

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0711889-9 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2007
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 21/06

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SINVASTATINA, COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE HUVASTATINA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE SINVASTATINA, E MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA DE SINVASTATINA OU HUVASTATINA

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SINVASTATINA, COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE HUVASTATINA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE SINVASTATINA, E MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE MATERIA DE SINVASTATINA OU HUVASTATINA A invenção aqui divulgada refere-se a métodos e materiais para produção de sinvastatirina e compostos associados tal como huvastatina.

(30) Prioridade Unionista: 24/05/2006 US 60/808.088

(73) Titular(es): The Regents Of The University Of California

(72) Inventor(es): Xinkai Xie, Yitang

(74) Procurador(es): Walter de Almeida Martins

(86) Pedido Internacional: PCT US2007012362 de
24/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/139871de
06/12/2007

MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SINVASTATINA, COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE HUVASTATINA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE SINVASTATINA, E MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA DE SINVASTATINA OU HUVASTATINA

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a métodos e material para bio-síntese de compostos tais como sinvastatina incluindo procedimentos com utilização de hospedeiros microbianos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 A sinvastatina é um derivado semi-sintético do produto natural lovastatina, que pode ser isolada do caldo de fermentação de *Aspergillus terreus*. Tanto a lovastatina quanto a sinvastatina são drogas redutoras de colesterol que reduzem substancialmente o risco de doenças cardíacas
15 em adultos. A lovastatina e a sinvastatina são comercializadas pela empresa Merck & Co. com as designações Mevacor e Zocor, respectivamente. A sinvastatina é um derivado mais potente da lovastatina e foi a segunda droga mais vendida nos Estados Unidos da América em 2005, com uma
20 expectativa de vendas de 4,5 bilhões de dólares norte-americanos somente nos Estados Unidos da América.

O agrupamento genético para bio-síntese de lovastatina em *A. terreus* (vide, por exemplo, J. Kennedy, K. e outros, *Science*, 1999, 284, 1368-1372; e C. R.
25 Hutchinson, J. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 78, 287-295) foi descrito anteriormente (vide, por exemplo, a

287-295) foi descrito anteriormente (vide, por exemplo, a patente norte-americana US 6.391.583, cujo conteúdo se encontra aqui incorporado a título de referência). No agrupamento genético encontra-se codificada uma proteína

5 LovD de 46 kD, que foi inicialmente identificada como um homólogo de esterase. A monacolina J, o precursor biosintético imediato da lovastatina, é construída pela LovB megasintase de montante (vide, por exemplo, L. Hendrickson, C. R. e outros, *Chem. Biol.* 1999, 6, 429-439), (também

10 conhecida como lovastatina nonacetídeo sintase [*"Lovastatin Nonaketide Synthase"*], LNKS), LovC enoilreductase e CYP450 oxigenases. A cadeia lateral de cinco unidades de carbono é sintetizada por LovF (lovastatina dicetídeo sintase [*"Lovastatin Diketide Synthase"*], LDKS) mediante

15 condensação entre uma acetil-CoA e uma malonil-CoA. O dicetídeo condensado sofre metilação e conformação redutora pelos domínios LovF individuais para produzir um α -S-metilbutiril tioéster acoplado covalentemente à ramificação fosfopanteteína no domínio de proteína transportadora de

20 acila (*"Acyl Carrier Protein"* - ACP) da LovF (vide, por exemplo, J. Kennedy, K. e outros, *Science*, 1999, 284, 1368-1372; e C. R. Hutchinson, J. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 78, 287-295), e a Lovastatina é subsequente

25 alternativamente de LovD ou de LovF em *A. terreus* causa acumulação do precursor monacolina (vide, por exemplo, J. Kennedy, K. e outros, *Science*, 1999, 284, 1368-1372; e C.

R. Hutchinson, J. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 78, 287-295).

Após a lovastatina ser produzida através de fermentação em um hospedeiro *A. terreus*, por exemplo, a sinvastatina pode ser produzida da lovastatina. Atualmente, a sinvastatina é um derivado semi-sintético da lovastatina. A lovastatina é obtida através de fermentação do hospedeiro *A. terreus*. Após a purificação do composto, a semi-síntese pode prosseguir da seguinte forma: 1) a ramificação do lado 2-metilbutirato pode ser hidrolisada na presença de uma base para produção da monacolina J intermediária; 2) lactonização do ácido livre; 3) o grupo funcional álcool em C13 é protegido com um grupo de proteção (tal como *tert*-butildimetilsilil); 4) Esterificação do álcool C8 exposto com um substrato acila tal como cloreto de 2-dimetilbutiril para obtenção de uma versão protegida C13 de sinvastatina; e 5) Desproteção de OH C13 para obtenção de sinvastatina (Figura 3).

Foram anteriormente descritas diversas sínteses de múltiplas etapas de sinvastatina (vide, por exemplo, o documento PCT WO 2005/066150 e os pedidos de patente norte-americanos nº 20050080275 e 20040068123, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). Por exemplo, um processo amplamente utilizado tem início com a hidrólise do éster C8 em lovastatina para obtenção do triol monacolina J, seguido pela sililação seletiva do álcool C13, esterificação do álcool C8 com cloreto de

dimetilbutiril e desproteção do álcool C13 para obtenção de sinvastatina (vide, por exemplo, W. F. Hoffman, e outros, *J. Med. Chem.* 1986, 29, 849-852). As transformações enzimáticas com utilização de lipases e esterases foram

5 investigadas como alternativas à derivação química (vide, por exemplo, os documentos PCT WO 2005/040107, PCT WO 94/26920 e T. G. Schimmel, e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 1307-1311, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). Entretanto, o

10 requisito de esterificação regioseletiva envolve invariavelmente a proteção de outros grupos álcool e causa freqüentemente uma redução de rendimento geral. Portanto, um reagente específico capaz de acilar seletivamente C8 de monacolina J é importante para uma síntese eficiente de

15 sinvastatina e análogos adicionais de estatina.

As variações dos esquemas acima são comuns, entretanto a maioria dos procedimentos irá invariavelmente envolver a isolação da lovastatina em primeiro lugar, hidrólise da cadeia lateral de metilbutirato, proteção do

20 álcool livre, reação com um substrato de acila, e desproteção. Muito embora as transformações químicas envolvidas sejam relativamente simples, elas são ineficazes e envolvem múltiplas etapas e portanto contribuem para o atualmente elevado custo de fabricação da sinvastatina (US\$

25 3 por pílula).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona métodos e materiais

para aproveitamento das vantagens de processo biológico de fabricação de lovastatina para produção do derivado de lovastatina designado como sinvastatina. A presente invenção também proporciona métodos e materiais destinados

5 ao aproveitamento das vantagens de processos biológicos de fabricação de lovastatina para produção de compostos associados tal como o derivado de pravastatina designado como huvastatina. Conforme foi observado acima, os processos biológicos para produção de lovastatina a partir

10 da fermentação de *A. terreus* são bem conhecidos na técnica. Em processos típicos para produção de lovastatina, o núcleo de decalina e as frações HMG-CoA que mimetizam porções do composto lovastatina são sintetizados pela lovastatina nonacetídeo sintase (LNKS) e três enzimas acessórias in

15 vivo. A cadeia lateral de 2-metilbutirato é sintetizada por lovastatina dicetídeo sintase (LDKS) in vivo. O 2-metilbutirato é acoplado covalentemente ao domínio transportador de acila de LovF através de uma interligação tioéster (Figura 6). Uma aciltransferase, LovD, é então

20 capaz de transferir o 2-metilbutirato seletivamente para o grupo hidroxila C8 de LDKS em uma etapa para obtenção de lovastatina. Conforme é discutido detalhadamente abaixo, é agora possível gerar sinvastatina e compostos associados tanto in vitro quanto in vivo mediante manipulação destes

25 processos.

As configurações da invenção incluem métodos para geração de sinvastatina sem as múltiplas etapas de síntese

química que são atualmente empregadas para geração deste composto. As configurações típicas da invenção não requerem a purificação de lovastatina como primeira etapa, seguida pelos procedimentos semi-sintéticos adicionais, utilizando
5 ao invés disso uma única etapa de fermentação para produção de sinvastatina. Os processos aqui divulgados são projetados de tal forma que as instalações de fermentação que produzem atualmente lovastatina possam ser convertidos para produção de sinvastatina e compostos associados com um
10 mínimo de modificações. Os materiais utilizados nos processo aqui divulgados são relativamente pouco dispendiosos e as etapas de purificação são bem conhecidas na técnica e fáceis de praticar.

Aqueles que são versados na técnica poderão
15 entender que a divulgação aqui proporcionada permite a produção de uma ampla variedade de configurações da invenção. Uma configuração típica da invenção consiste em um método de produção de sinvastatina mediante combinação de monacolina J; um tioéster de acila doador de uma fração
20 acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; permitindo-se subsequente que a LovD aciltransferase utilize um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J;
25 sendo assim obtida sinvastatina. Em configurações típicas da invenção, a LovD aciltransferase tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. Uma configuração

associada da invenção consiste em um método de fabricação de sinvastatina compreendendo as etapas de combinação de lovastatina; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase. Nesta configuração do método, é então permitido que a LovD aciltransferase hidrolise lovastatina para monacolina J; sendo então permitido a utilização de um grupo acila do tioéster de acila para acilar regiosseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J; sendo assim obtida sinvastatina. Em certas configurações, a sinvastatina é produzida in vitro na ausência de um organismo isolado.

Conforme é discutido detalhadamente mais abaixo, os métodos e materiais da invenção que são utilizados para fabricação de sinvastatina podem ser adaptados para produção de compostos que são estruturalmente similares à sinvastatina, por exemplo huvastatina. Neste contexto, uma configuração da invenção consiste em um método de produção de huvastatina compreendendo as etapas de combinação de tetraol de pravastatina hidrolisada; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; permitindo-se subsequente que a LovD aciltransferase utilize um grupo acila do tioéster de acila para acilar regiosseletivamente o grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada, sendo assim obtida huvastatina.

Uma configuração associada da invenção consiste em uma composição de matéria compreendendo: tetraol de pravastatina hidrolisada; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada na presença de LovD aciltransferase; LovD aciltransferase; e huvastatina. Conseqüentemente, as configurações da invenção incluem processos para fabricação de composições de matéria de sinvastatina ou huvastatina substancialmente conforme aqui divulgados e exemplificados.

Em algumas configurações da invenção, a monacolina J; o tioéster de acila e a LovD aciltransferase são combinados em uma mídia de fermentação na presença de um organismo isolado que produz a LovD aciltransferase e em que adicionalmente o organismo consiste em *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus*, *Monascus pubigerus*, *Candida cariosilognicola*, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*. Opcionalmente, o organismo isolado é *Aspergillus terreus* que expressa polipeptídeo LovD de SEQ ID NO:1. Em certas configurações, o *Aspergillus terreus* não expressa polipeptídeo LovF de SEQ ID NO: 3. Alternativamente, o organismo pode consistir em *Escherichia coli* que expressa polipeptídeo LovD de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. Em certas configurações, o

Escherichia coli não expressa polipeptídeo bioH de SEQ ID NO: 4. Conforme é discutido detalhadamente mais abaixo, o organismo isolado pode ser cultivado em uma de uma variedade de condições de fermentação conhecidas na técnica e as condições exatas podem ser selecionadas, por exemplo, com base nos requisitos de fermentação do organismo específico que é utilizado. Em configurações típicas da invenção, o organismo é cultivado a uma temperatura entre 30-40° C, durante um período de tempo de entre pelo menos 4 até pelo menos 48 horas e a um pH entre 6,5-8,5. Em configurações ilustrativas, o organismo é cultivado em uma mídia de fermentação compreendendo mídia LB, F1 ou TB.

Opcionalmente, a monacolina J que é combinada com os outros constituintes nos métodos da invenção é produzida por um organismo isolado dentro da mídia de fermentação, por exemplo um dos organismos listados acima que também produz a LovD aciltransferase. Alternativamente, a monacolina J que é combinada com os outros constituintes nos métodos de acordo com a invenção é produzida por um organismo diferente que produz este composto que é adicionado à mídia de fermentação e cultivado juntamente com o organismo que produz a LovD aciltransferase. Neste contexto um certo número de organismos conhecidos na técnica para produção de monacolina J podem ser adaptados para utilização com estas configurações da invenção (vide, por exemplo, Endo e outros, J Antibiot (Tokyo). 1985 Mar; 38(3):420-2. E Kennedy e outros, 1999 Maio

21;284(5418):1368-72). Em uma outra configuração da invenção, a monacolina J é derivada de uma fonte exógena alternativa (por exemplo, um processo de síntese química) e é adicionada à mistura de fermentação.

- 5 Em configurações típicas da invenção, o tioéster de acila capaz de doar uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase é derivado de uma fonte exógena (por exemplo, um processo de síntese química) e é adicionado à mistura de fermentação.
- 10 São aqui divulgados vários desses tioéster de acila. Tipicamente o tioéster de acila é um tioéster de butirlila, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metiltioglicolato. Opcionalmente, o tioéster de acila compreende frações de grupo acila de extensão média de cadeia (C3-C6).
- 15 Em certas configurações da invenção, o tioéster de acila é capaz de cruzar as membranas celulares de células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas dentro de uma mídia de fermentação. Tipicamente, o tioéster de acila é selecionado do grupo que consiste em α -
- 20 dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB). Em uma
- 25 configuração ilustrativa, o tioéster de acila é um α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato que é combinado em uma mídia de fermentação em uma faixa de concentração de 1 mM-100 mM.

Em certas configurações da invenção, o método tem como resultado a conversão em sinvastatina de pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da monacolina J adicionada à combinação. Opcionalmente, o método de acordo com a
5 invenção produz uma composição de matéria compreendendo 0%-1% da monacolina J que foi inicialmente adicionada à combinação. Certas configurações dos métodos para produção de sinvastatina e compostos associados incluem etapas adicionais para purificação destes compostos. Por exemplo,
10 as configurações da invenção podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo lise de células de um organismo isolado presente na combinação. As configurações podem também incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo centrifugação de células ou lisados de
15 células de um organismo isolado presente na combinação. Adicionalmente, as configurações podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo precipitação de um ou mais compostos presentes na combinação. Uma configuração de uma etapa de precipitação compreende a precipitação de
20 uma forma de ácido livre da sinvastatina. Opcionalmente nessas configurações, é então possível converter esta forma de ácido livre da sinvastatina em um sal de sinvastatina. As configurações da invenção podem igualmente incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo filtração de
25 um ou mais compostos presentes na combinação. Adicionalmente, as configurações podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo uma análise de

cromatografia líquida de alto desempenho ("High Performance Liquid Chromatography" - HPLC) de um ou mais compostos presentes na combinação.

As configurações da invenção incluem composições de
5 matéria úteis para produção e/ou produzidas pelos processos aqui divulgados. Por exemplo, uma configuração da invenção consiste em uma composição de matéria compreendendo: monacolina J; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de
10 LovD aciltransferase; LovD aciltransferase; e sinvastatina. Opcionalmente, a composição compreende adicionalmente um organismo isolado tal como *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus*, *Monascus pubigerus*, *Candida*
15 *cariosilognicola*, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*. Em configurações típicas, o organismo na composição é *Aspergillus terreus* ou *Escherichia coli* que
20 expressa polipeptídeo LovD de SEQ ID NO:1. Em uma configuração da invenção, o organismo é *Aspergillus terreus* que não expressa polipeptídeo LovF de SEQ ID NO: 3. Em uma outra configuração da invenção, o organismo é *Escherichia coli* que não expressa polipeptídeo bioH de SEQ ID NO: 4. Em
25 certas configurações da invenção, um organismo isolado dentro da composição foi transduzido com um vetor de expressão que codifica LovD de *Aspergillus terreus* (SEQ ID

NO: 1).

