geometría restringida. En el presente documento, los residuos restringidos incluyen Pro (P).

"Aminoácido o residuo no polar" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartidos en común por dos átomos es mantenido generalmente por igual por cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Los aminoácidos no polares codificados genéticamente incluyen Gly (G), Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M) y Ala (A).

"Aminoácido o residuo alifático" se refiere a un aminoácido o residuo hidrófobo que tiene una cadena lateral hidrocarbonada alifática. Los aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I).

La cisteína es inusual, ya que puede formar puentes disulfuro con otros residuos de Cys u otros aminoácidos que contienen sulfanilo o sulfhidrilo. Los "residuos de tipo cisteína" incluyen cisteína y otros aminoácidos que contengan restos sulfhidrilo que están disponibles para la formación de puentes disulfuro. La capacidad de Cys (y otros aminoácidos con cadenas laterales que contengan grupos -SH) de existir en un polipéptido, bien en la forma reducida con grupos -SH libres o bien en la forma oxidada con puentes disulfuro influye en si contribuye al carácter hidrófobo o hidrófilo neto del polipéptido. Aunque Cys presenta una hidrofobicidad de 0,29 según la escala consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1984, *supra*), debe entenderse que para

los fines de la presente descripción, Cys se clasifica en su propio grupo único.

"Aminoácido o residuo pequeño" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que se compone de un total de tres o menos carbonos y/o heteroátomos (excepto el  $\alpha$ -carbono y los hidrógenos). Los aminoácidos o residuos pequeños pueden clasificarse adicionalmente como aminoácidos o residuos pequeños alifáticos, no polares, polares o ácidos, según las definiciones anteriores. Los aminoácidos pequeños codificados genéticamente incluyen Ala (A), Val (V), Cys (C), Asn (N), Ser (S), Thr (T) y Asp (D).

"Aminoácido o residuo que contiene hidroxilo" se refiere a un aminoácido que contiene un resto hidroxilo (-OH). Los aminoácidos que contienen grupos hidroxilo codificados genéticamente incluyen Ser (S) Thr (T) y Tyr (Y).

Sustituciones o mutaciones "conservadoras" de aminoácidos se refiere a aquellas sustituciones y mutaciones en las que los residuos de aminoácidos de un polipéptido de referencia están sustituidos con residuos de aminoácidos que tienen propiedades fisicoquímicas similares. Las sustituciones y mutaciones consideradas conservadoras son conocidas en la técnica. En algunas formas de realización, las sustituciones y mutaciones conservadoras son aquellas en las que un aminoácido de una clase particular está sustituido con otro aminoácido dentro de esa misma clase (por ejemplo, alifático  $\rightarrow$  alifático). A continuación se proporcionan sustituciones conservadoras ejemplares:

Residuo	Posibles mutaciones conservadoras
A, L, V, I	Otro alifático (A, L, V, I) Otro no polar (A, L, V, I, G, M)
G, M	Otro no polar (A, L, V, I, G, M)
D, E	Otro ácido (D, E)
K, R	Otro básico (K, R, H)
N, Q, S, T	Otro polar
Y, W, F	Otro aromático (Y, W, F, H)
C, P	Ninguno

"Aislado" se refiere a una sustancia que se ha retirado de la fuente en la que se produce de forma natural. No es necesario purificar una sustancia con el fin de aislarla. Por ejemplo, un polipéptido LovD variante producido por recombinación en una célula hospedadora se considera aislado cuando se retira o se libera de la célula. Un polipéptido LovD variante contenido en una fracción de lisado celular en bruto se considera "aislado" para los fines de la presente descripción.

"Purificado" se refiere a una sustancia que se ha liberado al menos parcialmente de contaminantes y otros materiales que por lo general la acompañan. Las sustancias pueden purificarse en diversos grados. Una sustancia es "sustancialmente pura" cuando una preparación o composición de la sustancia contiene menos de aproximadamente un 1% de contaminantes. Una sustancia es "esencialmente pura" cuando una preparación o composición de la sustancia contiene menos de aproximadamente un 5% de contaminantes. Una sustancia es "pura" cuando una preparación o composición de la sustancia contiene menos de aproximadamente un 2% de contaminantes. Para las sustancias que están "purificadas a homogeneidad", no pueden detectarse contaminantes con los métodos analíticos convencionales.

#### 4.3. Polipéptidos variantes de LovD

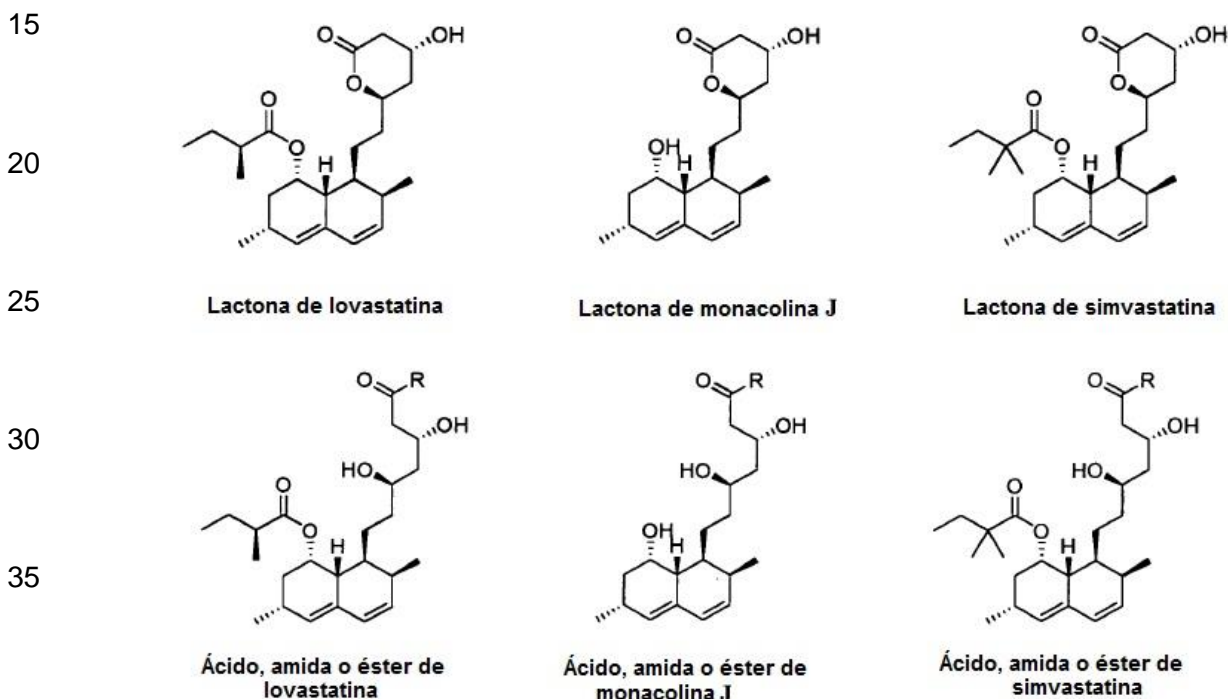
Como se ha analizado en la sección Antecedentes, el polipéptido codificado por el gen *LovD* de *A. terreus* es una aciltransferasa que cataliza la última etapa de la biosíntesis de la lovastatina. Esta aciltransferasa LovD tiene una amplia especificidad de sustrato hacia el transportador de acilo, el sustrato acilo y el aceptor decalina (véase, por ejemplo, Xie *et al.*, 2006, Chem. Biol. 12:1161-1169) de manera que la enzima puede utilizarse para transferir grupos acilo de cosustratos tioéster a decalinas tales como monacolina J y 6-hidroxi-6-desmetil monacolina J para producir compuestos de estatina terapéuticamente importantes. En la figura 1 (zona encuadrada) se ilustra una reacción ejemplar. Como se ilustra en esta figura 1, la aciltransferasa LovD transfiere catalíticamente el grupo  $\alpha$ -dimetilbutirilo del tioéster (**14**) a la monacolina J (**12**) para producir simvastatina (**16**), por lo que es una diana atractiva para la preparación de esta estatina farmacéuticamente importante.

A pesar de sus propiedades catalíticas atractivas, los intentos de utilizar la aciltransferasa LovD de *A. terreus* aislada y determinados mutantes de la misma *in vitro* para la producción de simvastatina no han tenido mucho éxito. La estabilidad, la solubilidad, el plegamiento anómalo, la agregación y la velocidad de reacción resultaron problemáticos (véanse, por ejemplo, Xie y Tang, 2007, Appln. Environ. Microbiol. 73:2054-2060; Xie *et al.*, 2009, Biotech. Bio. Eng. 102:20-28).

La presente descripción proporciona polipéptidos LovD variantes que, al igual que la aciltransferasa LovD de tipo silvestre de *A. terreus* (SEQ ID NO: 2), transfieren catalíticamente un grupo acilo de un cosustrato tioéster a

la monacolina J (o sus análogos o derivados) para producir simvastatina. Estas variantes incluyen mutaciones en las posiciones especificadas y presentan una o más propiedades mejoradas en comparación con la aciltransferasa LovD de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2.

5 Los expertos en la materia comprenderán que la lovastatina, la monacolina J y la simvastatina, así como sus análogos y derivados, pueden existir en diversas formas, incluidas formas de ácido, éster, amida y lactona. Las formas de ácido (R = -OH), éster (R = -O(alquilo)), amida (R = -N(alquilo)<sub>2</sub>) y lactona de estos compuestos se ilustran más adelante. A menos que se indique lo contrario, "lovastatina" tal como se utiliza en el presente documento incluye las formas de ácido, éster, amida, lactona y sal, "monacolina J" tal como se utiliza en el presente documento incluye las formas de ácido, éster, amida, lactona y sal, y "simvastatina" tal como se utiliza en el presente documento incluye las formas de ácido, éster, amida, lactona y sal. Estas formas pueden utilizarse en los métodos descritos en el presente documento.



45 Los experimentos de mutación llevados a cabo con la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre revelaron que las mutaciones en las posiciones especificadas se correlacionan con las mejoras en las propiedades de actividad catalítica, estabilidad térmica, estabilidad en condiciones de lisis celular y agregación. También se descubrió que podrían incorporarse diversas mutaciones en determinadas posiciones que, aunque no proporcionan una propiedad mejorada identificable, no influyen perjudicialmente en las propiedades globales del polipéptido. Todas estas diversas mutaciones, así como mutaciones conservadoras opcionales adicionales, pueden utilizarse en solitario y/o en combinaciones para producir polipéptidos variantes de LovD con propiedades especificadas. Cabe destacar que, a diferencia de la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre, los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento pueden aislarse y utilizarse en sistemas de reacción *in vitro* para producir compuestos de estatina terapéuticamente importantes.

55 Las mutaciones de la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se ha descubierto se correlacionan con una mayor actividad catalítica incluyen, pero no se limitan a, A123P, M157V, S164V, S172N, L174F, A178L, N191G, L192I, A247S, R250K, S256T, A261H, G275S, Q297G, L361M, V370I y N391S.

60 Las mutaciones de la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se ha descubierto se correlacionan con una mayor estabilidad térmica incluyen, pero no se limitan a, Q241M, A261H, Q295R y Q412R.

65 Las mutaciones de la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se ha descubierto se correlacionan con una menor agregación incluyen, pero no se limitan a, N43R, D96R y H404K.

Las mutaciones de la de aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que se ha

## ES 2 524 725 T3

descubierto se correlacionan con una mayor estabilidad enzimática en condiciones de lisis celular incluyen, pero no se limitan a, C40R, C60R y D245E.

5 Las posiciones dentro de la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 que pueden mutarse sin efectos perjudiciales incluyen, pero no se limitan a, I4N, A9V, K26E, R28K, R28S, I35L, C40A, C40V, C40F, S41R, N43Y, C60F, C60Y, C60N, C60H, S109C, S142N, A184T, A184V, N191S, A261T, A261E, A261V, L292R, Q297E, L355M, A377V, A383V, N391D y H404R.

10 Una clase importante de polipéptidos LovD variantes incluye polipéptidos LovD que presentan una mayor actividad catalítica en comparación con la aciltransferasa LovD de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2. Se ha descubierto que incluir un mayor número de mutaciones aumenta la actividad catalítica del polipéptido LovD. Como se ilustra mediante las formas de realización ejemplares de los polipéptidos LovD variantes proporcionados en la Tabla 1, *infra*, pueden seleccionarse combinaciones de mutaciones a partir de las identificadas anteriormente para obtener polipéptidos LovD variantes con propiedades catalíticas especificadas y otras propiedades. En la Tabla 1, las mutaciones indicadas son relativas a la SEQ ID NO: 2 y la Actividad Relativa es relativa a la actividad de la aciltransferasa LovD de tipo silvestre de *A. terreus*. Las condiciones utilizadas para el ensayo de actividad se proporcionan en la sección de Ejemplos.

20

<b>Tabla 1</b>		
<b>VARIANTE NO</b>	<b>Mutaciones</b>	<b>Actividad Relativa</b>
120	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; L361M;	+
4	I35L; A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; L361M;	+
6	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M;	+
8	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; R250K; L361M;	+
10	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; Q297E; L361M;	+
12	R28K; A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; L361M;	+
14	A123P; L174F; A178L; A184T; N191S; A247S; L361M;	+
16	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; Q297E; L361M;	+
18	A123P; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; L361M;	+
20	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; R250K; L361M;	+
22	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; A261E; L361M;	+
24	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; L361M; H404R;	+
26	K26E; A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; L361M;	+
28	A123P; S172N; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M;	++
30	A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M;	++
32	A123P; L174F; A178L; N191G; A247S; G275S; L361M;	+
34	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L335M; L361M;	+
36	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M; H404K;	+
38	A123P; L174F; A178L; A184V; N191S; A247S; G275S; L361M;	+
40	D96R; A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M;	+
42	A123P; L174F; A178L; N191G; A247S; G275S; L361M;	+
44	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L335M; L361M;	+
46	A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L292R; L361M;	+
48	A123P; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M;	++
50	A123P; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; G275S; L361M;	++
52	K26E; C40R; N43Y; A123P; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; G275S; L361M;	++
54	K26E; C40R; A123P; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; G275S; L361M;	++
56	K26E; A123P; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M;	+
58	A9V; K26E; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; A383V;	+++
60	K26E; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; G275S; L361M;	+++
62	A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191G; A247S; G275S; L335M; L361M;	++
64	N43R; D96R; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; A247S; G275S; L361M; H404K;	++
66	A9V; K26E; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; S256T; G275S; Q297E; L361M; A383V;	+++

65

ES 2 524 725 T3

5	68	A9V; K26E; S41R; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191S; L192I; A247S; R250K; A261V; G275S; Q297E; L361M; A383V;	+++
	70	A9V; K26E; R28K; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	+++
10	72	A9V; K26E; R28K; C40R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	+++
	74	A9V; K26E; R28K; C40R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	+++
15	76	A9V; K26E; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A377V; A383V;	+++
	78	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K;	++++
20	80	A9V; K26E; N43R; D96R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K;	++++
	82	A9V; K26E; D96R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	++++
25	84	A9V; K26E; D96R; A123P; M157V; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	+++
	86	A9V; K26E; N43R; D96R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K;	+++
30	88	A9V; K26E; N43R; D96R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V;	++++
	90	A9V; K26E; R28S; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; D254E; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K;	++++
35	92	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; A261V; G275S; Q295R; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K; Q412R;	++++
40	94	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; A261V; G275S; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K;	++++
	96	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; A261V; G275S; Q295R; Q297E; L361M; V370I; A383V; N391D; H404K;	++++
45	98	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261V; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
50	100	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261V; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
	110	I4N; A9V; K26E; R28S; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; D254E; S256T; A261H; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
55	112	I4N; A9V; K26E; R28S; N43R; S109C; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; G275S; Q295R; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K; Q412R;	++++
	114	I4N; A9V; K26E; R28S; I35L; N43R; D96R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; G275S; Q297G; L335M; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
60	116	I4N; A9V; K26E; R28S; I35L; N43R; D96R; S109C; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; G275S; Q297G; L335M; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
65			

5	118	I4N; A9V; K26E; R28S; I35L; C40R; N43R; C60R; D96R; S109C; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; D254E; S256T; A261H; G275S; Q297G; L335M; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
---	-----	--	------

10 En la Tabla 1, las variantes con una actividad relativa de "+" presentaron una actividad aproximadamente 10 a 50 veces mayor que el tipo silvestre; las variantes con una actividad relativa de "++" presentaron una actividad aproximadamente 50 a 100 veces mayor que el tipo silvestre; las variantes con una actividad relativa de "+++" presentaron una actividad aproximadamente 100 a 500 veces mayor que el tipo silvestre; y las variantes con una actividad relativa de "++++" presentaron una actividad aproximadamente 500 a 2.000 veces mayor que el tipo silvestre.

