

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 804**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2010 PCT/US2010/050253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO2011041233**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10821066 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2483293**

54 Título: **Acilación mejorada mediada por LovD aciltransferasa**

30 Prioridad:

30.09.2009 US 247274 P
30.09.2009 US 247253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COLLIER, STEVEN, JAMES;
TEO, EE, LING;
SUKUMARAN, JOLY;
WILSON, ROBERT, JOHN y
XU, JUNYE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 614 804 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).

Acilación mejorada mediada por LovD aciltransferasa**DESCRIPCIÓN****5 3. Antecedentes**

La invención se refiere a un proceso para formar simvastatina o precursores de simvastatina usando acilaciones mediadas por la LovD aciltransferasa mejoradas.

10 Las enzimas son biomoléculas que catalizan la conversión de un sustrato químico en un producto y se han usado en la síntesis química de valiosos productos naturales y sustancias farmacéuticas. De forma ventajosa, las enzimas pueden funcionar aumentando la velocidad de conversión química de un sustrato en un producto (reduciendo la energía de activación para la reacción) y dirigiendo la colocación de grupos funcionales, es decir, colocando regioselectivamente y/o estereoselectivamente grupos funcionales sobre un sustrato. La actividad enzimática puede verse afectada por otras moléculas conocidas como inhibidores. Estos inhibidores funcionan disminuyendo la actividad enzimática y pueden limitar considerablemente la conversión o la velocidad de conversión de un sustrato de partida en producto.

20 Un grupo particular de enzimas útiles incluye las transferasas. Las transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional, por ejemplo, grupos alquilo, acilo o fosfato, desde un sustrato (denominado donante y, a veces, conocido como coenzima) a otro sustrato (denominado aceptor). De este modo, la enzima cataliza una reacción entre compuestos químicos que da como resultado la pérdida de funcionalidad del donante y una ganancia de funcionalidad en el aceptor. La subclase de aciltransferasas se ha utilizado, entre otras cosas, para acilar regioselectivamente sustratos químicos, tales como monacolina J, para formar simvastatina.

25 La simvastatina es un derivado semisintético del producto natural lovastatina, que puede aislarse del caldo de fermentación de *Aspergillus terreus*. Tanto lovastatina como simvastatina son fármacos reductores del colesterol que reducen sustancialmente el riesgo de enfermedad cardíaca en adultos. El clúster génico para la biosíntesis de lovastatina en *A. terreus* se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.391.583. El clúster génico codifica una proteína de 46 kDa conocida como LovD, que funciona como una aciltransferasa.

30 Una vez producida la lovastatina mediante fermentación en un huésped de *A. terreus*, se puede producir simvastatina a partir de lovastatina por vía semisintética. Después del aislamiento y la purificación de lovastatina a partir del caldo de fermentación, puede producirse una semisíntesis típica mediante hidrólisis de la rama lateral de 2-metilbutirato en presencia de base, para producir la monacolina J intermedia J. La monacolina J es el precursor inmediato de la simvastatina. Después de la hidrólisis, el ácido libre sufre lactonización, se protege el hidroxilo libre en C13 y se acila el alcohol C8 para proporcionar un análogo protegido de la simvastatina. La posterior desprotección da simvastatina. Véase, por ejemplo, el documento WO 2007/139871.

40 Las transformaciones enzimáticas utilizando lipasas y esterases también se han investigado como alternativas a la derivación química. Véanse, por ejemplo, los documentos PCT WO 2005/040107, PCT WO 94/26920 y T. G. Schimmel, et. al. en Appl. Environ. Microbiol. (1997) 63:1307-1311. Las variantes enzimáticas sufren una disminución del rendimiento del sustrato, necesidades de carga altas, velocidad de conversión enzimática lenta o baja rotación enzimática. Por lo tanto, un método enzimático de producción de simvastatina, tal como por acilación selectiva del hidroxilo en C8 de la monacolina J, que proporcione un rendimiento bueno o alto con pocas etapas de aislamiento, buena rotación de enzimas y velocidad conversión y /o necesidades de carga razonables, es importante para una síntesis eficiente de simvastatina y análogos de estatinas adicionales.

50 Por consiguiente, durante mucho tiempo ha existido la necesidad de un proceso enzimático que supere una o más limitaciones de la técnica anterior, proporcionando de este modo un método para la acilación eficiente y conveniente de sustratos químicos, tales como lovastatina o monacolina J, usando aciltransferasas.

En el documento US 2009/0191602 A1 se divulga un método para producir simvastatina. En el documento US 5.917.058 se divulga un proceso mejorado de lactonización en la preparación de estatinas. El documento US 2003/0208046 se refiere a métodos y composiciones para extender la técnica de la ligación química nativa de una gama más amplia de péptidos, polipéptidos, otros polímeros y otras moléculas a través de un enlace amida. En el documento US 5.458.848 se divulga un método para desodorizar una formulación líquida con el fin de eliminar un compuesto maloliente presente en una formulación líquida.

60 3. Sumario de la invención

La invención proporciona un método para fabricar un compuesto de estatina, que comprende poner en contacto un sustrato de LovD aciltransferasa con una LovD aciltransferasa en presencia de un donante de tioéster y un agente de precipitación, en condiciones que producen un compuesto de estatina, en el que el producto de reacción precipita cuando el agente de precipitación está presente.

La invención también proporciona un método para fabricar sal de amonio de hidroxiácido de simvastatina que comprende poner en contacto monacolina J o lovastatina con una LovD aciltransferasa en presencia de un donante de tioéster de alfa-dimetilbutirilo e hidróxido de amonio en condiciones que producen sal de amonio de hidroxiácido de simvastatina, en el que el producto de reacción precipita.

5

4. Sumario

Sorprendentemente se ha descubierto que la acilación mediada por LovD aciltransferasa de precursores de simvastatina es un proceso en equilibrio y que este proceso en equilibrio puede ajustarse de una o más maneras para dar lugar a una conversión y/o velocidad de conversión del sustrato en producto más altas.

10

También se ha descubierto, sorprendentemente, que la simvastatina puede precipitarse como una sal insoluble en la acilación de un precursor de simvastatina durante una reacción de acilación mediada por LovD aciltransferasa y que esto da como resultado un desplazamiento del equilibrio, proporcionando con ello una mayor conversión y/o velocidad de conversión del sustrato en producto.

15

Sorprendentemente se ha descubierto que la LovD aciltransferasa puede ser inhibida por los subproductos de tiol producidos durante la acilación de la sal de hidroxiácido de monacolina J. Más particularmente, se ha descubierto que, mientras que la LovD aciltransferasa puede mediar en la acilación de sal de hidroxiácido de monacolina J en el correspondiente ácido de simvastatina con un rendimiento alto, la velocidad de reacción de la conversión puede mejorarse evitando la inhibición de la enzima LovD por el subproducto de tiol. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere, en una o más realizaciones, a un método de prevención de la inhibición de la enzima LovD aciltransferasa mediante la adición de secuestrantes de tiol. Véase la figura 1.

20

De forma ventajosa, se ha descubierto que la adición de secuestrantes de tiol, tal como carbón activado, mejora la velocidad de conversión del sustrato monacolina J en su análogo acilado cuando se usan como cosustratos compuestos de tioéster que comprenden restos de acilo. Los métodos descritos en el presente documento superan una o más limitaciones de la técnica anterior y satisfacen la necesidad desde hace tiempo de una síntesis eficiente y conveniente de simvastatina y de precursores de simvastatina usando enzimas LovD aciltransferasas.

25

30

La presente divulgación, en una o más realizaciones, también proporciona un método de producción de simvastatina que supera la recién descubierta inhibición de la LovD aciltransferasa por subproductos de tiol y que desplaza el equilibrio hacia el producto de reacción. Adicionalmente, se ha descubierto que la adición de un secuestrante de tiol, tal como carbón activado, impide o reduce la inhibición de la enzima. Esto da como resultado una conversión enzimática mejorada del sustrato en un compuesto diana y, por lo tanto, proporciona un método ventajoso para la producción de simvastatina. En realizaciones particulares, se describen métodos y materiales diseñados para aprovechar el proceso de conversión enzimática mejorado. Más particularmente, la presente divulgación, en una o más realizaciones, se refiere a un método para la producción de un sustrato químico acilado enzimáticamente (simvastatina o precursor de simvastatina), en el que se utiliza un secuestrante de tiol para evitar la inhibición de la enzima aciltransferasa. Véase la figura 1 (que ilustra una reacción de LovD aciltransferasa de ejemplo y generalizada, en la que el subproducto de tiol se secuestra).

35

40

En una o más realizaciones, el método comprende las etapas de combinar una enzima LovD aciltransferasa en un medio de reacción con (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación, un sustrato que comprende un resto hidroxilo libre y un tioéster que comprende un resto acilo. La aciltransferasa media la donación de un resto acilo desde el tioéster al resto hidroxilo libre, produciendo de este modo el compuesto diana. Aunque no se pretende estar limitado por teoría de funcionamiento alguna, en realizaciones en las que se utiliza un secuestrante de tiol, se cree que el secuestrante de tiol secuestra (une o, de otro modo, inactiva) el subproducto de tiol resultante. El subproducto de tiol puede actuar como un inhibidor enzimático de LovD, reduciendo de este modo la actividad enzimática y la conversión del sustrato en producto. La inhibición enzimática puede ser el resultado de la unión competitiva del inhibidor a la enzima. Asimismo, de nuevo, aunque no se pretende estar limitado por teoría de funcionamiento alguna, en realizaciones en las que se utiliza un agente de precipitación, se cree que la eliminación del producto del medio de reacción mediante precipitación da como resultado un desplazamiento favorable del equilibrio de la reacción. La eliminación del subproducto de tiol puede proporcionar también un desplazamiento favorable del equilibrio.

45

50

55

Las realizaciones descritas en el presente documento incluyen también métodos para generar simvastatina con un mínimo de etapas químicas usando una reacción de LovD aciltransferasa mejorada. De forma ventajosa, la reacción de aciltransferasa mejorada puede combinarse, opcionalmente, con etapas químicas adicionales, tales como en métodos de síntesis química "en un solo recipiente", para proporcionar un método para producir simvastatina a partir de lovastatina sin aislamiento y purificación del intermedio monacolina J. Por ejemplo, la lovastatina puede hidrolizarse en monacolina J y utilizar el producto de reacción bruto como sustrato para la reacción de acilación mediada por la enzima. La presente divulgación también proporciona métodos y materiales diseñados para aprovechar el proceso enzimático de LovD mejorado, tal como aquel mediante el cual se fabrica la lovastatina, con el fin de producir compuestos relacionados, tales como el derivado de pravastatina, huvastatina.

60

65

Los expertos en la técnica entenderán que la divulgación proporcionada en el presente documento permite a los expertos producir una amplia variedad de realizaciones. En una realización de ejemplo, la simvastatina se produce combinando monacolina J o un derivado de monacolina J (preferentemente, ácido de monacolina J), un tioéster que dona un resto acilo al grupo hidroxilo C8 de monacolina J (o derivado) en presencia de una LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol (que comprende, por ejemplo, carbón activado) y/o (ii) un agente de precipitación (tal como hidróxido de amonio (NH₄OH)), y una LovD aciltransferasa. La LovD aciltransferasa funciona participando en la transferencia de un grupo acilo del tioéster para acilar regioselectivamente el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J (o derivado), produciendo de este modo simvastatina. El subproducto de tiol resultante es secuestrado (unido o desactivado por el secuestrante de tiol) cuando hay presente un secuestrante de tiol. El producto de reacción precipita cuando hay presente un agente de precipitación. De forma ventajosa, la velocidad de reacción mejora notable o marcadamente.

Una realización relacionada proporciona un método para fabricar simvastatina, que comprende las etapas de combinar lovastatina, un tioéster que dona un resto acilo al grupo hidroxilo C8 de monacolina J en presencia de una LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol (que comprende, por ejemplo, carbón activado) y/o (ii) un agente de precipitación (tal como hidróxido amónico (NH₄OH)) y una LovD aciltransferasa. En esta realización del método, se permite que la LovD aciltransferasa hidrolice la lovastatina en monacolina J antes de la transferencia de un grupo acilo desde el tioéster a través de una acilación regioselectiva del grupo hidroxilo C8 de la monacolina J usando la aciltransferasa, proporcionando de este modo simvastatina. El subproducto tiol resultante es secuestrado (unido o desactivado por el secuestrante de tiol) cuando hay presente un secuestrante de tiol. El producto de reacción precipita cuando hay presente un agente de precipitación. De forma ventajosa, la velocidad de reacción mejora y se logran conversiones elevadas.

Los métodos y materiales descritos en el presente documento que se usan para fabricar simvastatina pueden adaptarse para producir otros compuestos, incluyendo aquellos que son estructuralmente similares a la simvastatina, por ejemplo huvastatina. En este contexto, se proporciona un método para fabricar huvastatina, que comprende las etapas de combinar tetraol de pravastatina, un tioéster que dona un resto acilo al grupo hidroxilo C8 de tetraol de pravastatina hidrolizada en presencia de una LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol (que comprende, por ejemplo, carbón activado) y/o (ii) un agente de precipitación (tal como hidróxido amónico NH₄OH) y una LovD aciltransferasa. Se permite que la LovD aciltransferasa utilice un grupo acilo del tioéster para acilar regioselectivamente el grupo hidroxilo C8 del tetraol de pravastatina hidrolizado, de manera que se fabrica huvastatina. Se cree que el secuestrante de tiol (cuando está presente) actúa de nuevo secuestrando el subproducto tiol, impidiendo así la inhibición de la enzima LovD, lo que da como resultado una velocidad de la reacción enzimática mejorada y un desplazamiento del equilibrio hacia el producto de la reacción. Se cree que el agente de precipitación (cuando está presente) desplaza el equilibrio hacia el producto de la reacción eliminando el producto de la reacción de la solución. En aún otra realización, la huvastatina puede fabricarse directamente a partir de pravastatina. La pravastatina se combina con la LovD aciltransferasa para hidrolizar pravastatina en el tetraol de pravastatina hidrolizado intermedio. La acilación por la LovD aciltransferasa puede proceder después de la adición de (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un tioéster que comprende un resto acilo.

En realizaciones típicas de los diversos métodos descritos en el presente documento, el donante del grupo funcional es un donante de acilo. Los tioésteres son un grupo altamente preferido de compuestos donantes que pueden donar un resto acilo a un sustrato químico en presencia de una LovD aciltransferasa y un compuesto o compuestos secuestrantes. Por ejemplo, el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J puede ser acilado por un tioéster en presencia de una LovD aciltransferasa. En el presente documento se divulgan diversos de tales tioésteres. Véase, por ejemplo, la figura 4 (que ilustra algunos compuestos de tioéster preferidos). Además de los tioésteres preferidos de la figura 4, otros tioésteres preferidos incluyen tioésteres de butirilo, tioésteres de N-acetilcisteamina o tioésteres de metiltioglicolato. Los compuestos de tioéster derivados biológicamente, tales como acetil coenzima A (acetil CoA), se pueden usar en una o más realizaciones. La acetil CoA comprende un tioéster entre la coenzima A (un tiol) y el ácido acético (un transportador del grupo acilo). Por consiguiente, entre otros compuestos que comprenden donantes de acilo se incluyen acil-CoA, butiril-CoA, benzoil-CoA, acetoacetil-CoA, β-hidroxiobutiril-CoA, malonil-CoA y palmitoil-CoA. El grupo tioéster puede comprender uno o más grupos funcionales, tales como, por ejemplo, una cadena enlazadora de alquilo, un grupo o grupos alquilo, grupo o grupos arilo, ésteres, amidas, sulfonatos, fosfatos, etc. Preferentemente, el tioéster comprende una cadena de alquilo corta terminada en un éster o amida, o el tioéster puede comprender solamente una cadena de alquilo. Otros donantes de grupos funcionales con la capacidad de donar un grupo acilo también se contemplan como donantes adecuados. Otros grupos donantes de acilo que forman subproductos de tiol después de la acilación mediada por LovD del sustrato diana se beneficiarían de los métodos de una o más realizaciones de la presente divulgación, en particular, la adición de secuestrantes que secuestran uno o más restos de tiol, y/o la adición de agentes de precipitación.