São aqui divulgados vários tioésteres de acila que podem ser utilizados nas composições de acordo com a invenção. Tipicamente, o tioéster de acila é um tioéster de butirlila, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato. Opcionalmente, o tioéster de acila compreende frações de grupo acila de extensão de cadeia média (C3-C6). Em certas configurações da invenção, o tioéster de acila é capaz de atravessar as membranas celulares de células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas dentro de uma mídia de fermentação. Tipicamente, o tioéster de acila é selecionado do grupo que consiste em α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB). Em uma configuração ilustrativa, o tioéster de acila é um α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato que é combinado em uma mídia de fermentação em uma faixa de concentração de 1 mM-100 mM. Em algumas configurações da invenção, a composição compreende adicionalmente lovastatina e a quantidade de sinvastatina na composição é maior que a quantidade de lovastatina na composição.

Em certas configurações da invenção, componentes adicionais e/ou etapas metodológicas adicionais podem ser combinados com um ou mais dos métodos e materiais discutidos acima. Por exemplo, o método pode compreender

adicionalmente a utilização de fermentação de alta densidade de células para aumentar a concentração efetiva de LovD aciltransferase e otimizar as condições de fermentação ou aumentar as eficiências catalíticas de LovD aciltransferase para engenharia de proteínas dos um ou mais tioésteres. Muitos outros componentes ou métodos podem ser utilizados para aumento da produção de sinvastatina ou de um composto intermediário ou associado que facilite a produção de sinvastatina.

As configurações da invenção também incluem artigos de manufatura e/ou kits destinados a facilitarem os métodos da invenção. Tipicamente esses kits incluem instruções para utilização de seus elementos de acordo com os métodos da presente invenção. Esses kits podem compreender um dispositivo de transporte dividido em compartimentos para acolher em confinamento um ou mais dispositivos recipientes tais como frascos, tubos, e similares, cada um dos dispositivos recipientes compreendendo um dos elementos separados para utilização no método. Um dos recipientes pode compreender um frasco, por exemplo, contendo LovD aciltransferase e/ou *A. terreus* e um outro frasco contendo um composto de tioéster ou similar, ambos os quais podem ser adicionados a uma mistura de fermentação para produção de sinvastatina e/ou huvastatina ou similares.

São discutidas abaixo configurações adicionais da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. A. Lovastatina. B. Sinvastatina. Os dois componentes diferem em uma substituição metila na posição α .

5 Figura 2. Lovastatina (1), Sinvastatina (2), Pravastatina (5), Huvastatina (6) e compostos associados.

Figura 3. Método atual de produção de sinvastatina.

Figura 4. Reação de transferência de acila de acordo com a invenção em *A. terreus*. O nucleófilo de sítio
10 ativo pode ser Serina 76.

Figura 5. A) Resultado de análise HPLC (238 nm) ilustrando a formação de 4 por transferência de acila mediada por LovD. Gradiente: 60%B-95%B, 5 min; 95%B, 15 min; A: H₂O+0,1% TFA; B: acetonitrilo + 0,1% TFA; a) LovD +
15 monacolina J + butiril-CoA decurso de tempo (0, 1, 3, 6 e 10 horas); b) LovD S76A + monacolina J + butiril-CoA, 10 hrs; c) LovD + butiril-SNAC, 10 hrs; d) LovD + butiril-SMTG, 10 hrs. Condições de ensaio: 1 mM de monacolina J, 4 mM de butiril-CoA, 10 μ LovD, 50 mM HEPES, pH 7,9, 25 graus
20 C. (B) Conversão como função de tempo para ($\diamond$) butiril-CoA ($\blacklozenge$) butiril-SNAC, ($\blacksquare$) butiril-SMTG. Os valores κ_{cat} aparentes relatados de princípio a fim do texto são taxas de conversão iniciais na escala linear. (C) Gráfico de Michaelis-Menten de hidrólise de lovastatina catalisada por
25 LovD para monacolina J. O progresso da reação é monitorado por HPLC. κ_{cat} : $0,21 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$; κ_m : $0,56 \pm 0,05 \text{ mM}$.

Figura 6. A LovD catalisa a transferência de acila para produção de lovastatina. O doador de acila encontra-se acoplado a LDKS.

Figura 7. Acila-SNAC. O círculo sombreado indica qualquer grupo funcional.

Figura 8. Resultado de análise HPLC (238 nm) ilustrando a formação de sinvastatina e lovastatina por transferência de acila mediada por LovD. O gradiente é idêntico àquele descrito na Figura 1; a) padrões autênticos de lovastatina e sinvastatina; b) monacolina J + α -S-metilbutiril-SNAC; c) monacolina J + α -dimetilbutiril-SNAC. Condições de ensaio: 1 mM de monacolina J, 10 mM de acil-SNAC, 100 μ M de LovD, 50 mM de HEPES, pH 7,9, 25° C, 6 hrs.

Figura 9. Resultados de análise de HPLC (238 nm) ilustrando a formação de pravastatina e huvastatina por acilação mediada por LovD do tetraol 7. Gradiente: 5% B-95%B, 5 min; 95%B, 15 min; A: H₂O+0,1% TFA; B: acetonitrila + 0,1% TFA; a) padrões autênticos de pravastatina e 7; b) 7 + α -S-metilbutiril-SNAC; c) 7 + α -dimetilbutiril-SNAC. Condições de ensaio: 1 mM de monacolina J, 10 mM de acil-SNAC, 100 μ M de LovD, 50 mM de HEPES, pH 7,9, 25 graus C, 6 hrs.

Figura 10. Conversão microbiana de monacolina J em sinvastatina.

Figura 11. Hidrólise catalisada por LovD e acilação catalisada por LovD. A Figura 11 abrange configurações da

invenção incluindo composições de matéria que produz
huvastatina ou sinvastatina na presença de LovD e um doador
de acila. A Figura 11 também ilustra um método de produção
de sinvastatina compreendendo a hidrólise de lovastatina na
5 presença de LovD para produção de monacolina J. A
monacolina J é dessa forma convertida em sinvastatina na
presença de um doador de acila. Similarmente, a Figura 11
ilustra também um método de produção de huvastatina que
compreende a hidrólise de pravastatina na presença de LovD
10 para produção de pravastatina hidrolisada. A pravastatina
hidrolisada é dessa forma convertida em huvastatina na
presença de um doador de acila.

Figura 12. Produção de huvastatina em um
microorganismo expressando LovD. A Figura 12 proporciona
15 ilustrações de configurações da invenção incluindo a
produção de huvastatina em um organismo expressando LovD.

Figura 13. (A) Conversão bio-catalítica de célula
inteira de ácido de sinvastatina a partir de ácido de
monacolina J e DMB-S-MMP. A cepa E. coli super-expressa a
20 LovD aciltransferase. A hidrólise de DMB-S-MMP para
produção de DMB-S-MPA é uma reação competitiva. (B)
resultado do topo: perfil típico de reagentes e produtos do
experimento de conversão de célula inteira. Resultados do
fundo: padrões para DMB-S-MMP e DMB-S-MPA. Os espectros
25 foram obtidos a 238 nm.

Figura 14. (A) Cromatografia de camada fina
ilustrando os extratos orgânicos de sessenta cepas E. coli

suplementados com DMB-S-MMP. As identificações das cepas podem ser encontradas na Tabela 2. A placa de cromatografia TLC foi desenvolvida com 20% EA em hexano para separação de DMB-S-MMP (topo) e DMB-S-MPA (fundo). O ponto do meio é um
5 composto desconhecido. Em todas as cepas com exceção da #56, o DMB-S-MMP foi hidrolisado para DMB-S-MPA após 10 horas de incubação. A cepa Δ bioH não hidrolisou o DMB-S-MMP. (B) Confirmação dos resultados de cromatografia TLC com utilização de cromatografia HPLC. Não foi possível
10 detectar DMB-S-MPA no extrato de cepa Δ bioH. Os espectros foram obtidos a 234 nm.

Figura 15. (A) Cinética de Michaelis-Menten de BioH para DMB-S-MMP. Os resultados foram ponderados para três ensaios. Os valores k_{cat} e K_m são $260 \pm 45 \text{ seg}^{-1}$ e 229 ± 26
15 μM , respectivamente. O elevado valor de desvio padrão observado em concentrações elevadas de DMB-S-MMP pode ser devido à fraca solubilidade do substrato em tampão (50 mM de HEPES, pH 7,9, 10% DMSO). (B) Comparação de taxas de hidrólise para três diferentes tioésteres de
20 dimetilbutiril. As reações foram realizadas com 1 mM de tioéster e 10 nM de BioH.

Figura 16. (A) Comparação de taxas de crescimento e densidade celular final para BL21(DE3)/pAW31 ($\diamond$ cinzento) e YT2/pAW31 (sem biotina: $\circ$; com 0,15 mg/L de biotina: $\bullet$) em
25 mídia F1 mínima. As células foram cultivadas para OD600 ~ 0,5, induzidas com 100 μM de IPTG e deslocadas para um

agitador a 20° C durante 12 horas. A cepa YT2 de *ΔbioH* requer a adição de biotina exógena para manter um crescimento celular robusto em mídia sintética. (B) Comparação de conversão de sinvastatina em função de tempo (15 mM de MJ, 25 mM de DMB-S-MMP). YT2/pAW31 (○) é significativamente mais rápido que BL21(DE3)/pAW31 (●) (dados obtidos de Xie e outros, (2007) *Appl Environ Microbiol* 73: 2054-2060) para alcançar 99% de conversão. Ambas as cepas apresentaram uma fase de intervalo ("lag phase") após a adição do substrato (0 hora) e uma fase de intervalo perto da completação da reação. As velocidades de reação entre as fases de intervalo são lineares. A taxa de conversão para YT2/pAW31 (1,5 mM/hr) foi duas vezes mais rápida que a taxa de conversão para BL21(DE3) (0,75 mM/hr).

Figura 17. Análise de cromatografia HPLC (238 nm) de etapas de purificação de sinvastatina. O ácido de sinvastatina é lactonizado para sinvastatina anteriormente à injeção. Resultado a: extrato cru (extrato de células e caldo de cultura combinado) de YT2/pAW31 após completação da reação (99% de conversão de ácido de MJ para ácido de sinvastatina). O pico a 6,80 é o DMB-S-MMP; Resultado b: Amostra crua após lavagem com volume igual de hexano para remoção de DMB-S-MMP não reagido e precipitação; Resultado c: Sinvastatina purificada após lavagem com dH₂O e solubilização em ACN. O pequeno pico observado aos 6, 7 minutos é ácido de sinvastatina que não foi totalmente lactonizado (~ 1%).

Figura 18. As estruturas químicas de ácido de lovastatina, ácido de monacolina J e ácido de sinvastatina. A reação bio-catalítica estudada é a conversão enzimática de monacolina J para sinvastatina (seta cheia). A LovD é capaz de acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8. Dois processos semi-sintéticos de utilização comum são ilustrados com setas tracejadas.

Figura 19. Análise cinética de acilação catalisada por LovD de monacolina J para obtenção de sinvastatina com utilização de DMB-S-MMP como o tioéster de acila. O eixo de ordenadas (eixo-y) é expressado como conversão catalítica (V/Eo) (A) Cinética Michaelis-Menten de LovD como função de concentração de monacolina J, a uma concentração fixa de DMB-S-MMP de 2 mM. Não foi observada inibição de substrato. K_m (monacolina J) = $0,78 \pm 0,12$ mM. (B) Cinética Michaelis-Menten de LovD como função de concentração de DMB-S-MMP, com uma concentração fixa de monacolina J de 2 mM. K_m (DMB-S-MMP) = $0,67 \pm 0,04$ mM. Em ambos os ensaios, o valor k_{cat} é estimado em $0,66 \pm 0,03$ min⁻¹.

Figura 20. Fermentação de baixa densidade e bio-catálise. A cepa de E. coli BL21(DE3)/pAW31 expressando LovD durante a noite foi concentrada 10X para um valor final OD600 de 22. Os substratos monacolina J e DMB-S-MMP foram adicionados para um concentrado final de 15 e 40 mM, respectivamente. A conversão foi acompanhada como função de tempo por análise de cromatografia HPLC. (A) Resultados de análise de cromatografia HPLC do estudo de decurso de

tempo. Os picos marcados são 1: monacolina J (forma lactonizada); 2: DMB-S-MPA como resultado de hidrólise de DMB-S-MMP; 3: DMB-S-MMP; e 4: sinvastatina (forma lactonizada). (B) Conversão de monacolina J para sinvastatina em função do tempo. A conversão final às 24 horas foi de 99%. Os pontos de dados são valores ponderados de dois experimentos.

Figura 21. Fermentação de alta densidade e biocatálise. (A) Fermentação de lote alimentado (500 mL) com mídia F1 mínima. A um valor OD600 (círculos) de 5,93 (I), a temperatura da fermentação é reduzida para e mantida em RT. É adicionado IPPG para uma concentração final de 200 μ M e a alimentação é iniciada e mantida a 0,08 mL/min. As concentrações efetivas de LovD em diferentes pontos da fermentação são medidas (quadrados). (B) A taxa de conversão de monacolina J para sinvastatina por células em quatro diferentes pontos durante a fermentação (indicados por 1, 2, 3 e 4) na Figura 21A. As células são alternativamente feitas "repousar" mediante o deslocamento para 50 mM de HEPES, pH 7,9, ou "não repousar" sem alteração da mídia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As técnicas e procedimentos aqui descritos ou referidos são geralmente bem entendidos e de emprego comum com utilização de uma metodologia convencional por aqueles que são versados na técnica, tal como, por exemplo, as amplamente utilizadas metodologias de clonagem molecular

descritas por Ausubel e outros em *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995). Conforme apropriado, os procedimentos envolvendo utilização de kits e reagentes disponíveis comercialmente são
5 geralmente realizados de acordo com protocolos e/ou parâmetros definidos pelos fabricantes salvo indicação em contrário. Salvo quando definido de outra forma, todos os termos da técnica, notações e outra terminologia científica aqui utilizados deverão ter os significados normalmente
10 entendidos por aqueles que são versados na técnica à qual esta invenção pertence. Em alguns casos, termos com significados de entendimento comum são aqui definidos para maior clareza e/ou para pronta referência, e a inclusão dessas definições não deverá ser necessariamente
15 interpretada como representando uma diferença substancial relativamente ao que é geralmente entendido na técnica.

As definições de certos termos são fornecidas abaixo.

"Lovastatina" (Mevacor) é um policetídeo fúngico
20 produzido por *Aspergillus terreus* (vide, por exemplo, A. W. Alberts, J. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, 77, 3957-3961 e A. Endo, *J. Antibiot.* 1980, 33, 334-336; e J. K. Chan, e outros, *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 3334-3336; Y. Yoshizawa, e outros, *J. Am. Chem. Soc.* 1994,
25 116, 2693-2694). É um composto farmacologicamente importante devido a suas potentes atividades inibidoras de hidroximetilglutaril coenzima A reductase (HMGR), a etapa

de limitação de taxa de bio-síntese de colesterol, sendo portanto amplamente utilizada no tratamento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia, e similares. A lovastatina é igualmente referida como Mevacor.