15 En algunas formas de realización de la descripción, las mutaciones están seleccionadas de entre las identificadas anteriormente para producir polipéptidos LovD variantes que presentan una actividad catalítica al menos dos veces mayor que la LovD de *A. terreus* de tipo silvestre. Tales polipéptidos LovD variantes tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a la SEQ ID NO: 2, pero incluyen al menos las siguientes dos mutaciones: L174F y A178L, y opcionalmente de una a aproximadamente 30 mutaciones adicionales seleccionadas de entre las diversas mutaciones identificadas anteriormente, y opcionalmente de aproximadamente una a 20 mutaciones conservadoras adicionales.

20 En algunas formas de realización de la descripción, las mutaciones están seleccionadas de entre las identificadas anteriormente para producir polipéptidos LovD variantes que presentan una actividad catalítica al menos aproximadamente 10 veces mayor que la LovD de *A. terreus* de tipo silvestre. Tales polipéptidos LovD variantes tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a la SEQ ID NO: 2, pero incluyen al menos las siguientes mutaciones: A123P, L174F, A178F, N191 (S o G), A247S y L361M, y de cero a aproximadamente 26 mutaciones adicionales seleccionadas de entre las diversas mutaciones identificadas anteriormente, y opcionalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mutaciones conservadoras adicionales. Los polipéptidos LovD variantes ejemplares específicos se proporcionan en la Tabla 1.

25 En algunas formas de realización de la descripción, los polipéptidos LovD variantes tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a los polipéptidos LovD variantes de la Tabla 1 e incluyen una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, por lo general en posiciones de residuos que no están mutadas en comparación con la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización de la descripción, el número de sustituciones conservadoras de aminoácidos está seleccionado de manera que la secuencia de un polipéptido LovD variante específico conserve al menos aproximadamente un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el polipéptido LovD variante de referencia específico.

30 Las mutaciones identificadas anteriormente, junto con los polipéptidos LovD variantes ejemplares específicos proporcionados en la Tabla 1, pueden utilizarse para crear polipéptidos LovD variantes que tengan propiedades específicas. Por ejemplo, pueden obtenerse polipéptidos LovD variantes con una mayor estabilidad térmica que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 incluyendo una o más de las mutaciones identificadas anteriormente que se correlacionan con una mayor estabilidad térmica. "Mezclando y haciendo coincidir" mutaciones de las diferentes categorías, pueden obtenerse fácilmente polipéptidos LovD variantes con mejoras en una o más propiedades diferentes.

35 En algunas formas de realización de la descripción, las mutaciones están seleccionadas de manera que los polipéptidos LovD variantes sean térmicamente estables.

40 En algunas formas de realización de la descripción, las mutaciones están seleccionadas de manera que los polipéptidos LovD variantes sean más estables frente a condiciones de lisis celular que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2. El aumento de la estabilidad a la lisis celular puede medirse preincubando el lisado a una temperatura elevada (por ejemplo, de 35°C a 45°C) y hallando la actividad residual.

45 En algunas formas de realización de la descripción, las mutaciones están seleccionadas de manera que los polipéptidos LovD variantes presenten menos agregación que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2 como se determina, por ejemplo, en tampón trietanolamina 100 mM en un pH de 8 a 9 y a una temperatura de 25°C.

50 Los expertos en la materia comprenderán que, en muchos casos, el polipéptido LovD variante de longitud completa no es necesario para que la enzima conserve la actividad catalítica. Por consiguiente, se contemplan análogos truncados y fragmentos catalíticamente activos de los polipéptidos LovD variantes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, pueden omitirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos. En formas de realización adicionales, los polipéptidos LovD variantes incluyen polipéptidos truncados en los que pueden omitirse de 1 a 15

aminoácidos en el extremo N-terminal y pueden omitirse de 1 a 6 aminoácidos en el extremo C-terminal. Puede evaluarse cualquier fragmento o análogo truncado específico para la actividad catalítica utilizando los ensayos proporcionados en la sección de Ejemplos.

5 Asimismo, pueden añadirse residuos de aminoácidos adicionales a uno o ambos extremos terminales sin influir perjudicialmente en la actividad catalítica. Por consiguiente, aunque muchas formas de realización ejemplares de los polipéptidos LovD variantes descritas en el presente documento contienen 413 residuos de aminoácidos, también se contemplan análogos que incluyan de aproximadamente 1 a aproximadamente 434 aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos terminales. La secuencia adicional puede ser funcional o no funcional. Por ejemplo, la secuencia adicional puede estar diseñada para facilitar la purificación, actuar como marcador o realizar alguna otra función. Por lo tanto, los polipéptidos LovD variantes de la descripción pueden estar en forma de polipéptidos de fusión en los que los polipéptidos LovD variantes (o fragmentos de los mismos) están fusionados a otros polipéptidos tales como, a modo de ejemplo y no de limitación, marcadores anticuerpos (por ejemplo, epítipo *myc*), secuencias de purificación (por ejemplo, marcadores His para la unión a metales) y señales de localización celular (por ejemplo, señales de secreción).

Los polipéptidos LovD variantes pueden obtenerse por medios convencionales, incluidos la síntesis química y la expresión recombinante. Los polinucleótidos y células hospedadoras útiles para la expresión recombinante se describen más adelante. Los polipéptidos LovD variantes obtenidos por medios sintéticos pueden incluir aminoácidos codificados no genéticamente, como se conoce en la técnica. Los aminoácidos no codificados comúnmente encontrados que pueden incluirse en los polipéptidos LovD variantes sintéticos incluyen, pero no se limitan a: ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr); ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib); ácido  $\epsilon$ -aminohexanoico (Aha); ácido  $\delta$ -aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly o Sar); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (Bua); t-butilglicina (Bug); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 2-clorofenilalanina (Ocf); 3-clorofenilalanina (Mcf); 4-clorofenilalanina (Pcf); 2-fluorofenilalanina (Off); 3-fluorofenilalanina (Mff); 4-fluorofenilalanina (Pff); 2-bromofenilalanina (Obf); 3-bromofenilalanina (Mbf); 4-bromofenilalanina (Pbf); 2-metilfenilalanina (Omf); 3-metilfenilalanina (Mmf); 4-metilfenilalanina (Pmf); 2-nitrofenilalanina (ONF); 3-nitrofenilalanina (Mnf); 4-nitrofenilalanina (Pnf); 2-cianofenilalanina (Ocf); 3-cianofenilalanina (Mcf); 4-cianofenilalanina (Pcf); 2-trifluorometilfenilalanina (Off); 3-trifluorometilfenilalanina (Mtf); 4-trifluorometilfenilalanina (Ptf); 4-aminofenilalanina (Paf); 4-yodofenilalanina (Pif); 4-aminometilfenilalanina (Pamf); 2,4-diclorofenilalanina (Opef); 3,4-diclorofenilalanina (Mpcf); 2,4-difluorofenilalanina (Opff); 3,4-difluorofenilalanina (Mpff); pirid-2-ilalanina (2pAla); pirid-3-ilalanina (3pAla); pirid-4-ilalanina (4pAla); naft-1-ilalanina (1nAla); naft-2-ilalanina (2nAla); tiazolilalanina (taAla); benzotienilalanina (bAla); tienilalanina (tAla); furilalanina (fAla); homofenilalanina (hPhe); homotirosina (hTyr); homotriptófano (hTrp); pentafluorofenilalanina (5ff); stirilalanina (sAla); autilalanina (aAla); 3,3-difenilalanina (Dfa); ácido 3-amino-5-fenilpentanoico (Afp); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic);  $\beta$ -2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (Mso); N(w)-nitroarginina (nArg); homolisina (hLys); fosfometilfenilalanina (pm-Phe); fosfoserina (pSer); fosfotreonina (pThr); ácido homoaspártico (hAsp); ácido homoglutámico (hGlu); ácido 1-amino-ciclopent-(2 ó 3)-eno-4 carboxílico; ácido piperídico (PA), ácido acetidina-3-carboxílico (ACA); ácido 1-aminociclopentano-3-carboxílico; alilglicina (aOly); propargilglicina (pgGly); homoalanina (hAla); norvalina (nVal); homoleucina (hLeu), homovalina (hVal); homoisoleucina (hIle); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,4-diaminobutírico (Dbu); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); N-metilvalina (MeVal); homocisteína (hCys); homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp) y homoprolina (hPro). Los aminoácidos no codificados adicionales de los cuales pueden estar compuestos los polipéptidos descritos en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, los diversos aminoácidos proporcionados en Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton, FL, en las págs. 3-70 y las referencias citadas en el mismo). Estos aminoácidos pueden estar en la configuración L o D y resultan preferentes en la configuración L.

50 Cuando se utilizan, estos aminoácidos no codificados se seleccionan generalmente de manera que sean sustituciones conservadoras en comparación con la secuencia de referencia. Los aminoácidos no codificados pueden proporcionar a los polipéptidos LovD variantes propiedades mejoradas, tales como, por ejemplo, mayor solubilidad en disolventes deseados, mayor estabilidad a las proteasas, etc. Tales aminoácidos no codificados se incluirán por lo general sólo en algunas posiciones de residuos, por ejemplo, de manera que más de un 98% ó 99% del polipéptido LovD variante se componga de aminoácidos codificados genéticamente.

#### 55 4.4. Ácidos nucleicos

En otro aspecto, la presente descripción proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos LovD variantes. Los polinucleótidos pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias reguladoras que controlan la expresión génica para crear un polinucleótido recombinante capaz de expresar el polipéptido LovD variante. Los constructos de expresión que comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido LovD variante pueden introducirse en células hospedadoras apropiadas para que expresen el polipéptido LovD variante correspondiente.

65 Gracias al código genético conocido, la disponibilidad de una secuencia polipeptídica proporciona una descripción de todos los polinucleótidos capaces de codificar ese polipéptido. La degeneración del código genético

produce un número extremadamente grande de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido LovD variante específico. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia polipeptídica particular, los expertos en la materia podrían fabricar multitud de diferentes ácidos nucleicos que codifiquen esa secuencia polipeptídica simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de una forma que no modifique la secuencia codificada. En este sentido, la presente descripción contempla específicamente todos y cada uno de los posibles polinucleótidos individuales que codifican una secuencia polipeptídica especificada, y todos estos ácidos nucleicos individuales deben considerarse descritos específicamente para cualquier polipéptido LovD variante descrito en el presente documento.

En algunas formas de realización, los polinucleótidos comprenden codones que están optimizados para la expresión en un tipo específico de célula hospedadora. Las preferencias codónicas y el uso de codones para diversos tipos diferentes de microorganismos son conocidos, al igual que los codones optimizados para la expresión de aminoácidos específicos en cada uno de estos microorganismos. (Véase, por ejemplo, Andersson, SG, y CG Kurland, 1990, *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 54(2): 198-210 Ermolaeva, M D., 2001, *Current Issues in Molecular Biology* 3(4): 91-97).

En algunas formas de realización, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos LovD variantes pueden proporcionarse como vectores de expresión, en los que se encuentran presentes una o más secuencias de control para regular la expresión de los polinucleótidos. Dependiendo del vector de expresión, puede ser deseable o necesaria la manipulación del polinucleótido aislado antes de su inserción en un vector. Las técnicas para modificar los polinucleótidos y las secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante son conocidas en la técnica. Se proporciona orientación en Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press; y *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel. F. ed., Greene Pub. Associates, 1998, actualizaciones hasta el 2006.

En algunas formas de realización, las secuencias de control incluyen, entre otros, promotores, secuencias líder, secuencias de poliadenilación, secuencias propeptídicas, secuencias de péptido señal y terminadores de la transcripción. Para las células hospedadoras bacterianas, los promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia codificante incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos a partir del operón *lac* de *E. coli*, operón *trp* de *E. coli*, bacteriófago  $\lambda$ , gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amiloliquefaciens*, gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, y gen de la beta-lactamasa procariota (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc Natl Acad Sci. EE.UU.* 80: 21-25).

Para las células hospedadoras de hongos filamentosos, los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (véase, por ejemplo, el documento WO 96/00787), así como el promotor NA2-*tpi* (un híbrido de los promotores de los genes para la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y promotores híbridos, truncados y mutantes de los mismos.

En un hospedador levadura, los promotores útiles pueden ser de los genes para la enolasa (*ENO-1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, la galactoquinasa (*GAL1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*ADH2/GAP*) de *Saccharomyces cerevisiae* y la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otros promotores útiles para células hospedadoras de levadura en Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8:423-488.

La secuencia de control puede ser también una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, es decir, una secuencia reconocida por una célula hospedadora para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está unida operativamente al extremo terminal 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Puede utilizarse cualquier terminador que sea funcional en la célula hospedadora de elección.

Por ejemplo, pueden obtenerse terminadores de la transcripción ejemplares para las células hospedadoras de hongos filamentosos de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Pueden obtenerse terminadores ejemplares para células hospedadoras de levadura de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (*CYC1*) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otros terminadores útiles para las células hospedadoras de levadura en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.