Opcionalmente, el tioéster comprende uno o más restos de grupos acilo de cadena corta (C₁-C₂), media (C₃-C₆) o larga (> C₇), que pueden estar ramificados, no ramificados o cíclicos. Se contempla que, en algunos casos, los restos de grupo acilo pueden estar funcionalizados. Algunos tioésteres representativos son mercaptopropionato de α-dimetilbutiril-S-metilo (también conocido como 3-(2,2-dimetilbutanoil)propanoato de metilo, DMB-S-MMP), mercaptopropionato de dimetilbutiril-S-etilo (DMB-S-EMP) tioglicolato de dimetilbutiril-S-metilo (DMB-S-MTG) y mercaptobutirato de dimetilbutiril-S-metio (DMB-S-MMB). En una realización ilustrativa y preferida, el tioéster es 2,2-

dimetilbutanoato de S-2-acetamidoetilo, 2,2-dimetilbutanoato de S-acetamidometilo, 2-(2,2-dimetilbutanoil)acetato de metilo y/o 3-(2,2-dimetilbutanoil)propanoato de metilo. Los tioésteres se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica. En un proceso de ejemplo, el tioéster altamente preferido DMB-S-MMP puede prepararse mediante la acilación de 3-mercaptopropanoato de metilo con cloruro de 2,2-dimetilbutanoilo en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Pueden prepararse otros tioésteres de acilo utilizando otros cloruros (o haluros) de acilo y bases inorgánicas u orgánicas en la acilación de 3-mercaptopropanoato de metilo.

Las enzimas aciltransferasa útiles en los métodos descritos en el presente documento son LovD aciltransferasas. La LovD aciltransferasa puede ser una enzima LovD de tipo salvaje obtenible de *A. terreus*, o un mutante de la misma, tal como, por ejemplo, los mutantes descritos en Biotechnol Bioeng, 2009 Jan 1; 102(1):20-8. En la solicitud n.º 61/247.253, titulada "variantes de LovD y sus usos", presentada el 30 de septiembre de 2009 y la solicitud n.º _____ del mismo nombre presentada junto con la misma con número de expediente 376247-043US (105191) {CX2-022} se describen ejemplos específicos de LovD aciltransferasas que catalizan los métodos descritos en el presente documento con velocidades de reacción y rendimiento mucho mayores en comparación con la LovD LovD aciltransferasa de tipo salvaje de *A. terreus* que pueden usarse de forma ventajosa en los métodos descritos en el presente documento. LovD aciltransferasas adecuadas también se describen más adelante, en la Sección 6 (véase, por ejemplo, la tabla 2).

Los métodos divulgados en el presente documento utilizan uno o más compuestos o agentes secuestrantes. Los compuestos secuestrantes adaptados para secuestrar compuestos de tiol incluyen, por ejemplo, carbón activado, anhídrido isatoico, 2,4-dicloro-1,3,5-triazinas fluoradas (F-DCT), éteres de vinilo, dihidropirano, N-etilmaleimida, p-(cloromercurio)benzoato, iones de cobre, y variantes de los mismos. Los secuestrantes de tiol pueden adaptarse mediante incorporación sobre un soporte sólido y pueden usarse solos o en combinación con otros secuestrantes, incluidos los secuestrantes no tioles, por ejemplo secuestrantes que actúan uniendo o desactivando otros grupos funcionales que inhiben la actividad enzimática. En una realización preferida, se utiliza carbón activado.

Los métodos descritos en el presente documento también pueden utilizar, además de o excluyendo, uno o más compuestos o agentes secuestrantes, uno o más agentes de precipitación. Los agentes de precipitación preferidos son compuestos que funcionan donando un contraión al sustrato acilado que hace que el compuesto sea insoluble en el medio de reacción. Por ejemplo, el hidróxido de amonio funciona donando un contraión de amonio (NH_4^+).

En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, los métodos dan como resultado una actividad mejorada de la enzima LovD. La actividad enzimática mejorada corresponde a una estabilidad enzimática mejorada, una velocidad enzimática mejorada, es decir, la velocidad a la que se modifica el sustrato, por ejemplo, se acila, y/o necesidades de carga enzimática mejoradas, por ejemplo, la cantidad de enzima requerida para lograr una conversión dada en un marco de tiempo dado. En una realización de ejemplo y preferida, se mejora la velocidad de la enzima. Por ejemplo, se puede mejorar la velocidad a la que se efectúa la acilación del hidroxiácido de monacolina J, la sal de sodio en el correspondiente hidroxiácido de simvastatina, es decir, la conversión completa en equilibrio, lo que significa el tiempo en que no se acila más sustrato es menor, como se ilustra en los ejemplos expuestos más adelante.

Determinadas realizaciones de los métodos para fabricar simvastatina y compuestos relacionados usando la reacción de LovD aciltransferasa mejorada pueden incluir etapas adicionales para purificar estos compuestos. Por ejemplo, las realizaciones de la divulgación pueden incluir al menos una etapa de purificación que comprende la lisis de células de un organismo aislado presente en la combinación. Las realizaciones también pueden incluir al menos una etapa de purificación que comprende la centrifugación de células o lisados celulares de un organismo aislado presente en la combinación. Además, las realizaciones pueden incluir al menos una etapa de purificación que comprende la precipitación de uno o más compuestos presentes en la combinación. Una realización de una etapa de precipitación comprende la precipitación de una forma de ácido libre de simvastatina. Opcionalmente, en tales realizaciones, se puede convertir esta forma de ácido libre de simvastatina en una sal de simvastatina. Las realizaciones de la divulgación también pueden incluir al menos una etapa de purificación que comprende la filtración o cromatografía de uno o más compuestos presentes en la combinación. Además, las realizaciones pueden incluir al menos una etapa de análisis que comprende espectrometría, tal como RMN de protones o de carbono o cromatografía, tal como cromatografía ultrarrápida, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y/o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

A continuación se tratan realizaciones adicionales.

5. Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un esquema generalizado de la acilación mediada por LovD aciltransferasa de un grupo hidroxilo por un compuesto donante y el posterior "secuestro" del subproducto de tiol; la figura 2 ilustra la hidrólisis de lovastatina (100), que puede hidrolizarse química o enzimáticamente para producir (a) lovastatina hidrolizada por LovD (110), (b) hidroxiácido de monacolina J (120) o (c) sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J (140);

la figura 3 ilustra varias acilaciones mediadas por aciltransferasa del hidroxiácido de monacolina J y sus sales; la figura 4 ilustra algunos tioésteres representativos que comprenden un grupo acilo; la figura 5 ilustra lovastatina (100) y simvastatina (160) con numeración y etiquetas químicas; y la figura 6 ilustra la síntesis de simvastatina (160) a partir de lovastatina (100) a través de una lovastatina hidrolizada por LovD (110).

6. Descripción detallada

La acilación mediada por LovD aciltransferasa de precursores de estatinas, tales como monacolina J o sus análogos y derivados, es un proceso en equilibrio. Esto significa que los productos de reacción pueden inhibir la formación adicional del producto. El proceso de equilibrio puede desplazarse hacia el producto de reacción ya sea mediante (i) el incremento de la carga del tioéster; (ii) la eliminación/secuestro el subproducto de tiol; o (iii) la precipitación del producto. Los procesos de la presente divulgación utilizan una o más técnicas de desplazamiento en equilibrio para mejorar el porcentaje de conversión del sustrato en producto y/o la velocidad de reacción. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa el incremento de la carga de tioéster para mejorar el rendimiento/velocidad de la reacción. En otras realizaciones, se secuestra el subproducto de tiol para mejorar el rendimiento/velocidad de la reacción. En aún otras realizaciones, el producto se precipita durante la reacción, mejorando así el rendimiento/velocidad de la reacción. Se pueden usar técnicas de desplazamiento del equilibrio combinadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usan un cosustrato de tioéster adicional y precipitación del producto (con o sin la dición de un secuestrante de tiol).

La presente divulgación, en una o más realizaciones, proporciona un nuevo proceso para la acilación mejorada de sustratos químicos usando LovD aciltransferasa. Las realizaciones preferidas incluyen un método para mejorar la actividad aciltransferasa de LovD o sus variantes mediante la adición de compuesto o compuestos secuestrantes. Otra realización preferida comprende el uso de un agente de precipitación. Todavía realizaciones preferidas adicionales incluyen un método de producción de un sustrato químico acilado usando LovD aciltransferasa, un tioéster que comprende un resto acilo y (i) un compuesto o compuestos secuestrantes y/o (ii) un agente de precipitación. Ejemplos de una o más realizaciones preferidas es un proceso mejorado para la acilación y, por lo tanto, la producción de simvastatina a partir de lovastatina o monacolina J (o sus sales hidroxiácidas) usando la LovD aciltransferasa, un tioéster que comprende un resto acilo, y (i) compuesto o compuestos secuestrantes y/o (ii) un agente de precipitación.

Un compuesto secuestrante de ejemplo y preferido es carbón activado. Sin estar ligado por teoría de funcionamiento alguna, se plantea la hipótesis de que el carbón activado atrapa la enzima LovD que inhibe los subproductos de tiol y/o convierte ("desactiva") los subproductos de tiol en disulfuros que no interfieren en la actividad enzimática. También se prefieren otros secuestrantes de tiol que no interfieran en la actividad enzimática y que se unan o desactiven los subproductos de tiol.

6.1 Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, se pretende que los siguientes términos tengan los siguientes significados:

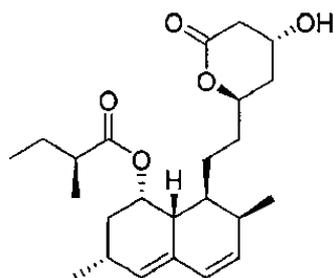
"Lovastatina" (Mevacor®) es un policétido fúngico producido por *Aspergillus terreus*. Véase, por ejemplo, A. W. Alberts, J. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 3957-3961 y A. Endo, J. Antibiot. 1980, 33, 334-336; y J. K. Chan, et. al., J. Am. Chem. Soc. 1983, 105, 3334-3336; Y. Yoshizawa, et. al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 2693-2694. Es un compuesto farmacéuticamente importante debido a sus potentes actividades inhibitorias hacia la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMGR), la etapa limitante de la velocidad de la biosíntesis del colesterol y, por lo tanto, es ampliamente utilizado en el tratamiento de la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia y similares. Véase la figura 5 para la numeración y etiquetado químico de lovastatina (100).

La "simvastatina" es un análogo de la lovastatina. Se favorece sobre la lovastatina debido a la ausencia de efectos secundarios adversos y su alta capacidad de absorción en el estómago. Asimismo, se ha notificado que la simvastatina previene y reduce el riesgo de la enfermedad de Alzheimer (EA) al retrasar la producción de Ab42, una proteína β -amiloide asociada con la EA. En la técnica se sabe que la simvastatina puede prepararse por vía sintética. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.444.784, 4.582.915, 5.393.893, 5.763.646 y 5.763.653, la patente EP n.º 299.656 y la publicación de patente internacional n.º WO 99/45003. Véase, la figura 5 para la numeración y el etiquetado químico de la simvastatina (160).

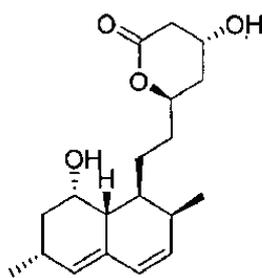
"Derivados de la lovastatina", como se usan en el presente documento, comprenden derivados o precursores de la lovastatina, por ejemplo: pravastatina, huvastatina y simvastatina.

"Variantes de monacolina J" hace referencia a variantes de monacolina J divulgadas en la técnica, por ejemplo, el tetraol de pravastatina hidrolizada o 6-hidroxi-6-desmetilmonacolina J y similares. En ciertas realizaciones de la divulgación, "variantes de monacolina J" hace referencia a compuestos de monacolina J que tienen sustituciones en la posición C6 o en la forma de hidroxiácido de monacolina J (y sales de los mismos).

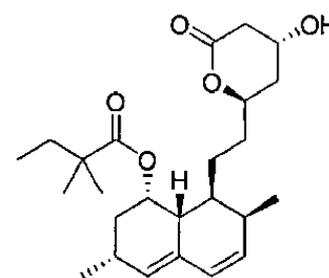
Los expertos en la técnica apreciarán que lovastatina, monacolina J y simvastatina, así como sus análogos y derivados, pueden existir en diversas formas, incluyendo formas de ácido, éster, amida y lactona. Las formas de ácido, éster, amida y lactona también pueden estar en forma de sales. A continuación se ilustran las formas de ácido (R = -OH), éster (R = -O(alquilo)), amida (R = -N(alquilol)₂) y lactona de estos compuestos. 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 se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento.



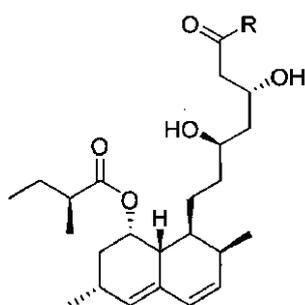
Lovastatina lactona



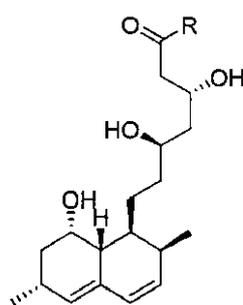
Monacolina J lactona



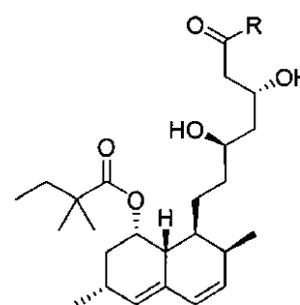
Simvastatina lactona



Ácido, amida o éster de lovastatina



Ácido, amida o éster de monacolina J



Ácido, amida o éster de simvastatina

Las sales de estos compuestos (por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica) pueden producirse tanto en forma de ácido libre como de las sales de sodio, potasio, amonio u otras sales derivadas de metales del grupo I o del grupo II, incluyendo elementos alcalino-térreos u otras sales metálicas. También pueden utilizarse sales orgánicas, incluidas, por ejemplo, sales de amonio y trietanolamina. Tales sales se pueden encontrar en combinación; por ejemplo, una sal de simvastatina podría ser una combinación de sales de sodio y potasio con simvastatina.