5 "Sinvastatina" é um análogo de lovastatina. É preferida relativamente à lovastatina devido à ausência de efeitos colaterais adversos e sua elevada absorção no estômago. Além disso, foi relatado que a sinvastatina previne e reduz o risco de doença de Alzheimer (AD)

10 mediante retardo da produção de proteína β -amilóide Ab42 associada à AD. É conhecido na técnica que a sinvastatina pode ser preparada sinteticamente por metilação direta da cadeia lateral de 8'-metilbutirilóxi de lovastatina de

15 fórmula utilizando um haleto de metila na presença de uma base de amida metálica. A etapa de C-metilação tem que ser realizada em temperaturas extremamente baixas (-75 até -30°) com utilização de uma base forte sob condição anidra o que é difícil de realizar na produção em massa (vide, por exemplo, a patente norte-americana n° US 5.393.893, a

20 patente norte-americana n° US 4.582.915, a patente norte-americana n° US 5.763.646, a patente norte-americana n° US 5.763.653, a patente européia n° EP 299.656 e a Publicação de Patente Internacional n° WO 99/45003, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). Outros

25 métodos de produção sintética de sinvastatina são igualmente conhecidos na técnica. Por exemplo, a lovastatina pode ser hidrolisada com uma quantidade

excessiva de hidróxido de lítio para remoção da cadeia lateral de 2-metilbutiril e para simultaneamente abrir seu anel de lactona de 6 elementos para produção de um ácido de triol. O composto de ácido de triol pode então ser aquecido para obtenção de uma lactona de diol. O grupo hidróxi no anel de lactona da lactona de diol pode ser protegido para obtenção de um éter de terc-butildimetilsilil e em seguida o grupo hidróxi em C8 do sistema de anel de hexahidronaftaleno pode ser acilado com ácido 2,2-dimetilbutaônico na presença de diciclohexil carbodiimida, ou 2,2-dimetil cloreto para produção de um composto. O grupo protetor de t-butildimetilsilil do composto pode então ser removido na etapa final com utilização de fluoreto de tetrabutilamônio para produção de sinvastatina (vide, por exemplo, a patente norte-americana n° US 4.444.784, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência).

"Derivados de lovastatina" conforme aqui indicados compreendem derivados de lovastatina ou precursores, por exemplo, pravastatina, huvastatina, sinvastatina, ou tetraol de pravastatina hidrolisada. "Variantes de monacolina J" significa variantes de monacolina J divulgadas na técnica, por exemplo, tetraol de pravastatina hidrolisada ou 6-hidroxil-6-desmetilmonacolina J e similares. Em certas configurações da invenção "Variantes de monacolina J" refere-se a compostos de monacolina J com substituições na posição C6 na Figura 2. Na descrição de

compostos tais como sinvastatina, pravastatina, monacolina J e variantes, etc., aqueles que são versados na técnica poderão entender que esta linguagem pretende abranger estes compostos bem como os sais destes compostos (por exemplo, 5 sais farmaceuticamente aceitáveis conhecidos na técnica). Por exemplo, conforme é sabido na técnica, a sinvastatina pode ocorrer tanto em uma forma de ácido livre quanto na forma de sais de sódio, potássio ou amônio de sinvastatina, e outros sais derivados de elementos alcalinos terrosos ou 10 outros sais metálicos.

"*Aspergillus terreus*" ou "*A. terreus*" é um ascomiceto filamentoso normalmente encontrado no solo. São conhecidas na técnica várias cepas de *A. terreus*, por exemplo aquelas depositadas por exemplo com os números de 15 depósito ATCC 20542 e ATCC 20541.

Conforme é conhecido na técnica, os genes relacionados com a bio-síntese de metabólicos secundários de fungos filamentosos podem formar um agrupamento no genoma fúngico e são referidos como "agrupamentos 20 genéticos" ("*gene clusters*"). Por exemplo, um "agrupamento genético produtor de lovastatina" pode referir um grupo de genes que produzem lovastatina, o grupo de genes compreendendo, LovA, um P450I, LovC, uma deshidrogenase; LovD, uma esterase e aciltransferase; e LovF, um ScPKS ou 25 LDKS. Foi anteriormente determinado que cada um destes quatro genes (LovA, LovC, LovD, e LovF) é requerido para a síntese de lovastatina (vide, por exemplo, a patente norte-

americana nº US 6.943.017, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência). O LovF (gene de LDKS) é caracterizado como um gene de poliketídeo sintase. LovD é um gene semelhante a esterase putativa/carboxipeptidase. A

5 perturbação do gene LovF foi realizada anteriormente (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.943.017, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência). O LovD interage com LovF para produzir lovastatina; entretanto, a interação LovD-LovF não é necessária para

10 produção de sinvastatina. Adicionalmente, um outro gene no agrupamento de genes produtores de lovastatina é o LovE, que é um dedo de Zn que pode regular a transcrição dos outros genes. O agrupamento genético produtor de lovastatina compreende igualmente LovB (gene de NPKS).

15 "LDKS" ou "gene de LDKS" refere-se à proteína codificada pelo gene LovF, um membro do agrupamento de genes produtores de lovastatina. LDKS significa lovastatina dicetídeo sintase. LovF é o gene que produz LDKS. LovF é também o gene que produz proteína LovF. "Gene de LDKS"

20 também se refere ao gene que produz LDKS. Na síntese de lovastatina, a LDKS sintetiza a cadeia lateral de cinco unidades de carbono de monacolina J mediante condensação entre uma acetil-CoA e uma malonil-CoA. O dicetídeo condensado sofre metilação e conformação redutora pelos

25 domínios de LovF individuais para produzir como resultado um tioéster de α -S-metilbutiril ligado covalentemente à ramificação de fosfopanteteína nos domínios de proteína

transportadora de acila (ACP) do LovF.

“LovD aciltransferase” conforme é aqui utilizado refere-se a polipeptídeos tais como o polipeptídeo LovD de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) capazes de utilizar um tioéster de acila para acilar regioespecificamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J para produção de sinvastatina. Conforme é igualmente aqui divulgado, esta enzima LovD pode adicionalmente utilizar um tioéster de acila para acilar regioespecificamente o grupo hidroxila C8 de tetraol de pravastatina hidrolisada para produção de huvastatina.

As LovD aciltransferases incluem enzimas homólogas de LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) que podem ser encontradas por exemplo, mas não limitativamente, em agrupamentos genéticos de policetídeos fúngicos. Por exemplo, a técnica comprova que Mlc na via de bio-síntese de compactina catalisa a reação de transacilação idêntica (vide, por exemplo, Y. Abe, T. e outros, *Mol Genet Genomics*. 2002, 267, 636-646), ao passo que uma aciltransferase na via de squalostatina pode catalisar uma reação similar entre um tioéster de tetracetídeo com ligação a ACP e um aglicon (vide, por exemplo, R. J. Cox, F. e outros, *Chem Commun (Camb)* 2004, 20, 2260-2261). A sequência de aminoácidos de LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) assemelha-se às enzimas de β -lactamase tipo C, que catalisa a inativação hidrolítica da classe de β -lactama de

antibióticos (vide, por exemplo, E. Lobkovsky, E. M. e outros, *Biochemistry*, 1994, 33, 6762-6772 e A. Dubus, D. e outros, *Biochem. J.* 1993, 292, 537-543). O alinhamento do LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) com a P99 lactamase de *enterobacter cloacae* (vide, por exemplo, S. D. Goldberg, e outros, *Protein Sci.* 2003, 12, 1633-1645) demonstra uma moderada homologia de sequência, incluindo resíduos de sítios ativos potencialmente conservados, tais como os catalíticos Ser76, Lys79, Tyr188, e Lys315 (vide, por exemplo, S. D. Goldberg, e outros, *Protein Sci.* 2003, 12, 1633-1645).

As LovD aciltransferases podem igualmente referir-se tanto a enzimas obtidas por engenharia genética quanto enzimas de ocorrência natural que são relacionadas com o LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) em termos de sequência porém contendo leves diferenças de aminoácidos (por exemplo, mutações de substituição de 1-10 aminoácidos). A sinvastatina, por exemplo, pode ser produzida de enzimas de ocorrência natural que são similares ao LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo, SEQ ID NO: 1) em termos de sequência (por exemplo, a MlCH do agrupamento de compactina). "LovD aciltransferases" pode igualmente referir mutantes de LovD polipeptídeo de *A. terreus* (SEQ ID NO: 1). É conhecido na técnica que podem ser criados mutantes por técnicas convencionais de biologia molecular para produção, por exemplo, de mutantes de SEQ ID NO: 1 que aperfeiçoam eficiências catalíticas ou similares.

Por exemplo, os presentes requerentes utilizam atualmente abordagens racionais e orientadas para evolução para aperfeiçoamento das taxas de produção catalítica de LovD de *A. terreus*. Tipicamente esses mutantes apresentarão uma

5 similaridade de seqüência de 50%-99% relativamente à SEQ ID NO: 1. Neste contexto, a expressão "enzima homóloga de LovD" inclui um LovD polipeptídeo possuindo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:

10 1, em que o polipeptídeo tem capacidade para utilizar um tioéster de acila para acilar regioespecificamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J para produzir sinvastatina e/ou utilizar um tioéster de acila para acilar regioespecificamente o grupo hidroxila C8 de tetraol de

15 pravastatina hidrolisada para produção de huvastatina. Esses mutantes são prontamente produzidos e são então identificados em ensaios que observam a produção de um composto desejado tal como a sinvastatina (tipicamente utilizando LovD polipeptídeo de *A. terreus* (por exemplo,

20 SEQ ID NO: 1) como controle). Estes mutantes podem ser utilizados de acordo com os métodos da presente invenção para produção de sinvastatina ou huvastatina, por exemplo.

O termo "heterólogas" relacionado com seqüências de ácido nucléico tais como seqüências de codificação e

25 seqüências de controle indica seqüências que não são normalmente associadas com uma região de um constructo recombinante, e/ou não são normalmente associadas com uma

célula específica. Desta forma, uma região "heteróloga" de um constructo de ácido nucléico pode ser um segmento identificável de ácido nucléico contido ou acoplado a uma outra molécula de ácido nucléico que não é encontrado em associação com a outra molécula na natureza. Por exemplo, uma região heteróloga de um constructo pode incluir uma seqüência de codificação flanqueada por seqüências não encontradas em associação com a seqüência de codificação na natureza. Similarmente, uma célula hospedeira transformada com um constructo, que não se encontra normalmente presente na célula hospedeira, pode ser considerada heteróloga (vide, por exemplo, as patentes norte-americanas de números US 5.712.146, US 6.558.942, US 6.627.427, US 5.849.541, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). Por exemplo, um constructo com genes Lov pode ser isolado e expressado em células hospedeiras de fermentos ou fungos não produtores de lovastatina, e pode dessa forma ser produzida lovastatina (vide, por exemplo, as patentes norte americanas de números US 6.391.583 e US 6.943.017, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). Como outro exemplo, procariotos tais como bactérias podem igualmente ser células hospedeiras, conforme é conhecido na técnica. Os genes de fungos podem também ser clonados para um vetor de expressão para expressão em procariotos (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 5.849.541, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência).

Um procarioto tal como *E. coli* pode ser utilizado como hospedeiro heterólogo. Um plasmídeo pode ser construído com um gene de interesse e o plasmídeo pode ser transformado em *E. coli*. O gene de interesse pode ser traduzido ("translated") e a proteína derivada do gene de interesse pode ser subsequêntemente purificada. Este método de expressão e purificação de proteína é conhecido na técnica. Por exemplo, éxons de LovD de *A. terreus* podem ser individualmente amplificados do DNA genômico de *A. terreus* e ligados entre si ("spliced") para obtenção de uma fase de leitura aberta contínua utilizando PCR de extensão de sobreposição de ligação "splice". Podem ser introduzidos sítios de restrição, e a cassete genética pode ser ligada a um vetor para obtenção de um constructo de expressão que pode ser transformado em *E. coli*. Dessa forma, o *E. coli* pode ser utilizado como hospedeiro heterólogo para expressão de genes de *A. terreus*. O *E. coli* pode ser co-cultivado com uma outra cepa que produz um outro substrato de interesse. Adicionalmente, podem ser adicionados substratos a esta cultura ou co-cultura. A expressão heteróloga dos genes de bio-síntese de lovastatina é conhecida na técnica (vide, por exemplo, as patentes norte-americanas de números US 6.391.583 e US 6.943.017, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

Como outro exemplo, certos policetídeos, tais como policetídeos de fungos, ou outros organismos, podem ser expressados heterologamente em *E. coli*, fermento, e outros

organismos hospedeiros. Estes organismos hospedeiros podem ser suplementados com outros substratos, visto que podem requerer tanto a expressão heteróloga de um PKS desejado quanto as enzimas que produzem pelo menos algumas das moléculas de substrato requeridas pelo PKS (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 7.011.959, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência). Similarmente, genes de Lov de fungos podem ser expressados em *E. coli* ou outra bactéria, e estas bactérias hospedeiras podem ser suplementadas com outros substratos, tal como acila-SNAC ou outros grupos doadores de acila. Estes grupos doadores de acila podem ser permeáveis para células, e podem ingressar na célula bacteriana.

"Vetor de expressão" refere-se a um ácido nucléico que pode ser introduzido em uma célula hospedeira. Conforme é conhecido na técnica, um vetor de expressão pode ser mantido em uma célula de forma permanente ou transiente, alternativamente como parte do DNA cromossômico ou outro DNA na célula ou em qualquer compartimento celular, tal como um vetor de replicação no citoplasma. Um vetor de expressão também compreende um promotor que aciona a expressão de um RNA, que é tipicamente traduzido para um polipeptídeo na célula ou extrato celular. Por exemplo, promotores adequados para inclusão nos vetores de expressão de acordo com a invenção incluem aqueles que funcionam em células hospedeiras eucarióticas ou procarióticas. Os promotores podem compreender seqüências regulatórias que

permitem a regulação de expressão relativa ao crescimento da célula hospedeira ou que causam a ativação ou desativação da expressão de um gene em resposta a um estímulo químico ou físico. Para *E. coli* e certas outras

5 células hospedeiras bacterianas, os promotores derivados de genes para enzimas bio-sintéticas, enzimas que conferem resistência a antibióticos, e proteínas de fagos podem ser utilizados e incluem, por exemplo, os promotores de galactose, lactose (lac), maltose, triptofan (trp), beta-

10 lactamase (b/a), bacteriófago lambda PL, e T5. Adicionalmente, podem igualmente ser utilizados promotores sintéticos tais como o promotor tac (patente norte-americana nº US 4.551.433). Para vetores de expressão de *E. coli*, é útil incluir uma origem de replicação de *E. coli*,

15 tal como de pUC, p1P, p1I, e pBR. Para tradução eficiente de RNA para proteína, o vetor de expressão também contém tipicamente uma sequência de sítio de ligação de ribossomo posicionada a montante do códon de início da sequência de codificação do gene a ser expressado. Outros elementos,

20 tais como intensificadores, sequências de sinal de secreção, sequências de término de transcrição, e um ou mais genes marcadores mediante os quais as células hospedeiras contendo os vetores podem ser identificadas e/ou selecionadas, podem igualmente encontrar-se presentes

25 em um vetor de expressão. Os marcadores selecionáveis, isto é, genes que conferem sensibilidade ou resistência a antibióticos, podem ser utilizados e conferem um fenótipo

selecionável em células transformadas quando as células são cultivadas em uma mídia seletiva apropriada. Por exemplo, um vetor de expressão contendo o agrupamento genético Lov ou partes do mesmo pode ser introduzido em um hospedeiro heterólogo, tal como E. coli. Assim, os vetores de expressão recombinantes podem conter pelo menos um sistema de expressão, que por sua vez pode ser composto de pelo menos uma parte de seqüências de Lov e/ou outras seqüências de codificação genética bio-sintética operacionalmente ligadas a um promotor e opcionalmente seqüências de término que operam para efetuar a expressão da seqüência de codificação em células hospedeiras compatíveis.

Uma "seqüência de codificação" pode ser uma seqüência que "codifica" um gene específico, tal como um gene do agrupamento genético Lov, por exemplo. Uma seqüência de codificação é uma seqüência de ácido nucléico que é transcrita (no caso de DNA) e traduzida (no caso de mRNA) para um polipeptídeo in vitro ou in vivo quando sob controle de seqüências regulatórias apropriadas. Os limites da seqüência de codificação são determinados por um códon de início na terminação 5' (amino) e um códon de final de tradução na terminação 3' (carbóxi). Uma seqüência de término de transcrição será normalmente localizada em 3' para a seqüência de codificação.