La secuencia de control puede ser también una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula hospedadora. La secuencia líder está unida operativamente al extremo terminal 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Puede utilizarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula hospedadora de elección. Los líderes ejemplares para las células hospedadoras de hongos filamentosos se obtienen de los genes para la TKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*. Los líderes adecuados para las células hospedadoras de levadura se obtienen de los genes para la enolasa (*ENO-1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*ADH2/GAP*) de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de control puede ser también una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al extremo terminal 3' de la secuencia de ácido nucleico y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula hospedadora como señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. En la presente invención puede utilizarse cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedadora de elección. Las secuencias de poliadenilación ejemplares para las células hospedadoras de hongos filamentosos pueden ser de los genes para la TKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*. Se describen secuencias de poliadenilación útiles para las células hospedadoras de levadura en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cell Bio. 15:5983-5990.

La secuencia de control puede ser también una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico puede contener intrínsecamente una región codificante de péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido secretado. Como alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que sea ajena a la secuencia codificante. La región codificante de péptido señal ajena puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante de péptido señal.

Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para las células hospedadoras bacterianas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para la amilasa maltogénica de *Bacillus NCIB 11837*, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, la subtilisina de *Bacillus licheniformis*, la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, las proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y la *prsA* de *Bacillus subtilis*. Se describen otros péptidos señal en Simonen y Palva, 1993, Microbiol. Rev. 57:109-137.

Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para las células hospedadoras de hongos filamentosos pueden ser las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para la TKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la celulasa de *Humicola insolens* y la lipasa de *Humicola lanuginosa*.

Los péptidos señal útiles para las células hospedadoras de levadura pueden ser de los genes para el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otras regiones codificantes de péptido señal útiles en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia de control puede ser también una región codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede convertirse en un polipéptido maduro activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región codificante de propéptido puede obtenerse de los genes para la proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, la proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y la lactasa de *Myceliophthora thermophila* (véase, por ejemplo, el documento WO 95/33836).

Cuando las regiones de péptido señal y de propéptido se encuentran presentes en el extremo amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al extremo amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al extremo amino terminal de la región de propéptido.

También puede ser deseable incluir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido relativa al crecimiento de la célula hospedadora. Los ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se active o se desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. En las células hospedadoras procariotas, las secuencias reguladoras adecuadas incluyen los sistemas de operadores *lac*, *tac* y *trp*. En las células hospedadoras de levadura, los sistemas reguladores adecuados incluyen, como ejemplos, el sistema *ADH2* o el sistema *GAL1*. En los hongos filamentosos, las secuencias reguladoras adecuadas incluyen el promotor de TKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*.

Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucariotas, éstas incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa, que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína, que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido transaminasa de la presente invención estaría unida operativamente con la secuencia reguladora.

Por lo tanto, en otra forma de realización, la presente descripción se refiere también a un vector de expresión recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante, o un fragmento catalíticamente activo del mismo, y una o más regiones reguladoras de la expresión tales como un promotor y un terminador, un origen de replicación, etc., dependiendo del tipo de hospedadores en los que vayan a introducirse. Las diversas secuencias de ácidos nucleicos y de control descritas anteriormente pueden juntarse para producir un vector de expresión que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido en tales sitios. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico de la presente descripción puede expresarse insertando la secuencia de ácido nucleico o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se coloca dentro del vector de manera que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus), que pueda someterse oportunamente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda provocar la expresión de la secuencia polinucleotídica. La elección del vector dependerá por lo general de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que va a introducirse el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

El vector de expresión puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma los cromosomas en los que se ha integrado. Además, puede utilizarse un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contengan el ADN total a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

El vector de expresión puede contener uno o más marcadores seleccionables, que permitan una fácil selección de las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores adecuados para las células hospedadoras de levadura son *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* y *URA3*.

Los marcadores seleccionables para el uso en una célula hospedadora de hongo filamentoso incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrito reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Las formas de realización para el uso en una célula de *Aspergillus* incluyen los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

Los vectores de expresión para la expresión de los polipéptidos LovD variantes pueden contener un elemento o elementos que permitan la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma. Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede depender de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga.

Como alternativa, el vector de expresión puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten que el vector se integre en el genoma de la célula hospedadora en una ubicación o ubicaciones precisas en el cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deberían contener preferentemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferentemente de 400 a 10.000 pares de bases y lo más preferentemente de 800 a 10.000 pares de bases, que presenten una gran homología con la correspondiente secuencia diana para potenciar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que presente homología con la secuencia diana en el genoma de la célula hospedadora. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de ácidos nucleicos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de replicación que permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula hospedadora en cuestión. Los ejemplos de orígenes

de replicación bacterianos son *ori* de *P15A* (como se muestra en el plásmido de la figura 5) o los orígenes de replicación de los plásmidos *pBR322*, *pUC19*, *pACYC177* (plásmido que tiene el *ori* de *P15A*) o *pACYC184* que permiten la replicación en *E. coli*, y *pUB110*, *pE194*, *pTA1060* o *pAMβ1* que permiten la replicación en *Bacillus*. Los ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula hospedadora de levadura son el origen de replicación de 2 micrómetros, *ARS1*, *ARS4*, la combinación de *ARS1* y *CEN3*, y la combinación de *ARS4* y *CEN6*. El origen de replicación puede ser uno que tenga una mutación que haga que su funcionamiento sea sensible a la temperatura en la célula hospedadora (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 75:1433).

Puede insertarse en una célula hospedadora más de una copia de un ácido nucleico que codifica un LovD variante para aumentar la producción del producto génico. Puede conseguirse un aumento en el número de copias de la secuencia de ácido nucleico integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de ácido nucleico cuando puedan seleccionarse células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de ese modo copias adicionales de la secuencia de ácido nucleico, cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

Muchos de los vectores útiles para la expresión de polipéptidos LovD variantes están disponibles en el mercado. Los vectores de expresión comerciales adecuados incluyen vectores de expresión *p3xFLAGTM* de Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis MO., que incluye un promotor de CMV y el sitio de poliadenilación de la hGH para la expresión en células hospedadoras de mamífero y un origen de replicación de *pBR322* y marcadores de resistencia a ampicilina para la amplificación en *E. coli*. Otros vectores de expresión adecuados son *pBluescriptII SK(-)* y *pBK-CMV*, que están disponibles en el mercado en Stratagene, La Jolla CA, y plásmidos que se derivan de *pBR322* (Gibco BRL), *pUC* (Gibco BRL), *pREP4*, *pCEP4* (Invitrogen) o *pPoly* (Lathe *et al.*, 1987, Gene 57:193-201).

#### 4.5. Métodos para fabricar los ácidos nucleicos y polipéptidos variantes de LovD

Pueden prepararse polipéptidos LovD variantes y polinucleótidos que codifican tales polipéptidos utilizando métodos comúnmente utilizados por los expertos en la materia.

Pueden obtenerse variantes de las variantes descritas específicamente sometiendo al polinucleótido que codifica la variante a mutagénesis y/o a métodos de evolución dirigida. Una técnica de evolución dirigida ejemplar es la mutagénesis y/o el barajado de ADN como se describe en Stemmer, 1994, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91:10747-10751; los documentos WO 95/22625, WO 97/0078, WO 97/35966, WO 98/27230, WO 00/42651; WO 01/75767 y la patente de EE.UU. 6.537.746.

Otros procedimientos de evolución dirigida que pueden utilizarse incluyen, entre otros, el proceso de extensión escalonada (StEP), la recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol. 16:258-261), la PCR mutagénica (Caldwell *et al.*, 1994, PCR Methods Appl. 3:S136-S140) y la mutagénesis de casete (Black *et al.*, 1996, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93:3525 a 3529). Las técnicas de mutagénesis y evolución dirigida útiles para obtener variantes adicionales también se describen en las siguientes referencias: Ling *et al.*, 1997, "Approaches to DNA mutagenesis: an overview", Anal. Biochem. 254(2):157-78; Dale *et al.*, 1996, "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorotioate method", Methods Mol. Biol. 57:369-74; Smith, 1985, "In vitro mutagenesis", Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein *et al.*, 1985, "Strategies and applications of in vitro mutagenesis", Science 229:1193-1201; Carter, 1986, "Site-directed mutagenesis", Biochem. J. 237:1-7; Kramer *et al.*, 1984, "Point Mismatch Repair", Cell 38:879-887; Wells *et al.*, 1985, "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites", Gene 34:315-323; Minshull *et al.*, 1999, "Protein evolution by molecular breeding", Curr Opin Chem Biol 3:284-290; Christians *et al.*, 1999, "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling", Nature Biotech 17:259-264; Cramer *et al.*, 1998, "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", Nature 391:288-291; Cramer *et al.*, 1997, "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", Nature Biotech 15:436-438; Zhang *et al.*, 1997, "Directed evolution of an effective fructosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening", Proc Natl Acad Sci EE.UU. 94:45-4-4509; Cramer *et al.*, 1996, "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling", Nature Biotech 14:315-319; Stemmer, 1994, "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", Nature 370:389-391; patente de EE.UU. N° 6.117.679 (Stemmer, 12 de septiembre de 2000); patente de EE.UU. N° 6.376.246 (Cramer *et al.*, 23 de abril de 2002); patente de EE.UU. N° 6.586.182 (Patten *et al.*, 1 de julio de 2003); solicitud de patente de EE.UU. N° 2008/0220990 (Fox, 11 de septiembre de 2008); y solicitud de patente de EE.UU. N° 2009/0312196 (Colbeck *et al.*, 17 de diciembre de 2009).

Pueden obtenerse polipéptidos LovD variantes a través de la expresión recombinante en células hospedadoras, como se ha descrito anteriormente. El polipéptido LovD variante expresado puede recuperarse de las células y/o del medio de cultivo utilizando una cualquiera o más de las técnicas bien conocidas para la purificación de proteínas, incluidas, entre otras, el tratamiento con lisozima, la sonicación, la filtración, la precipitación por adición de sal, la ultracentrifugación y la cromatografía. Los reactivos adecuados para la lisis y la extracción de alta eficacia de proteínas a partir de bacterias, tales como *E. coli*, están disponibles en el mercado con el nombre comercial CelLytic BTM de Sigma-Aldrich de St. Louis MO.

Las técnicas cromatográficas para el aislamiento y/o la purificación del polipéptido LovD variante incluyen, entre otras, la cromatografía de fase inversa, la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel y la cromatografía de afinidad. Las condiciones para purificar una enzima particular dependerán, en parte, de factores tales como la carga neta, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, el peso molecular, la forma molecular, etc., y resultarán evidentes para los expertos en la materia. En algunas formas de realización, las transaminasas obtenidas por ingeniería genética pueden expresarse como proteínas de fusión con marcadores de purificación, tales como marcadores His que tengan afinidad por los metales, o marcadores anticuerpos para la unión a anticuerpos, por ejemplo, el marcador epítópico *myc*.

En algunas formas de realización, pueden utilizarse técnicas de afinidad para aislar y/o purificar los polipéptidos LovD variantes. Para la purificación por cromatografía de afinidad, puede utilizarse cualquier anticuerpo que se una específicamente al polipéptido LovD variante. Para la producción de anticuerpos, puede inmunizarse a diversos animales hospedadores, incluidos pero no limitados a conejos, ratones, ratas, etc., mediante inyección con un polipéptido obtenido por ingeniería genética. El polipéptido puede estar fijado a un transportador adecuado, tal como BSA, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o conectores fijados a un grupo funcional de cadena lateral. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria, dependiendo de la especie hospedadora, incluidos pero no limitados a adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

#### 4.6. Células hospedadoras

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante, estando el polinucleótido unido operativamente a una o más secuencias de control para la expresión de la LovD variante en la célula hospedadora. Las células hospedadoras para su uso en la expresión de los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento son conocidas en la técnica e incluyen pero no se limitan a, células bacterianas, tales como *E. coli*, células de *Lactobacillus*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (Nº de registro de la ATCC 201178) o células de hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* o *Chrysosporium*); células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, BHK, 293 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Las condiciones de crecimiento y los medios de cultivo apropiados para las células hospedadoras descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos para la expresión del polipéptido LovD variante pueden introducirse en las células mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las técnicas incluyen, entre otras, la electroporación, el bombardeo de partículas de biolística, la transfección mediada por liposomas, la transfección con cloruro cálcico y la fusión de protoplastos. Los diversos métodos para introducir polinucleótidos en las células resultarán evidentes para el experto en la materia.

La preparación de vectores de expresión adecuados para la expresión de polipéptidos LovD variantes en las células hospedadoras *E. coli* se describe en la sección de Ejemplos. Tales vectores de expresión pueden utilizarse para expresar polipéptidos LovD variantes en diversas cepas diferentes de células hospedadoras bacterianas *E. coli*. Una célula hospedadora *E. coli* especialmente adecuada es BL21 y W3110 con desactivación del gen bioH. (Véanse, por ejemplo, Xie, Xinkai y Yi Tang, 2007, Applied and Environmental Microbiology 73(7): 2054-2060; Xie *et al.*, 2006, Chemistry & Biology 13(11): 1161-1169; y Xie *et al.*, Metabolic Engineering 9(4): 379-386).

#### 4.7. Usos

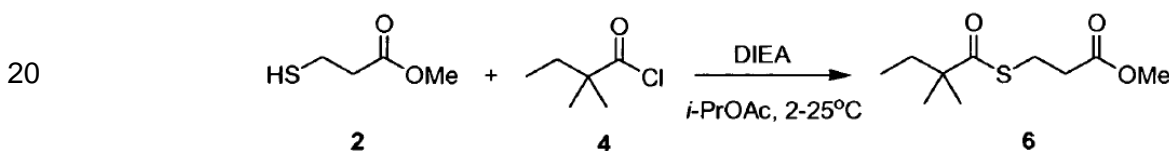
Los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento catalizan la transferencia de un grupo acilo desde cosustratos tioéster hasta la monacolina J y análogos o derivados de la misma para producir compuestos de estatina terapéuticamente importantes. Una forma de realización específica de esta reacción, en la que la monacolina J se convierte en simvastatina, se ilustra en la región encuadrada de la figura 1. Debido a sus propiedades catalíticas y a otras propiedades, los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento pueden utilizarse para fabricar grandes cantidades de estatinas terapéuticamente importantes, tales como simvastatina, a partir de monacolina J y/o sus precursores éster C8, con altos rendimientos. Cuando se utiliza como material de partida la monacolina J, puede obtenerse simvastatina en una sola etapa. Esto contrasta con los métodos semisintéticos utilizados actualmente para obtener simvastatina (ilustrado en la Fig. 1 con las flechas discontinuas).