"*Aspergillus terreus*" o "*A. terreus*" es un ascomiceto filamentosos que habitualmente se encuentra en el suelo. En la técnica se conocen diversas cepas de *A. terreus*, por ejemplo, las depositadas como ATCC 20542 y ATCC 20541.

"LovD aciltransferasa", como se usa en el presente documento, se refiere a los polipéptidos que pueden usar un tioéster para acilar regioespecíficamente el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J o 6-hidroxi-6-desmetilmonacolina J para producir simvastatina o huvastatina, respectivamente. Véase, por ejemplo, Xie et al., 2006, "Biosynthesis of Lovastatin Analogs with a Broadly Specific Acyltransferase," Chem. Biol. 13:1161-1169. Las LovD aciltransferasas incluyen, a modo de ejemplo y sin limitaciones, la LovD aciltransferasa de tipo salvaje obtenible a partir de *A. terreus* (secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 2), así como mutantes, variantes y formas truncadas de la misma, como se describirá con más detalle a continuación).

Como se divulga en el presente documento, un "donante de acilo" o "transportador de acilo" es un compuesto que tiene un grupo acilo que puede transferirse a un sustrato diana, tal como, por ejemplo, simvastatina y/precursor o un compuesto relacionado. Típicamente, un "donante de acilo" o "transportador de acilo" es un tioéster que dona (mediado por una aciltransferasa) un resto acilo a una región específica sobre una molécula diana, tal como, por ejemplo, el grupo hidroxilo C8 de la monacolina J. En la técnica se conocen una amplia variedad de tales agentes que tienen esta actividad. Véase, por ejemplo, el documento WO 2007/139871. Además de los conocidos en la

técnica y que en la presente divulgación se muestra que tienen esta actividad, cualquier potencial donante/transportador de acilo conocido en la técnica (o sintetizado *de novo*) que tenga la capacidad de acilar un sustrato diana a través de una aciltransferasa, tal como C8 de monacolina J (que produce de este modo simvastatina), puede identificarse fácilmente mediante experimentos comparativos con los donantes de acilo divulgados.

Otros ejemplos de donantes de acilo incluyen, pero sin limitaciones, α -dimetilbutiril-SNAC, acil-tioésteres, acil-CoA, butiril-CoA, benzoil-CoA, acetoacetil-CoA, β -hidroxibutiril-CoA, malonil-CoA, palmitoial-CoA, butiril-tioésteres, N-acetilcisteamina tioésteres (SNAC), metil-tioglicolato (SMTG), benzoil-SNAC, benzoil-SMTG o α -S-metilbutiril-SNAC. Estos compuestos se pueden producir de forma natural o sintética y, en algunos casos, pueden atravesar una membrana celular. Se puede añadir una serie de estos compuestos a un medio de reacción que comprende LovD y monacolina J para producir, por ejemplo, simvastatina.

"Acil-SNAC", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a α -dimetilbutiril-SNAC. Como se sabe en la técnica, el acil-SNAC puede atravesar una membrana celular en condiciones *in vivo*. LovD puede usar acil-SNAC como sustrato para iniciar la reacción de monacolina J a simvastatina mediante acilación regioespecífica del grupo hidroxilo C8 de monacolina J. El acil-SNAC puede donar su grupo acilo a LovD.

"Alquilo" significa un grupo alquilo no sustituido o sustituido. Un grupo alquilo puede ser, por ejemplo, cíclico, acíclico, ramificado o lineal.

"Arilo" significa un grupo arilo no sustituido o sustituido y puede comprender heterociclos.

"Un tioéster que comprende un resto acilo" significa un tioéster que tiene un resto acilo que sufre una transferencia mediada a un sustrato cuando se trata en las condiciones adecuadas con una aciltransferasa. Por ejemplo, un compuesto de fórmula general R-C(=O)-SR', en la que R es un alquilo o arilo y R' es variable comprende un grupo acilo como R-C(=O)-.

"Un medio de reacción adecuado" es un sistema disolvente, mono o bifásico, que permite que los componentes de la mezcla de reacción se combinen y produzcan el producto. Ejemplos de medios de reacción incluyen éter, acetato de etilo, hexanos, tetrahidrofurano, metanol, isopropanol, acetona, dimetilformamida, diclorometano, cloroformo, éter metil terc-butílico (MTBE), agua, acetonitrilo y combinaciones de los mismos. Los medios de reacción pueden tamponarse para mantener un pH o intervalo de pH específicos, tal como mediante la adición de ácidos, bases o sales. Por ejemplo, un medio de reacción de ejemplo es una suspensión acuosa tamponada con trietanolamina de reactivos. Otro medio de reacción de ejemplo es acetato de etilo con la adición de metanol. Preferentemente, los medios de reacción se mantienen a temperaturas controladas, en atmósferas inertes, tales como argón o nitrógeno, y con agitación mecánica o magnética.

Un "compuesto secuestrante" es un compuesto que se une, modifica químicamente, a una forma inerte (con relación a la actividad enzimática) o elimina un subproducto formado durante una reacción de acilación mediada por aciltransferasa. El proceso de unión o modificación química de un compuesto en una forma inerte también se denomina secuestro.

"Carbón activado" es una forma de carbono que ha sido procesada para proporcionar una superficie muy grande. Una forma adecuada de carbón activado está representada por Fluka® puriss.p.a. Carbón activado en polvo (n.º CAS 7440-44-0, adsorción de yodo (0,05 de I₂/l) de > 70 ml/g).

"Acilación mediada por LovD aciltransferasa" significa que la acilación de un sustrato está mediada por la LovD aciltransferasa. Sin estar limitado por teoría de operación alguna, se cree que la LovD aciltransferasa es acilada por un compuesto tioéster, aceptando el resto acilo del tioéster y produciendo un subproducto de tiol. Posteriormente, un hidroxilo libre puede aceptar el resto acilo unido a la LovD aciltransferasa, acilándose ella misma y regenerando la LovD aciltransferasa activa. Se ha descubierto que la producción de compuestos de tiol durante la reacción de la aciltransferasa da lugar a una disminución de la actividad de la enzima. En particular, se ha descubierto que los compuestos de tiol inhiben la velocidad de conversión enzimática del sustrato en la diana.

"Agente de precipitación" es un agente químico que induce la precipitación de un compuesto o que convierte un material de partida en un compuesto que se vuelve insoluble después de la posterior reacción. Por precipitación se entiende la deposición de materia insoluble en un medio de reacción, es decir la formación de un sólido en una solución durante una reacción química. Un agente de precipitación actúa convirtiendo un compuesto normalmente soluble en un compuesto que experimenta precipitación en el medio de reacción o que experimenta precipitación en el medio de reacción tras la conversión adicional en una diana. Un agente de precipitación también puede funcionar manteniendo o ajustando el pH de la solución. Por ejemplo, se puede usar hidróxido de amonio como agente de precipitación, en cuanto que el hidroxácido de monacolina J puede convertirse en su sal de amonio antes de la acilación. La acilación en un medio de reacción adecuado da como resultado un producto insoluble. El hidróxido de amonio también funciona ajustando el pH de la solución.

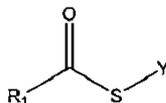
"Insoluble", "sustancialmente insoluble" y "parcialmente Insoluble" hacen referencia a la capacidad de un soluto para formar una solución en un disolvente líquido. La solubilidad se mide, a menos que se indique lo contrario, a temperatura y presión ambientales. Una sustancia es insoluble si para un sistema disolvente dado, es decir, un medio que comprende uno o más disolventes, no es posible la disolución completa a las concentraciones de reacción. Una sustancia es sustancialmente insoluble si no más del 5 % de la sustancia sufre disolución a las concentraciones de reacción en un sistema disolvente dado. Una sustancia es parcialmente insoluble si más del 5 % pero menos del 95 % de la sustancia sufre disolución a las concentraciones de reacción en un sistema dado. Un agente de precipitación alcanza al menos la insolubilidad parcial de un compuesto.

6.2. Descripción detallada

La presente divulgación, en una o más realizaciones, proporciona métodos y materiales diseñados para aprovechar una reacción de LovD aciltransferasa mejorada. Más particularmente, una o más realizaciones proporcionan un método para la producción de un sustrato químico acilado con LovD, en el que se utiliza un secuestrante de tiol para evitar la inhibición de la enzima LovD aciltransferasa. Véase la figura 1. En una realización típica, el método comprende las etapas de combinar la enzima LovD aciltransferasa en un medio de reacción que comprende un secuestrante de tiol, un sustrato que comprende un resto hidroxilo libre y un tioéster. La LovD media la donación de un resto acilo desde el tioéster al resto hidroxilo libre, produciendo de este modo el compuesto diana. El secuestrante de tiol secuestra, o de otra manera inactiva, el subproducto de tiol resultante, que se cree que actúa como un inhibidor enzimático, permitiendo de este modo una conversión enzimática mejorada del sustrato en el producto.

En otras realizaciones, se divulga un método para la producción de un sustrato químico acilado por LovD, en el que se utiliza un agente de precipitación que hace que el producto final sea insoluble en el medio de la reacción. En una realización típica, el método comprende las etapas de combinar la enzima LovD aciltransferasa en un medio de reacción que comprende un agente de precipitación, un sustrato que comprende un resto hidroxilo libre y un tioéster. La LovD media la donación de un resto acilo desde el tioéster al resto hidroxilo libre, produciendo de este modo el compuesto diana. El compuesto diana se vuelve insoluble como resultado del agente de precipitación. La eliminación del compuesto diana mediante precipitación da como resultado un desplazamiento favorable en el equilibrio de la reacción.

La presente divulgación también proporciona, en una o más realizaciones, un método de acilación de un sustrato químico que comprende un compuesto hidroxilo libre usando LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un compuesto de fórmula general (I):



en la que:

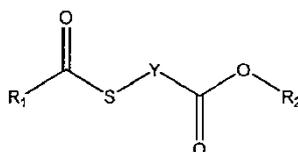
R₁ representa un grupo arilo o alquilo; y

Y es (a) $-(CH_2)_n-NR_2-(CO)-R_3$; o (b) $-(CH_2)_n-(CO)O-R_3$; o (c) $-(CH_2)_n-H$ o un grupo alquilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

en la que n es un número entero de 1-10 y R₂ y R₃ son, independientemente, un grupo alquilo o arilo.

El método comprende combinar el compuesto que contiene hidroxilo libre en un medio de reacción adecuado con la LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un tioéster que comprende un resto acilo. Por ejemplo, el compuesto que contiene hidroxilo libre se puede añadir a un matraz de fondo redondo que comprende un medio de reacción adecuado, tal como una solución acuosa tamponada a pH 6-11 y, a menudo, a pH 7-10, mediante la adición de una base, por ejemplo trietanolamina, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio u otras bases inorgánicas u orgánicas. Bajo agitación, el recipiente de reacción puede cargarse con la enzima LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y, después, el tioéster. La reacción puede monitorizarse para seguir la conversión del sustrato, tal como mediante HPLC, cromatografía en capa fina, u otros métodos adecuados. Según sea apropiado, se puede añadir enzima adicional u otro reactivo (por ejemplo, tioéster) para efectuar una conversión óptima. El procesamiento, tal como mediante inactivación adecuada cuando sea necesario, y la extracción del compuesto diana o la filtración directa del producto, pueden efectuarse cuando se ha conseguido la conversión deseada. También se puede realizar filtración, tal como a través de Celite®, y el secado de extractos orgánicos, tal como mediante la adición de sulfato de sodio o sulfato de magnesio o mediante secado azeotrópico. Los extractos que contienen el producto pueden concentrarse mediante métodos apropiados, tal como a presión reducida.

La presente divulgación también proporciona, en una o más realizaciones, un método de acilación de un sustrato químico que comprende un compuesto hidroxilo libre usando LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un compuesto de fórmula general (II):

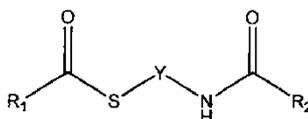


en la que:

R₁ y R₂ representan, independientemente, un grupo arilo o alquilo; y
Y es -(CH₂)_n- o un grupo alquilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

en la que n es un número entero de 1-10.

El método comprende combinar el compuesto que contiene hidroxilo libre en un medio de reacción adecuado con la LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un tioéster que comprende un resto acilo. El sustrato químico puede ser lovastatina, monacolina J (o sus hidroxiaácidos o sales hidroxiaácidas) o análogos de los mismos que comprenden un grupo hidroxilo libre. La presente divulgación también proporciona, en una o más realizaciones, un método de acilación de un sustrato químico que comprende un compuesto hidroxilo libre usando LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un compuesto de fórmula general (III):

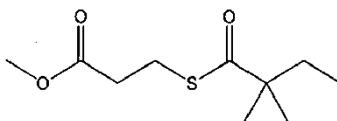


en la que:

R₁ y R₂ representan, independientemente, un grupo arilo o alquilo; y
Y es -(CH₂)_n- o un grupo alquilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

en la que n es un número entero de 1-10.

El método comprende combinar el compuesto que contiene hidroxilo libre en un medio de reacción adecuado con LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un tioéster que comprende un resto acilo. El sustrato químico puede incluir lovastatina, monacolina J (o sus hidroxiaácidos o sales hidroxiaácidas) y análogos de los mismos que comprenden un grupo hidroxilo libre. La presente divulgación también proporciona, en una o más realizaciones, un método de acilación de un sustrato químico que comprende un compuesto hidroxilo libre usando LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol y/o (ii) un agente de precipitación y un compuesto de fórmula (IV):



La presente divulgación comprende, en una o más realizaciones, un método de acilación de lovastatina o monacolina J (o sus hidroxiaácidos o sales hidroxiaácidas) y análogos de los mismos utilizando LovD aciltransferasa, (i) un secuestrante de tiol que comprende carbón activado y/o (ii) un agente de precipitación que comprende hidróxido de amonio y un compuesto de fórmula (IV), que comprende la combinación de los reactivos en un medio de reacción adecuado, permitiendo de este modo que LovD produzca formas aciladas de lovastatina o monacolina J.

Como se muestra en la tabla 1, los tioésteres, como se usan en la presente divulgación, tienen velocidades relativas de reactividad, lo que significa que algunos compuestos de tioéster aumentan la velocidad de reacción. En los métodos de la presente divulgación se pueden usar como tioésteres uno cualquiera o más de los compuestos mostrados en la Tabla 1. El Compuesto IV es un tioéster preferido, ya que su actividad relativa es alta.