As "seqüências de controle" de DNA referem coletivamente seqüências promotoras, sítios de ligação de ribossomos, sinais de poliadenilação, seqüências de término

de transcrição, domínios regulatórios de montante, intensificadores, e similares, que proporcionam coletivamente a transcrição e tradução de uma sequência de codificação em uma célula hospedeira.

5 "Ligado operacionalmente" refere-se a um arranjo de elementos em que os componentes assim descritos são configurados para realizarem sua função usual. Desta forma, as sequências de controle ligadas operacionalmente a uma sequência de codificação são capazes de efetuar a expressão
10 da sequência de codificação. Não é necessário que as sequências de controle sejam contíguas à sequência de codificação, desde que funcionem dirigindo a expressão das mesmas.

"Organismo produtor de lovastatina" refere-se a uma
15 ampla variedade de diferentes organismos conhecidos na técnica como produzindo lovastatina. Estes organismos que produzem lovastatina podem ser modificados para produção de sinvastatina de acordo com os métodos da presente invenção. *A. terreus* constitui um exemplo de um organismo produtor de
20 lovastatina. Microorganismos diversos de *A. terreus* que foram relatados como produtores de lovastatina (mevinolina) incluem espécies de *Monascus*, por exemplo, *M. ruber*, *M. purpureus*, *M. pilosus*, *M. vitreus*, *M. pubigerus*, bem como as espécies *Penicillium*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phorna*,
25 *Eupenicillium*, *Gymnoascus*, e *Trichoderma*, *Pichia labacensis*, *Candida cariosilognicola*, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium*

citrinum, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *Trichoderma viride* (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.391.583; e os trabalhos de Juzlova e outros, J. Ind. Microbiol. 16:163-170; Gunde-
 5 Cimerman e outros, FEMS Microbiol. Lett. 132:39-43 (1995); e Shindia e outros, Folio Microbiol. 42:477-480 (1977), cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

"Organismos não produtores de lovastatina",
 10 conforme a expressão é aqui utilizada, refere um número de organismos que não produzem lovastatina na ausência de manipulação humana (por exemplo, *E. coli*). Estes organismos podem ser induzidos a produzir LovD, ou podem ser cultivados na presença de LovD para produção de lovastatina
 15 ou sinvastatina pelos métodos da presente invenção, por exemplo.

"*A. terreus* possuindo uma perturbação no gene de LDKS" compreende um *A. terreus* sem o gene de LDKS, possuindo um gene de LDKS que sofreu mutação, possuindo um
 20 gene de LDKS inativado ("knocked-out"), possuindo um gene de LDKS deletado, possuindo um gene de LDKS cuja expressão foi perturbada, ou possuindo um gene de LDKS perturbado.
 "A. terreus possuindo uma perturbação no gene de LDKS" compreende um *A. terreus* possuindo um gene de LDKS que foi
 25 silenciado por métodos conhecidos na técnica. "A *terreus* possuindo uma perturbação no gene de LDKS" refere-se a um *A. terreus* que não pode produzir LDKS funcional. "A *terreus*

possuindo uma perturbação no gene de LDKS" pode igualmente referir-se a um *A. terreus* que produz LDKS funcional. O LDKS pode ser inativado ou inibido por métodos conhecidos na técnica tais como protocolos de inativação ("knock out")

5 de genes. A quantidade de LDKS presente pode ser reduzida por métodos conhecidos na técnica. Outros métodos de inibição, inativação, ou perturbação da proteína ou gene de LDKS incluem, sem limitações, "antisense", siRNA, RNAi ou interferência de RNA conforme é conhecido na técnica. "Gene

10 de LDKS", conforme é aqui utilizado pode igualmente referir-se ao gene de LovF. A perturbação do gene de LovF é conhecida na técnica (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.391.583, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência. "*A. terreus* possuindo uma

15 perturbação no gene de LDKS" é tipicamente um organismo geneticamente manipulado. A manipulação genética de *A. terreus* é conhecida na técnica. A perturbação genética dos genes de Lov em *A. terreus* foi realizada anteriormente (vide, por exemplo, as patentes norte-americanas de números

20 US 6.391.583 e US 6.943.017, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência). A perturbação específica do gene de LovF (produzindo LDKS) em *A. terreus* foi realizada anteriormente (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.943.017, cujo conteúdo é aqui

25 incorporado a título de referência). A perturbação do gene de LovF pode ocorrer por outros métodos conforme é conhecido na técnica. O *A. terreus* possuindo uma

perturbação no gene de LDKS pode encontrar-se em uma mistura de fermentação. Podem ser adicionados substratos à mistura de fermentação de um *A. terreus* possuindo uma perturbação no gene de LDKS para produção de análogos de
5 lovastatina.

"Um componente ou método para aumento da produção de sinvastatina" conforme é aqui utilizado refere-se a um composto ou substrato, sintético ou natural, que aumenta a produção de certos intermediários para aumentar a
10 quantidade de sinvastatina produzida para aumento de escala de síntese e síntese de larga escala de sinvastatina. Os componentes e métodos para aumento da produção de certos intermediários são conhecidos na técnica. Por exemplo, são conhecidos na técnica compostos que são adicionados à
15 mistura de fermentação para aumento da quantidade de intermediários, tal como monacolina J, na produção de lovastatina (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.943.017, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência). Alguns destes intermediários, tal como a
20 monacolina J, podem igualmente ser utilizados na produção de sinvastatina. Compostos para aumento da produção de monacolina J podem ser assim adicionados para aumentarem a produção de sinvastatina. Por exemplo, compostos para aumento da produção de monacolina J podem ser adicionados
25 diretamente à mistura de fermentação para aumento da quantidade de sinvastatina produzida. Um exemplo de um componente para aumento da produção de sinvastatina é um

clone contendo o segmento D4B do agrupamento de genes de produção de lovastatina que se encontra depositado com o número de acesso ATCC 98876. Este clone pode ser transformado em um organismo não produtor de lovastatina para produção de monacolina J conforme é conhecido na técnica. Este clone pode igualmente ser transformado em um organismo produtor de lovastatina para aumento da produção de monacolina J com conseqüente aumento da produção de sinvastatina. Adicionalmente, um outro exemplo de um componente para aumento da produção de sinvastatina é o gene de dedo-de-zinco/LovE, que pode ser transformado em um organismo produtor de lovastatina para aumento da produção de sinvastatina. Preferencialmente, este organismo produtor de lovastatina terá uma perturbação no gene de LDKS (vide, por exemplo, a patente norte-americana nº US 6.391.583, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência). Os componentes e métodos para aumento da produção de sinvastatina podem referir-se a muitos outros e não se encontram limitados aos exemplos listados acima.

Conforme é aqui divulgado, um "doador de acila" ou "transportador de acila" é um composto possuindo um grupo acila que pode ser transferido para sinvastatina e/ou um precursor de sinvastatina ou um composto associado. Tipicamente, "doador de acila" ou "transportador de acila" é um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J. Uma ampla variedade desses agentes são conhecidos na técnica sendo aqui adicionalmente

demonstrados como tendo esta atividade (vide, por exemplo, os tioésteres de acila ilustrativos na Tabela 1). Adicionalmente àqueles que são conhecidos na técnica e adicionalmente ilustrados pela presente divulgação como tendo esta atividade, qualquer potencial transportador/doador de acila conhecido na técnica (ou sintetizado de novo) possuindo uma capacidade para acilar C8 de monacolina J para produzir sinvastatina poderá ser facilmente identificado por experimentos comparativos com os doadores de acila aqui divulgados (por exemplo, acila-SNAC). Conforme é conhecido na técnica, um grupo acila pode ter a fórmula RCON; em que R pode ser uma alquila ou arila e N pode ser -Cl, -OOCR, -NH₂, -OR, ou similar. Compostos que possuem um grupo acila incluem, sem limitação, cloretos de ácidos, ésteres, amidas, ou anidridos e similares. Estes compostos podem ser alifáticos ou aromáticos, substituídos ou não substituídos. Exemplos dos mesmos incluem, sem limitações, cloreto de benzoíla, anidrido benzóico, benzamida, ou benzoato de etila, e similares. Outros exemplos de doadores de acila incluem, sem limitações, α -dimetilbutiril-SNAC, tioésteres de acila, acila-CoA, butiril-CoA, benzoil-CoA, acetoacetil-CoA, β -hidroxilbutiril-CoA, malonil-CoA, palmitoil-CoA, tioésteres de butirila, tioésteres de N-acetilcisteamina (SNAC), metil-tioglicolato (SMTG), benzoil-SNAC, benzoil-SMTG, ou α -S-metilbutiril-SNAC). Estes compostos podem ser produzidos naturalmente ou sinteticamente, e em alguns

casos podem penetrar a membrana celular. Alguns destes compostos podem ser adicionados a LovD na presença de monacolina J para produção de sinvastatina, por exemplo.

5 "Acila-SNAC" conforme é aqui utilizado refere-se a α -dimetilbutiril-SNAC. Conforme é conhecido na técnica, a acila-SNAC pode penetrar em membrana celular em condições in vivo. A LovD pode utilizar acila-SNAC como substrato para iniciar a reação de monacolina J para sinvastatina para acilar regioespecificamente o grupo hidroxila C8 da
10 monacolina J. A acila-SNAC pode doar seu grupo acila para a LovD.

CONFIGURAÇÕES TÍPICAS DA INVENÇÃO

Aqueles que são versados na técnica poderão entender que a divulgação aqui proporcionada permite que
15 pessoas versadas na técnica produzam uma ampla variedade de configurações da invenção. Uma configuração típica da invenção consiste em um método de produção de sinvastatina mediante combinação mútua de monacolina J; um tioéster de acila doador de uma fração acila para o grupo hidroxila C8
20 de monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; deixando-se subsequente a LovD aciltransferase utilizar um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J; sendo dessa forma produzida sinvastatina.
25 Em configurações ilustrativas da invenção, a LovD aciltransferase tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. Uma configuração associada da

invenção consiste em um método de produção de sinvastatina compreendendo as etapas de combinação mútua de lovastatina; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 de monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase. Neste método associado, a LovD aciltransferase é então deixada hidrolisar lovastatina para monacolina J; e subsequente utilizar um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J; sendo dessa forma produzida sinvastatina. Em certas configurações, a sinvastatina é produzida in vitro na ausência de um organismo isolado.

Em algumas configurações da invenção, a monacolina J; o tioéster de acila e a LovD aciltransferase são combinados em uma mídia de fermentação na presença de um organismo isolado que produz a LovD aciltransferase e em que adicionalmente o organismo é *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus*, *Monascus pubigerus*, *Candida cariosilognicola*, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*. Opcionalmente, o organismo isolado é *Aspergillus terreus* que expressa polipeptídeo de LovD de SEQ ID NO: 1. Em certas configurações, o *Aspergillus terreus* não expressa polipeptídeo de LovF de SEQ ID NO: 3. Em certas configurações da invenção, os polipeptídeos de

expressão tais como aqueles das SEQ ID NOs: 3 e 4 são reduzidos para pelo menos 90, 95, ou 99% de sua atividade endógena. Alternativamente, o organismo pode consistir em *Escherichia coli* que expressa polipeptídeo de LovD de SEQ ID NO: 1. Em certas configurações, a *Escherichia coli* não expressa polipeptídeo bioH de SEQ ID NO: 4. Conseqüentemente, o hospedeiro pode alternativamente ser um hospedeiro que produz uma LovD aciltransferase endogenamente ou alternativamente um hospedeiro heterólogo em que o gene de LovD aciltransferase foi introduzido no organismo, por exemplo, através de uma tecnologia de clonagem conhecida na técnica e aqui adicionalmente discutida. em uma configuração típica, o hospedeiro heterólogo que expressa LovD aciltransferase é uma bactéria, um fermento, ou um fungo conhecido na técnica como sendo útil para tais propósitos.

Conforme é discutido mais detalhadamente abaixo, o organismo isolado pode ser cultivado em uma de uma variedade de condições de fermentação conhecidas na técnica, e as condições exatas são selecionadas, por exemplo, com base em parâmetros de fermentação associados a um crescimento otimizado de um organismo específico utilizado em uma configuração da invenção (vide, por exemplo, Miyake e outros, Biosci. Biotechnol. Biochem., 70(5): 1154-1159 (2006) e Hajjaj e outros, Applied and Environmental Microbiology, 67: 2596-2602 (2001), cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

Tipicamente, o organismo é cultivado a uma temperatura entre 30-40° C, durante um período de tempo de entre pelo menos 4 até pelo menos 48 horas. Tipicamente, os organismos são cultivados com um pH entre 6,5-8,5. Em certas
5 configurações da invenção, o pH da mídia de fermentação pode ser 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0 ou 8,1. Em configurações ilustrativas, o organismo é cultivado em uma mídia de fermentação compreendendo mídia LB, F1 ou TB.

10 Opcionalmente, a monacolina J que é combinada com os outros constituintes nos métodos de acordo com a invenção é produzida por um organismo isolado dentro da mídia de fermentação, por exemplo, um dos organismos listados acima que também produz a LovD aciltransferase.
15 Alternativamente, a monacolina J que é combinada com os outros constituintes nos métodos de acordo com a invenção é produzida por um organismo diferente que produz este composto que é adicionado à mídia de fermentação e cultivado juntamente com o organismo que produz a LovD
20 aciltransferase. Em uma outra configuração da invenção, a monacolina J é derivada de uma fonte exógena e é adicionada à mistura de fermentação. Opcionalmente, o método de acordo com a invenção produz uma composição de matéria compreendendo 0%-1% da monacolina J que foi inicialmente
25 adicionada à combinação. Em certas configurações da invenção, o método produz como resultado uma conversão para sinvastatina de pelo menos 95% da monacolina J adicionada à

combinação.

Em configurações típicas da invenção, o tioéster de acila que pode doar uma fração acila para o grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase é derivado de uma fonte exógena (por exemplo, um processo de síntese química) e é adicionado à mistura de fermentação. São aqui divulgados uma variedade desses tioésteres de acila. Tipicamente, o tioéster de acila é um tioéster de butirlila, um tioéster de M-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato. Opcionalmente, o tioéster de acila compreende frações de grupo acila de extensão de cadeia média (C3-C6). Em certas configurações da invenção, o tioéster de acila é capaz de cruzar as membranas celulares de células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas em uma mídia de fermentação. Tipicamente, o tioéster de acila é selecionado do grupo que consiste em α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB). Em uma configuração ilustrativa, o tioéster de acila é um α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato que é combinado em mídia de fermentação em uma faixa de concentração de 1 mM-100 mM.

Certas configurações dos métodos para produção de sinvastatina incluem adicionalmente etapas para purificação de sinvastatina pela combinação. Por exemplo, algumas

configurações da invenção incluem pelo menos uma etapa de purificação compreendendo lise de células de um organismo isolado presente na combinação. As configurações podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo 5 centrifugação de células ou lisados de células de um organismo isolado presente na combinação. As configurações podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo precipitação de um ou mais compostos presentes na combinação. As configurações podem incluir 10 pelo menos uma etapa de purificação compreendendo filtração de um ou mais compostos presentes na combinação. As configurações podem incluir pelo menos uma etapa de purificação compreendendo uma análise de cromatografia líquida de alto desempenho ("High Performance Liquid 15 Chromatography" - HPLC) de um ou mais compostos presentes na combinação.