Por consiguiente, la presente descripción también proporciona métodos de fabricación de simvastatina utilizando los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento. Según los métodos, y en referencia a la figura 1, el sustrato monacolina J (o una sal de la misma tal como una sal de sodio o una sal de amonio) (12) se pone en contacto con un polipéptido LovD variante en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo (14) en

condiciones en las que el polipéptido LovD variante transfiere el grupo  $\alpha$ -dimetilbutirilo a la posición C8 de la monacolina J para producir simvastatina (**16**).

5 La identidad del cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo no es crucial. Los polipéptidos LovD variantes aceptan una gran diversidad de cosustratos tioéster. Los cosustratos tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo adecuados útiles para producir simvastatina incluyen, pero no se limitan a,  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-N-acetilcisteamina ("DMB-S-NAC"),  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metilglucolato ("DMB-S-MTG"), mercaptopropionato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metil ("DMB-S-MMP"), mercaptopropionato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-etil ("DMB-S-EMP"), mercaptobutirato de  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-metil ("DMB-S-MMB"), ácido  $\alpha$ -dimetilbutiril-S-mercaptopropiónico ("DMB-S-MPA") y tioésteres S-arilo/heteroarilo opcionalmente sustituidos o S-alquilo opcionalmente sustituidos. Puede utilizarse cualquiera de estos cosustratos tioéster, o mezclas de tales cosustratos tioéster, en los métodos descritos en el presente documento.

15 El sustrato  $\alpha$ -dimetilbutirilo puede prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado utilizando métodos convencionales. A continuación se ilustra una reacción ejemplar para preparar DMB-S-MMP:



25 En resumen, se acila 3-mercaptopropionato de metilo (**2**) con cloruro de 2,2-dimetilbutanoilo (**4**) en presencia de N,N-diisopropilamina (DIEA) para producir DMB-S-MMP (**6**). En el Ejemplo 7 se proporcionan las condiciones de reacción ejemplares específicas. Pueden prepararse otros cosustratos tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo mediante modificación rutinaria de estos métodos.

30 El método puede llevarse a cabo con un polipéptido LovD variante purificado, o, como alternativa, el polipéptido LovD puede añadirse a la mezcla de reacción en forma de lisado celular en bruto, o fracción semipurificada de lisado celular. En el Ejemplo 3 se proporcionan los métodos para purificar polipéptidos LovD variantes hasta un nivel de pureza adecuado para su uso en reacciones a gran escala.

35 El sustrato monacolina J (o una sal de la misma) puede añadirse a la mezcla de reacción en forma purificada, o como alternativa, puede generarse *in situ* por hidrólisis de lovastatina. Los métodos para obtener lovastatina y/o monacolina J son conocidos. Por ejemplo, la lovastatina puede aislarse a partir de *A. terreus* a través de métodos conocidos (véanse, por ejemplo, Endo, A., 1980, The Journal of Antibiotics 33(3): 334-336; Hendrickson *et al.*, 1999, Chemistry & Biology 6(7): 429-439; Kennedy *et al.*, 1999, Science 284(5418): 1368-1372; y Manzoni *et al.*, 2002, Applied Microbiology and Biotechnology 58(5): 555-564). También está disponible en el mercado.

40 Puede obtenerse monacolina J (y sales de la misma) a través de hidrólisis alcalina de lovastatina, utilizando métodos convencionales. En el Ejemplo 6 se proporciona una reacción ejemplar específica.

45 La reacción puede llevarse a cabo en diversas condiciones de reacción diferentes. Por lo general, la reacción se lleva a cabo como suspensión que contiene de aproximadamente 0,2 g/l a 10 g/l, con frecuencia de 0,25 g/l a 5 g/l, de polipéptido LovD variante, de aproximadamente 1 g/l a 250 g/l, con frecuencia de 50 g/l a 150 g/l, del sustrato monacolina J (o una sal de la misma) y de aproximadamente 1 a 10 equivalentes, con frecuencia de 1 a 2 equivalentes, de cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo. La reacción se lleva a cabo por lo general en un tampón acuoso (de 0 mM a 300 mM) con un pH en el intervalo de pH de 7,5 a 10,5, con frecuencia un pH de 8,5 a 9,5. La identidad del tampón no es crucial. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, trietanolamina (TEA), fosfato de potasio, o puede no utilizarse tampón. Las temperaturas de reacción son de 20°C a 50°C, con frecuencia de 20°C a 40°C.

50 También pueden utilizarse sistemas de codisolventes acuosos. Tales codisolventes incluirán por lo general de aproximadamente un 1% a un 10% de un codisolvente orgánico polar. Los codisolventes orgánicos polares adecuados incluyen, pero no se limitan a, MeCN, DMSO, alcohol isopropílico (IPA), dioxano, THF, acetona y MeOH.

55 Se ha descubierto que el subproducto tiol (**18** en la Fig. 1) generado por la reacción puede inhibir los polipéptidos LovD variantes. Por consiguiente, puede ser deseable incluir un agente neutralizante de tiol en la mezcla de reacción. Los agentes neutralizantes de tiol y métodos para su uso adecuados se describen en la solicitud N° 61/247.242, titulada "Improved Lov-D Acyltransferase Mediated Acylation", presentada el 30 de septiembre de 2009, y la Solicitud N° \_\_\_\_\_, del mismo nombre presentada al mismo tiempo que el presente documento con el número de expediente del mandatario 376247-044US (105192) {CX2-032}. Un agente neutralizante de tiol preferente es el carbón vegetal activado. Cuando se utiliza, puede incluirse en la mezcla de reacción en una cantidad que va de

aproximadamente 2 g/l a 20 g/l. Como alternativa, puede hacerse precipitar el producto en forma de sal, por ejemplo, en forma de sal de amonio o sodio.

5 Las condiciones de reacción adecuadas para su uso con los polipéptidos LovD variantes descritos en el presente documento son las siguientes: de 1 g/l a 250 g/l, también de 25 g/l a 200 g/l, y, con frecuencia de 50 g/l a 150 g/l, de sustrato sal de sodio de monacolina J; de 1 a 10 equivalentes, también de 1 a 5 equivalentes, y con frecuencia de 1 a 2 equivalentes, de cosustrato DMB-S-MMP; de 0,2 g/l a 10 g/l, con frecuencia de 0,25 g/l a 5 g/l, de polipéptido LovD variante (preparado como se describe en el Ejemplo 3); de 2 g/l a 20 g/l de carbón vegetal activado (opcional); y tampón TEA 0 mM a 300 mM, pH 7,5 a 10,5, también pH 8,0 a 10,0, y, con frecuencia pH de 8,5 a 9,5.

15 La reacción se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20°C a 50°C, también de 20°C a 30°C, y con frecuencia de 20°C a 40°C, dependiendo de la termoestabilidad del polipéptido LovD variante utilizado, con agitación o removiendo durante aproximadamente 18 a 48 horas. El desarrollo de la reacción puede supervisarse analizando alícuotas mediante cromatografía de HPLC como se describe en la sección de Ejemplos.

Después de la reacción, la simvastatina puede aislarse de la mezcla de reacción y convertirse en sales farmacéuticamente útiles, tal como sal de amonio, utilizando procedimientos convencionales.

20 En resumen, se extraen con MTBE (2x) el subproducto y el exceso de sustrato, se combinan las fases acuosas y se ajusta el pH a pH 5,3-5,4 con HCl 5M mientras se mantiene una temperatura de aproximadamente 17°C. Se añade EtOAc (13 vol) y se agita la mezcla durante 10 minutos con un impulsor de palas planas (345 rpm, 17°C). El proceso de lavado de EtOAc se repite dos veces más y se combinan las tres extracciones de EtOAc. Las extracciones de EtOAc se filtran a través de un lecho de Celite a presión reducida, y se lava la torta de filtro con EtOAc. El filtrado y los lavados se combinan y se concentran a presión reducida para producir hidroxácido de simvastatina.

30 El hidroxácido puede convertirse en la sal de amonio utilizando técnicas convencionales. En el Ejemplo 8 se proporcionan condiciones ejemplares específicas. Como alternativa, la reacción puede llevarse a cabo utilizando la sal de amonio de monacolina J, y la sal de amonio de simvastatina producida de ese modo puede aislarse directamente a partir del medio de reacción por filtración. Este proceso se ejemplifica en el Ejemplo 9.

## 5. EJEMPLOS

### 35 Ejemplo 1: Construcción de genes LovD y vectores de expresión

Se diseñó el gen *LovD* que codifica la aciltransferasa de *Aspergillus terreus* de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) para su expresión en *E. coli* utilizando la optimización de codones convencional (para una revisión reciente del software de optimización de codones, véase Puigbò *et al.*, julio de 2007, "OPTIMIZER: A Web Server for Optimizing the usage of DNA Sequences", Nucleic Acids Res. 2007 35(edición de servidor Web):W126-31). Se sintetizaron los genes utilizando oligonucleótidos compuestos por 42 nucleótidos y se clonaron en el vector de expresión pCK110900, representado en la figura 3 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2006/0195947, bajo el control de un promotor *lac*. El vector de expresión también contenía un origen de replicación de p15a y un gen de resistencia a cloranfenicol. Los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* W3110 o *E. coli* BL21 utilizando métodos convencionales.

50 Los polinucleótidos que codifican las formas de realización ejemplares de los polipéptidos LovD variantes de la presente descripción descritos en la Tabla 1, *supra*, también se clonaron en el vector pCK110900 para la expresión en *E. coli* W3110 o *E. coli* BL21.

### Ejemplo 2: Procedimiento del matraz oscilante para la producción de polipéptidos LovD

Una sola colonia microbiana de *E. coli* que contenía un plásmido que codificaba un polipéptido LovD variante de interés se inoculó en 50 ml de caldo 2xYT (concentración 1X, 16 g/l de digerido pancreático de caseína (triptona peptona), 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro sódico) que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol y glucosa al 1%. Se cultivaron las células durante toda la noche (al menos 16 horas) en una incubadora a 30°C con agitación a 250 rpm. Se diluyó el cultivo en 250 ml de caldo 2xYT que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol, en un matraz de 1 litro a una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,2 y se dejó crecer a 25°C-30°C. Se indujo la expresión del gen *LovD* mediante adición de isopropil P D-tiogalactósido ("IPTG") a una concentración final de 1 mM cuando la DO600 del cultivo era de 0,6 a 0,8 y a continuación se continuó la incubación durante toda la noche (al menos 16 horas).

65 Se recogieron las células por centrifugación (2.400 g, 15 minutos, 4°C) y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular con un volumen igual de tampón fosfato 50 mM frío (4°C) (pH 8,5) y se recogió por centrifugación como se ha indicado anteriormente. Se resuspendieron las células lavadas en dos volúmenes de tampón fosfato frío y se hicieron pasar por una prensa francesa (18.000 psi, 4°C). Los restos celulares se eliminaron

por centrifugación (7.700 g, 30 minutos, 4°C). El sobrenadante del lisado transparente se recogió y se almacenó a -20°C. La liofilización del lisado transparente congelado proporciona un polvo seco de matraz oscilante de polipéptido LovD en bruto. Como alternativa, el sedimento celular (antes o después del lavado) puede almacenarse a 4°C ó -80°C.

5

Ejemplo 3: Procedimiento de fermentación para la producción de polipéptidos LovD

Se iniciaron fermentaciones a escala experimental a 37°C en un fermentador de 15 l, aireado y agitado, utilizando 6,0 l de medio de crecimiento (0,88 g/l de sulfato de amonio, 0,98 g/l de citrato de tri-sodio dihidratado; 12,5 g/l de hidrogenofosfato de dipotasio trihidratado, 6,25 g/l de dihidrogenofosfato de potasio, 3,33 g/l de extracto de levadura Tastona-154, 10 mg/l de biotina, 0,083 g/l de citrato de amonio férrico y 8,3 ml/l de una solución de elementos traza que contenía 2 g/l de cloruro de calcio dihidratado, 2,2 g/l de sulfato de zinc heptahidratado, 0,5 g/l de sulfato de manganeso monohidratado, 1 g/l de sulfato cuproso pentahidratado, 0,1 g/l de molibdato de amonio tetrahidratado y 0,02 g/l de tetraborato de sodio). Se inoculó el fermentador con un cultivo en fase exponencial tardía de *E. coli* W3110 o *E. coli* BL21 que contenía el plásmido que codificaba el gen *LovD* variante de interés (cultivado en un matraz oscilante como se ha descrito en el Ejemplo 2) a una DO600 de partida de 0,5 a 2,0. El fermentador se agitó a 500 rpm-1.500 rpm suministrando aire al recipiente de fermentación a 2,0 l/min-30,0 l/min para mantener un nivel de oxígeno disuelto de al menos un 55%. El pH del cultivo se mantuvo a 7,0 mediante adición de hidróxido de amonio acuoso al 28% (v/v). El crecimiento del cultivo se mantuvo mediante adición de una solución de alimentación (hasta 4 l) que contenía 500 g/l de glucosa, 12 g/l de cloruro de amonio, 10 mg/l de biotina y 5 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado. Después de la adición de 1 l de volumen de alimentación al fermentador, a una DO600 del cultivo de aproximadamente 50, se indujo la expresión del gen *LovD* mediante adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó la fermentación a 30°C durante otras 18 horas. A continuación se enfrió el cultivo a 4°C-8°C y se mantuvo a esa temperatura hasta la recolección. Se recogieron las células por centrifugación (7.300 g, 30 minutos, 4°C-8°C). Las células recogidas se utilizaron directamente en el proceso de recuperación que se describe más adelante o se congelaron a -20°C hasta tal uso.

Se resuspendió el sedimento celular y se ajustó el pH a 8,5 en 2 volúmenes de tampón (cloruro de trietanolamina 100 mM (pH 8,5), a 4°C a cada volumen de pasta celular húmeda. El polipéptido LovD intracelular se liberó de las células haciendo pasar la suspensión a través de un homogeneizador equipado con un conjunto de válvulas de homogeneización de dos etapas utilizando una presión de 12.000 psi. Se enfrió el homogeneizado celular a 4°C inmediatamente después de la rotura, se ajustó el pH a 8,5 y, a continuación, se añadió al lisado una solución de polietilenglicol al 11% (p/v), pH 7,2, a una concentración final del 0,35%-0,5% (p/v) y se agitó a 600 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente de 25°C-30°C. La suspensión resultante se aclaró por centrifugación (7.300 g, 60 minutos, 4°C-8°C). Se decantó el sobrenadante transparente, se ajustó su pH a 8,5 y se concentró de ocho a diez veces a 20°C utilizando una membrana de ultrafiltración de celulosa (límite de peso molecular de 30 KDa). Se distribuyó el concentrado final en placas de Petri o en recipientes poco profundos, se congeló a -20°C y se liofilizó durante 48 a 72 horas, con un aumento gradual de la temperatura desde -20°C hasta 15°C, para producir un polvo secado de polipéptido LovD en bruto. El polvo en bruto se transfirió a bolsas de polietileno y se almacenó a -20°C.