5

10

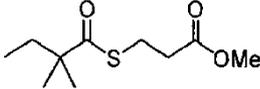
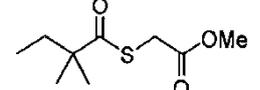
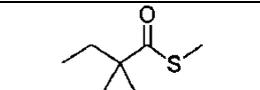
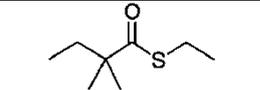
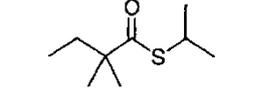
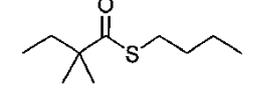
15

20

25

30

35

Tabla 1		
Compuesto	Estructura	Actividad relativa a 24 h (%)
IV		++++
V		++
VI		+
VII		++
VIII		+
IX		+++
+=0-1 ++= 1-10 +++= 10-75 ++++ = 75-100		

40

45

50

55

60

65

La presente divulgación también proporciona, en una o más realizaciones, un método para mejorar la actividad enzimática de LovD. El método comprende la adición de (i) un secuestrante, preferentemente un secuestrante de tiol, y, lo más preferentemente carbón activado y/o (ii) un agente de precipitación, preferentemente un agente que hace que el producto sea sustancialmente insoluble y, más preferentemente, hidróxido de amonio. En una realización de ejemplo, el hidroxiácido de monacolina J, la sal de sodio se acila usando una enzima LovD o variante de LovD usando un tioéster en presencia de carbón activado. En otra realización de ejemplo adicional, se carga un medio de reacción con 75 g/l de hidroxiácido de monacolina J, sal de sodio, 1,5 g/l de enzima (LovD o cantidad equivalente de la variante de LovD), 1,7 equivalentes (con respecto al sustrato) de tioéster, y 10 g/l de carbón activado. La reacción puede llevarse a cabo usando un tampón de trietanolamina 200 mM a pH 9,0 a temperatura ambiente. En el ejemplo de ejemplo, > 98 % del sustrato se convierte en producto acilado en 24 horas. Las concentraciones relativas de los reactivos en el ejemplo de ejemplo son típicas de una realización preferida.

En algunas realizaciones, el carbón activado se añade en cantidad suficiente para secuestrar al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 % y al menos el 90 % del subproducto de tiol y, lo más preferentemente, en cantidad suficiente para secuestrar al menos el 98 % de subproducto de tiol. El carbón activado también se puede añadir en proporción a la cantidad de disolvente; por ejemplo, se pueden añadir 2-20 gramos de carbón activado por litro de disolvente. Preferentemente, se añaden 5-15 gramos de carbón activado por litro de disolvente. Lo más preferentemente, se añaden 10 gramos de carbón activado por litro de disolvente. La adición de carbón activado en una realización se realiza antes de la adición de la enzima y la molécula donante. La clarificación de un sustrato, tal como durante el procesamiento de una reacción, puede implicar, a veces, el uso de carbón activado. Un experto en la técnica apreciará que el uso de carbón activado de esta manera no proporciona una reacción enzimática mejorada porque ya se ha alcanzado la conversión máxima y ya no es posible lograr la ventaja de una velocidad enzimática aumentada.

Los agentes precipitantes pueden producir compuestos con solubilidad reducida, incluyendo sales. Pueden usarse diversas sales, incluyendo sales que contienen iones de metales alcalinos y metales alcalinotérreos, tales como calcio, bario, litio y magnesio. Un ejemplo de agente de precipitación puede incluir, por ejemplo, hidróxido de calcio. También se pueden usar sales de amina, incluyendo las formadas a partir de aminas primarias, secundarias, terciarias, aminas aromáticas, sales de amonio cuaternario y poliaminas de las mismas. También se pueden usar

agentes secuestrantes, incluidas resinas de intercambio iónico y otras especies poliméricas, para efectuar la eliminación del producto de la solución.

5 En otra realización de ejemplo, a un medio de reacción se añaden de 25 a 200 g/l, también de 30 a 150 g/l, y, a menudo, de 50 a 100 g/l (preferentemente, aproximadamente 75 g/l) de sustrato. Además, se añaden de 0,25 a 10 g/l, también de 0,3 a 8 g/l y, a menudo, de 0,5 a 6 g/l (preferentemente 0,75 g/l) de la enzima LovD o variante, y de 1,0 a 5, también de 1,0 a 2,5 y, a menudo, de 1,05 a 1,7 (preferentemente 1,1) equivalentes de tioéster. El pH se controla mediante, por ejemplo, un pH stat, que mantiene el pH del sistema de aproximadamente 8,5 a 9,5 y, preferentemente, 9,0 mediante titulación con hidróxido de amonio. El hidróxido de amonio también funciona como agente de precipitación. En realizaciones preferidas, no se utiliza tampón. Un sistema de disolvente típico puede ser agua. La reacción se realiza, preferentemente, con agitación a temperatura ambiente.

15 En una realización ejemplar, la simvastatina se produce a partir de lovastatina que comprende una primera etapa de hidrólisis. La hidrólisis puede efectuarse para proporcionar monacolina J como el hidroxiácido libre o la sal de sodio del hidroxiácido. Véase la figura 2. La hidrólisis también puede efectuarse de una manera que proporcione monacolina J como una sal de amonio.

20 La monacolina J como el hidroxiácido puede (i) convertirse en una o más sales, tales como sus correspondientes sales de sodio o de amonio; y, después, (ii) acilarse para proporcionar un compuesto precursor de simvastatina. Cuando se forma una sal de sodio u de otro tipo que no sea amónica del compuesto precursor de simvastatina, por ejemplo, el compuesto 150 de la Figura 3, la sal no amónica puede convertirse en una sal de amonio (155). La lactonización de la sal de amonio (155) proporciona simvastatina (160). Como alternativa, cuando se usa una sal de amonio de monacolina J, la sal de amonio de monacolina J puede acilarse directamente al precursor de simvastatina de la sal de amonio (155). Algunas de las diversas rutas a la simvastatina se ilustran en la Figura 3.

25 La aciltransferasa también se puede usar para efectuar una o más etapas de hidrólisis, además de la acilación de la lovastatina. Por ejemplo, la LovD aciltransferasa puede usarse para efectuar la hidrólisis de lovastatina en una LovD lovastatina hidrolizada (monacolina J lactona) y la acilación del hidroxilo libre en C8. Véase la figura 6.

30 En la práctica de los métodos de la divulgación, pueden utilizarse diversas cantidades de sustrato, reactivo y se pueden usar condiciones de reacción para llevar a cabo los métodos de una o más realizaciones. Los parámetros ajustables incluyen la concentración de sustrato en solución, el número de equivalentes del donante de acilo con respecto al sustrato, el tipo de tampón y la concentración, la carga de peso, las condiciones atmosféricas, tales como la presión parcial y el tipo de gas, por ejemplo, aire, nitrógeno, oxígeno, argón, etc., la cantidad de secuestrante de tiol (si está presente), la cantidad de agente de precipitación (si está presente), el pH de la reacción, la temperatura y la velocidad de agitación, la presencia o ausencia de codisolvente, el tiempo de reacción y la manera en que el sustrato se aísla o se prepara para una reacción adicional.

40 En una o más realizaciones, se hace reaccionar la sal de sodio del hidroxiácido de monacolina J a una carga de sustrato entre aproximadamente 1 y 250 g/l, a menudo de 1 g/l a 150 g/l o de 50 g/l a 150 g/l. Preferentemente, la sal de sodio del hidroxiácido de monacolina J se hace reaccionar a una carga de sustrato entre 75 g/l y 150 g/l. Lo más preferentemente, la sal de sodio del hidroxiácido de monacolina J se hace reaccionar usando una carga de sustrato de aproximadamente 75 g/l. Un experto en la técnica apreciará que los valores de carga del sustrato pueden convertirse fácilmente en una molaridad, en la que la molaridad es una medida de la concentración de un soluto en solución. Por ejemplo, una carga de 75 g/l de la sal de sodio de hidróxido de monacolina J (MJ) tiene una molaridad aproximada de 0,21 M (75 g/l de MJ \times (1 mol/360,42 g de MJ)). En otras realizaciones, los sustratos distintos de la sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J pueden acilarse de acuerdo con los métodos de la divulgación. Preferentemente, dichas acilaciones se producirán con una concentración de sustrato que tiene una molaridad dentro de los intervalos dados para la sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J. Por ejemplo, una condición de reacción altamente preferida para la acilación de un sustrato es una molaridad de sustrato de aproximadamente 0,21 M.

55 La reacción puede llevarse a cabo en una serie de condiciones de reacción diferentes. Típicamente, la reacción se lleva a cabo comprendiendo de aproximadamente 0,2 a 10 g/l, a menudo de 0,25 a 5 g/l, de la variante del polipéptido LovD, de aproximadamente 1 a 250 g/l, a menudo de 50 a 150 g/l, del sustrato de monacolina J (o una sal del mismo) y de aproximadamente 1 a 10 equivalentes, a menudo de 1 a 2 equivalentes, de cosustrato de α -dimetilbutiril tioéster. Normalmente, la reacción se lleva a cabo en un tampón acuoso (de 0 a 300 mM, preferentemente de 50 a 300 mM, más preferentemente 200 mM) que tiene un pH en el intervalo de pH 7,5 a 10,5, a menudo un pH de 8,0 a 9,5 o un pH de 8,5 a 9,5. La identidad del tampón no es crucial. Los tampones adecuados incluyen, pero sin limitaciones, trietanolamina (TEA), fosfato de potasio, o puede no usarse un tampón.

60 También se pueden usar sistemas de codisolventes acuosos. Tales codisolventes incluirán, típicamente, de aproximadamente 1 a 10 % de un codisolvente orgánico polar. Los codisolventes orgánicos polares adecuados incluyen, pero sin limitaciones, MeCN, DMSO, alcohol isopropílico (IPA), dioxano, THF, acetona y MeOH.

65 En una o más realizaciones, el donante de acilo se carga en el recipiente de reacción en una concentración entre

aproximadamente 1,0 o 1,05 y aproximadamente 4 equivalentes con respecto al sustrato. En realizaciones preferidas, el tioéster está presente en una cantidad entre 1,1 y 2,0 equivalentes con respecto al sustrato. Más preferentemente, el tioéster está presente en una cantidad entre 1,1 y 1,7 equivalentes.

- 5 Se ha encontrado que, en ciertas acilaciones de un sustrato usando LovD aciltransferasa, el pH puede afectar a la progresión de la reacción. Por consiguiente, en una o más realizaciones, la reacción de aciltransferasa tiene lugar a un pH mayor que 7. Preferentemente, el pH es mayor que 8. Más preferentemente, el pH está entre aproximadamente 8,0 y 10,5 y, lo más preferentemente, el pH está entre aproximadamente 8,0 y 9,5.
- 10 La reacción de acilación puede efectuarse a diversas temperaturas, incluyendo entre 15 °C y 45 °C, también entre 20 °C y 40 °C, y entre 20 °C y 35 °C. Preferentemente, la reacción tiene lugar a una temperatura entre 22 °C y 28 °C. Lo más preferentemente, la reacción se produce a aproximadamente 25 °C. Preferentemente, la reacción de acilación se produce con agitación. En algunos casos, se puede añadir un codisolvente para ayudar a la solvatación completa de uno o más componentes del medio de reacción o para evitar la formación de suspensiones intratables.
- 15 En realizaciones preferidas, la acilación de la sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J o la sal de amonio, no requiere la adición de codisolvente.

En algunas realizaciones, se añade una alimentación controlada de sustrato, tal como, pero sin limitaciones, sustrato en solución. Por ejemplo, se puede usar una bomba de jeringa para suministrar una alimentación controlada de sustrato disuelto en un sistema disolvente. En una realización alternativa, el sustrato se puede añadir en lotes, por ejemplo, a una carga inicial de sustrato le sigue, en algún período de tiempo más tarde, una segunda carga. En aún otra realización, a una única carga puede seguirle una alimentación controlada de sustrato.

20

El tiempo de reacción, es preferentemente, de duración suficiente para permitir la conversión completa del sustrato en el producto diana. En una realización preferida que usa la sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J en una cantidad preferida y usando condiciones preferidas, se deja que la reacción avance entre 2 y 48 horas antes del procesamiento. En algunas realizaciones preferidas, el transcurso de la reacción se controla por métodos adecuados. La reacción se inactiva, o, de otro modo, se "procesa", cuando la monitorización indica que no hay un grado apreciable de conversión adicional del sustrato en el producto diana. El aislamiento puede implicar extracción.

25

30 En una realización preferida se utilizan uno o más volúmenes de éter metil terc-butílico (MTBE) para realizar una primera extracción antes del ajuste del pH de la fase acuosa y la posterior extracción con acetato de etilo (EtOAc) como se describe a continuación en los ejemplos. Un experto en la técnica apreciará que el tiempo de reacción y las condiciones de procesamiento para diversos sustratos pueden determinarse usando métodos conocidos y no más que una experimentación rutinaria.

35

Se contempla que el exceso de tioéster puede recuperarse de una o más corrientes de desecho. Por ejemplo, en una realización, el tioéster en exceso o sin reaccionar se extrae en MTBE. El extracto de MTBE puede, a continuación, someterse a uno o más lavados acuosos, preferentemente lavados acuosos básicos, para eliminar el subproducto de tiol. A continuación, el tioéster purificado se puede volver a someter a las condiciones de reacción como un material reciclado bruto o como una mezcla con tioéster recién preparado. En algunas realizaciones, el tioéster reciclado se destila para aumentar la pureza antes de la adición al medio de reacción.

40

El orden de adición de los materiales puede variar en una o más realizaciones. Por ejemplo, pueden utilizarse las siguientes órdenes de adición: enzima, secuestrante, tioéster; secuestrante, enzima, tioéster; o secuestrante, tioéster, enzima. En realizaciones en las que no se utiliza un secuestrante, la enzima o el tioéster pueden añadirse primero al medio de reacción.

45

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la acilación de un precursor de simvastatina usando (i) un agente de precipitación y/o (ii) un agente secuestrante. En un aspecto de una o más realizaciones, un experto en la técnica puede evaluar la solubilidad de las sales de simvastatina. Por ejemplo, un experto en la técnica podría generar las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio de simvastatina o un precursor de la misma. El experto en la técnica podría después evaluar estas sales en diversos sistemas disolventes. Por tanto, el experto en la técnica compararía la solubilidad de estas sales en un sistema disolvente dado frente a la solubilidad de la sal de monacolina J correspondiente. Las sales de monacolina J que son solubles en el sistema disolvente dado que producen sales de simvastatina que tienen solubilidad reducida (o baja o nula solubilidad) en el sistema disolvente pueden usarse después en un proceso para producir simvastatina que utiliza la precipitación del producto para desplazar favorablemente el equilibrio de la reacción.

50

55

Los diversos métodos y procesos descritos en el presente documento no se limitan al uso de cualquier enzima LovD aciltransferasa específica y pueden llevarse a cabo con cualquier LovD aciltransferasa capaz de catalizar la transferencia de acilo deseada. Las LovD aciltransferasas útiles en los procesos y métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitaciones, la LovD aciltransferasa de tipo salvaje obtenible de *A. terreus* (cuya secuencia de aminoácidos se proporciona como SEQ ID NO: 2; véanse también los documentos WO 00/037692 y WO 2007/139871), los diversos mutantes de esta LovD aciltransferasa de tipo salvaje descritos, por ejemplo, en Biotechnol Bioeng, 2009 Jan 1; 102 (1): 20 - 8, y las diversas variantes descritas en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/247.253, presentada el 30 de septiembre de 2009, titulada "Polipéptidos variantes de LovD y

60

65

sus usos" y la solicitud relacionada presentada simultáneamente con el mismo nombre con el número de expediente 376247-043US (105191) {CX2-032}, ambas denominadas en conjunto "solicitudes de variantes".