A divulgação aqui provida ilustra que uma variedade de permutações destes métodos podem ser utilizadas para produção de sinvastatina e huvastatina e similares. Em 20 certas configurações da invenção, por exemplo, o organismo hospedeiro produz o tioéster de acila e/ou a monacolina J. Alternativamente, o tioéster de acila e/ou a monacolina J é/são adicionados ao organismo como parte do processo para produção de sinvastatina. Os métodos podem compreender 25 adicionalmente a adição de um vetor de expressão possuindo um ou mais genes de *A terreus* que são conhecidos como facilitadores da produção de sinvastatina e/ou huvastatina

ou similares, tais como os genes que codificam a SEQ ID NO: 1 ou a SEQ ID NO: 2 e transformação do mesmo em um hospedeiro heterólogo, em que o polipeptídeo com atividade aciltransferase é assim expressado. Em uma outra
5 configuração, a monacolina J pode ser produzida de um hospedeiro heterólogo.

Uma outra configuração da invenção consiste em um método de produção de sinvastatina a partir de monacolina J em um organismo que expressa um gene de LovD
10 aciltransferase compreendendo a co-cultura deste primeiro organismo que expressa a LovD aciltransferase com um segundo organismo (por exemplo, em uma mistura de fermentação) que produz o tioéster de acila e/ou a monacolina J, em que o tioéster de acila interage com o
15 produto de gene de LovD aciltransferase na presença de monacolina J para produção de sinvastatina. Opcionalmente, o primeiro organismo é um organismo que não produz lovastatina naturalmente (por exemplo, *E. coli* transduzido com o gene de LovD aciltransferase). Alternativamente, o
20 primeiro organismo é um organismo produtor de lovastatina tal como *A. terreus* (por exemplo, *A. terreus* possuindo um gene de LDKS/LovF inativado). O método pode compreender adicionalmente a adição de um ou mais componentes exógenos à mistura de fermentação para aumentar a produção de
25 precursores de sinvastatina tal como monacolina J para dessa forma aumentar a produção de sinvastatina.

Os métodos de acordo com a invenção podem

adicionalmente compreender a adição de componentes adicionais à mistura de fermentação para aumentar a produção de monacolina J e para dessa forma aumentar a produção de sinvastatina e/ou huvastatina. Como uma
5 configuração ilustrativa deste método, o componente pode ser um clone com o gene de LovE, em que o organismo é transformado com o clone e a LovE é traduzida e dessa forma a produção de sinvastatina é aumentada. Como outra configuração ilustrativa deste método, o componente pode
10 ser um clone contendo o segmento D4B do genoma de *A. terreus* (número de acesso ATCC 98876), em que o organismo é transformado com o clone para dessa forma ser aumentada a produção de monacolina J.

Uma outra configuração ainda da invenção consiste
15 em um método para conversão de monacolina J em sinvastatina in vitro ou in vivo na presença de um tioéster de acila exógeno. Preferencialmente, o tioéster de acila é capaz de penetrar a membrana celular. Uma outra configuração ainda da invenção consiste em um método de conversão de
20 monacolina J em sinvastatina diretamente dentro do organismo na presença do tioéster de acila em que o organismo produz LovD. Em uma configuração ilustrativa da invenção, o organismo é um *A. terreus* possuindo um gene LDKS perturbado.

25 Uma outra configuração ainda da invenção consiste em um produto de sinvastatina obtido por um processo que compreende as etapas de combinação entre si de monacolina

J; um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; permitindo-se que a LovD aciltransferase utilize um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J para produção do produto de sinvastatina. Uma configuração associada da invenção consiste em um produto de huvastatina produzido por um processo que compreende as etapas de combinação entre si de tetraol de pravastatina hidrolisada; um tioéster de acila doador de uma fração acila ao grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; e permitindo-se que a LovD aciltransferase utilize um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada; sendo dessa forma obtido o produto de huvastatina.

Uma outra configuração da invenção consiste em um método de produção de sinvastatina compreendendo a hidrólise de lovastatina para monacolina J na presença de LovD de SEQ ID NO: 1 ou homólogo de LovD e acilação da monacolina J, em que as referidas hidrólise e acilação produzem sinvastatina. Uma outra configuração associada da invenção consiste em um método de produção de huvastatina compreendendo pravastatina para pravastatina hidrolisada na presença de LovD de SEQ ID NO: 1 ou um homólogo de LovD e acilação de uma variante de monacolina J, em que as

referidas hidrólise e acilação produzem huvastatina.

As configurações da invenção incluem composições de matéria utilizadas para produção ou feitas pelos processos aqui divulgados. Por exemplo, uma configuração da invenção

5 consiste em uma composição de matéria compreendendo monacolina J; um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase. Certas configurações destas composições de matéria compreendem adicionalmente LovD aciltransferase.

10 Certas configurações destas composições de matéria compreendem adicionalmente sinvastatina. Opcionalmente, a composição compreende adicionalmente um organismo isolado tal como *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus*

15 *vitreus*, *Monascus pubigerus*, *Candida cariosilognicola*, *Aspergillus oryzea*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*. Em configurações típicas, o organismo na composição é

20 *Aspergillus terreus* ou *Escherichia coli* que expressa polipeptídeo de LovD de SEQ ID NO: 1. Em uma outra configuração da invenção o organismo é *Aspergillus terreus* que não expressa polipeptídeo de LovF de SEQ ID NO: 3. Em uma outra configuração da invenção o organismo é

25 *Escherichia coli* que não expressa polipeptídeo bioH de SEQ ID NO: 4. Em certas configurações da invenção, o organismo isolado dentro da composição foi transduzido com um vetor

de expressão codificando polipeptídeo LovD de *Aspergillus terreus* de SEQ ID NO: 1.

É aqui divulgada uma variedade de tioésteres de acila que podem ser utilizados nas composições da invenção.

5 Tipicamente, o tioéster de acila é um butiril-tioéster, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato. Opcionalmente, o tioéster de acila compreende frações de grupo acila de extensão de cadeia média (C3-C6). Em certas configurações da invenção, o tioéster de acila é

10 capaz de cruzar as membranas celulares de células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas dentro de uma mídia de fermentação. Tipicamente, o tioéster de acila é selecionado do grupo que consiste em α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP),

15 dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB). Em uma configuração ilustrativa, o tioéster de acila é um α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato que é combinado

20 em mídia de fermentação em uma faixa de concentração de 1 mM-100 mM e pode ser tipicamente de cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 mM. Em algumas configurações da invenção, a composição compreende adicionalmente lovastatina e a quantidade de sinvastatina na composição é

25 superior à quantidade de lovastatina na composição.

Conforme se encontra discutido detalhadamente abaixo, os métodos e materiais da invenção que são

utilizados para produção de sinvastatina podem ser adaptados para produção de compostos que são estruturalmente similares à sinvastatina, por exemplo huvastatina. Neste contexto, uma configuração da invenção

5 consiste em um método de produção de huvastatina compreendendo as etapas de combinação mútua de tetraol de pravastatina hidrolisada; um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada na presença de LovD

10 aciltransferase; e LovD aciltransferase; permitindo-se subsequente que a LovD aciltransferase utilize um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada, sendo assim obtida huvastatina.

15 Uma configuração associada da invenção consiste em uma composição de matéria compreendendo: tetraol de pravastatina hidrolisada; um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 do tetraol de pravastatina hidrolisada na presença de LovD

20 aciltransferase; LovD aciltransferase; e huvastatina.

Uma outra configuração ainda da invenção consiste em uma composição de matéria compreendendo um ou mais dos precursores de huvastatina, por exemplo, tetraol de pravastatina hidrolisada ou 6-hidroxil-6-desmetilmonacolina

25 J na presença de tioéster selecionado por sua capacidade para acilar o grupo hidroxila C8 da monacolina J ou uma variante de monacolina J tal como tetraol de pravastatina

hidrolisada. Tipicamente, essas composições podem incluir adicionalmente um organismo conforme discutido acima. Conseqüentemente, as configurações da invenção incluem processos para produção de composições de matéria de
5 sinvastatina ou huvastatina substancialmente conforme aqui divulgados e exemplificados.

Em situações em que um organismo modificado que produz sinvastatina (por exemplo, *A. terreus* com uma perturbação no gene de LDKS) também produz lovastatina (por
10 exemplo, alguma quantidade residual mínima), os métodos e materiais aqui divulgados permitem a manipulação de processos/vias bioquímicas no organismo de tal forma que a sinvastatina ou um composto associado tal como huvastatina seja o produto dominante nestas vias. Uma configuração
15 associada consiste em uma composição de matéria compreendendo um organismo e sinvastatina e/ou huvastatina produzida(s) por esse organismo, em que a quantidade de sinvastatina e/ou huvastatina na composição é superior à quantidade de lovastatina na composição.

20 Uma configuração associada da invenção consiste em uma composição de matéria compreendendo LovD, pravastatina hidrolisada, e um tioéster de acila. Em configurações ilustrativas, a composição de matéria compreende um *E coli* que produz huvastatina. Em configurações associadas, a
25 composição de matéria consiste em um *A. terreus* (por exemplo, *A. terreus* com uma perturbação no gene de LDKS) que produz huvastatina. Em situações em que um organismo

modificado que produz huvastatina (por exemplo, *A. terreus* com uma perturbação no gene de LDKS) também produz lovastatina (por exemplo, alguma quantidade residual mínima), os métodos e materiais aqui divulgados permitem a
5 manipulação de processos/vias bioquímicas no organismo de tal forma que a huvastatina seja o produto dominante nestas vias. Uma configuração associada consiste em uma composição de matéria compreendendo um organismo e huvastatina produzida por esse organismo, em que a quantidade de
10 huvastatina na composição é superior à quantidade de lovastatina na composição

Em certas configurações da invenção, componentes e/ou etapas metodológicas adicionais podem ser combinados com um ou mais dos métodos ou materiais discutidos acima.
15 Por exemplo, os métodos podem compreender adicionalmente a utilização de fermentação de alta densidade celular para aumentar a concentração efetiva de LovD aciltransferase e otimizar as condições de fermentação e/ou aumentar as eficiências catalíticas de LovD aciltransferase para o(s)
20 um ou mais tioésteres de acila através de engenharia de proteína. Muitos outros componentes ou métodos podem ser utilizados para aumento da produção de sinvastatina ou de um composto intermediário que facilita a produção de sinvastatina.

25 Conforme foi observado acima, a produção de lovastatina (que requer atividade de LovD aciltransferase) é observada em vários organismos tais como *Aspergillus*

terreus, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus*, *Monascus pubigerus*, *Candida cariosilognicola*, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*,
5 *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*. Tendo em vista a natureza da invenção aqui divulgada, mediante utilização de métodos e materiais conhecidos em combinação com a divulgação aqui provida, uma pessoa versada na técnica pode combinar uma cultura de um
10 ou mais destes organismos (ou qualquer outro organismo conhecido como produzindo lovastatina) com monacolina J e tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 de monacolina J na presença de LovD aciltransferase (por exemplo, α -dimetilbutiril-SNAC) para
15 utilizar LovD aciltransferase para produção de sinvastatina. Conforme é ilustrado pela presente divulgação, por exemplo, a natureza da presente invenção permite produzir sinvastatina e compostos associados na ampla variedade de organismos produtores de lovastatina
20 conhecidos na técnica, sem nenhum conhecimento específico relativo às características da LovD aciltransferase específica expressada nestes organismos.

Em um procedimento ilustrativo para produção de sinvastatina em um novo organismo (por exemplo, uma espécie
25 de fungo relacionada com *A. terreus*) e/ou para teste do organismo quanto a sua capacidade para tal, uma primeira etapa consiste em fazer uma mistura de monacolina J e

tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J. Em uma segunda etapa, a mistura é então combinada com o organismo (por exemplo, um organismo produtor de lovastatina) em uma mistura de fermentação e deixada em cultura. Em uma terceira etapa, a mistura é testada quanto à presença de sinvastatina, por exemplo, mediante utilização de uma análise de cromatografia HPLC conforme se encontra discutido nos exemplos abaixo. Tendo em vista as metodologias de triagem de alto rendimento conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kittel e outros, *Metab. Eng.* 2005; 7(1): 53-58, aqui incorporado a título de referência), esses métodos podem ser realizados em um grande número de amostras de teste tal como o imenso número de culturas de fungos conhecidas na técnica e prontamente disponíveis para uma pessoa versada na técnica para uma fácil determinação de onde e quais espécies de organismos expressam polipeptídeos que possuem uma atividade de LovD aciltransferase que permite a utilização dos mesmos nas configurações da invenção aqui divulgadas.

Os métodos aqui divulgados também permitem que pessoas versadas na técnica isolem e clonem configurações adicionais de LovD aciltransferase, por exemplo, as combinações que podem ter qualidades desejáveis adicionais tais como maior estabilidade em diversas condições de reação e/ou características cinéticas enzimáticas favoráveis em diversas condições de reação. Neste contexto,

uma outra configuração da invenção consiste em um método para identificação de configurações adicionais de LovD aciltransferase de acordo com a invenção, em que o método compreende as simples etapas de combinação de um organismo com probabilidade de expressar LovD aciltransferase (por exemplo, um organismo produtor de lovastatina) ou um extrato celular desse organismo com um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase (por exemplo, α -dimetilbutiril-SNAC) e subsequente teste desta combinação quanto à presença de sinvastatina. A presença de sinvastatina indica a presença da atividade desejada de LovD aciltransferase. Tendo em vista os métodos aqui divulgados bem como as metodologias de triagem de alto rendimento conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Kittel e outros, Metab. Eng. 2005; 7(1): 53-58, aqui incorporado a título de referência), esses métodos podem ser realizados em um grande número de amostras de teste tal como o imenso número de culturas de fungos conhecidas na técnica e prontamente disponíveis para uma pessoa versada na técnica (por exemplo, culturas produtoras de lovastatina) com somente uma quantidade mínima de experimentação. Conseqüentemente, o grande número de organismos produtores de lovastatina conhecidos na técnica, as metodologias de triagem de alto rendimento conhecidas nesta técnica e a presente divulgação guiam um técnico para permitir que o mesmo determine facilmente onde e quais espécies de

polipeptídeos possuem uma atividade de LovD aciltransferase que permite a utilização dos mesmos nas combinações da invenção aqui divulgadas.

Após a atividade de LovD aciltransferase ter sido observada com utilização destes métodos, podem então ser utilizados na técnica métodos para clonagem do gene que codifica a proteína que tem esta atividade. Alternativamente, uma biblioteca nos genes de um organismo pode ser criada com utilização de uma sequência de polinucleotídeos de LovD aciltransferase (por exemplo, de *A. terreus*) seja isoladamente, seja em combinação com estudos funcionais conforme discutidos acima para identificação de uma nova sequência de polinucleotídeos de LovD aciltransferase com homologia relativamente à SEQ ID NO: 1 ou à SEQ ID NO: 2). Neste contexto, as enzimas homólogas para LovD podem ser encontradas, por exemplo, mas não limitativamente, em agrupamentos de genes de policetídeos fúngicos. Por exemplo, a Mlc na via de biosíntese de compactina está implicada na catálise da reação de transacilação idêntica (vide, por exemplo, Y. Abe, T. e outros, *Mol Genet Genomics*. 2002, 267, 636-646), ao passo que uma aciltransferase na via de squalostatina pode catalisar uma reação similar entre um tioéster de tetracetídeo ligado a ACP e um aglicon (vide, por exemplo, R. J. Cox, F. e outros, *Chem Commun (Camb)* 2004, 20, 2260-2261). A sequência de aminoácidos de LovD assemelha-se às enzimas de β -lactamase de tipo C, que catalisam a

inativação hidrolítica da classe de antibióticos de β -lactama (vide, por exemplo, E. Lobkovsky, E. M. e outros, *Biochemistry*, 1994, 33, 6762-6772 e A. Dubus, D. e outros, *Biochem. J.* 1993, 292, 537-543). O alinhamento de LovD com a lactamase P99 de *enterobacter cloacae* (vide, por exemplo, S. D. Goldberg e outros, *Protein Sci.* 2003, 12, 1633-1645) apresenta uma homologia moderada de sequência, incluindo resíduos de sítios ativos potencialmente conservados, tais como os catalíticos Ser76, Lys79, Tyr188, e Lys315 (vide, por exemplo, S. D. Goldberg e outros, *Protein Sci.* 2003, 12, 1633-1645). Tendo em vista estes métodos, uma outra configuração ainda da invenção consiste em um polipeptídeo de LovD aciltransferase isolado possuindo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 1, em que o polipeptídeo tem capacidade para acilar o grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de um doador de tioéster de acila apropriado (por exemplo, α -dimetilbutiril-SNAC).