Ejemplo 4: Método de HPLC de alto rendimiento para determinar la conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina

El grado de conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina se determinó utilizando un Agilent HPLC 1200 equipado con una columna Gemini® C18 (4,6 x 50 mm). Para el ensayo, se eluyeron muestras de 10 µl con una solución acuosa de acetonitrilo al 52% (v/v) que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) a un caudal de 1,5 ml/min y una temperatura de 30°C. El eluato se monitorizó a 238 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención de la sal de sodio del ácido de monacolina J, el mercaptopropionato de dimetilbutiril-S-metilo (DMB-S-MMP) y la sal de sodio de simvastatina son de aproximadamente 0,8, 2,9 y 3,9 minutos, respectivamente. El grado de conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina puede determinarse utilizando un análisis del área bajo la curva.

Ejemplo 5: Método de HPLC de alta resolución para determinar la conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina

Se recogieron 5 µl de la mezcla de reacción y se disolvieron en 1,0 ml de una mezcla de MeCN:agua (95:5). Se centrifugó la muestra (300 g, 5 minutos, 25°C) para eliminar la enzima precipitada y se analizó el sobrenadante con HPLC. La conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio del hidroxiácido de simvastatina se determinó utilizando un Agilent HPLC 1200 equipado con una columna Zorbax Eclipse C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) con H<sub>2</sub>O + TFA al 0,1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0,1% (B) como eluyentes a un caudal de 2,0 ml/min a 30°C y 238 nm. El análisis se llevó a cabo según el método del gradiente con los siguientes tiempos y composiciones: 0-1 minuto, B al 40%; 1-9 minutos, B al 90%; 9-9,5 minutos, B al 90%; 9,5-10,0 minutos, B al 40%; 10,0-10,5 minutos, B al 40%. Los tiempos de retención del hidroxiácido de monacolina J, la monacolina J, el mercaptopropionato de dimetilbutiril-S-metilo (DMB-S-MMP), el hidroxiácido de simvastatina y la simvastatina fueron aproximadamente 2,0, 3,2, 5,9, 6,4 y 7,7 minutos, respectivamente.

23

## Ejemplo 6: Preparación de monacolina J a partir de lovastatina

5 Se añadió isopropanol (IPA, 250 ml) a lovastatina (30 g, 0,074 mol) en un matraz de fondo redondo (RBF) de 3 bocas equipado con un condensador. A continuación, se añadieron a la suspensión agitada lentejas de KOH (33,2 g, 0,593 mol) y agua (3 ml, 0,1 vol). Se agitó la reacción a 80°C (temperatura interna) durante 7 horas. A continuación, se enfrió la reacción a ~ 50°C y se eliminó el IPA a presión reducida (35°C, 50 mbar) hasta un volumen final de ~ 100 ml (3,3 vol). Se añadió al residuo agua (110 ml, 3,7 vol) y se enfrió la solución a ~ 10°C en un baño de agua helada. Se añadió a la solución, gota a gota, HCl 6 M (92 ml, 3,0 vol) mientras se mantenía la temperatura  
10 interna entre 12°C-17°C. Se ajustó el pH de la solución a un pH final entre 3 y 4. A continuación, se agitó la mezcla en un baño de hielo durante 2 horas. Se separó por filtración el sólido obtenido y se lavó con agua (60 ml-90 ml, 2-3 vol) y a continuación con heptano (60 ml, 2 vol). Se secó a vacío la torta de filtro a 25°C durante 24 horas para producir un sólido blanco (22,4 g, rendimiento del 90%) con una pureza > 99% mediante análisis por HPLC.

## 15 Ejemplo 7: Preparación de DMB-S-MMP

Se enfrió una solución de *N,N*-diisopropiletilamina (19,9 ml, 120 mmol) y 3-mercaptopropanoato de metilo (7,21 60 mmol) en acetato de isopropilo (*i*-PrOAc, 100 ml) hasta una temperatura interna de 2°C. A esta solución agitada energicamente, se añadió gota a gota cloruro de 2,2-dimetilbutanoilo (8,1 g, 60 mmol) durante 10 minutos.  
20 La suspensión resultante se agitó a 25°C durante 2 horas. La reacción se supervisó comprobando la desaparición del 3-mercaptopropanoato de metilo utilizando cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de sílice. Las manchas se tiñeron con yodo (eluyente: EtOAc/heptano al 5%; R<sub>f</sub> del 3-mercaptopropanoato de metilo: 0,20). Se interrumpió la reacción mediante adición de cloruro de amonio saturado (100 ml) seguido de *i*-PrOAc (100 ml) y se agitó la mezcla resultante hasta que se disolvió todo el sólido. Se separaron las fases y se lavó la fase orgánica sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 1% (100 ml) y a continuación con agua (2 x 50 ml). A continuación, se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida (baño a 45°C, 50 mm Hg) hasta obtener una mezcla en bruto en forma de líquido de color amarillo pálido. La mezcla en bruto se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando un gradiente de heptano a EtOAc:heptano al 2%. Las fracciones que comprendían el producto puro se combinaron y se concentraron para proporcionar 10,5 g (80%) de 3-(2,2-dimetilbutanoil)propionato de metilo (DMB-S-MMP).  
30

Ejemplo 8: Conversión de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina, purificación, aislamiento del hidroxiácido de simvastatina y conversión del hidroxiácido de simvastatina en sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina  
35

Se ensayaron las enzimas aciltransferasa variantes, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 3, para su uso en una conversión a escala preparativa de la sal de sodio de monacolina J en sal de sodio de simvastatina, de la siguiente manera. Se equipó un matraz de fondo redondo (RBF) de 3 bocas de 250 ml con un agitador superior, un impulsor de palas planas y un termómetro interno. Se cargó el recipiente de reacción con hidroxiácido de monacolina J (5 g, 14,79 mmol). Posteriormente se añadieron solución de NaOH 1 M (16,3 ml) y agua desionizada (8,6 ml). Se agitó la mezcla hasta que se disolvió todo el sólido antes de la adición del tampón (~ 5 minutos). Se añadió solución de tampón de TEA (33,3 ml, 400 mM, pH = 8,5) y se ajustó el pH de la mezcla resultante de 9,4 a 9,0 con HCl 5 M (0,15 ml) antes de la adición de la enzima. Se cargó a la mezcla agitada enzima LovD variante (0,05 g) en forma de polvo. Se agitó la mezcla durante 5 minutos a 350 rpm a 25°C para conseguir homogeneidad. Se añadió DMB-S-MMP (3,55 ml, 16,27 mmol, 1,1 eq) para iniciar la reacción enzimática. Se agitó la mezcla bifásica resultante a 350 rpm a 25°C (temperatura interna). El análisis por HPLC, como se ha descrito en el Ejemplo 5, se realizó en muestras tomadas periódicamente. Se obtuvo aproximadamente un 92% de conversión al cabo de 72 horas. Cuando se añadió carbón vegetal activado (10 g/l) antes del DMB-S-MMP (para neutralizar el subproducto, 3-mercaptopropanoato de metilo), pudo conseguirse un 95%-99% de conversión al cabo de 40-48 horas. En una forma de realización, la variante con las mutaciones descritas en la VARIANTE NO: 116 de la Tabla 1 proporciona buenos resultados según las condiciones anteriormente indicadas. Puede ser necesario optimizar las condiciones de reacción, incluidas las cantidades de carga del sustrato o enzima, para el perfil de reactividad de otras variantes.  
40  
45  
50

Se purificó sal de sodio del hidroxiácido de simvastatina a partir de la reacción anteriormente indicada, de la siguiente manera. Una vez que el análisis durante el proceso indicó la máxima conversión, se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 9,0 desde 8,2 utilizando solución de NaOH 10 M (0,55 ml). Si se añadía carbón vegetal, la mezcla de reacción se filtraba a través de un lecho de Celite (1,5 g) en un embudo de vidrio sinterizado G4 convencional a presión reducida para eliminar el carbón vegetal. Se enjuagó el RBF de 3 bocas de 250 ml con agua desionizada (5 ml), que se filtró a través del mismo lecho de Celite y a continuación se combinó con el filtrado. Se lavó la torta de filtro con agua (5 ml) y los lavados se recogieron y se combinaron con el filtrado. Se cargó a la reacción MTBE (60 ml; 12 vol) y se agitó la mezcla a 450 rpm durante 10 minutos. A continuación, se separaron las 2 fases y se recogieron por separado utilizando un embudo de decantación. Se volvió a cargar la fase acuosa en el RBF de 3 bocas de 250 ml y se extrajo de nuevo con MTBE (30 ml; 6 vol). Las fases se separan y recogieron por separado.  
55  
60  
65



A continuación, se realizó la conversión de la sal de sodio del hidroxiácido de simvastatina en hidroxiácido de simvastatina, de la siguiente manera. Se cargó EtOAc (65 ml; 13 vol) a la fase acuosa. El pH de la mezcla se ajustó a 5,3-5,4 utilizando una solución de HCl 5 M (0,52 ml) y se agitó a 450 rpm durante 10 minutos a 23°C-25°C. Se dejó que se separaran las fases en un embudo de decantación. Si se formaba una emulsión, se añadía salmuera para mejorar la separación de las dos fases. Se eliminó la capa acuosa y se recogió por separado la fase de EtOAc. Se volvió a cargar la capa acuosa en el RBF de 3 bocas de 250 ml y se extrajo de nuevo con EtOAc (65 ml; 13 vol). Se agitó la mezcla bifásica a 450 rpm durante 10 minutos a 23°C y, a continuación, se dejó que se separaran las fases en un embudo de decantación y se recogieron por separado. Se enjuagó el embudo de decantación con EtOAc (5 ml), que a continuación se combinó con los extractos de EtOAc primero y segundo. Los extractos de EtOAc combinados se filtraron a través de un lecho de Celite (1 g) en un embudo de vidrio sinterizado G4 convencional a presión reducida para aclarar el extracto. Se lavó la torta de filtro con EtOAc (10 ml) y se combinaron los lavados con el filtrado. El filtrado se concentró de 145 ml a 65 ml a presión reducida.

La conversión del hidroxiácido de simvastatina en sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina se realizó de la siguiente manera. La solución de acetato de etilo que contenía el hidroxiácido de simvastatina se cargó en un RBF de 3 bocas de 250 ml y se agitó la mezcla de reacción a 250 rpm a 20°C-22°C. A continuación se añadió a la mezcla de reacción, gota a gota durante 10 minutos, una mezcla 1:1 (v/v) de hidróxido de amonio (2,5 ml) y MeOH (2,5 ml), manteniendo la temperatura interna a 20°C-22°C. Después de la adición completa de la mezcla de hidróxido de amonio y MeOH, se agitó la mezcla resultante a 260 rpm durante 1 hora a 20°C-22°C. Se agitó adicionalmente la suspensión durante 1 hora a 0°C-5°C. A continuación, se filtró el sólido blanco a través de un embudo de vidrio sinterizado G4 convencional a vacío y se enjuagó el recipiente de reacción con 6,5 ml de EtOAc frío. Se filtró el aclarado a través del mismo lecho de Celite y se combinó con el filtrado. A continuación, se lavó la torta de filtro con EtOAc frío (6,5 ml; 1,3 vol). El sólido blanco se secó en la estufa de vacío (2 mm Hg) a 25°C durante 24 horas para proporcionar aproximadamente 4,3 g-5,0 g (rendimiento aislado del 65%-75%) de sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina, en forma de sólido blanco con una pureza química del 94%-97% (AUC, 238 nm).

Ejemplo 9: Conversión de la sal de amonio del hidroxiácido de monacolina J en sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina y aislamiento de la sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina.

Las enzimas aciltransferasa variantes, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 3, se ensayaron para su uso en una conversión a escala preparativa de la sal de amonio de monacolina J en sal de amonio de simvastatina, de la siguiente manera. Se equipó un matraz de fondo redondo (RBF) de 3 bocas de 250 ml con un agitador superior, un impulsor de palas planas y un termómetro interno. Se cargó el recipiente de reacción con hidroxiácido de monacolina J (10 g, 29,58 mmol). Posteriormente se añadieron agua desionizada (112,0 ml) y NH<sub>4</sub>OH (4,2 ml). Se agitó la mezcla hasta que se disolvió todo el sólido antes del ajuste del pH (~ 2 minutos). Se ajustó el pH de la mezcla resultante de 9,2 a 9,0 con HCl 5 M (1,5 ml) antes de la adición de la enzima. Se cargó a la mezcla agitada enzima LovD variante (0,10 g) en forma de polvo. Se agitó la mezcla durante 5 minutos a 300 rpm a 25°C para conseguir homogeneidad. Se añadió DMB-S-MMP (7,1 ml, 32,54 mmol, 1,1 eq) para iniciar la reacción enzimática. La mezcla bifásica resultante se agitó a 300 rpm a 25°C (temperatura interna). El pH de la reacción se controló a 9,0 mediante pH-stat y titulación de NH<sub>4</sub>OH al 25%. El análisis por HPLC, como se ha descrito en el Ejemplo 5, se realizó en muestras tomadas periódicamente. Se consiguió aproximadamente un 97% de conversión al cabo de 48 horas. En una forma de realización, la variante con las mutaciones descritas en la VARIANTE NO: 116 de la Tabla 1 proporciona buenos resultados según las condiciones anteriormente indicadas. Puede ser necesario optimizar las condiciones de reacción, incluidas las cantidades de carga del sustrato o enzima, para el perfil de reactividad de otras variantes.

Se aisló sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina a partir de la reacción anteriormente indicada, de la siguiente manera. Una vez que el análisis durante el proceso indicó la máxima conversión, se filtró la mezcla de reacción a través de un embudo de vidrio sinterizado G4 convencional a presión reducida. Se enjuagó el RBF de 3 bocas de 250 ml con agua desionizada enfriada (10 ml) y se filtró la suspensión a través del mismo embudo de vidrio sinterizado. Se lavó la torta de filtro dos veces con agua desionizada enfriada (20 ml) y, a continuación, se lavó tres veces con MTBE (40 ml). El sólido blanco se secó en una estufa de vacío (2 mm Hg) a 25°C durante 24 horas para proporcionar aproximadamente 11,4 g a 11,7 g (rendimiento aislado del 85% al 87%) de sal de amonio del hidroxiácido de simvastatina en forma de sólido blanco con una pureza química de aproximadamente el 97% al 98% (AUC, 238 nm).