- 5 Como se divulga en las solicitudes de variantes, se han descubierto numerosas variantes de LovD aciltransferasas que tienen propiedades mejoradas en comparación con la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2. Todas estas variantes de LovD se pueden utilizar de forma ventajosa en los métodos y procesos descritos en el presente documento. Por ejemplo, tal como se divulga en las solicitudes anteriores, tales LovD aciltransferasas variantes incluyen una o más mutaciones en posiciones seleccionadas que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como actividad catalítica incrementada, estabilidad térmica aumentada, agregación reducida y/o estabilidad incrementada a condiciones de lisis celular. Las LovD aciltransferasas variantes puede 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 de LovD variantes adecuados para su uso en condiciones especificadas.
- 10
- 15 Las posiciones en la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de la secuencia de SEQ ID NO: 2 en la que se han encontrado mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como actividad catalítica aumentada incluyen, pero sin limitaciones, A123, M157, S164, S172, L174, A178, N191, L192, A247, R250, S256, A261, G275, Q297, L361, V370 y N391. Las mutaciones específicas de ejemplo de la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una actividad catalítica incrementada incluyen, pero sin limitaciones, A123P, M157V, S164G, S172N, L174F, A178L, N191G, L192I, A247S, R250K, S256T, A261H, G275S, Q297G, L361M, V370I y N391S.
- 20
- 25 Las posiciones adicionales en las que se han encontrado mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como la estabilidad térmica, incluyen, pero sin limitaciones, Q241, A261, Q295 y Q412. Entre las mutaciones específicas de ejemplo de la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una estabilidad térmica aumentada se incluyen, pero sin limitaciones, Q241M, A261H, Q295R y Q412R.
- 30 Otras posiciones adicionales en las que se han encontrado mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como la agregación reducida, incluyen, pero sin limitaciones, N43, D96 y H404. Entre las mutaciones específicas de ejemplo de la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una agregación reducida se incluyen, pero sin limitaciones, N43R, D96R y H404K.
- 35 Todavía otras posiciones en las que se han encontrado mutaciones que se correlacionan con una o más propiedades mejoradas, tales como la estabilidad aumentada, incluyen, pero sin limitaciones, C40, C60 y D254. Entre las mutaciones específicas de ejemplo de la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 que se correlacionan con una estabilidad aumentada se incluyen, pero sin limitaciones, C40R, C60R y D254E.
- 40 También se descubrieron posiciones que podían mutarse sin efectos perjudiciales, confirieran o no dichas mutaciones a la LovD aciltransferasa propiedades mejoradas. Las posiciones dentro de la secuencia de LovD aciltransferasa de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 2 que pueden mutarse sin efectos perjudiciales incluyen, pero sin limitaciones, I4, A9, K26, R28, I35, C40, S41, N43, C60, S109, S142, A184V, N191S, A261, L292, Q297, L335, A377, A383, N391 y H404. Las mutaciones específicas de ejemplo que se pueden incorporar en estas posiciones incluyen, pero sin limitaciones, 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.
- 45
- 50 Las LovD aciltransferasas que tienen secuencias que corresponden a la SEQ ID NO: 2 y que incluyen una o más mutaciones en cualquiera de las posiciones mencionadas anteriormente son útiles en los métodos y procesos descritos en el presente documento. En una realización específica, las LovD aciltransferasas útiles tienen secuencias que corresponden a la SEQ ID NO: 2 e incluyen mutaciones en las posiciones L174 y A178 (en una realización específica L174F y A178L), y, opcionalmente, de 1 a aproximadamente 30 mutaciones adicionales, que pueden seleccionarse de las posiciones y los residuos tratados anteriormente. En otra realización específica, las LovD aciltransferasas útiles tienen secuencias que corresponden a la SEQ ID NO: 2 e incluyen al menos las siguientes mutaciones: A123P, L174F, A178L, N191(S o G), A247S y L361M, y de cero hasta aproximadamente 26 mutaciones adicionales, que se pueden seleccionar de las diversas posiciones y mutaciones diferentes tratadas anteriormente.
- 55
- 60 Como se describe en las solicitudes de variantes, se cree que el aminoácido en la posición 76 puede estar implicado en la catálisis. Preferentemente, deben evitarse 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. Asimismo, preferentemente se evitan las mutaciones en estas posiciones.
- 65 Además de las mutaciones descritas anteriormente, las LovD aciltransferasas útiles también pueden incluir mutaciones conservadoras en una o más posiciones (independientemente o además de las mutaciones discutidas

ES 2 614 804 T3

anteriormente). Generalmente, las LovD aciltransferasas de tipo salvaje y variantes que incluyen mutaciones conservadoras contendrán de 1 a 20 mutaciones de este tipo. En realizaciones adicionales, las LovD aciltransferasas de tipo salvaje y variantes que están truncadas en uno o ambos extremos y que retienen su actividad catalítica se pueden usar en los métodos y procesos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, tales LovD aciltransferasas truncadas incluyen LovD aciltransferasas de tipo salvaje o variantes, en las que se omitieron de 1 a 15 aminoácidos del extremo N y/o de 1 a 6 aminoácidos del extremo C.

En la tabla 2, más adelante, se proporcionan realizaciones específicas de LovD aciltransferasas variantes que tienen una actividad catalítica mejorada en comparación con la aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2 que son útiles en los métodos y procesos descritos en el presente documento.

Tabla 2		
N.º de variante	Mutaciones (respecto a la SEQ ID NO:2)	Actividad*
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;	+++

ES 2 614 804 T3

(Continuación)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 2		
N.º de variante	Mutaciones (respecto a la SEQ ID NO:2)	Actividad*
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;	+++
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;	+++
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;	++++
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;	++++
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;	+++
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;	++++
92	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; A261V; G275S; Q295R; Q297E; L361M; V370I; A383V; H404K; Q412R;	++++
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;	++++
98	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261V; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
100	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261V; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++

(Continuación)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Tabla 2		
N.º de variante	Mutaciones (respecto a la SEQ ID NO:2)	Actividad*
102	A9V; K26E; N43R; S109C; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261V; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
104	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174P; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; G275S; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K;	++++
106	A9V; K26E; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; G275S; Q295R; Q297G; L361M; V370I; A383V; N391S; H404K; Q412R;	++++
108	I4N; A9V; K26E; R28S; N43R; A123P; M157V; S164G; S172N; L174F; A178L; N191G; L192I; Q241M; A247S; R250K; S256T; A261H; 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;	++++
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;	++++
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;	++++
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;	++++
*Actividad relativa a la LovD aciltransferasa de tipo salvaje de SEQ ID NO: 2. Una actividad relativa de "+" mostró una actividad de aproximadamente 10 a 50 veces la del tipo salvaje; variantes con una actividad relativa de "++" exhibieron de aproximadamente 50 a 100 veces mayor actividad la del tipo salvaje; variantes con una actividad relativa de "+++" exhibieron de aproximadamente 100 a 500 veces más actividad que el tipo salvaje; y las variantes con una actividad relativa de "++++" exhibieron de aproximadamente 500 a 2000 veces más actividad que el tipo salvaje		

7. Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de una o más realizaciones y, como tales, no deben considerarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Preparación de 3-(2,2-dimetilbutanoilto)propionato de metilo

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) a una temperatura interna de 2 °C (baño de hielo con salmuera). A esta solución agitada energicamente se añadió cloruro de 2,2-dimetilbutanoilo (8,1 g, 60 mmol) gota a gota durante

10 minutos. La suspensión resultante se agitó después a 25 °C durante 2 horas. La reacción se controló verificando la desaparición del 3-mercaptopropanoato de metilo usando cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de sílice. Los puntos se tiñeron con yodo (eluyente: 5 % de EtOAc/heptano; R_f de 3-mercaptopropanoato de metilo: 0,20). Después, la reacción se inactivó mediante la adición de cloruro de amonio saturado (100 ml), seguida de *i*-PrOAc (100 ml) y la mezcla resultante se agitó hasta que todo el sólido se disolvió. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico acuoso al 1 % (100 ml) y después con agua (2 x 50 ml). Después, la fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró a presión reducida (baño a 45 °C, 50 mm Hg) para obtener una mezcla en bruto en forma de un líquido amarillo claro. La mezcla en bruto se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un gradiente de heptano hasta 2 % de EtOAc: heptano. Las fracciones que comprenden el producto puro se combinaron y concentraron para proporcionar 10,5 g (80 %) de 3-(2,2-dimetilbutanoiltio) propionato de metilo.

Ejemplo 2: Preparación de hidroxiácido de monacolina J a partir de lovastatina

15 A lovastatina (30 g, 0,074 moles) en un matraz de fondo redondo (MFR) de 3 bocas equipado con un condensador se añadió isopropanol (IPA, 250 ml). A continuación, se añadieron pastillas de KOH (33,2 g, 0,593 moles) y agua (3 ml, 0,1 vol) a la suspensión agitada. La reacción se agitó a 80 °C (temperatura interna) durante 7 horas. A continuación, la reacción se enfrió a ~ 50 °C y se retiró el IPA a presión reducida (35 °C, 50 mbares) hasta que se alcanzó un volumen final de ~ 100 ml (3,3 vol). Se añadió agua (110 ml, 3,7 vol) al residuo y la solución se enfrió a ~ 20 °C en un baño de hielo-agua. Gota a gota se añadió HCl 6 M (92 ml, 3,0 vol) a la solución mientras se mantenía la temperatura interna entre 12-17 °C. El pH de la solución se ajustó de este modo a un pH final entre 3 y 4. A continuación, la mezcla se agitó en un baño de hielo durante 2 horas. El sólido obtenido se separó por filtración y se lavó con agua (60-90 ml, 2-3 vol) y, después, con heptano (60 ml, 2 vol). La torta de filtración se secó en un horno de vacío a 25 °C durante 24 horas, produciendo un sólido blanco (22,4 g, rendimiento del 90 %) con una pureza > 99 % mediante análisis por HPLC.

Ejemplo 3: Preparación enzimática de la sal de sodio del hidroxiácido de simvastatina a partir de hidroxiácido de monacolina J, en ausencia de un secuestrante de tior

30 La reacción se realizó en un MFR de 3 bocas de 250 ml usando un agitador superior equipado con un impulsor de hoja plana y un termómetro interno. La ejecución del siguiente procedimiento proporcionó 70-80 % de sal de sodio de hidroxiácido de simvastatina en un solo cultivo como un sólido blanco con una pureza química de al menos 96 % de acuerdo con el análisis HPLC. En el MFR se cargó, secuencialmente: hidroxiácido de monacolina J (10 g), NaOH 1M (32,5 ml) y agua desionizada (13 ml). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió antes de la adición de tampón (trietanolamina, 400 mM, pH = 8,5, 66 ml). El pH de la mezcla resultante se ajustó después de 9,5 a 8,5 con HCl 5 M (1,2 ml) antes de la adición de la enzima. Se mantuvo un pH de al menos 7,5 durante el transcurso de la reacción. En la mezcla agitada se cargó la enzima (~0,6-0,75 g de LovD aciltransferasa o una cantidad equivalente de una variante de la misma) en forma de un polvo. La mezcla se agitó hasta alcanzar la homogeneidad.

40 Se añadió tioéster (3-(2,2-dimetilbutanoiltio)-propanoato de metilo, 11 ml) y la mezcla bifásica resultante se agitó a 240 rpm a 25 °C (temperatura interna). El transcurso de reacción se siguió, periódicamente, tomando muestras de la mezcla de reacción, enfriando y analizando. Se cargó enzima adicional (0,127 g de LovD o una cantidad equivalente de una variante de la misma) en la mezcla agitada después de 7 horas. Después de que el análisis indicó una conversión máxima (60-70 horas), el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 9,0 a partir de 7,8 usando solución de NaOH 10 M (1,6 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 345 rpm durante 10 minutos.

El procesamiento de la mezcla de reacción puede realizarse en primer lugar, extrayendo la fase acuosa con éter metil terc-butílico (MTBE). Después de la extracción con MTBE (2 extracciones), la fase acuosa se ajustó a un pH de aproximadamente 5,3 a 5,4 usando HCl 0,5 M mientras se mantenía una temperatura por debajo de 20 °C. La fase acuosa se extrae tres veces con EtOAc. Durante cada extracción, se añadió HCl adicional, a demanda, para mantener el pH de la fase acuosa entre 5,3 y 5,4. Las fases de EtOAc de la 3 extraccións se combinaron. Los extractos combinados de acetato de etilo se filtraron a través de una almohadilla de Celite® (1 g) en un embudo de vidrio sinterizado G4 estándar a presión reducida para clarificar el extracto. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo (10 ml) y los lavados se combinaron con el filtrado. El filtrado se concentró a demanda o se añadió EtOAc adicional para producir una solución de EtOAc con un volumen de aproximadamente 160 ml. Esta solución de EtOAc se usó en la etapa siguiente.

La reacción se puede monitorizar mediante cualquier método adecuado. Un método adecuado y de ejemplo incluyó la monitorización por análisis de HPLC. Por ejemplo, se tomó una alícuota de 5 µl de la mezcla de reacción y se disolvió en 1,0 ml de MeCN: agua (95:5). La muestra se centrifugó para eliminar la enzima precipitada y el sobrenadante se analizó en una columna Zorbax Eclipse® C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) usando un gradiente de fase móvil de agua y 0,1 % de TFA a MeCN y 0,1 % de TFA. Se usó un caudal de muestra de 2,0 ml/min con una longitud de onda de detección de 238 nm, una temperatura de columna de 30 °C y un volumen de inyección de 10 µl. Se calculó el porcentaje de conversión dividiendo la suma del área de hidroxiácido de simvastatina detectable y simvastatina sobre la suma de las áreas de hidroxiácido de monacolina J detectable, monacolina J lactona, hidroxiácido de simvastatina y simvastatina. El hidroxiácido de monacolina J y el hidroxiácido de simvastatina

demonstraron ambos un factor de respuesta de 1.

Ejemplo 4: Preparación de la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina a partir de la sal de sodio de hidroxácido de simvastatina

5 Se cargaron 160 ml de una solución de acetato de etilo que contenía la sal de sodio de hidroxácido de simvastatina del ejemplo 3 en un MFR de 3 bocas de 250 ml y la mezcla de reacción se agitó a 250 rpm a 21 °C. A continuación, gota a gota se añadió una mezcla 1:1 (v/v) de hidróxido de amonio (5 ml) y MeOH (5 ml) durante 10 minutos a la
10 mezcla de reacción mientras se mantenía la temperatura interna a 21-22 °C. Después de la adición completa de la mezcla de hidróxido de amonio y MeOH, se aumentó la velocidad del agitador y la mezcla se agitó durante 1 hora a 21 °C y, después, durante 1 hora a 0-5 °C. A continuación, se filtró el sólido blanco a través de un embudo de vidrio sinterizado G4 estándar al vacío y el recipiente de reacción y la torta de filtración se aclararon con EtOAc frío. El sólido blanco se secó en un horno de vacío (2 mmHg) a 25 °C durante 24 horas. Esto proporcionó 10,48 g (78,2 %) de rendimiento aislado de la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina, como un sólido blanco con una pureza
15 química > 96 % mediante análisis HPLC.