Conforme é aqui divulgado, um "tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J" é um composto possuindo um grupo acila que pode ser transferido para monacolina J ou um composto associado para produção de sinvastatina ou um composto associado conforme aqui divulgado. É conhecida na técnica uma ampla variedade desses agentes que são aqui adicionalmente aqui apresentados como tendo esta atividade

(vide, por exemplo, os tioésteres de acila ilustrativos da Tabela 1). Adicionalmente àqueles conhecidos na técnica e adicionalmente ilustrados pela presente divulgação como tendo esta atividade, qualquer potencial

5 transportador/doador de acila conhecido na técnica (ou sintetizado de novo) que tenha adicionalmente uma capacidade para acilar C8 de monacolina J para produção de sinvastatina poderá ser facilmente identificado por experimentos comparativos com os doadores de acila aqui

10 divulgados (por exemplo, acila-SNAC). Tipicamente nesses experimentos, o tioéster de acila é um tioéster de butirlila, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato. Opcionalmente, o tioéster de acila compreende frações de grupo acila de extensão de cadeia

15 média (C3-C6). Em certas configurações da invenção, o tioéster de acila é capaz de transpor as membranas celulares de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivados em uma mídia de fermentação. Tipicamente, o tioéster de acila é selecionado do grupo que consiste em α -

20 dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB).

Conforme é demonstrado pela presente divulgação, a

25 natureza da presente invenção permite que um técnico identifique prontamente um composto como um "tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8

de monacolina J'' com um mínimo de experimentação. Em um procedimento ilustrativo para identificação de um composto como um "tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo hidroxila C8 de monacolina J'', uma primeira etapa
5 consiste na obtenção de uma mistura de monacolina J e *A. terreus*. Em uma segunda etapa, esta mistura é então combinada com um composto de teste em uma mistura de fermentação e é deixada em cultura. Em uma terceira etapa a mistura é então testada quanto à presença de sinvastatina,
10 por exemplo mediante utilização de uma análise de cromatografia HPLC conforme se discute nos exemplos abaixo, em que a presença de sinvastatina identifica o composto como tendo esta atividade. Tendo em vista as metodologias de triagem de alto rendimento conhecidas na técnica (vide,
15 por exemplo, Kittel e outros, *Metab. Eng.* 2005, 7(1): 53-58, aqui incorporado a título de referência), esses métodos podem ser realizados em um grande número de amostras de teste para determinar facilmente onde e quais espécies de compostos doadores de acila possuem uma utilidade que
20 permite a utilização dos mesmos nas configurações da invenção aqui divulgadas.

As configurações da invenção também incluem artigos de manufatura e/ou kits destinados a facilitarem os métodos da invenção. Tipicamente esses kits incluem instruções para
25 utilização dos elementos contidos nos mesmos de acordo com os métodos da presente invenção. Esses kits podem compreender um meio transportador dividido em

compartimentos para acolher em confinamento um ou mais meios recipientes tais como frascos, tubos, e similares, cada um dos meios recipientes compreendendo um dos elementos separados a serem utilizados no método. Por exemplo, um dos recipientes pode compreender um frasco, por exemplo, contendo *A. terreus* possuindo uma perturbação no gene de LDKS e um outro frasco contendo um composto acila-SNAC ou similar, em que ambos podem ser adicionados a uma mistura de fermentação para produção de sinvastatina.

10 Em uma configuração típica da invenção, é provido um artigo de manufatura contendo materiais úteis para produção de sinvastatina. O artigo de manufatura compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, e tubos
15 de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente pode conter uma composição de matéria (por exemplo, um transportador de acila e um organismo) que pode produzir sinvastatina, por exemplo. O rótulo no recipiente
20 ou associado ao mesmo indica que a composição é utilizada para exame de polipeptídeos celulares. O artigo de manufatura pode compreender adicionalmente um segundo recipiente compreendendo um outro composto ou substrato para adição à mistura de fermentação, por exemplo. Este
25 composto ou substrato, por exemplo, poderá ser utilizado para aumentar a produção de certos intermediários na produção de sinvastatina, tal como monacolina J. Ele pode

incluir adicionalmente outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do ponto de vista do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e insertos de embalagem com instruções de
5 utilização.

Aspectos biológicos adicionais da invenção são discutidos nas seções a seguir.

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE CONFIGURAÇÕES DA INVENÇÃO

Uma apreciação de certos aspectos da invenção será
10 facilitada por uma discussão de aspectos bioquímicos da invenção. Nas seções a seguir e nos exemplos do relatório descritivo, a LovD aciltransferase é o polipeptídeo de LovD de *A. terreus* ilustrado na SEQ ID NO: 1, sendo tipicamente referida como "LovD" ou a "enzima de LovD".

15 A promiscuidade da enzima de LovD para doadores de acila alternativos foi examinada. Os presentes requerentes descobriram que não é necessário que o doador/transportador de acila se encontre acoplado à LDKS. Transportadores alternativos contendo tiol são adequados, incluindo acila-
20 CoA (coenzima A) e mais importantemente, a acila-SNAC permeável em membrana (Figura 7). Os presentes requerentes descobriram que não é necessário que a LovD interaja com a LovF e que a mesma pode aceitar um grupo acila de uma variedade de diferentes doadores. Também foi descoberto que
25 a LovD pode transferir uma variedade de substratos de acila para o grupo hidroxila C8 da monacolina J para produção de uma variedade de análogos de lovastatina. Os presentes

requerentes descobriram que a LovD pode acilar regioseletivamente a posição hidroxila C8 na monacolina J com uma variedade de substratos de acila. Entre os grupos acila que obtêm êxito encontra-se a α -dimetilbutiril-SNAC, que produz sinvastatina na presença de LovD e monacolina J. Os presentes requerentes também descobriram que a atividade de transacilação de LovD pode ser confirmada in vitro e pode ser reconstituída em um hospedeiro heterólogo. Os presentes requerentes descobriram que a LovD acila diretamente a monacolina J com um α -dimetilbutirato produzindo a farmacologicamente importante sinvastatina. A α -dimetilbutiril-SNAC é permeável em células. As propriedades de permeabilidade celular da α -dimetilbutiril-SNAC possuem uma importante implicação: o composto pode ser fornecido como precursor in vivo para um organismo, tal como um procarioto ou um eucarioto, expressando LovD. O procarioto ou eucarioto, quando fermentado na presença de monacolina J (seja produzido endogenamente ou fornecido exogenamente à mídia de fermentação) pode proporcionar diretamente sinvastatina. O *E. coli*, por exemplo, foi examinado como hospedeiro microbiano para a bio-conversão de monacolina J para sinvastatina. Tanto monacolina J quanto dimetilbutiril-SNAC foram adicionados a uma cultura de uma cepa de *E. coli* sobre-expressando a enzima LovD (Figura 10). A sinvastatina foi isolada do caldo de fermentação da cultura em bom rendimento de produção. Esta técnica pode ser utilizada no produtor de lovastatina

nativa *Aspergillus terreus*. Pode ser construída uma cepa deficiente em LDKS para não ser capaz de sintetizar a cadeia lateral de 2-metilbutirato. A α -dimetilbutiril-SNAC pode ser adicionada à mídia de fermentação. A sinvastatina
5 pode ser sintetizada durante esta fermentação de etapa única.

Conforme foi observado acima, a LovD pode catalisar a etapa final de transferência de acila durante a biosíntese de lovastatina e pode acilar regioespecificamente o
10 grupo hidroxila C8 na monacolina J. A LovD pode apresentar uma ampla especificidade de substrato para o aglicon de decalina, o transportador de acila, é o grupo acila. Quando suplementada com o substrato não natural de α -dimetilbutiril-SNAC, a LovD pode produzir a
15 farmaceuticamente importante sinvastatina tanto in vitro quanto in vivo. Quando o precursor de α -dimetilbutiril-tioéster é fornecido a uma cepa de *A. terreus* deficiente em LovF, a via de biosíntese de lovastatina pode ser redirecionada para produzir diretamente sinvastatina. A
20 presente invenção permite: 1) Conversão microbiana de monacolina J em sinvastatina (Figura 10); 2) Co-cultura da cepa de sobre-expressão de LovD com uma cepa que produz monacolina J; e 3) Fermentação de etapa única de *Aspergillus terreus* (Δ LDKS) para obtenção de sinvastatina.
25 Em cada caso, o substrato de acila α -dimetilbutiril-SNAC pode ser sintetizado quimicamente e ser adicionado ao caldo de fermentação.

NÃO É NECESSÁRIO QUE A LOVD INTERAJA COM A LOVF, E A LOVD PODE CATALISAR A REAÇÃO DE TRANSACILAÇÃO DE ACILA-COA E OUTROS TRANSPORTADORES ALTERNATIVOS CONTENDO TIOL (FIGURA 5)

5 Os presentes requerentes examinaram em primeiro lugar se uma acila-CoA pode ser utilizada como substrato para a reação de transacilação. O gene ininterrupto de LovD foi amplificado de DNA genômico de *A. terreus* mediante utilização de "splice" por cromatografia PCR de extensão de
10 sobreposição e foi inserido no vetor de expressão pET28a. A sobre-expressão de LovD de fusão 6xHis de terminal-N solúvel foi realizada na cepa de *E. coli* BL21(DE3)/pAW31. A LovD foi purificada por coluna de afinidade Níquel-NTA para obtenção de homogeneidade (rendimento final ~ 40 mg/L). O
15 substrato de monacolina J (1 mM) foi preparado mediante hidrólise de LiOH de lovastatina e foi adicionado à mistura de reação contendo LovD pura (10 μ M) e butiril-CoA (4 mM), que é a acila-CoA disponível comercialmente que mimetiza melhor a cadeia lateral natural de α -dimetilbutirato. A
20 mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente, extraída com acetato de etila e analisada por cromatografia HPLC e LC-MS (Figura 5).

Um composto simples mais hidrofóbico com uma absorvência de UV idêntica à lovastatina foi formado na
25 mistura de reação, em combinação com o desaparecimento da monacolina J (Figura 5, indicação a). Foi determinado que a massa do novo composto era 391 (M+H), de acordo com a

adição de um grupo butirila à monacolina J. A esterificação seletiva do grupo hidroxila C8 da monacolina J para obtenção de 4 foi confirmada por espectroscopia de NMR de próton (CDCl_3 , 500 MHz). A análise de NMR de próton de 4 (forma lactonizada) é praticamente idêntica à da lovastatina com exceção dos sinais alifáticos da cadeia lateral de acila linear. O diagnóstico H8 multiplet (atribuído com utilização de ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC e ^1H - ^{13}C HMBC) em 4 é deslocado no campo no sentido descendente para δ 5,38, em comparação com δ 4,23 observado para o mesmo próton na monacolina J. Isto é consistente com o efeito de desproteção da substituição acilóxi em C8. Os prótons H11 e H13 de carbonos portadores de outros grupos hidroxila foram deslocados de δ 4,71 e δ 4,38 na monacolina J para δ 4,51 e δ 4,36 em 4, respectivamente.

Conforme se encontra ilustrado na Figura 5A (indicação a), foi observada 87% de conversão de monacolina J para 4 após 10 horas com utilização de butiril-CoA como doador de acila. Um estudo de decurso de tempo revelou uma taxa de conversão aparente de $0,18 \text{ min}^{-1}$ (Figura 5B). A conversão observada de 87% aproxima-se provavelmente do equilíbrio conforme é apresentado na Figura 5B. Para exame da natureza bioquímica da conversão de equilíbrio, os presentes requerentes realizaram ensaios para determinar se a LovD também catalisa a reação inversa de hidrólise. De fato, quando a lovastatina foi utilizada como o único substrato, a formação de monacolina J foi prontamente

detectada com valores k_{cat} e K_m de $0,21 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ e $0,56 \pm 0,05 \text{ mM}$, respectivamente (Figura 5C). Quando a serina de sítio ativo putativo em LovD (Ser76) foi mutada para uma alanina, não foi possível detectar a formação de 4 ou a
5 hidrólise de lovastatina (Figura 5A, indicação b).

A síntese enzimática de 4 confirma que a LovD catalisa de fato a reação de transferência de acila ilustrada na Figura 4. Adicionalmente, este resultado indica que não é necessária uma associação direta entre
10 domínios de LovF e LovD para conversão catalítica, em contraste com o modo previamente suposto de catálise de LovD (vide, por exemplo, J. Kennedy, K. e outros, *Science*, 1999, 284, 1368-1372 e C. R. Hutchinson, J. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 78, 287-295). A acila-S-CoA
15 pode substituir a acila-S-LovF, muito embora provavelmente com um valor K_m significativamente mais elevado devido à perda de interações potenciais proteína-proteína.

ENSAIOS DE TRANSACILAÇÃO COM VÁRIOS SUBSTITUINTES DE ACILA
DIFERENTES DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE REVELARAM A
20 PREFERÊNCIA DA LOVD POR GRUPOS ACILA DE EXTENSÃO DE CADEIA
MÉDIA (C3-C6)

Os presentes requerentes realizaram ensaios para determinação da tolerância de LovD relativamente a diferentes substituintes de acila mediante realização do
25 ensaio de transacilação com diversas acila-CoA's disponíveis comercialmente (Tabela 1A). Todos os ensaios

foram realizados com 1 mM de monacolina J, 4 mM de acila-CoA e 10 uM de LovD durante 10 horas. Os resultados dos presentes requerentes indicam claramente que a LovD demonstra uma preferência por grupos acila de extensão de cadeia média (C3-C6) com a butiril-CoA constituindo o substrato ideal de alquilacila-CoA. Surpreendentemente, a benzoíla-CoA, mais volumosa, foi um dos melhores substratos de acila examinados, com perto de 70% de conversão de sinvastatina para o correspondente análogo de 8-benzóxi-lovastatina (valor k_{cat} aparente = $0,16 \text{ min}^{-1}$). A introdução de insaturação α - β reduziu significativamente a taxa de reação, conforme pode ser observado na acilação de 6% da monacolina J na presença de crotonila-CoA. A acetoacetil-CoA e a β -hidroxilbutirila-CoA foram ambas excelentes substratos de LovD, de forma concordante com a isolamento de monacolina X (vide, por exemplo, A. Endo, K. e outros, *J. Antibiot*, 1986, 38, 321-327) e monacolina M (vide, por exemplo, A. Endo, K. e outros, *J. Antibiot*, 1986, 39, 321-327) do hospedeiro natural, respectivamente. Entre os substratos de CoA submetidos a ensaio, a LovD foi inativa para malonila-CoA e palmitoíla-CoA.