Aunque se han ilustrado y descrito diversas formas de realización específicas, se comprenderá que pueden realizarse diversos cambios sin alejarse del alcance de la invención o invenciones tal como se define en las reivindicaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gilson, Lynne

<111> Collier, Steven James

<112> Sukumaran, Joly  
 <113> Yeo, Wan Lin  
 <114> Alvizo, Oscar  
 <115> Teo, Ee Ling  
 5 <116> Wilson, Robert John  
 <117> Xu Junye  
  
 <120> Polipéptidos LovD variantes y sus usos  
 10 <130> 376247-043US (105191) {CX2-022}  
  
 <141> 24-09-2010  
  
 <160> 20  
 15 <210> 1  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> LovD de *Aspergillus terreus* con codones optimizados  
  
 <400> 1  
 25  
  
 atgggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggaccggy tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaaag cggttaaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 30 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tggaaaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaacgccc gtctgcgcga acgcccgtgtt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt ctctctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480  
 35 catttgacga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcgcggcc agctgttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660  
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720  
 cagaccacc gcaactccgc ggatggtcgt ctgctgatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 40 gcggacggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840  
 aagggtctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggtg tcattgcaact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 45 ctgacgtttg gtggcggctc aaacattggt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140  
 actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggy tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242  
  
 <210> 2  
 50 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 55 <223> LovD de *Aspergillus terreus* con codones optimizados  
  
 <400> 2  
  
 60 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 65 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg

5 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
50 55 60  
Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
65 70 75 80  
Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
85 90 95  
10 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
100 105 110  
Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Ala Arg Leu Arg Glu Arg  
115 120 125  
Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
130 135 140  
15 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
145 150 155 160  
His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Leu Ala Pro  
165 170 175  
20 Pro Ala Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Asn Leu  
180 185 190  
Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
195 200 205  
Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
210 215 220  
25 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
225 230 235 240  
Gln Thr His Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Leu Ser Tyr Asp Asp Ser  
245 250 255  
Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
260 265 270  
30 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
275 280 285  
Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
290 295 300  
35 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
305 310 315 320  
Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
325 330 335  
Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
340 345 350  
40 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
355 360 365  
Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
370 375 380  
Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
385 390 395 400  
45 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
405 410

50 <210> 3  
<211> 1242  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Variante de LovD

55 <400> 3

60

65

ES 2 524 725 T3

5 atggggttcta tcattgatgc ggctgcggcc ggggacccgg tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggatata ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgcggga cctgagcggg atgccggctg tggaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaacgccc gtctgcggga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420

10 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480  
 catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcgccgcc agctgttaat 540  
 gatccaggcg cggaaatggat ttatggcgct aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660  
 15 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720  
 cagacccacc gcaactccgc ggatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 gcggacggtg aagagtgttt cggggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgctgc tgcagccaca aaccgtggat 900  
 20 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgccc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtcggccc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgctcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcggctc aaacattggt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140  
 actttagcct ttttccagct ggaaccgtgg aacgacccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 25 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

30 <210> 4  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Variante de LovD

40 <400> 4

45

50

55

60

65

5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Ala Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Leu Ala Pro  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Asn Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320

45 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

60 <210> 5  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 5

```

5   atggggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggacccgg tggttctgat ggaaacggct 60
    ttcgtaaaag cggtaaaaag ccgccagatt cggggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
    agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgcagagtgc 180
    aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
    ctgaccacga ttatggcact gcagtgcctg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
    gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360
10  ggcaacccgc gctcgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
    accagcggtc tgcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
    catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtt ttgcgccgcc attagttaa 540
    gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtt tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
    cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
    atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
15  cagaccacc gcaactccag cgatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
    gcggacgggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
    aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctctgtgc tgcagccaca aaccgtggat 900
    ctgatgttcc agccggcgtt ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
    gcgtcgcgcg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
20  ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
    atgacgtttg gtggcggctc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
    actttagcct ttttcagct ggaaccgtgg aacgaccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
    acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

```

```

25  <210> 6
     <211> 413
     <212> PRT
     <213> Secuencia Artificial
30  <220>
     <223> Variante de LovD
35  <400> 6

```

```

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

```

```

50
55
60
65

```

5 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 10 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 15 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 20 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 25 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 30 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 35 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 40 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

45 <210> 7  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 7

55

60

65

ES 2 524 725 T3

5 atgggttcta tcattgatgc ggctgcgccc gcggaccggt tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgogggc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgce tgctgcccga cctgagcgcg atgcccgtgc tggaaaggct tgatgatgcc 360  
 10 ggcaaccgce gtctgcccga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480  
 catttgacga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660  
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tegtgccgac 720  
 15

cagaccacc gcaactccag cgatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 gcggacgggt aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 aagttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900  
 20 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgccc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtcgccgc acatcaacta tggcggcca atgcctatgg tcttgcgtcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcggctc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140  
 actttagcct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 25 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

30 <210> 8  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 8

40

45

50

55

60

65



5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 10 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 15 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 20 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 25 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 30 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 35 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 40 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 45 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 50 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

55 <210> 9  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 65 <400> 9

ES 2 524 725 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35

```

atgggttcta tcattgatgc ggctgoggcc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60
ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
agtggtaacc tgaactacac tcgctgttcc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcctg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggctg tggaggctt tgatgatgcc 360
ggcaaccggc gtctgcgoga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
accagcggtc tgtcgtacgt ctctctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccctggggc 660
atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
cagaccacc gcaactccag cgatggctgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
gcggaacggg aagagtgtt cggggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
ctgatgttcc agccggcgtc ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
gcgtgcgccg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tctctcgtcg cagcttcggc 1020
ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
atgacgtttg gtggcggctc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctcgtgt 1140
actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242
  
```

<210> 10  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 <400> 10

40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

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

ES 2 524 725 T3

5 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 10 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 15 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 20 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 25 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 30 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 35 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

40 <210> 11  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 <400> 11

50

55

60

65

ES 2 524 725 T3

```

5      atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60
      ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
      agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
      aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
      ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
      gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggcgc tgggaaggctt tgatgatgcc 360
10     ggcaaccggc gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
      accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggc 480
      catttgacga gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
      gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc tctatcgact gggcaggcaa attagtggaa 600
      cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
15     atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
      cagaccacc  gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
      gcggaacggc aagagtgttt cggggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
      aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgttgc tgcagccaga aaccgtggat 900
      ctgatgttcc agccggcgtc ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
20     gcgtgcggc  acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020

      ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
25     atgacgtttg gtggcgggtcc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140
      actttagtct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
      acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

```

```

30     <210> 12
      <211> 413
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

35     <220>
      <223> Variante de LovD

40     <400> 12

```

40

45

50

55

60

65

5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 10 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 15 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 20 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 25 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 30 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 35 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Glu Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 40 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 45 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 50 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400

Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

55

<210> 13  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de LovD

65

<400> 13

ES 2 524 725 T3

5 atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc ggggaccggt tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtcgct tgaactacac tcgctgtttc gggcagcgca ctgtgcgctg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgct tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcctg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgcccga cctgagcgcg atgcccgtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360  
 10 ggcaaccgct gtctgcccga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggct tctcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 catttgacgg gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgct ttgcccgcgc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc ggcacgact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660  
 15 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgctccggata tgctggcacg tcgtgcccgc 720  
 atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcccctatg atgactctgt gtatcttctgc 780  
 gcggacgggt aagagtgttt cggggccag ggcgtgttca gcagtcacag cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgttgc tgcagccaga aaccgtgat 900  
 ctgatgttcc agcccgcgct ggaaccgccc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 20 gcgtgcccgc acatcaacta tggcggtcca atgcccctatg tcctgcccgc cagcttcggc 1020  
 ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcggtcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140  
 actttagtct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 accttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

25  
 <210> 14  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 35 <400> 14

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

60  
 65

5 His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 10 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 15 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Glu Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 20 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 25 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 30 Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

35 <210> 15  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 45 <400> 15

atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc ggggaccggt tggttctgat ggaaaccggt 60  
 ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agcgttcgct tgaactacac tcgctgtttc ggccgacgca ctgtgcgctc cgacgagtgc 180  
 50 aatcaattac caccgctgca ggttgataca ccatgtcgtc tggaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcagt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaaccgct gtctgcgca acgcccgtgg aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 55 catttgaggc gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct ggcacgact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtag ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660  
 atcaactgata tgacgttcaa actgcagcag cgcccggata tgctggcagc tcgtgccgac 720  
 atgaccacc gcaactccag cगतggtaaa ctgcgctatg atgacacggt gtattttcgc 780  
 gttgaccggt aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 60 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccagg gaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgctc ttggaagaac aatatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtcgcgca acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgctc cagcttcggc 1020  
 ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgctc taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcggtcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140  
 actttagtct tttccagct ggaaccgtgg agtgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 65 acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

5 <210> 16  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 <400> 16

15 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 25 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 30 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 35 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 40 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr  
 245 250 255  
 45 Val Tyr Phe Arg Val Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gly Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 50 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 55 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 60 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Ser Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

65 <210> 17



ES 2 524 725 T3

<211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 17

10  
 15  
 20  
 25  
 30

```

atggggttcta acattgatgc ggctgtggcc gcggaacccgg tggttctgat gaaacgggct 60
ttccgtaaag cggttgaaag ctctcagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
agcggtcgctc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgctg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgcccgtgc tgggaaggctt tgatgatgcc 360
ggcaacccgc gtctgcgca acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
accagcggctc tgtcgtacgt ctctcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
catttgccagg gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcccggcc attagttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct ggcacgcact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgcccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcccctatg atgacacggt gtattttcgc 780
catgacggtg aagagtgttt cgggggccaq ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggccctgttc tgcagccagg gaccgtggat 900
ctgatgttcc agccgcgctt ggaaccgctt ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
gcgtgcgcgc acatcaacta tggcggctca atgcctatgg tcctgcgctg cagcttcggc 1020
ctgggtggtg tcattgcaact ggagatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
atgacgtttg gtggcgtcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
actttagctc ttttccagct ggaaccgtgg agtgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242
    
```

<210> 18  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 18

35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

```

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

		195				200				205						
	Gln	Tyr	Leu	Gln	Glu	Asn	Ile	Cys	Ala	Pro	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Met
5		210					215					220				
	Thr	Phe	Lys	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp
	225					230					235					240
	Met	Thr	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu	Arg	Tyr	Asp	Asp	Thr
					245					250					255	
10	Val	Tyr	Phe	Arg	His	Asp	Gly	Glu	Glu	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Gly	Val
				260					265					270		
	Phe	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Tyr	Met	Lys	Val	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Lys
				275				280					285			
	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Val	Asp	Leu	Met	Phe	Gln
	290						295					300				
15	Pro	Ala	Leu	Glu	Pro	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Met	Asn	Gln	His	Met	Asp
	305					310					315					320
	Ala	Ser	Pro	His	Ile	Asn	Tyr	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Met	Val	Leu	Arg
					325					330					335	
	Arg	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gly
20				340					345					350		
	Glu	Asn	Trp	Arg	Arg	Lys	Gly	Ser	Met	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Pro	Asn
			355					360					365			
	Ile	Ile	Trp	Gln	Ile	Asp	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Val	Phe
						375						380				
25	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Cys	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg
	385					390					395					400
	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	Gly			
					405					410						

30 <210> 19  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Variante de LovD

40 <400> 19

	atgggttcta	acattgatgc	ggctgtggcc	gcggaaccgg	tggttctgat	gaaacgggct	60
	ttccgtaaag	cggttgaaag	ctctcagatt	cgggtgctg	ttttgatggc	gcgtgattgt	120
	agcggctcgtc	tgaactacac	tcgctgtttc	ggcgcacgca	ctgtgcgtcg	cgacgagtgc	180
45	aatcaattac	caccgctgca	ggtggataca	ccatgtcgtc	tggcaagcgc	tactaaatta	240
	ctgaccacga	ttatggcact	gcagtgcacg	gaacgcggcc	tggtacgctt	ggatgaaact	300
	gttgaccgcc	tgctgccgga	cctgtgcgcg	atgccgggtg	tggaaggctt	tgatgatgcc	360
	ggcaaccocg	gtctgcgcca	acgocgtggt	aaaattacgt	tacgccatct	gctgacacac	420
	accagcggtc	tgtcgtacgt	cttctgcat	ccgctgctgc	gcgagtatgt	tgcccagggt	480
	catttgagg	gcgctgagaa	gtttggcatt	cagaatcgtt	ttgcgcgcc	attagttaat	540
50	gatccaggcg	cggaatggat	ttatggcgct	ggcatcgact	gggcaggcaa	attagtggaa	600
	cgcgcaacgg	gcttggacct	ggaacagtac	ttgcaggaga	acatttgccg	gccgctgggc	660
	atcactgata	tgacgttcaa	actgcagcag	cgcccggata	tgctggcacg	tcgtgccgac	720
	atgaccacc	gcaactccag	cgatggtaaa	ctgcgctatg	atgacacggg	gtattttcgc	780
	catgacgggtg	aagagtgttt	cggggggccag	ggcgtgttca	gcagtcagg	cagttacatg	840
55	aaggttctgc	actctctgct	gaaacgtgac	ggcctgttgc	tgacgcccag	gaccgtggat	900
	ctgatgttcc	agccggcgct	ggaaccgcgt	ttggaagaac	aaatgaacca	gcatatggac	960
	gcgtgcggcg	acatcaacta	tggcgggtcca	atgcctatgg	tcatgcgtcg	cagcttcggc	1020
	ctgggtggta	tcattgcact	ggaggatctg	gatggtgaga	actggcgtcg	taaaggctcg	1080
	atgacgtttg	gtggcggctc	aaacattatt	tggcagattg	accgaaagc	gggtctgtgt	1140
60	actttagtct	tttccagct	ggaaccgtgg	agtgaccocg	tgtgtcgtga	cctgactcgc	1200
	acctttgaga	aagcgatcta	tgcacagtat	caacagggct	aa		1242

65 <210> 20  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Variante de LovD

5 <400> 20

10 Met Gly Ser Asn Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
1 5 10 15  
Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Ser Gln Ile Pro Gly  
20 25 30  
Ala Val Leu Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Thr Arg  
35 40 45  
Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
50 55 60  
Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
65 70 75 80  
Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Arg  
85 90 95  
20 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Cys Ala Met Pro  
100 105 110  
Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
115 120 125  
Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
130 135 140  
25 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
145 150 155 160  
His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
165 170 175  
Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile  
180 185 190  
30 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
195 200 205  
Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
210 215 220  
35 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
225 230 235 240  
Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr  
245 250 255  
Val Tyr Phe Arg His Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
260 265 270  
40 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
275 280 285  
Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gly Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
290 295 300  
Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
305 310 315 320  
45 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Met Arg  
325 330 335  
Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
340 345 350  
Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
355 360 365  
50 Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
370 375 380  
Phe Gln Leu Glu Pro Trp Ser Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
385 390 395 400  
Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
405 410

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- 60 <110> Gilson, Lynne  
<111> Collier, Steven James  
<112> Sukumaran, Joly  
<113> Yeo, Wan Lin  
  
<114> Alvizo, Oscar  
65 <115> Teo, Ee Ling  
<116> Wilson, Robert John

ES 2 524 725 T3

<117> Xu Junye

<120> Polipéptidos LovD variantes y sus usos

5 <130> 376247-043US (105191) {CX2-022}

<141> 24-09-2010

10 <160> 20

<210> 1

<211> 1242

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> LovD de *Aspergillus terreus* con codones optimizados

20 <400> 1