Ejemplo 5: Preparación enzimática de la sal de sodio del hidroxácido de simvastatina a partir de hidroxácido de monacolina J, en presencia de un secuestrante de tiol

20 Se equipó un MFR de 3 bocas de 250 ml con un agitador superior, un impulsor de hoja plana y un termómetro interno. El recipiente de reacción se cargó secuencialmente con lo siguiente: hidroxácido de monacolina J (5 g), NaOH 1M (16,3 ml) y agua desionizada (6,7 ml). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió antes de la adición de tampón (trietanolamina, 400 mM, pH = 8,5, 33,3 ml). El pH de la mezcla resultante se ajustó de 9,5 a 9,0 con HCl 5 M (0,12 ml) antes de la adición de la enzima. En la mezcla agitada se cargó la enzima (0,10 g de LovD aciltransferasa o una cantidad equivalente de una variante de la misma) en forma de un polvo. La mezcla se agitó
25 hasta alcanzar la homogeneidad. Posteriormente se añadió carbón activado (0,67 g) y la mezcla se agitó durante otros 5 minutos a 240 rpm a 25 °C.

30 A continuación, se añadió tioéster (3-(2,2-dimetilbutanoilto)-propanoato de metilo, 5,5 ml) para iniciar la reacción enzimática. La mezcla resultante se agitó a 240 rpm a 25 °C (temperatura interna). El transcurso de reacción se siguió, periódicamente, tomando muestras de la mezcla de reacción, enfriando y analizando mediante HPLC. Cuando el análisis indicó una conversión máxima (24 horas), la mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite (1,5 g) en un embudo de vidrio sinterizado G4 estándar a presión reducida para eliminar el carbón vegetal. El MFR de 3 bocas de 250 ml se aclaró con agua desionizada (5 ml), que se filtró a través de la
35 misma almohadilla de Celite® y, después, se combinó con el filtrado. La torta de filtración se lavó con agua (5 ml) y se recogieron los lavados y se combinaron con el filtrado. El filtrado se recargó en un nuevo matraz de 3 bocas de 250 ml y el pH del filtrado se ajustó a 9,0 a partir de 8,2 utilizando solución de NaOH 10 M (0,55 ml).

40 El procesamiento de la mezcla de reacción se realizó, en primer lugar, extrayendo la fase acuosa con éter metil terciario. Después de la extracción con MTBE (2 extracciones), la fase acuosa se ajustó a un pH de aproximadamente 5,3 a 5,4 usando HCl 0,5 M mientras se mantenía una temperatura por debajo de 20 °C. La fase acuosa se extrajo tres veces con EtOAc. Durante cada extracción, se añadió HCl adicional, a demanda, para mantener el pH de la fase acuosa entre 5,3 y 5,4. Las fases de EtOAc de la 3 extracción se combinaron. Los extractos combinados de acetato de etilo se filtraron a través de una almohadilla de Celite® (1 g) en un embudo de vidrio sinterizado G4 estándar a presión reducida para clarificar el extracto. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo (10 ml) y los lavados se combinaron con el filtrado. El filtrado se concentró a demanda o se añadió EtOAc adicional para producir una solución de EtOAc con un volumen de aproximadamente 65 ml. Esta solución de EtOAc concentrado se usó para la siguiente etapa, la formación de la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina de acuerdo con el método del Ejemplo 4.
50

Ejemplo 6: Método general para la acilación enzimática mejorada de un sustrato usando un tioéster y una LovD aciltransferasa

55 En un medio de reacción adecuado se cargó un sustrato que tenía un sustituyente hidroxilo libre. Se añadieron disolvente y tampón (a demanda). A continuación, con agitación, se añadieron tioéster (1,1-2,0 eq.) y carbón activado (~ 10 g/l de disolvente). Después de homogeneizar mediante agitación, se añadió la enzima LovD aciltransferasa o una variante de la misma (de 0,01 a 0,2 eq.). La reacción se agitó hasta que finalizó. El procesamiento incluyó filtración, extracción y/o concentración para producir el producto acilado final.

Ejemplo 7: Conversión de hidroxácido de monacolina J en la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina hidroxácido y aislamiento de la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina

60 Se equipó un matraz de fondo redondo (MFR) de 3 bocas con un agitador superior, un impulsor de hoja plana y un termómetro interno. El recipiente de reacción se cargó con hidroxácido de monacolina J (10 g, 29,58 mmol). A continuación se añadieron agua desionizada (112,0 ml) y NH₄OH (4,2 ml). La mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió antes del ajuste del pH (~ 2 minutos). El pH de la mezcla resultante se ajustó de 9,2 a 9,0 con HCl
65

5 M (1,5 ml) antes de la adición de la enzima. La enzima LovD (0,10 g) se cargó en la mezcla agitada en forma de un polvo. La mezcla se agitó durante 5 minutos a 300 rpm a 25 °C para obtener homogeneidad. Se añadió DMB-S-MMP (3-(2,2-dimetilbutanoilto)-propanoato de metilo, 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 con solución de NH₄OH al 25 %. Tras 48 horas se obtuvo una conversión de aproximadamente 97 %.

La sal de amonio de hidroxácido de simvastatina pudo aislarse de la reacción anterior como sigue. Después de que el análisis durante el proceso indicó una conversión máxima, la mezcla de reacción se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado G4 estándar a presión reducida. El MFR de 3 bocas de 250 ml se aclaró con agua desionizada enfriada (10 ml) y la suspensión se filtró a través del mismo embudo de vidrio sinterizado. La torta de filtración se lavó dos veces con agua desionizada enfriada (20 ml) y después se lavó tres veces con MTBE (40 ml). El sólido blanco se secó en un horno de vacío (2 mmHg) a 25 °C durante 24 horas, produciendo aproximadamente de 11,4 a 11,7 g (rendimiento aislado de 85 a 87 %) de la sal de amonio de hidroxácido de simvastatina en forma de un sólido blanco con una pureza química de aproximadamente 97 a 98 % (AUC, 238 nm). En una realización, la variante que tiene las mutaciones descritas en la SEQ ID NO: 116 proporciona buenos resultados de acuerdo con las condiciones anteriores. Es posible que se deban optimizar las condiciones de reacción para los ejemplos anteriores, incluyendo cantidades de carga de sustrato o enzima, para el perfil de reactividad de otras variantes.

Aunque se han ilustrado y descritos varias formas de realización específicas, se apreciará que se pueden realizar varios cambios sin desviarse del alcance de la(s) invención(es), como se define en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Collier, Steven James
 <111> Teo, Ee Ling
 <112> Wilson, Robert John
 <113> Xu Junye

<120> Improved Lov-D Acyltransferase Mediated Acylation

<130> 376247-044US (105192) {CX2-032}

<141> 2010-09-24

<160> 20
 <210> 1
 <211> 1242
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Codon optimizado *Aspergillus terreus* lovD

<400> 1

```

45  atggggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggaccggg tggttctgat ggaaacggct 60
    ttccgtaaaag cgggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
    agtggtaaac tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
    aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
50  ctgaccacga ttatggcact gcagtgcacg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
    gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tggaaaggctt tgatgatgcc 360
    ggcaacgccc gtctgcgca acgcctggtt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
    accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
    catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcgccgcc agctgttaat 540
    gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
55  cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
    atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
    cagaccacac gcaactccgc ggatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
    gcggacggtg aagagtgtt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
    aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
60  ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aatgaacca gcatatggac 960
    gcgtgcgcgc acatcaacta tggcggcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
    ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
    ctgacgtttg gtggcggctc aaacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
    actttagcct ttttcagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
65  acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242
    
```

<210> 2
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> SECUENCIA ARTIFICIAL

5
 <220>
 <223> Codon optimizado Aspergillus terreus lovD
 <400> 2

```

10      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
15      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

20      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
25      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
30      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
35      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
40      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
45      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
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
        Arg Ser Phe Gly Leu Gly Gly Ile Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asp Gly
           340         345         350
55      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
60      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
    
```

65 <210> 3

ES 2 614 804 T3

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

5 <220>
 <223> Variante de lovD

<400> 3

10 atgggttcta tcattgatgc ggctgcgggc gcggacccgg tggttctgat ggaaacggct 60
 ttccgtaaag cggtaaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
 agtggttaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
 15 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
 gttgaccgcc tgctgcccga cctgagcgcg atgccggtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360
 ggcaacgccc gtctgcgcga acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
 accagcggtc tgcctgacgt ctctctcat ccgctcgtc gcgagtatat ggcccagggt 480
 20 catttgcaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtc tggcgcgcgc agctgttaat 540
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgt aatctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660

25 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
 cagaccaccc gcaactccgc ggatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
 gcggacgggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctctgttc tgcagccaca aaccgtggat 900
 30 ctgatgttcc agccggcgt ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
 gcgtcgcgcg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tctcgcgtcg cagcttcggc 1020
 ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
 atgacgtttg gtggcgggtcc aacattggt tggcagattg acccgaaagc ggtctgtgt 1140
 actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgacccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
 35 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

<210> 4
 <211> 413
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Variante de lovD

45 <400> 4

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
 5 20 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
 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

65

ES 2 614 804 T3

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

5 <220>

<223> Variante de lovD

10 <400> 5

```

    atggggttcta tcattgatgc ggctgcgggc gcggaaccgg 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 gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
    gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tggagggtt tgatgatgcc 360
    ggcaaccgca gtctgcgca acgccgtggt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
    accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
    catttgaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtt ttgcgcgcc attagttaat 540
    gatccaggcg cggaatggat ttatggcgt tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
    cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
    atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcagc tcgtgccgac 720
    cagaccacc gcaactccag cgatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
    gcggacggtg aagagtgtt cgggggcccag ggcgtgttca gcggtccagg cagttacatg 840
    aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
    ctgatgttcc agccggcgt ggaaccgctc ttggaagaac aatgaacca gcatatggac 960
    gcgtcgcggc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
    ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
    atgacgtttg gtggcggctc aacattggt tggcagattg acccgaaagc ggtctgtgt 1140
    actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
    acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242
    
```

35 <210> 6
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Variante de lovD

<400> 6

```

    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
    
```

65

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
 5 130 135 140
 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
 10 165 170 175
 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
 15 195 200 205
 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
 20 225 230 235 240
 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
 25 260 265 270
 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
 30 305 310 315 320
 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
 35 340 345 350
 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
 40 370 375 380
 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> 7
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Variante de lovD

<400> 7

60

65

ES 2 614 804 T3

atggggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggaaccgg tggttctgat ggaaacggct 60
 ttccgtaaag cggttaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
 agtggttaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
 5 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tggaggctt tgatgatgcc 360
 ggcaacccgc gtctgcgcga acgcccgtgtt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatat ggcccagggt 480
 10 catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagtctcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtc tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtag ttgcaggaga acatttgccg gccgctgggc 660
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
 cagaccacc gcaactccag cgatggtcgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
 15 gcggacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
 ctgatgttcc agccggcgcct ggaaccgcgc ttggaagaac aatgaacca gcatatggac 960

20 gcgtgcgccg acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
 ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
 atgacgtttg gtggcgggtcc aaacattggt tggcagattg accgaaagc gggctctgtg 1140
 actttagcct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
 25 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

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

<220>
 <223> Variante de lovD

35 <400> 8

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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
 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
 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

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

ES 2 614 804 T3

<400> 9

```

atgggttcta tcattgatgc ggctgcggcc gcggaccggg tggttctgat ggaaacggct 60
ttccgtaaag cggttaaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
5 agtggtaacc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tgggaaggctt tgatgatgcc 360
10 ggcaaccggc gtctgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
accagcggtc tgcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
catttgacaga gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtt tctctggact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
15 atcaactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
cagaccacc gcaactccag cgatggctgt ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
gcggacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggctgttca gcagtccagg cagttacatg 840
aagggtctgc actctctgct gaaacgtgac ggctgttgc tgcagccaca aaccgtggat 900
ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
20 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
ctgggtggtg tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
atgacgtttg gtggcgtcc aacattgtt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140
actttagcct tttccagct ggaaccgtgg aacgaccggg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
25 acctttgagc acgcatccta tgcacagtat caacagggct aa 1242

```

<210> 10

<211> 413

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de lovD

35 <400> 10

```

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
40        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
45        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
50        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
55        130       135       140
Ser Tyr Val Phe Leu His Pro Leu Leu Arg Glu Tyr Val Ala Gln Gly

```

60

65

ES 2 614 804 T3

	145				150				155					160		
	His	Leu	Gln	Ser	Ala	Glu	Lys	Phe	Gly	Ile	Gln	Asn	Arg	Phe	Ala	Pro
					165					170				175		
5	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
10		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		
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			
20	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	
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	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						

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

<220>
 <223> Variante de lovD

<400> 11

ES 2 614 804 T3

atggggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gcggaccggt tggttctgat ggaaacggct 60
 ttccgtaaaag cggttgaaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
 agtggttaacc tgaactacac tcgctgtttc ggccgacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
 5 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcctg gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tggaggctt tgatgatgcc 360
 ggcaacccgc gtctgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
 accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
 10 catttgcaga 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
 cagacccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
 15 gcggacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaga aaccgtggat 900
 ctgatgttcc agccggcgcct ggaaccgcgc ttggaagaac aatgaacca gcatatggac 960
 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
 ctgggtggta tcattgcaact ggaggatctg gatgggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
 20 atgacgtttg gtggcggctc aaacattggt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140
 actttagtct ttttccagct ggaaccgtgg aacgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
 acctttgagc acgcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

25 <210> 12
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Variante de lovD

<400> 12

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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 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
 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 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
 40 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
 45 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 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
 55 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
 405 410

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

<220>
 <223> Variante de lovD

65

ES 2 614 804 T3

<400> 13

```

atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gcggacccgg tggttctgat ggaacgggct 60
ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
5 agtgggtcgtc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgtcg cgacgagtgc 180
aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccgggtg tgggaaggctt tgatgatgcc 360
ggcaaccgcg gtctgcgcga acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
10 accagcggtc tgcctgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
catttgacagc gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
gatccaggcg cggaatggat ttatggcgtt ggcatcgact gggcaggcaa attagtggaa 600
cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
15 atcaactgata tgacgttcaa actgcagcag cgtccggata tgctggcacg tcgtgccgac 720
atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgactctgt gtattttcgc 780
gcgacgggtg aagagtgttt cgggggccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccaga aaccgtggat 900
ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
20 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
ctgggtggta tcattgcaact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
atgacgtttg gtggcgggtcc aacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtgt 1140
actttagtct ttttcagct ggaaccgtgg aacgacccgg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
25 acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

```

<210> 14

<211> 413

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de lovD

35 <400> 14

```

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
40          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
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
115          120          125
Arg Gly Lys Ile Thr Leu Arg His Leu Leu Thr His Thr Ser Gly Leu
55          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
60 Pro Leu Val Asn Asp Pro Gly Ala Glu Trp Ile Tyr Gly Ala Gly Ile
180          185          190

```

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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
 10 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
 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
 20 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
 25 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
 30 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
 405 410