ENSAIOS ADICIONAIS DE TRANSACILAÇÃO COM UM TRANSPORTADOR DE ACILA ALTERNATIVO, ACILA-SNAC, QUE É MAIS SIMPLES DE PREPARAR SINTETICAMENTE E PODE PENETRAR A MEMBRANA CELULAR EM CONDIÇÕES *IN VIVO*, REVELARAM QUE A ACILA-SNAC CONSTITUI UM SUBSTRATO COMPETENTE PARA LOVD

Para examinar adicionalmente as especificidades de

substrato de LovD para transportadores de acila alternativos, particularmente aqueles que são mais simples de preparar sinteticamente, e podem penetrar a membrana celular em condições *in vivo*, os presentes requerentes

5 realizaram ensaios com duas variantes de butiril-tioésteres como substratos de LovD (Figura 5). Os tioésteres de *N*-acetilcisteamina (SNAC) foram utilizados extensivamente como sondas e precursores em estudos de bioquímica de produtos naturais (vide, por exemplo, Auclair e outros,

10 *Science*, 1997, 277, 367-369). Foi recentemente determinado que o metil-tioglicolato (SMTG) constitui um substituto econômico para o SNAC na bio-síntese dirigida a precursor da eritromicina (vide, por exemplo, S. Murli, K. S. e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 4503-4509). A

15 Figura 5 (indicações c e d) ilustra a conversão de monacolina J para 4 quando estes butiril-tioésteres foram utilizados como doadores de acila. Tanto os tioésteres SNAC quanto SMTG substituíram eficientemente a butirila-CoA, com valores k_{cat} aparentes de $0,09 \text{ min}^{-1}$ e $0,23 \text{ min}^{-1}$ (Figura

20 5B), respectivamente, exemplificando adicionalmente que as interações proteína-proteína entre LovD e LovF, bem como as interações entre LovD e o braço de fosfopanteteína não são necessárias para transferência de acila. O butiril-tioetano, entretanto, não constituiu um substrato

25 competente de LovD e suportou somente 4% de conversão de monacolina J para 4. Similarmente, a benzoíla-SNAC e a benzoíla-SMTG substituíram eficientemente a benzila-CoA,

com valores k_{cat} aparentes de $0,12 \text{ min}^{-1}$ e $0,15 \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1A).

ENSAIO PARA SÍNTESE QUIMIO-ENZIMÁTICA IN VITRO DE
LOVASTATINA E SINVASTATINA COM UTILIZAÇÃO DE A-S-
5 METILBUTIRIL-SNAC E A-DIMETILBUTIRIL-SNAC REVELA QUE A
MONACOLINA J É CONVERTIDA EM SINVASTATINA NA PRESENÇA DE
ACILA-SNAC

Os presentes requerentes sintetizaram então α -S-
dimetilbutiril-SNAC e α -dimetilbutiril-SNAC e realizaram
10 ensaios de síntese quimio-enzimática in vitro de
lovastatina e sinvastatina, respectivamente. os resultados
encontram-se ilustrados na Figura 8 e na Tabela 1A. Foram
utilizadas amostras autênticas de lovastatina e
sinvastatina como referências para a detecção de HPLC
15 (Figura 8, indicação a). A cadeia lateral de α -S-
dimetilbutirato natural constituiu surpreendentemente um
substrato mais deficiente em comparação com butiril-,
pentanoil-, e hexanoil-SNAC. O valor k_{cat} aparente ($\sim 0,04$
 min^{-1}) da síntese de lovastatina é mais de 50% mais lento
20 que o de LovD para butiril-SNAC. Isto sugeriu que a LovD de
tipo natural não foi otimizada para transferência do
substrato ramificado. A adição de um segundo substituinte
de metila à posição- α atenuou adicionalmente a taxa de
acilação, com provável atribuição ao aumento de impedimento
25 estérico da fração dimetila. Em condições de ensaio
convencionais, aproximadamente 10% da monacolina J foi

convertida em sinvastatina quando foi utilizada uma α -dimetilbutiril-SNAC como substrato (valor k_{cat} aparente = $0,02 \text{ min}^{-1}$). Foi possível obter conversões de equilíbrio > 70% quando 100 μM de LovD e um excesso de 10 vezes de α -
5 dimetil-SNAC ou α -dimetil-SMTG foram adicionados à mistura de reação in vitro (Figura 8, indicações b e c).

A LOVD, IN VITRO, PODE TRANSFERIR UMA VARIEDADE DE SUBSTRATOS DE ACILA (NÃO SOMENTE LDKS) PARA O GRUPO HIDROXILA C8 DA MONACOLINA J PARA OBTENÇÃO DE UMA VARIEDADE
10 DE ANÁLOGOS DE LOVASTATINA

Para teste da especificidade de substrato da LovD para variantes de monacolina J, os presentes requerentes realizaram ensaios de conversão de tetraol 7 para 8, pravastatina (5) e huvastatina (6) (Figura 9). Foi
15 anteriormente demonstrado que quando é fornecida 8-desmetil-monacolina J a um mutante de *A. terreus* bloqueado em bio-síntese de monacolina J, pode ser prontamente isolada compactina (vide, por exemplo, J. L. Sorensen, K. e outros, *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 50-59). Isto indica que
20 possivelmente a LovD tolera substituições na posição C6 do núcleo de decalina. De fato, a LovD apresenta uma especificidade relaxada para a substituição de hidroxila em C6, e catalisa a acilação de 7 com mais eficiência. As
25 taxas de conversão aparentes para a síntese de 8, pravastatina, ou huvastatina utilizando os acil-tioésteres correspondentes foram de 0,18, 0,11, 0,03 min^{-1} ,

respectivamente. O tempo de retenção da pravastatina autêntica foi idêntico ao do composto sintetizado enzimaticamente. A massa dos compostos recém formados foi confirmada por LC-MS. Não foram detectados quaisquer
5 produtos di-acilados na mistura de reação.

OS DADOS IN VIVO DEMONSTRAM QUE A LOVD PODE SER UTILIZADA PARA BIO-SÍNTESE DE PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DE LOVASTATINA

Para demonstrar que a LovD pode ser utilizada para bio-síntese de preparação de análogos de lovastatina, os
10 presentes requerentes tentaram em primeiro lugar realizar a reação de benzoilação in vivo utilizando *E. coli* como hospedeiro heterólogo. A cepa de sobre-expressão de BL21(de3)/pAW31 foi cultivada em um frasco de agitação (200 mL) com um valor OD₆₀₀ de 1,0, e nessa ocasião foram
15 adicionados à cultura 1 mM de IPTG, 0,8 mM de monacolina J e 4 mM de alternativamente benzoíla-SNAC ou benzoíla-SMTG. A expressão de LovD e bio-conversão foram realizadas a 18° C. A cultura foi extraída e analisada quanto à formação de 8-benzoil-monacolina J. Quando suplementada com benzoíla-
20 SNAC, foi detectada 84% de conversão de monacolina J no prazo de 20 horas pós-indução. O produto foi lactonizado e purificado por uma única etapa de cromatografia de sílica-gel. Os espectros de ressonância NMR confirmaram a benzoilação regioseletiva do grupo hidroxila C8 quando o
25 diagnóstico H8 multiplet é deslocado no sentido descendente do campo para δ 5,61. Em contraste, foi observado somente 40% de benzoilação para a cultura que foi suplementada com

benzoíla-SMTG. A benzoíla-SMTG foi rapidamente degradada por *E. coli* e não pôde ser detectado nenhum resíduo no meio de cultura após 24 horas.

UM SUBSTRATO DE ACILA, α -DIMETILBUTIRIL-SNAC, PRODUZIU
5 SINVASTATINA NA PRESENÇA DE LOVD PURIFICADA E MONACOLINA J

Os presentes requerentes realizaram fermentação de baixa densidade celular com α -dimetilbutiril-SNAC como precursor para obtenção de sinvastatina a partir de monacolina J em uma única etapa de bio-síntese. Após dois
10 dias de cultura, foi observada uma conversão de ~ 90% de monacolina J para sinvastatina (vide, por exemplo, "condições de fermentação", listadas abaixo). O produto foi purificado e os espectros de ressonância NMR de carbono e próton foram idênticos aos do composto adquirido
15 comercialmente. O menor rendimento de produção de sinvastatina é consistente com a taxa de conversão mais lenta observada in vitro, que pode ser adicionalmente reduzida em uma concentração intracelular mais baixa do precursor SNAC. Outros fatores, tal como a hidrólise
20 reversível da sinvastatina (os presentes requerentes observaram hidrólise de sinvastatina na presença de LovD - o valor k_{cat} ($0,02 \text{ min}^{-1}$) da hidrólise é ~ 10 vezes mais lento que o da hidrólise de lovastatina ilustrada na Figura 5C) e a inativação de LovD após fermentação prolongada
25 podem causar a conversão observada. Os presentes requerentes prevêem que o rendimento de produção pode ser significativamente aperfeiçoado por vários meios, tais como

1) utilização de fermentação de alta densidade celular para aumento da concentração efetiva de LovD e otimização das condições de fermentação; 2) aumento das eficiências catalíticas de LovD para o precursor não natural mediante
5 engenharia de proteína.

De princípio a fim do presente pedido de patente são feitas referências a diversas publicações. As divulgações destas publicações são aqui incorporadas na íntegra a título de referência.

10

EXEMPLOS

Os Exemplos abaixo proporcionam métodos e materiais ilustrativos que podem ser utilizados na prática das diversas configurações da invenção aqui divulgadas.

EXEMPLO 1: CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LOVD
15 ACILTRANSFERASE ILUSTRATIVA

Os três éxons de LovD de *A. terreus* foram amplificados individualmente do DNA genômico de *A. terreus* e foram submetidos a "splicing" para obtenção de uma fase de leitura aberta contínua com utilização de PCR de
20 extensão de sobreposição para "splice". Os sítios de restrição *NdeI* e *HindIII* foram introduzidos nos "primers" externos 5' e 3', respectivamente. A cassette de gene foi ligada em pET28 (Novagen) para obtenção do constructo de expressão pAW31. A cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada
25 com pAW31 foi cultivada em mídia LB a 37° C para um valor OD₆₀₀ de 0,5, e nessa ocasião foi adicionado à cultura 1 mM de IPTG e a expressão foi realizada a 18° C durante 24

horas. As células foram colhidas por centrifugação, re-suspensas em tampão Buffer A (50 mM Tris, pH 8,0, 2 mM de DTT, 2 mM de EDTA) e foram lisadas por sonicação. Os detritos de células e proteínas insolúveis foram removidos por centrifugação (17.000 g, 4° C, 1 hora). Foram adicionados ao lisado clarificado 2 mL de resina de Ni-NTA (Qiagen). A LovD foi purificada com utilização de um gradiente de etapa de tampão A com concentração crescente de imidazol. Proteínas de LovD puras (> 95%) foram eluídas em tampão A contendo 250 mM de imidazol, tampão substituído por Tampão A sem imidazol, e foram concentradas, divididas em alíquotas e submetidas a congelamento instantâneo. As alíquotas de LovD congeladas foram de utilização de instância única. Os presentes requerentes observaram um decréscimo significativo de atividade enzimática após ciclos repetidos de congelamento-descongelamento.

EXEMPLO 2: CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ILUSTRATIVAS

Condições de fermentação: 500 mL de cultura com mídia LB com 30 mg/L de kanamicina. Em OD₆₀₀ de 1,0, as células foram concentradas para um valor final OD₆₀₀ de 5,0 e induzidas com 1 mM de IPTG. Os substratos monacolina J e α -dimetilbutiril-SNAC foram adicionados em uma concentração final de 1 mM e 4 mM. Em pontos diferentes no tempo, amostras de cultura foram colhidas, centrifugadas, filtradas e injetadas para HPLC (20 μ L). Condições de extração: Quando foi alcançada a conversão máxima, o caldo foi acidificado para um pH de 2,0, extraído com acetato de

etila, submetido a secagem, e re-dissolvido em tolueno. A forma de lactona de monacolina J foi obtida mediante refluxo com utilização de um aparelho soxhlet conforme discutido anteriormente (vide, por exemplo, J. L. Sorensen, K. e outros, *Org. Biomol. Chem.* 2003, 1, 50-59).

Uma variedade de mídias de fermentação tais como as mídias LB, F1 ou TB são bem conhecidas na técnica podendo ser utilizadas ou adaptadas para utilização com configurações da invenção aqui divulgadas incluindo mídia LB, TB e F1. Mídias adicionais especificamente adaptadas para cultura de organismos tais como *A. terreus* e *M. pilosus* são igualmente bem conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Miyake e outros, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(5): 1154-1159 (2006) e Hajjaj e outros, *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2596-2602 (2001), cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência).

Uma receita típica de caldo Luria Bertani (LB) é a seguinte:

- 10 g de Triptona
- 5 g de Extrato de Levedura
- 10 g de NaCl
- 1 L de água destilada

pH para ~ 7,3-7,5.

Uma receita TB típica é a seguinte:

- 3 g Pipes (10 mM)
- 2,2 g de CaCl₂ H₂O (15 mM)
- 18,6 KCl (250 mM)

- 10,9 g de MnCl₂ (55 mM)
- 1 L de água destilada

pH para 6,7-6,8 com KOH

Uma mídia F1 típica pode ser encontrada na patente
5 norte-americana n° US 5.064.856, cujo conteúdo é aqui
incorporado a título de referência.

Tipicamente essas mídias são esterilizadas após a
preparação mediante procedimentos tais como filtração ou
processamento em autoclave.

10 EXEMPLO 3: APERFEIÇOAMENTO DE BIO-CONVERSÃO DE SINVASTATINA
EM *ESCHERICHIA COLI* MEDIANTE DELEÇÃO DE *BIOH*

Este exemplo caracteriza adicionalmente o
polipeptídeo de LovD codificado no agrupamento genético de
lovastatina (vide igualmente Xie e outros, (2006) Chem Biol
15 13: 1161-1169). A LovD catalisa a última etapa da bio-
síntese de lovastatina e é responsável por transferir a
cadeia lateral de 2-metilbutirato da LovF megasintase para
o precursor bio-sintético imediato, ácido de monacolina J
(MJ) (vide, por exemplo, Kennedy e outros, (1999) Science
20 284: 1368-1372). Os presentes requerentes demonstraram que
a LovD apresenta uma ampla especificidade de substrato para
o núcleo de decalina, a unidade de acila de tioéster e o
transportador de acila de tioéster. Mediante utilização de
uma cepa de *Escherichia coli* sobre-expressando LovD e um
25 tioéster dimetilbutiril-S-metil mercaptopropionato (DMB-S-
MMP) permeável para membrana celular (Figura 13A), os
presentes requerentes desenvolveram um processo bio-

catalítico de célula total capaz de converter ácido de MJ em ácido de sinvastatina em uma etapa com elevados rendimentos (vide, por exemplo, Xie e outros, (2007) Appl Environ Microbiol 73: 2054-2060). O processo de fermentação
5 pode constituir uma alternativa economicamente competitiva para as atuais rotas de síntese.

O tioéster DBM-S-MMP é um componente integral da bio-conversão de sinvastatina. Este tioéster encontra-se entre os doadores de acila mais eficientes cataliticamente
10 que foram examinados para a reação de transferência de acila, sendo simultaneamente o menos dispendioso de sintetizar. Uma desvantagem significativa associada a este composto consiste na hidrólise da ligação metil éster em DMB-S-MMP que produz ácido dimetilbutiril
15 mercaptopropiônico (DMB-S-MPA) (Figura 13). A reação de hidrólise é enzimática visto não ter sido observada nenhuma degradação na ausência de E. coli, e é extraordinariamente elevada durante a fermentação de alta densidade celular. A reação colateral é indesejável por três motivos: 1) A
20 hidrólise do substrato subtrai DMB-S-MMP disponível para a transacilação catalisada por LovD, requerendo que o tioéster seja adicionado em grande excesso molar e seja freqüentemente reabastecido durante a fermentação; 2) Devido ao fato de o DMB-S-MPA ser menos eficiente em
25 comparação com o DMB-S-MMP como doador de dimetilbutirato (~ 10 vezes mais lento) (vide, por exemplo, Xie e outros, (2007) Appl Environ Microbiol 73: 2054-2060), a acumulação

do DMB-S-MPA que é mais solúvel pode servir como substrato de acila competidor para LovD. Isto reduz efetivamente a velocidade da reação e tem sido demonstrado in vitro com utilização de LovD purificada. Desta forma, a duração geral da bio-conversão é prolongada desnecessariamente; e 3) A fração ácido carboxílico de DMB-S-MPA interfere na purificação do ácido de sinvastatina da mídia de cultura na completação da bio-conversão. Ambos os compostos precipitam-se do caldo de cultura após a acidificação da mídia e são necessárias etapas de separação adicionais anteriormente à cristalização da sinvastatina. Muito embora o DMB-S-MPA possa ser removido mediante lavagem do filtrado com uma quantidade excessiva de água, uma quantidade apreciável de ácido de sinvastatina é perdida durante as etapas de lavagem, com um resultante decréscimo de recuperação em geral.