```

atggggttcta tcattgatgc ggctgcgggcc gcggaaccggg tggttctgat ggaaacggct 60
ttccgtaaag cggttaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
agtggttaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360
ggcaacgccc gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcggccgc agctgttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
cagaccacc gcaactcgc ggatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
gcggaacggg aagagtgtt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tctcgcgtcg cagcttcggc 1020
ctgggtggta tcattgcaact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
ctgacgtttg gtggcggctc aaacattggt tggcagattg acccgaaagc gggctctggt 1140
actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
acctttgagc acgcgatcta tgcacagat caacagggt aa 1242

```

45 <210> 2

<211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> LovD de *Aspergillus terreus* con codones optimizados

<400> 2

55

60

65

5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
1 5 10 15  
Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
20 25 30  
Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
10 35 40 45  
Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
50 55 60  
Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
65 70 75 80  
15 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
85 90 95  
Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
100 105 110  
20 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Ala Arg Leu Arg Glu Arg  
115 120 125  
Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
130 135 140  
25 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
145 150 155 160  
His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Leu Ala Pro  
165 170 175  
30 Pro Ala Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Asn Leu  
180 185 190  
Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
195 200 205  
35 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
210 215 220  
Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
225 230 235 240  
40 Gln Thr His Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
245 250 255  
Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
260 265 270  
Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
275 280 285  
45 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
290 295 300  
Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
305 310 315 320  
Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
325 330 335  
50 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
340 345 350  
Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
355 360 365  
Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
370 375 380  
Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
385 390 395 400  
55 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
405 410

60 <210> 3  
<211> 1242  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
65 <220>  
<223> Variante de LovD  
<400> 3

ES 2 524 725 T3

```

5      atgggttcta tcattgatgc ggctgogggc goggaccogg tggttctgat ggaaacggct 60
      ttccgtaaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
      agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
      aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
      ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
      gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtc tggaggctt tgatgatgcc 360
      ggcaacgccc gtctgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420

10

      accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
      ctttgcaga ggcctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcgccgcc agctgttaat 540
      gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtt aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
15     cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
      atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
      cagaccaccc gcaactccgc ggatggctgt ctgocgtatg atgactctgt gtatthtgcg 780
      gcgacgggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
      aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
20     ctgatgttcc agccggcgtt ggaaccgctc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
      gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcc atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
      ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
      atgacgtttg gtggcgggtc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
      actttagcct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccogg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
25     acctttgagc acgcatctc tgcacagtat caacagggct aa
      1242

```

```

30     <210> 4
      <211> 413
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

      <220>
      <223> Variante de LovD

35     <400> 4

```

40

45

50

55

60

65

5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 10 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 15 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Ala Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 20 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Leu Ala Pro  
 165 170 175  
 25 Pro Ala Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Asn Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 30 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ala Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 35 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 40 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
  
 45 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 50 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 55 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

<210> 5  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Variante de LovD  
  
 65 <400> 5

ES 2 524 725 T3

```

5      atgggttcta tcattgatgc ggctgcgccc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60
      ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
      agtggtaacc tgaactacac togctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
      aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
      ctgaccacga ttatggcact gcagtgcacg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
      gttgaccgcc tgctgcccga cctgagcgcg atgccggctg tggaaaggctt tgatgatgcc 360
      ggcaaccgcg gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
10     accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
      catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
      gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
      cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
      atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
      cagaccaccc gcaactccag cgatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
15     gcggacggtg aagagtgttt cggggggccag ggcgtgttca gcgggtccagg cagttacatg 840
      aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
      ctgatgttcc agccggcgtc ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
      gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
      ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
20     atgacgtttg gtggcggctc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
      actttagcct ttttcagct ggaaccgtgg aacgaccggc tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
      acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

```

25 <210> 6  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 6

```

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

```

50

55

60

65



5 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 10 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 15 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Leu  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 20 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 25 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 30 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 35 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 40 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

45 <210> 7  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Variante de LovD

55 <400> 7

60

65

ES 2 524 725 T3

5 atgggttcta tcattgatgc ggctgcgccc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtaacc tgaactacac togctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgetgcccga cctgagcgcg atgccgggtg tggaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaaccggc gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtogtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480  
 10 catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcggt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660  
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tctgcccac 720

15 cagaccacc gcaactccag cgatggctgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 gcggacggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggccgtgttc tgcagccaca aaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 20 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tccctgcgtcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcgggtcc aaacattggt tggcagattg acccgaagc gggctctgtg 1140  
 actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggt aa 1242

25 <210> 8  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Variante de LovD

35 <400> 8

40

45

50

55

60

65

5 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
1 5 10  
Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Lys Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
20 25 30  
Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
35 40 45  
10 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
50 55 60  
Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
65 70 75 80  
Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
85 90 95  
15 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
100 105 110  
Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
115 120 125  
20 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
130 135 140  
Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Met Ala Gln Gly  
145 150 155 160  
His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Ser Arg Phe Ala Pro  
165 170 175  
25 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Leu  
180 185 190  
Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
195 200 205  
30 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
210 215 220  
Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
225 230 235 240  
Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Arg Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
245 250 255  
35 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
260 265 270  
Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
275 280 285  
40 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
290 295 300  
Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
305 310 315 320  
Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
325 330 335  
45 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
340 345 350 355  
Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn

50 355 360 365  
Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Ala Phe  
370 375 380  
Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
385 390 395 400  
55 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
405 410

60 <210> 9  
<211> 1242  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65 <220>  
<223> Variante de LovD

ES 2 524 725 T3

<400> 9

5 atgggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cgggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtc tggaggctt tgatgatgcc 360  
 10 ggcaaccggc gtctgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt ctctctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcccggcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660  
 15 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720  
 cagaccaccc gcaactccag cgatggctgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 gcggacgggtg aagagtgttt cggggggccag ggctgtttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgtttgc tgcagccaca aaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgtc ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 20 gcgtgcggcg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tctctgcgtc cagcttcggc 1020  
 ctgggttgta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacgtttg gtggcgggtcc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140  
 actttagcct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

25 <210> 10  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 35 <400> 10

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

55  
 60  
 65

		115				120				125						
	Arg	Gly	Lys	Ile	Thr	Leu	Arg	His	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ser	Gly	Leu
5		130						135				140				
	Ser	Tyr	Val	Phe	Leu	His	Pro	Leu	Leu	Arg	Glu	Tyr	Val	Ala	Gln	Gly
	145					150					155					160
	His	Leu	Gln	Ser	Ala	Glu	Lys	Phe	Gly	Ile	Gln	Asn	Arg	Phe	Ala	Pro
					165					170					175	
10	Pro	Leu	Val	Asn	Asp	Pro	Gly	Ala	Glu	Trp	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Leu
				180						185				190		
	Asp	Trp	Ala	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	Leu	Asp	Leu	Glu
			195					200					205			
	Gln	Tyr	Leu	Gln	Glu	Asn	Ile	Cys	Ala	Pro	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Met
15		210						215				220				
	Thr	Phe	Lys	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp
	225					230					235					240
	Gln	Thr	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Arg	Tyr	Asp	Asp	Ser
				245						250					255	
20	Val	Tyr	Phe	Arg	Ala	Asp	Gly	Glu	Glu	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Gly	Val
			260						265					270		
	Phe	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Tyr	Met	Lys	Val	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Lys
			275					280						285		
	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Gln	Thr	Val	Asp	Leu	Met	Phe	Gln
25		290					295					300				
	Pro	Ala	Leu	Glu	Pro	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Met	Asn	Gln	His	Met	Asp
	305					310					315					320
	Ala	Ser	Pro	His	Ile	Asn	Tyr	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Met	Val	Leu	Arg
				325						330					335	
30	Arg	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gly
			340						345					350		
	Glu	Asn	Trp	Arg	Arg	Lys	Gly	Ser	Met	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Pro	Asn
			355					360					365			
	Ile	Val	Trp	Gln	Ile	Asp	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Ala	Phe
35		370					375					380				
	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	Trp	Asn	Asp	Pro	Val	Cys	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg
	385					390					395					400
	Thr	Phe	Glu	His	Ala	Ile	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	Gly			
				405						410						

40 <210> 11  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Variante de LovD

50 <400> 11

ES 2 524 725 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25

```

atggggttcta tcattgatgc ggctgtggcc ggggacccgg tggttctgat ggaaacggct 60
ttccgtaaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
agtggtaaac tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcacg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tgggaaggctt tgatgatgcc 360
ggcaaccocg gtctgcgcga acgcccgtgg aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct tctatcgact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
cagaccaccc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgactctgt gtatthttcgc 780
gcggaacggg aagagtgttt cggggggccag ggctgtttca gcagtccagg cagttacatg 840
aaggttcttc actctctgct gaaacgtgac ggctgtttgc tgcagccaga aaccgtggat 900
ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tctcgtcgtcg cagcttcggc 1020

ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
atgacgtttg gtggcggtcc aaacattggt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
actttagtct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242
  
```

- <210> 12
- <211> 413
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Variante de LovD
- <400> 12

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Asn Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Ser Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Gln Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Glu Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Val Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400

Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

<210> 13  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 13

ES 2 524 725 T3

5 atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gggaccggg tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agtggctcgc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 10 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcacg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgcccgtgc tggaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaaccgcg gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 catttgacag gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc ggcacgact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660  
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcagc tcgtgccgac 720  
 15 atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780  
 ggggacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaga aaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgtc ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtgcgcgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 20 atgacgtttg gtggcggctc aaacattatt tggcagattg acccgaagc gggctctgtg 1140  
 actttagtct ttttcagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 acctttgaga aagcgtacta tgcacagtat caacagggct aa 1242

25 <210> 14  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Variante de LovD  
 <400> 14

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

60  
 65



5 His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 10 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Ser  
 245 250 255  
 15 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Glu Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 20 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 25 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 30 Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

35 <210> 15  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 15

45 atggggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gcggaccggtc tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agcggctcgtc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 50 aatcaattac caccgtgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaaacggcgc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtc tggaaaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaaccgca gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 catttgcagg gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct ggcacgcact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 55 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660  
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgcgccgata tgctggcacg tcgtgccgac 720  
 atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgacacggt gtattttcgc 780  
 gttgacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagtacatg 840  
 60 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccagg gaccgtggat 900  
 ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgccc ttggaagaac aaatgaacca gcataggac 960  
 gcgtgcgcgc acatcaacta tggcggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttggcc 1020  
 ctgggttgta tcattgcaact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacggttg gtggcggtcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140  
 65 acttttagtct ttttccagct ggaaccgtgg agtgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

5 <210> 16  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Variante de LovD  
  
 10 <400> 16

15 Met Gly Ser Ile Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu  
 1 5 10 15  
 Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Arg Gln Ile Pro Gly  
 20 25 30  
 Ala Val Ile Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Thr Arg  
 35 40 45  
 Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Asp  
 85 90 95  
 25 Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Ser Ala Met Pro  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg  
 115 120 125  
 30 Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu  
 130 135 140  
 Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro  
 165 170 175  
 35 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile  
 180 185 190  
 Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu  
 195 200 205  
 40 Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr  
 245 250 255  
 45 Val Tyr Phe Arg Val Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val  
 260 265 270  
 Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys  
 275 280 285  
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gly Thr Val Asp Leu Met Phe Gln  
 290 295 300  
 50 Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Leu Arg  
 325 330 335  
 55 Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly  
 340 345 350  
 Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn  
 355 360 365  
 Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe  
 370 375 380  
 60 Phe Gln Leu Glu Pro Trp Ser Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly  
 405 410

65 <210> 17

ES 2 524 725 T3

<211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 17

10 atgggttcta acattgatgc ggctgtggcc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60  
 ttccgtaaag cggttgaaag ctctcagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120  
 agcggctcgtc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180  
 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240  
 15 ctgaccacga ttatggcaact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300  
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgcgggtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360  
 ggcaaccggc gtctgcgcga acgcccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420  
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480  
 catttgccagg gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540  
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtt ggcatcgact gggcaggcaa attagtggaa 600  
 20 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660  
 atcaactgata tgacgttcaa actgcagcag cgcgccgata tgctggcacg tcgtgccgac 720  
 atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgacacggg gtattttcgc 780  
 catgacggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840  
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccagg gaccgtggat 900  
 25 ctgatgttcc agccggcgtt ggaaccgctt ttggaagaac aatgaacca gcatatggac 960  
 gcgtgcgccg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020  
 ctgggtggta tcattgcaact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080  
 atgacggttg gtggcgggtcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140  
 acttttagtet ttttccagct ggaaccgtgg agtgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200  
 30 acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

<210> 18  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 18

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

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30

			195					200					205			
	Gln	Tyr	Leu	Gln	Glu	Asn	Ile	Cys	Ala	Pro	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Met
		210					215					220				
	Thr	Phe	Lys	Leu	Gln	Gln	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp
	225					230					235					240
	Met	Thr	His	Arg	Asn	Ser	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu	Arg	Tyr	Asp	Asp	Thr
					245					250					255	
	Val	Tyr	Phe	Arg	His	Asp	Gly	Glu	Glu	Cys	Phe	Gly	Gly	Gln	Gly	Val
				260					265					270		
	Phe	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Tyr	Met	Lys	Val	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Lys
			275					280						285		
	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Thr	Val	Asp	Leu	Met	Phe	Gln
		290					295					300				
	Pro	Ala	Leu	Glu	Pro	Arg	Leu	Glu	Glu	Gln	Met	Asn	Gln	His	Met	Asp
						310					315					320
	Ala	Ser	Pro	His	Ile	Asn	Tyr	Gly	Gly	Pro	Met	Pro	Met	Val	Leu	Arg
					325					330					335	
	Arg	Ser	Phe	Gly	Leu	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	Gly
				340					345					350		
	Glu	Asn	Trp	Arg	Arg	Lys	Gly	Ser	Met	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Pro	Asn
			355					360					365			
	Ile	Ile	Trp	Gln	Ile	Asp	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Thr	Leu	Val	Phe
			370				375					380				
	Phe	Gln	Leu	Glu	Pro	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Cys	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg
						390					395					400
	Thr	Phe	Glu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	Gly			
					405					410						

35  
 40

<210> 19  
 <211> 1242  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de LovD

<400> 19

45  
 50  
 55  
 60  
 65

atgggttcta	acattgatgc	ggctgtggcc	gcggaaccgg	tggttctgat	ggaaaccgct	60
ttccgtaaag	cggttgaaag	ctctcagatt	ccgggtgctg	ttttgatggc	gcgtgattgt	120
agcggctgtc	tgaactacac	tcgctgtttc	ggcgcacgca	ctgtgcgctg	cgacgagtgc	180
aatcaattac	caccgctgca	ggtggataca	ccatgtcgtc	tggaagcgc	tactaaatta	240
gtgaccaoga	ttatggcact	gcagtgcata	gaacgcggcc	tggtacgctt	ggatgaaact	300
gttgacogcc	tgctgccgga	cctgtgcgog	atgccggtgc	tggaaggctt	tgatgatgcc	360
ggcaaccogc	gtctgccgga	acgccgtggt	aaaattacgt	tacgccatct	gctgacacac	420
accagcggtc	tgtcgtaagt	cttctgcat	ccgctgctgc	gcgagtatgt	tgcccagggt	480
catttgcagg	gcgctgagaa	gtttggcatt	cagaatcggt	ttgcgccgcc	attagttaat	540
gatccaggcg	cggaatggat	ttatggcgct	ggcatcgact	ggcaggcaa	attagtggaa	600
cgcgcaacgg	gcttggacct	ggaacagtac	ttgcaggaga	acatttgogc	gccgctgggc	660
atcactgata	tgacgttcaa	actgcagcag	cgcccggata	tgctggcacg	tcgtgccgac	720
atgaccacc	gcaactccag	cgatggtaaa	ctgcgctatg	atgacacggt	gtattttcgc	780
catgacggtg	aagagtgttt	cggggggccag	ggcgtgttca	gcagtccagg	cagttacatg	840
aaggttctgc	actctctgct	gaaacgtgac	ggcctgttgc	tcagaccagg	gaccgtggat	900
ctgatgttcc	agccggcgct	ggaaccgcgt	ttggaagaac	aaatgaacca	gcatatggac	960
gcgtcgccgc	acatcaacta	tggcgggtcca	atgcctatgg	tcatgcgctg	cagcttcggc	1020
ctgggtggta	tcattgcaact	ggaggatctg	gatggtgaga	actggcgtcg	taaaggctcg	1080
atgacgtttg	gtggcggtcc	aaacattatt	tggcagattg	accgaaaagc	gggtctgtgt	1140
actttagtct	ttttccagct	ggaaccgtgg	agtgaaccgg	tgtgtcgtga	cctgactcgc	1200
acctttgaga	aagcgatcta	tgcacagtat	caacagggct	aa		1242

ES 2 524 725 T3

<210> 20  
 <211> 413  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Variante de LovD

10

<400> 20

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Gly Ser Asn Ile Asp Ala Ala Val Ala Ala Asp Pro Val Val Leu
1      5      10      15
Met Glu Thr Ala Phe Arg Lys Ala Val Glu Ser Ser Gln Ile Pro Gly
20      25      30
Ala Val Leu Met Ala Arg Asp Cys Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Thr Arg
35      40      45
Cys Phe Gly Ala Arg Thr Val Arg Arg Asp Glu Cys Asn Gln Leu Pro
50      55      60
Pro Leu Gln Val Asp Thr Pro Cys Arg Leu Ala Ser Ala Thr Lys Leu
65      70      75      80
Leu Thr Thr Ile Met Ala Leu Gln Cys Met Glu Arg Gly Leu Val Arg
85      90      95
Leu Asp Glu Thr Val Asp Arg Leu Leu Pro Asp Leu Cys Ala Met Pro
100      105      110
Val Leu Glu Gly Phe Asp Asp Ala Gly Asn Pro Arg Leu Arg Glu Arg
115      120      125
Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu
130      135      140
Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly
145      150      155      160
His Leu Gln Gly Ala Glu Lys Phe Gly Ile Gln Asn Arg Phe Ala Pro
165      170      175
Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile
180      185      190
Asp Trp Ala Gly Lys Leu Val Glu Arg Ala Thr Gly Leu Asp Leu Glu
195      200      205
Gln Tyr Leu Gln Glu Asn Ile Cys Ala Pro Leu Gly Ile Thr Asp Met
210      215      220
Thr Phe Lys Leu Gln Gln Arg Pro Asp Met Leu Ala Arg Arg Ala Asp
225      230      235      240
Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr
245      250      255
Val Tyr Phe Arg His Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val
260      265      270
Phe Ser Ser Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys
275      280      285
Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gly Thr Val Asp Leu Met Phe Gln
290      295      300
Pro Ala Leu Glu Pro Arg Leu Glu Glu Gln Met Asn Gln His Met Asp
305      310      315      320
Ala Ser Pro His Ile Asn Tyr Gly Gly Pro Met Pro Met Val Met Arg
325      330      335
Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly
340      345      350
Glu Asn Trp Arg Arg Lys Gly Ser Met Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn
355      360      365
Ile Ile Trp Gln Ile Asp Pro Lys Ala Gly Leu Cys Thr Leu Val Phe
370      375      380
Phe Gln Leu Glu Pro Trp Ser Asp Pro Val Cys Arg Asp Leu Thr Arg
385      390      395      400
Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
405      410
    
```