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

<220>
 <223> Variante de lovD

40 <400> 15

atgggttcta tcattgatgc ggctgtggcc gcgaccggtg tggttctgat ggaaacggct 60
 ttccgtaaag cggttgaaag ccgccagatt ccgggtgctg ttattatggc gcgtgattgt 120
 agcggtcgctc tgaactacac tcgctgttcc ggcgcacgca ctgtgcgctc cgacgagtgc 180
 45 aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
 ctgaccacga ttatggcact gcagtgcatt gaacgcggcc tggtagactt ggatgaaact 300
 gttgaccgcc tgctgccgga cctgagcgcg atgccggtgc tggaggctt tgatgatgcc 360
 ggcaaccgca gtctgcgca acgcccgtgt aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
 50 accagcggtc tgctgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
 catttgacag gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
 gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct ggcatcgact gggcaggcaa attagtggaa 600
 cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
 atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cccccggata tgctggcagc tcgtgccgac 720
 55 atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgacacggt gtattttcgc 780
 gttgacgggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
 aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccagg gaccgtggat 900
 ctgatgttcc agcccggcgt ggaaccgcgc ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
 gcgtcgccgc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcctgcgtcg cagcttcggc 1020
 60 ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
 atgacgtttg gtggcgttcc aaacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
 actttagtct ttttccagct ggaaccgtgg agtgaccggt tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
 acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggtc aa 1242

65

ES 2 614 804 T3

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

5

<220>
<223> Variante de lovD

10

<400> 16

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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
 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 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
 25 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
 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
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr
 245 250 255
 35 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
 40 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 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
 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
 55 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
 405 410

<210> 17
 <211> 1242
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Variante de lovD

65

ES 2 614 804 T3

<400> 17

	atgggttcta	acattgatgc	ggctgtggcc	gCGgaccCGg	tggttctgat	ggaaacggct	60
	ttccgtaaag	cggttgaaag	ctctcagatt	cCGggtgctg	ttattatggc	gcgtgattgt	120
5	agCGgtcgtc	tgaactacac	tCGctgtttc	ggCGcagcga	ctgtgcgtcg	cgacgagtgc	180
	aatcaattac	caccgctgca	ggtggataca	ccatgtcgtc	tggcaagcgc	tactaaatta	240
	ctgaccacga	ttatggcact	gcagtgcacg	gaacgcggcc	tggtagactt	ggatgaaact	300
	gTtgaccgCC	tGctgCCgga	cctgagcgcg	atgCCggtgc	tGgaaggctt	tGatgatgcc	360
10	ggcaaccCGc	gtctgcgcga	acgCCgtggt	aaaattacgt	tacGCCatct	gctgacacac	420
	accagcggtc	tgtcgtacgt	cttcctgcat	cCGctgctgc	gcgagtatgt	tgccCagggt	480
	catttgCagG	gcgctgagaa	gtttggcatt	cagaatcgtt	ttgcgCCgCC	attagttaat	540
	gatccagggcg	cggaatggat	ttatggcGct	ggcatcGact	gggcaggcaa	attagtggaa	600
	cgcgcaacgg	gcttggacct	ggaacagtac	ttgcaggaga	acatttgCgc	gCCgctgggc	660
15	atcactgata	tGacgttcaa	actgcagcag	cGccCGgata	tGctggcagc	tCGtgCCgac	720
	atgaccacc	gcaactccag	cGatggtaaa	ctgcGctatg	atgacacggT	gtattttcgc	780
	catgacggTg	aagagtgttt	cgggggCCag	ggcgtgttca	gcagtccagG	cagttacatg	840
	aaggTtctgc	actctctgct	gaaacgtgac	ggcctgttgc	tgcagccagG	gaccgtggat	900
20	ctgatgttcc	agccggcGct	ggaaccGcgt	ttggaagaac	aaatgaacca	gcatatggac	960
	gcgtcGccgc	acatcaacta	tggcggTcca	atgcctatgg	tcttgcgtcg	cagcttcggc	1020
	ctgggtggta	tcattgcact	ggaggatctg	gatggtgaga	actggcgtcg	taaaggctcg	1080
	atgacgtttg	gtggcggTcc	aaacattatt	tggcagattg	accCGaaagc	gggtctgtgt	1140
	actttagtct	ttttccagct	ggaaccgtgg	agtgaccCGg	tgtgtcgtga	cctgactcgc	1200
25	acctttgaga	aagcGatcta	tgcacagtat	caacagggct	aa		1242

<210> 18

<211> 413

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante de loVD

35 <400> 18

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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
 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 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
 25 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
 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
 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
 45 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 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
 55 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

60 <210> 19
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 614 804 T3

<223> Variante de lovD

<400> 19

```

5      atgggttcta acattgatgc ggctgtggcc gcggaccocgg tggttctgat ggaaacggct 60
      ttccgtaaag cggttgaaag ctctcagatt ccgggtgctg ttttgatggc gcgtgattgt 120
      agcggtcgtc tgaactacac tcgctgtttc ggcgcacgca ctgtgcgctg cgacgagtgc 180
10     aatcaattac caccgctgca ggtggataca ccatgtcgtc tggcaagcgc tactaaatta 240
      ctgaccacga ttatggcact gcagtgcagc gaacgcggcc tggtagcctt ggatgaaact 300
      gttgaccgcc tgctgccgga cctgtgcgcy atgcccgtgc tggaaaggctt tgatgatgcc 360
      ggcaaccocg gtctgcgcga acgcccgtgg aaaattacgt tacgccatct gctgacacac 420
      accagcggtc tgtcgtacgt cttcctgcat ccgctgctgc gcgagtatgt tgcccagggt 480
15     catttgagg gcgctgagaa gtttggcatt cagaatcgtt ttgcgccgcc attagttaat 540
      gatccaggcg cggaatggat ttatggcgct ggcacgact gggcaggcaa attagtggaa 600
      cgcgcaacgg gcttggacct ggaacagtac ttgcaggaga acatttgcgc gccgctgggc 660
      atcactgata tgacgttcaa actgcagcag cgcgccgata tgctggcacg tcgtgccgac 720
      atgaccacc gcaactccag cgatggtaaa ctgcgctatg atgacacggg gtattttcgc 780
20     catgacggtg aagagtgttt cgggggcccag ggcgtgttca gcagtccagg cagttacatg 840
      aaggttctgc actctctgct gaaacgtgac ggcctgttgc tgcagccagg gaccgtggat 900
      ctgatgttcc agccggcgct ggaaccgcgt ttggaagaac aaatgaacca gcatatggac 960
      gcgtcgcggc acatcaacta tggcgggtcca atgcctatgg tcatgcgctg cagcttcggc 1020
      ctgggtggta tcattgcact ggaggatctg gatggtgaga actggcgtcg taaaggctcg 1080
25     atgacgtttg gtggcgggcc aacattatt tggcagattg acccgaaagc gggctctgtg 1140
      actttagtct ttttccagct ggaaccgtgg agtgaccocg tgtgtcgtga cctgactcgc 1200
      acctttgaga aagcgatcta tgcacagtat caacagggct aa 1242

```

30 <210> 20
 <211> 413
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Variante de lovD

<400> 20

40

45

50

55

60

65

ES 2 614 804 T3

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
 5 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
 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 Arg
 85 90 95
 15 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
 20 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
 25 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
 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
 Met Thr His Arg Asn Ser Ser Asp Gly Lys Leu Arg Tyr Asp Asp Thr
 245 250 255
 35 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
 40 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
 45 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
 55 Thr Phe Glu Lys Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
 405 410

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar un compuesto de estatina, que comprende poner en contacto un sustrato de LovD aciltransferasa con una LovD aciltransferasa en presencia de un donante de tioéster y un agente de precipitación, en condiciones que producen un compuesto de estatina, en el que el producto de reacción precipita cuando el agente de precipitación está presente.
2. El método de la reivindicación 1 en el que el agente de precipitación es hidróxido de amonio.
3. El método de la reivindicación 1, en el que:
- (i) el sustrato de la LovD aciltransferasa es monacolina J;
 - (ii) el sustrato de la LovD aciltransferasa es lovastatina;
 - (iii) el sustrato de la LovD aciltransferasa es 6-hidroxi-6-des-metil-monacolina-J;
 - o
 - (iv) el sustrato de la LovD aciltransferasa es pravastatina.
4. El método de la reivindicación 3(i), en el que la monacolina J es una sal de hidroxiácido de monacolina J o monacolina J lactona.
5. El método de la reivindicación 3(ii), en el que la lovastatina es una sal de hidroxiácido de lovastatina o lovastatina lactona.
6. El método de la reivindicación 3(iii), en el que la 6-hidroxi-6-desmetil-monacolina J es una sal de hidroxiácido de 6-hidroxi-6-desmetil monacolina J o 6-hidroxi-6-desmetil monacolina J lactona.
7. El método de la reivindicación 3(iv), en el que la pravastatina es una sal de hidroxiácido de pravastatina o pravastatina lactona.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el donante de tioéster es un tioéster de alfa-dimetilbutirilo y en el que el tioéster de alfa-dimetilbutirilo se selecciona, opcionalmente, del grupo que consiste en α -dimetilbutiril-S-metilmercaptopropionato (DMB-S-MMP), mercaptopropionato de dimetilbutiril-S-etilo (DMB-S-EMP), tioglicolato de dimetilbutiril-S-metilo (DMB-S-MTG), mercaptobutirato de dimetilbutiril-S-metilo (DMB-S-MMB), 2,2-dimetilbutanotioato de S-2-acetamidoetilo, 2,2-dimetilbutanotioato de S-acetamidometilo y 2-(2,2-dimetilbutanoil)acetato de metilo.
9. El método de la reivindicación 8, en el que: (a) se lleva a cabo en un medio acuoso a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 8 a pH 9,5; o (b) se lleva a cabo en un tampón acuoso que tiene un pH inicial de aproximadamente pH 9.
10. El método de la reivindicación 8, en el que la LovD aciltransferasa es una variante de LovD con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la tabla 2.
11. El método de la reivindicación 8, en el que la LovD aciltransferasa es una variante de LovD con las siguientes mutaciones con respecto a la SEQ ID NO: 2: 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; y H404K.
12. Un método para fabricar sal de amonio de hidroxiácido de simvastatina que comprende poner en contacto monacolina J o lovastatina con una LovD aciltransferasa en presencia de un donante de tioéster de alfa-dimetilbutirilo e hidróxido de amonio en condiciones que producen sal de amonio de hidroxiácido de simvastatina, en el que el producto de reacción precipita.
13. El método de la reivindicación 12, en el que: (a) se lleva a cabo en una solución acuosa a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 8 a pH 9,5; o (b) se lleva a cabo en un tampón acuoso que tiene un pH inicial de aproximadamente pH 9.

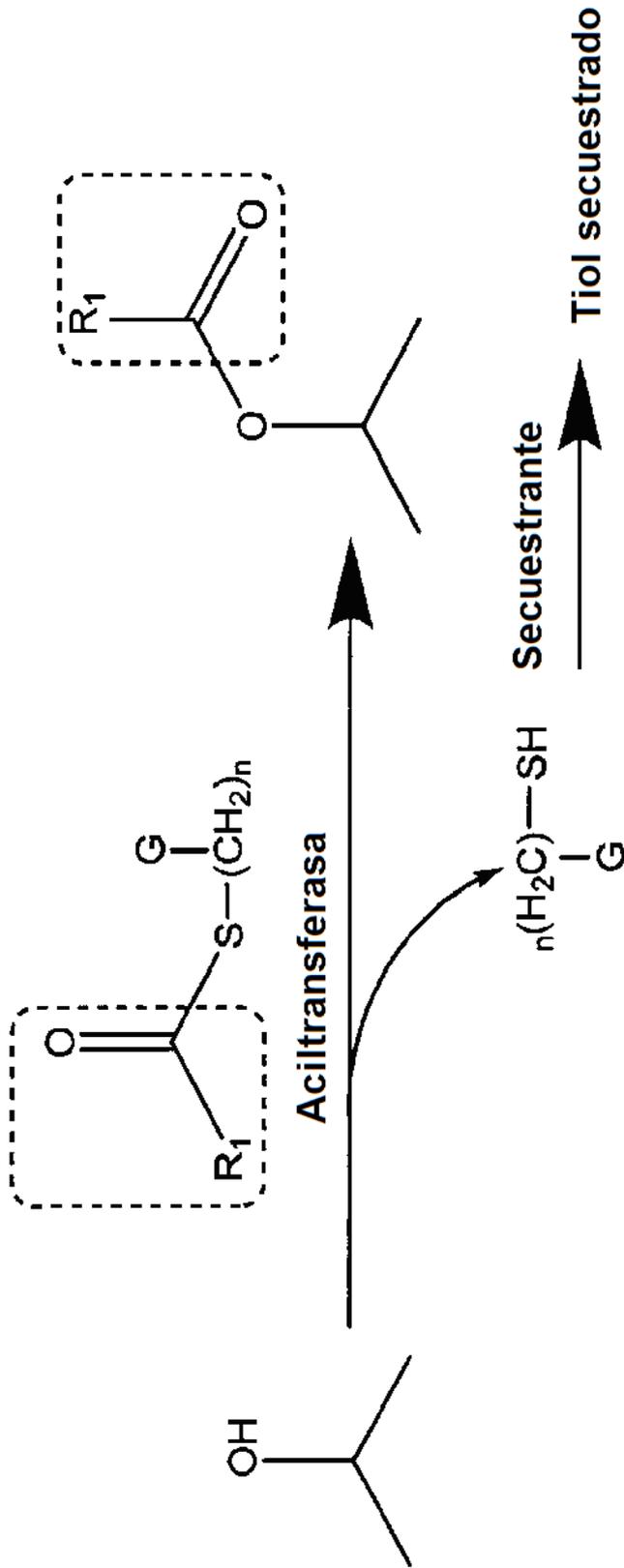
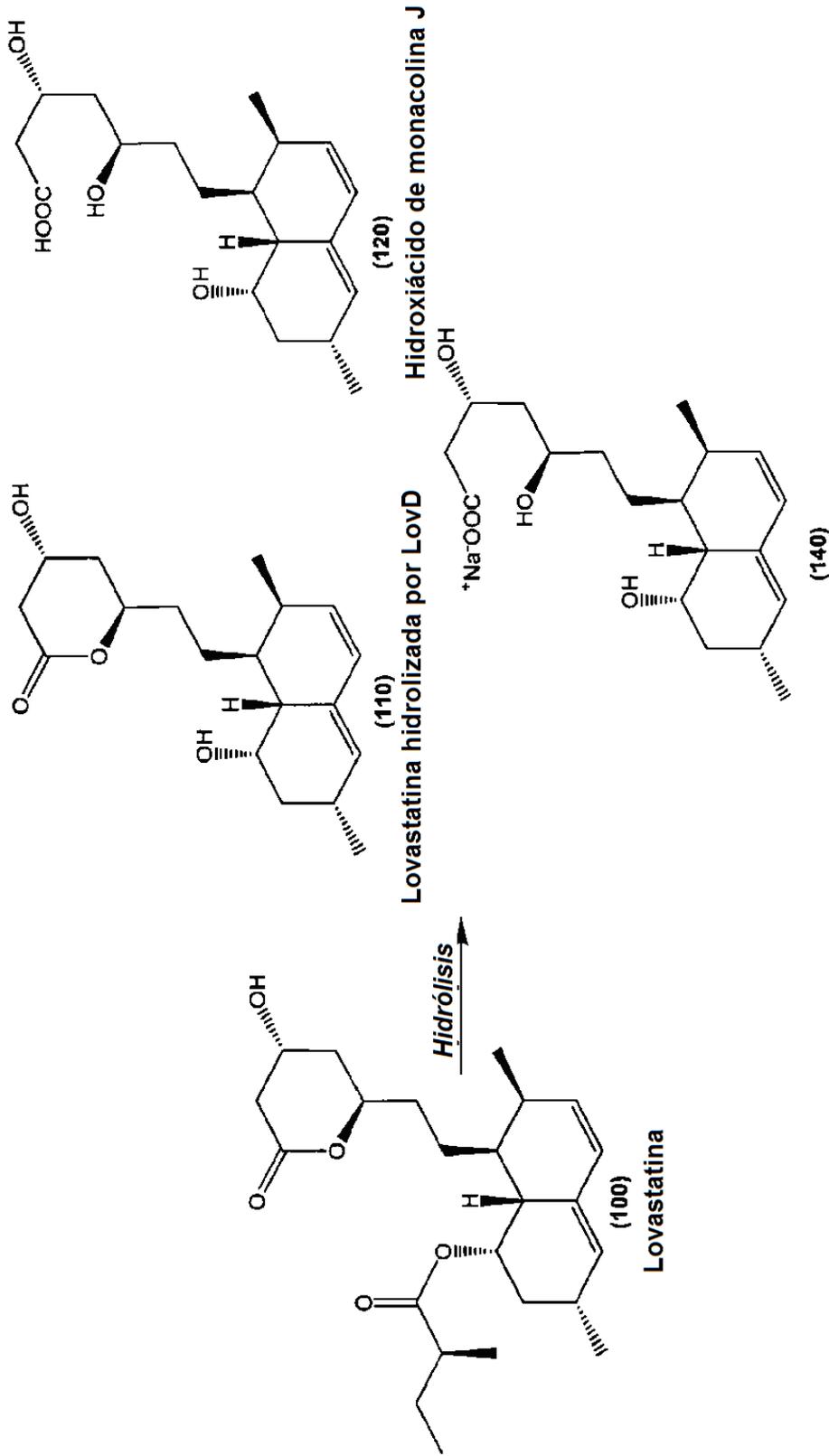