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido LovD variante que tiene al menos dos veces mayor actividad catalítica que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2, en el que el polipéptido LovD variante comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que incluye las dos mutaciones siguientes: L174F y A178L, y opcionalmente de aproximadamente 1 a 30 mutaciones adicionales y opcionalmente de aproximadamente 1 a 20 mutaciones conservadoras adicionales.
- 10 2. Polipéptido LovD variante según la reivindicación 1, que tiene al menos 10 veces mayor actividad catalítica que la aciltransferasa de *A. terreus* de tipo silvestre de la SEQ ID NO: 2.
3. Polipéptido LovD variante según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que incluye una o más de las siguientes características:
- 15 (i) una o más mutaciones que se correlacionan con una mayor actividad catalítica;  
 (ii) una o más mutaciones que se correlacionan con una mayor estabilidad térmica;  
 (iii) una o más mutaciones que se correlacionan con una menor agregación;  
 (iv) una o más mutaciones que se correlacionan con una mayor estabilidad enzimática; y  
 20 (v) una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en I4N, A9V, K26E, R28K, R28S, I35L, C40A, C40V, C40F, S41R, N43Y, C60F, C60Y, C60N, C60H, S109C, S142N, A184T, A184V, N191S, A261T, A261E, A261V, L292R, Q297E, L335M, A377V, A383V, N391D y H404R,  
 y que contiene opcionalmente de aproximadamente 1 a 20 mutaciones conservadoras adicionales.
- 25 4. Polipéptido LovD variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que incluye una o más de las siguientes características:
- (i) al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A123P, M157V, S164G, S172N, N191G, L192I, A247S, R250K, S256T, A261H, G275S, Q297G, L361M, V370I y N391S;  
 30 (ii) al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en Q241 M, A261H, Q295R y Q412R;  
 (iii) al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en N43R, D96R y H404K;  
 (iv) al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en C40R, C60R y D245E; y  
 (v) al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en I4N, A9V, K26E, R28K, R28S, I35L, C40A, C40V, C40F, S41R, N43Y, C60F, C60Y, C60N, C60H, S109C, S142N, A184T, A184V, N191S, A261T, A261E, A261V, L292R, Q297E, L335M, A377V, A383V, N391D y H404R;  
 35 y opcionalmente de aproximadamente 1 a 20 mutaciones conservadoras adicionales.
5. Polipéptido LovD variante según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID NO: 2 que incluye las siguientes mutaciones: A123P, N191 (S o G), A247S y L361M, de cero a aproximadamente 26 mutaciones adicionales seleccionadas del grupo que consiste en Q241M, A261H, Q295R, Q412R, N43R, D96R, H404K, C40R, C60R, D254E, I4N, A9V, K26E, R28K, R28S, I35L, C40A, C40V, C40F, S41R, N43Y, C60F, C60Y, C60N, C60H, S109C, S142N, A184T, A184V, N191S, A261T, A261E, A261V, L292R, Q297E, L335M, A377V, A383V, N391D y H404R, y opcionalmente de aproximadamente 1 a 20 mutaciones conservadoras adicionales.
- 40 6. Polipéptido LovD variante según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la Tabla 1.
7. Polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es opcionalmente un vector de expresión adecuado para expresar el polipéptido LovD variante en una célula hospedadora, y vector de expresión en el que la secuencia codificante utiliza opcionalmente codones optimizados para la expresión en la célula hospedadora.
- 50 8. Célula hospedadora que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido LovD variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 55 9. Método de fabricación de un polipéptido LovD variante que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 8 en condiciones en las que se expresa el polipéptido LovD variante y opcionalmente recuperar el polipéptido LovD variante.
- 60 10. Método de fabricación de simvastatina que comprende poner en contacto un sustrato monacolina J con un polipéptido LovD variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo y en condiciones en las que la monacolina J se convierte en simvastatina.
- 65 11. Método según la reivindicación 10, en el que la monacolina J es una sal de sodio o una sal de amonio.
12. Método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 en el que se añade un agente para hacer precipitar la

simvastatina, y en el que dicho agente es opcionalmente hidróxido de amonio.

5 13. Método de fabricación de simvastatina que comprende poner en contacto un sustrato lovastatina con un polipéptido LovD variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en presencia de un cosustrato tioéster de  $\alpha$ -dimetilbutirilo y en condiciones en las que el sustrato lovastatina se convierte en simvastatina.

10 14. Método según la reivindicación 13, en el que: (a) dicho sustrato lovastatina, dicho polipéptido LovD variante y dicho tioéster se cargan sustancialmente al mismo tiempo en un recipiente; o (b) en el que se cargan primero dicho sustrato lovastatina y dicho polipéptido LovD variante en un recipiente y a continuación se carga dicho tioéster en dicho recipiente.

15 15. Método según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que se añade un agente para hacer precipitar la simvastatina, y en el que dicho agente es opcionalmente hidróxido de amonio.

15

20

25

30

35

40

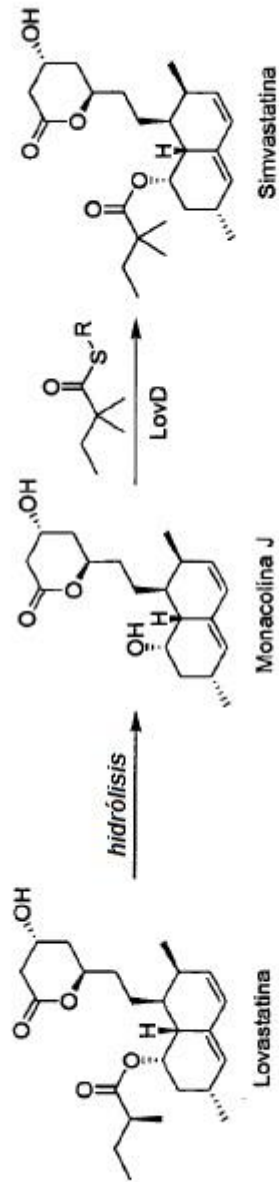
45

50

55

60

65



**FIGURA 1**



Polinucleótido de *Aspergillus terreus* con codones optimizados – SEQ ID NO: 1

ATGGGTTCTATCAATTGATGCGGCTGCGGCCGGGACCCGGTGGTTCTGATGGAACCGGCTTCCGTAAGCGGTTAAAA  
 GCCGCCAGATTCCGGGTGCTGTTATTATGGCGGTGATTTGATGTTGGTAACCTGAACCTACACTCGCTGTTTCGGCGCACG  
 CACTGTGCGTGGCAGGAGTGCAATCAATTACCAACCGTGCAGGTGGATACACCAATGTCGTCTGGCAAGCGCTACTAA  
 ATTA CTGACCACGATTATGGCACTGCAGTGCATGGAACGCGGCTGGTAGACTTGGATGAAACTGTTGACCCGCTGCTG  
 CCGGACCTGAGCGCGGATGCCGGTGTGGAAAGGCTTTTGATGATGCCCGGCAACGCCGCTGCGCGAACGCCGTGGTAAA  
 ATTACGTTACGCCAICTGCTGACACACACACCAGCGGCTCTGTCGTACGCTTCCCTGCA TCCGCTGCTGGCGGAGTATATGG  
 CCCAGGTCATTTGCAGAGCGCTGAGAAGTTTGGCAITTCAGTCTCGTCTGGCGCCGCCAAGCTGTTAATGATCCAGGGCC  
 GGAA TGGATTTATGGCGCTAATCTGGACTGGGCAGGCAAA TTAGTGAACGCGCAACCGGCTTGGACCTGGAACAGTA  
 CTTGCAGGAGAACATTTGCCGCCGCTGGGCATCACTGATATGACGTTCAA AACTGCAGCAGCGTCCCGGATATGCTGGCA  
 CGTCTGCCGACCAAGACCCACCAGTCCCGGATGGTCTGCGCTATGATGACTCTGTGTATTTTCGGCGGGACG  
 GTGAA GAGTGTTCGGGGGCCAGGGCGTGTTCAGCGGTCCAGGCAGTTACATGAAAGGTTCTGCACTCTCTGCTGAAAACG  
 TGACGGCCTGTTGCTGCAGCCACAACCCGTGGATCTGATGTTCCAGCCGGGCTGGAAACCGGCTTGGAAAGAACAAAT  
 GAACCA GCATATGGACGCTGCCCGCACATCAACTATGGCGGTCCAATGCCATGCTCCTGCCGCTGCGAGCTTCGGCCTG  
 GGTGGTATCATTGCACCTGGAGGATCTGGATGGTGAGAACTGGCGTCCGTA AAGGCTCGCTGACGTTTGGTGGCGGTCCA  
 AACAT TGTGTTGGCAGATTGACCCGAAAGCGGGTCTGTGTACTTTAGCCTTTTTCCAGCTGGAAACCGTGGAAACGCCGG  
 TGTGTCGTGACCTGACTCGCAACCTTTGAGCACCGGATCTATGCACAGTATCAACAGGGCTAA

**FIGURA 2**

Polipéptido de *Aspergillus terreus* – SEQ ID NO: 2

MGSIIDAAAADPVVLMETAFRKAVKSRQIPGAVIMARDCSGNLNYTRCFGARTVRRDEC  
NQLPPLQVDTPCRLASATKLLTTIMALQCMERGLVDLDETVDRLLPDL.SAMPVLEGFDDA  
GNARLRERRGKITLRHLLTHTSGLSYVFLHPLLREYMAQGHLSAEKFGIQRSLAPPVYN  
DPGAEWYGANLDWAGKLVERATGLDLEQYLQENICAPLGITDMTFKLQQRPDMLARRAD  
QTHRNSADGRLRYDSDSVYFRADGEECFGGQGVFSGPGSYMKVLHSLKRDGLLLPQPTVD  
LMFQPALEPRLEEQMNQHMDASPHINYGGPMPMVLRRSFGLGGIALEDLDGENWRRKGS  
LTFGGPNIVWQIDPKAGLCTLAFFQLEPWNDPVCRDLTRTFEHAIIYAQYQQG

**FIGURA 3**