FIGURA 1



Sal de sodio de hidroxiácido de monacolina J

FIGURA 2

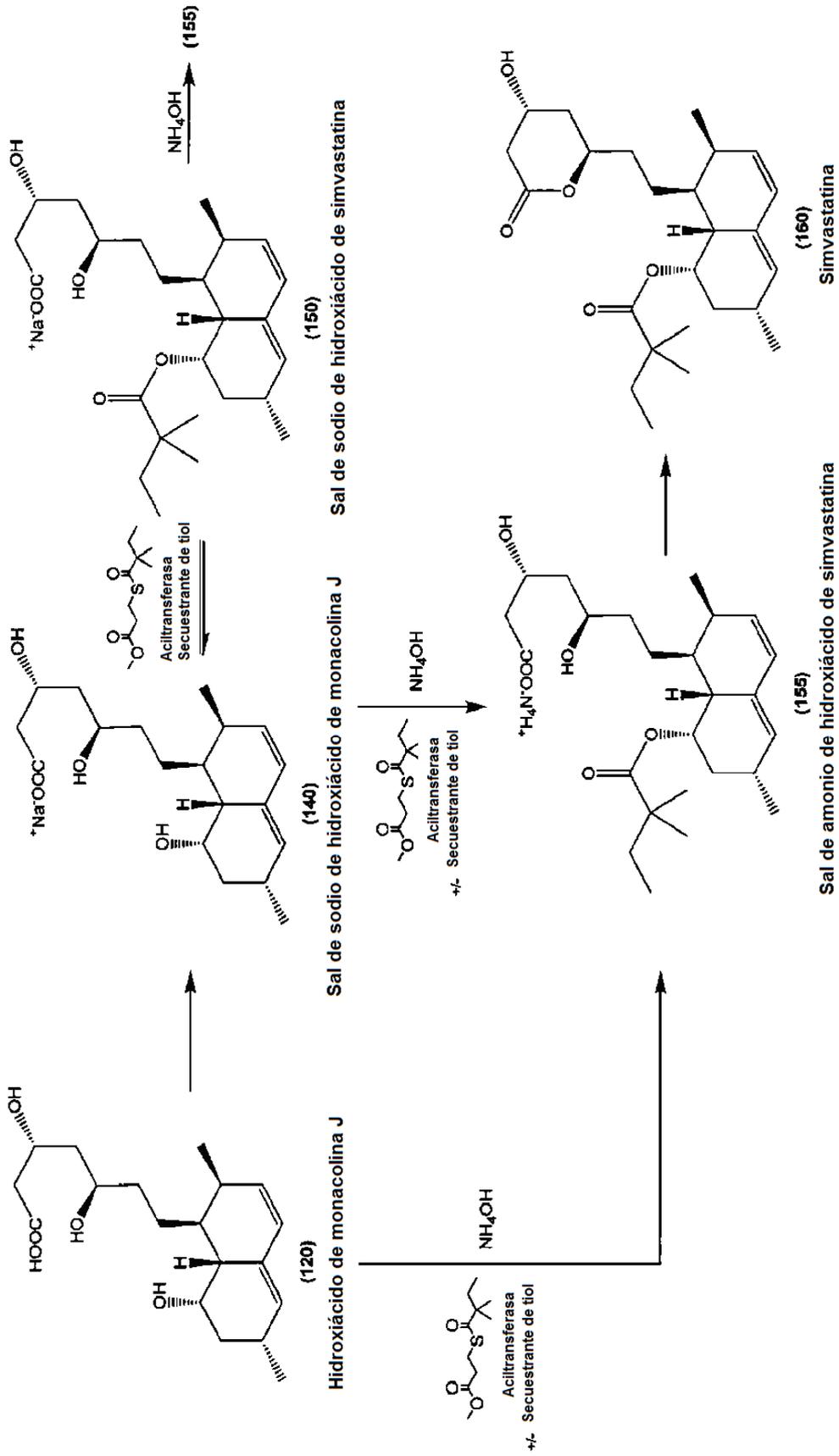


FIGURA 3

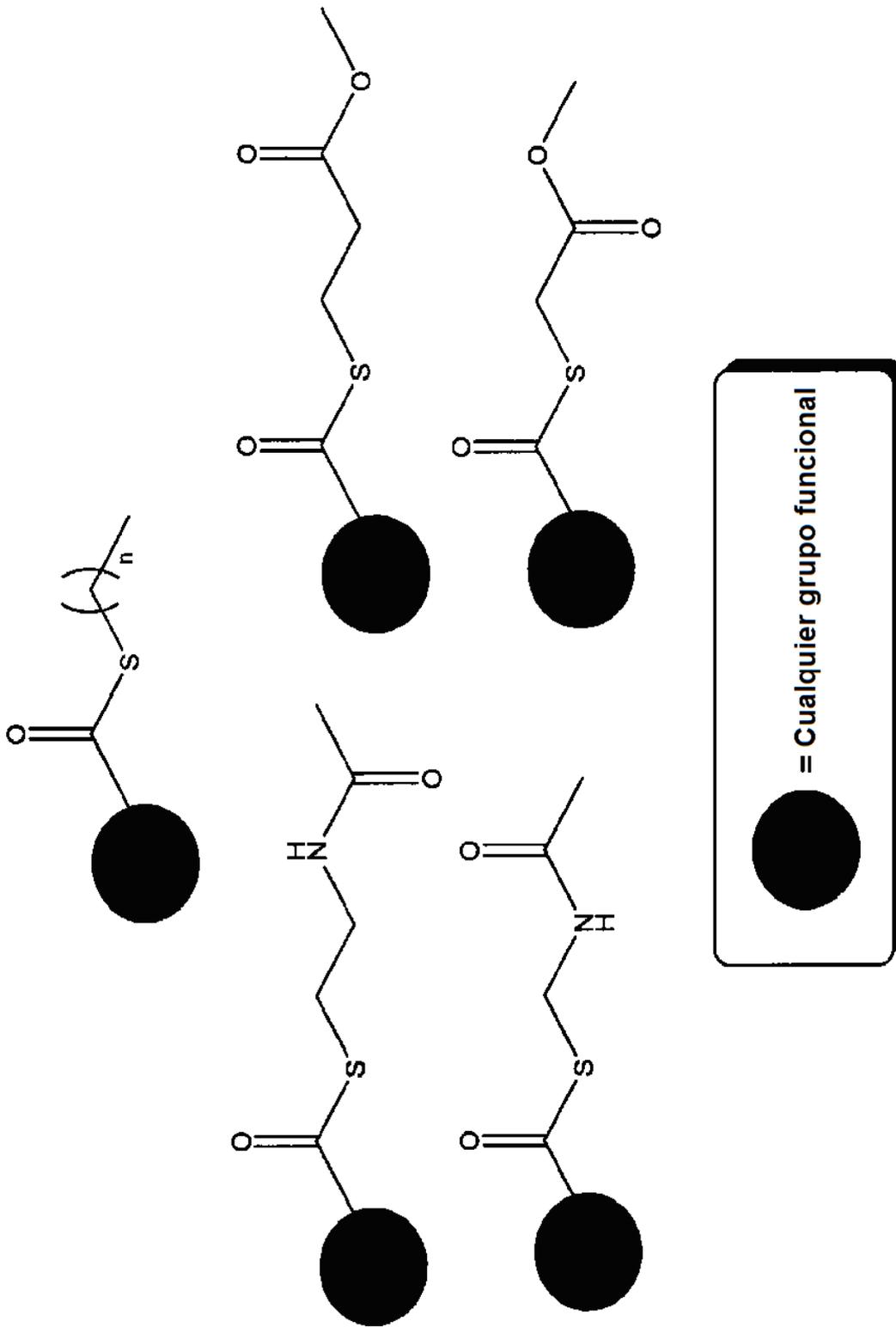


FIGURA 4

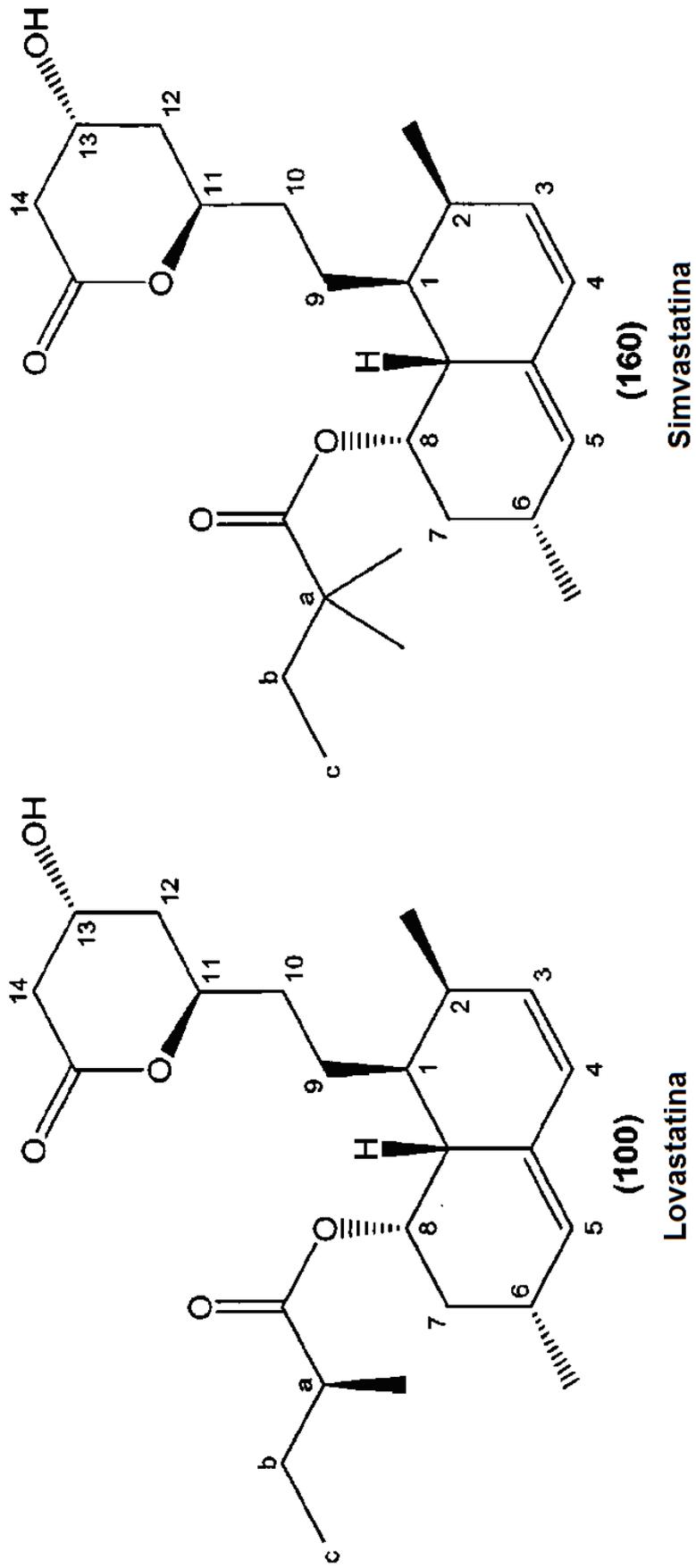


FIGURA 5

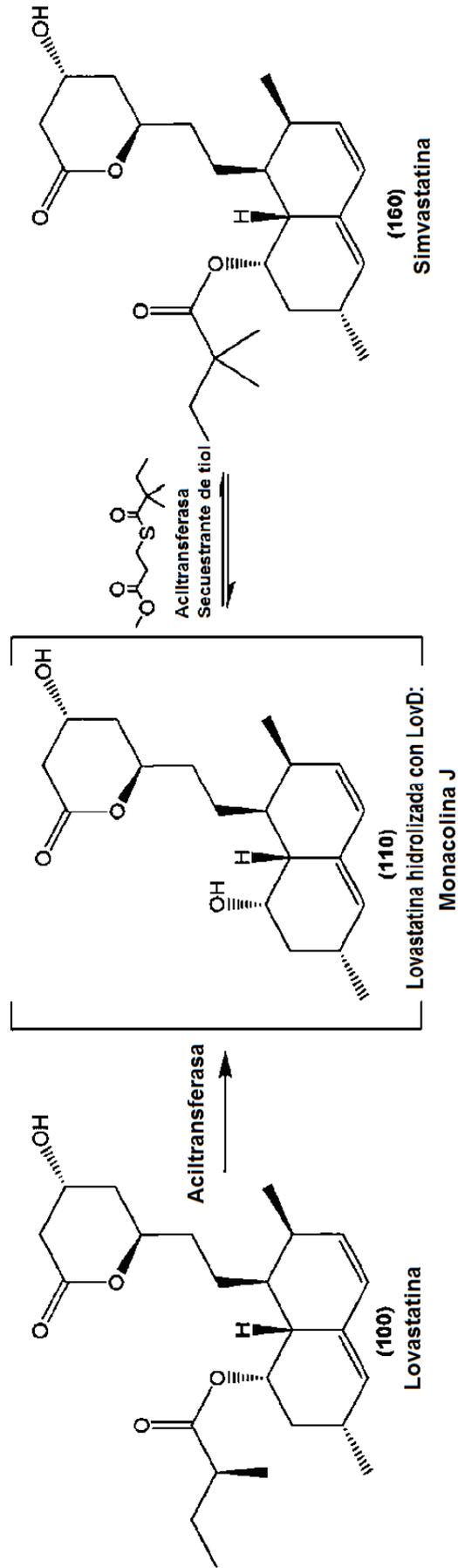


FIGURA 6