A eliminação da indesejável reação colateral de hidrólise pode portanto aperfeiçoar as características econômicas do processo bio-catalítico de célula inteira e as etapas de purificação de jusante. O objetivo mais imediato consiste portanto em determinar a(s) enzima(s) responsável(eis) pela reação colateral indesejável. Neste caso, os presentes requerentes ensinam a identificação de BioH como carboxilesterase de *E. coli* que hidrolisa DMB-S-MMP para DMB-S-MPA. Mediante construção de um derivado Δ bioH da cepa de sobre-expressão de LovD, os presentes requerentes eliminaram totalmente a reação competidora e

aperfeiçoaram adicionalmente a robustez da síntese biocatalítica de célula inteira de ácido de sinvastatina.

MATERIAIS, CEPAS E PLASMÍDEOS

Foram preparados monacolina J e DMB-S-MMP conforme
5 foi anteriormente descrito (vide, por exemplo, Xie e
outros, (2007) Appl Environ Microbiol 73: 2054-2060). Todos
os reagentes foram adquiridos de fontes convencionais. A
cepa BL21(DE3) [F⁻ omp hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm λ(DE3)] foi
obtida da empresa Novagen. A coleção Keio foi obtida do
10 National Institute of Genetics, Japão (vide, por exemplo,
Baba e outros, (2006) Mol Syst Biol 2: 2006 0008). Os
mutantes de "knockout" de gene único foram derivados da
cepa BW25113 [rrnB3DElacZ4787 hsdR514 DE(araBAD)567
DE(rhaBAD)568rph-1]. A cepa WA837 (rB⁻, mB⁺, gal met), uma
15 cepa de *E. coli* B que é menos-restrição e mais-modificação,
foi obtida do The Coli Genetic Stock Center (CGSC) (vide,
por exemplo, Wood, W. B. (1966). J Mol Biol 16: 118-133).
Os plasmídeos pAW31(kanr) e pXK8(kanr) foram derivados de
pET28a e contêm o gene de LovD de *A. terreus* e o gene bioH
20 de *E. coli*, respectivamente.

ENSAIO DE HIDRÓLISE BASEADO EM CÉLULA INTEIRA

Os 57 mutantes selecionados da coleção Keio
juntamente com BW25113, BL21(DE3) e BL21(DE3)/pAW31 foram
cultivados até a saturação em uma placa de 96 receptáculos
25 profundos em 1 mL de mídia LB a 37° C. Foi adicionado a
cada cultura DMB-S-MMP (5 µL) puro com uma concentração

final de 20 mM. Após agitação (20° C, 300 rpm) durante 10 horas, cada cultura foi extraída com um volume igual de acetato de etila (EA)/1% de ácido acético (AcOH). A fase orgânica foi submetida a secagem, re-dissolvida em 20 µL de
 5 acetonitrila (CH₃CN), e 1 µL foi pingado sobre uma placa de TLC (sílica gel 60 F254). As placas de TLC foram reveladas com 20% de EA em hexano e visualizadas com iodo.

A análise dos compostos foi igualmente realizada com HPLC com utilização de uma coluna C18 analítica
 10 (Alltech Apollo 5u, 150 mm X 4,6 mm); gradiente linear: 60% CH₃CN em água (0,1% de ácido trifluoroacético [TFA]) para 95% CH₃CN em água (0,1% TFA) durante 5 min, 95% CH₃CN em água (0,1% TFA) durante 10 minutos, com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. Os tempos de retenção (t_R) de HPLC foram os
 15 seguintes: forma de lactona de MJ: 3,40 min; DMB-S-MPA: 3,82 min; DMB-S-MMP: 6,80 min; forma de lactona de sinvastatina: 8,45 min. Tanto os ácidos de MJ quanto de sinvastatina foram lactonizados anteriormente à análise de HPLC.

20 PURIFICAÇÃO DE BIOH E ENSAIO ENZIMÁTICO

O gene de bioH foi amplificado de DNA genômico de E. coli por PCR com sítios de restrição de flanco NdeI e EcoRI com utilização dos "primers" 5'-
 AACATATGAATAACATCTGGTGGCA-3' (SEQ ID NO: 5) e 5'-
 25 AAGAATTCTACACCCTCTGCTTCAACG-3' (SEQ ID NO: 6). A cassete de gene foi digerida e ligada a pET28a para obtenção do constructo de expressão pXK8. A cepa BL21(DE3) de E. coli

transformada com pXK8 foi cultivada em mídia LB a 37° C com um OD₆₀₀ de 0,5, e nessa ocasião foi adicionado à cultura 0,1 mM de IPTG e a expressão foi realizada a 20° C durante 16 horas. As células foram re-suspensas em tampão Buffer A
5 (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM de DTT, 2 mM de EDTA) e foram lisadas com sonicação. A purificação de BioH foi facilitada pelo marcador 6xHis de terminal-N e resina Ni-NTA (Qiagen). O BioH praticamente puro (> 95%) foi eluído em tampão Buffer A contendo 250 mM de imidazol, sendo o
10 tampão substituído pelo tampão Buffer A, concentrado, dividido em alíquotas, e submetido a congelamento instantâneo.

Os ensaios de hidrólise foram realizados à temperatura ambiente em 50 mM de HEPES, pH 7,9. O substrato
15 de tioéster DMB-S-MMP foi adicionado para concentração final entre 0,1 mM e 1,0 mM. Para facilitar a solubilização do DMB-S-MMP, foi adicionado DMSO para uma concentração final de 10% para todas as amostras. A reação foi iniciada com a adição de BioH (0,01 µM) com têmpera em pontos de
20 tempo desejados (10, 20, 30 minutos) mediante adição de um volume igual de EA/1% AcOH. A fase orgânica foi separada, submetida a secagem, e re-dissolvida em 20 µL de ACN e submetida a análise por HPLC. As conversões de DMB-S-MMP para DMB-S-MPA foram quantificadas mediante integração dos
25 picos a 234 nm. A comparação da eficiência catalítica de BioH para os três dimetilbutiril tioésteres foi realizada com uma concentração de substrato de 1 mM e uma

concentração de BioH de 10 nM.

TRANSDUÇÃO DE P1

De acordo com protocolos convencionais (vide, por exemplo, Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press), foi utilizada transdução de P1 para construção do mutante de deleção Δ bioH de BL21(DE3). Devido ao sistema de restrição diferente entre a cepa K de E. coli (BW25113) e a cepa B (BL21), a cepa B WA837 (rB-, mB+) foi utilizada como hospedeiro intermediário para transdução. O marcador Δ bioH::FRT-kan-FRT foi em primeiro lugar transduzido de JW3375 para WA837 para obtenção de YT0 (WA837 Δ bioH::FRT-kan-FRT). Utilizando-se BL21(DE3) como recipiente e YT0 como doador, a cepa YT1 (BL21 Δ bioH::FRT-kan-FRT λ (DE3)) foi construído. A cepa YT1 foi transformada com o plasmídeo auxiliar pCP20 que contém um gene FLP induzível termicamente e replicação sensível à temperatura (vide, por exemplo, Datsenko e outros, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6640-6645; e Wanner, 2000). A remoção do marcador kan para obtenção de YT2 ((BL21 Δ bioH::FRT λ (DE3)) foi feita de acordo com procedimentos publicados (vide, por exemplo, Datsenko e outros, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6640-6645; e Wanner, 2000).

Foi utilizado PCR para determinação das alterações genéticas de YT2. Foram atribuídos três "primers". Os

"primers" B1: 5'-TGACGGCTTCGCTATCCCAT-3' (SEQ ID NO: 7);
B2: 5'-TACACCCTCTGCTTCAACG-3' (SEQ ID NO: 8); e B3: 5'-
GCTGGATTGTTTCGCCGATC-3' (SEQ ID NO: 9) associam-se ao gene
de montante yhgA, a extremidade 3' do bioH que foi deixada
5 intacta, e ao gene de jusante gntX, respectivamente. Os
produtos previstos para reação PCR com utilização de DNA
genômico de YT2 como gabarito são: B1/B2: 602 bp; B1/B3:
1002 bp. Os produtos previstos para reação PCR com
utilização de DNA genômico de BL21(DE3) como gabarito são:
10 B1/B2: 1271 bp; B1/B3: 1771 bp. Os produtos de PCR
previstos foram observados para cada cepa.

BIO-CATÁLISE DE CÉLULA INTEIRA

A síntese catalítica de célula inteira de ácido de
sinvastatina a partir de ácido de MJ e DMB-S-MMP foi
15 realizada conforme descrito (vide, por exemplo, Xie e
outros, (2007) Appl Environ Microbiol 73: 2054-2060). As
cepas de E. coli BL21(DE3)/pAW31 e YT2/pAW31 foram
cultivadas lado a lado para comparação. Uma única colônia
das cepas recém-transformadas foi utilizada para inocular
20 uma cultura de 5 mL de LB suplementada com 35 mg/L de
kanamicina com cultura durante a noite a 37° C. Na manhã
seguinte, 100 µL da cultura noturna foram inoculados em 50
mL de culturas contendo caldo de LB, mídia mínima de F1, e
mídia de F1 suplementada com 0,15 mg/L de biotina. As taxas
25 de cultivo foram monitoradas mediante medição periódica da
leitura OD₆₀₀. Quando o valor OD₆₀₀ alcançou ~ 0,5, foram
adicionados 100 µM de IPTG à cultura e foi realizada

expressão de LovD a 20° C durante 16 horas. Para mimetizar condições de fermentação de alta densidade, as células foram concentradas 10 vezes anteriormente à adição de substratos. Tipicamente, uma alíquota de 14 mL da cultura
5 foi transferida para um tubo de centrifugação de 15 mL e as células foram colhidas por centrifugação (4° C), 4000 g, 10 minutos). A pelota de células foi suavemente re-suspensa em 1316 µl do sobrenadante, com subsequente adição de 84 µl de uma solução de ácido de MJ (250 mM em H₂O) (concentração
10 final 15 mM). A cultura concentrada foi então separada em sete amostras de 200 µL e foram adicionados a cada amostra 1,2 µL de DMB-S-MMP puro (concentração final ~ 25 mM). A cultura foi então submetida a agitação a 300 rpm à temperatura ambiente. Em cada ponto no tempo, foi realizada
15 uma extração total mediante adição de 10 µL de 20% SDS para lisar as células, com subsequente extração líquido-líquido com 500 µL de EA/1% de AcOH. A fase orgânica foi removida, evaporada, e re-dissolvida em 50 µL de ACN para análise de HPLC. Para a amostra de BL21(DE3), foi adicionada uma
20 alíquota adicional de 1,2 µL de DMB-S-MMP após 12 horas para reabastecimento dos substratos hidrolisados.

IDENTIFICAÇÃO DE BIOH COMO A ESTERASE DE DMB-S-MMP

Os presentes requerentes pretenderam em primeiro
25 lugar identificar a enzima de E. coli responsável pela hidrólise observada de DMB-S-MMP para DMB-S-MPA durante a

fermentação. Quando foram utilizados como substrato de tioéster diferentes transportadores de acila tais como dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG), os
 5 presentes requerentes observaram os correspondentes ácidos carboxílicos hidrolisados no caldo de fermentação. Isto sugere que a enzima responsável é uma esterase ou hidrolase com especificidade de substrato relaxada para funcionalidades éster.

10 Os presentes requerentes utilizaram uma abordagem de alto rendimento para identificação da enzima responsável, utilizando a biblioteca de mutantes de "knockout" de gene único em-fase K-12 de E. coli (Coleção Keio) (vide, por exemplo, Baba e outros, (2006) Mol Syst
 15 Biol 2: 2006 0008). Os presentes requerentes consideraram que qualquer cepa mutante incapaz de hidrolisar DMB-S-MMP é diretamente devida à deleção de gene específico. O exame de anotações de genoma de E. coli (vide, por exemplo, Blattner e outros, (1977) Science 277: 1453-1474) revela 23
 20 esterases/enzimas semelhantes a esterase, 94 hidrolases/enzimas semelhantes a hidrolase, e 16 aciltransferases (133 genes candidatos no total). As enzimas com atividades confirmadas e substratos provavelmente envolvidos na hidrólise de DMB-S-MMP não
 25 foram examinados na primeira rodada de ensaios. A lista de 57 cepas mutantes BW25113 examinadas encontra-se ilustrada na Tabela 2.

Os mutantes, tipo natural de BW21113 e BL21(DE3) foram cultivados até a saturação em caldo de LB em uma placa de 96 receptáculos. Os presentes requerentes adicionaram 5 μ L de DMB-S-MMP puro a cada cultura (1 mL) e a placa foi agitada vigorosamente durante 10 horas adicionais à temperatura ambiente. As culturas foram acidificadas, extraídas com acetato de etila, e as fases orgânicas foram analisadas por cromatografia de camada fina ("Thin Layer Chromatography" - TLC) com utilização de uma fase móvel (20% de acetato de etila em hexano) que permitiu a separação de DMB-S-MMP e DMB-S-MPA (Figura 14A). Cada um dos tipos naturais de BW25113 (pista 58) e BL21(DE3) (pista 59) apresentou um nível comparável de hidrólise de substrato e acumulação de DMB-S-MPA. Todos os mutantes examinados apresentaram atividade hidrolítica para DMB-S-MMP, com exceção de Δ bioH (pista 56, cepa JW3357). Esta descoberta surpreendente sugere que o BioH (vide, por exemplo, O'Regan e outros, (1989) Nucleic Acids Res 17: 8004), que está envolvido na bio-síntese da biotina (vitamina H) poderá ser a única enzima responsável pela hidrólise observada in vivo. Um exame adicional com utilização de HPLC confirmou adicionalmente que o DMB-S-MPA não pode ser detectado no extrato orgânico do mutante Δ bioH, enquanto que aproximadamente 30% foi hidrolisado em cepas bioH+ (Figura 14B).

CONFIRMAÇÃO DE PROPRIEDADES DE BIOH IN VITRO

Para comprovar que o BioH se encontra diretamente

envolvido na hidrólise de DMB-S-MMP durante a fermentação, os presentes requerentes clonaram o gene bioH e expressaram o mesmo como uma proteína com marcação N-his de BL21(DE3) (vide, por exemplo, Tomczyk e outros, (2002) FEBS Lett 513: 299-304). A proteína foi purificada para homogeneização com utilização de cromatografia de afinidade Ni-NTA com um rendimento final de 9 mg/L. As propriedades catalíticas de BioH para DMB-S-MMP foram submetidas a ensaio e a magnitude da hidrólise foi medida por HPLC (234 nm). O BioH apresentou cinética de Michaelis-Menten para DMB-S-MMP e os valores kcat e km foram determinados como sendo 260 ± 45 seg⁻¹ e 229 ± 26 μM, respectivamente (Figura 15A).

As atividades de BioH para outros dimetilbutiril tioésteres foram igualmente examinadas com utilização do ensaio de HPLC e encontram-se ilustradas na Figura 15B. Em condições de reação idênticas (1 mM de substrato, 10 nM de BioH), os presentes requerentes observaram que o BioH apresentou a maior parte da potente atividade de esterase para DMB-S-MMP. O decréscimo de um átomo de carbono da extensão de infra-estrutura de ácido carboxílico causou um decréscimo de 2,5 vezes na taxa de hidrólise (DMB-S-MTG, ao passo que um acréscimo do tamanho da fração éster para um etil éster atenuou significativamente a taxa de hidrólise de substrato (DMB-S-EMP). Estas observações são consistentes com o resultado in vivo, em que ambos os substratos foram hidrolisados na presença de células, embora menos substancialmente que DMB-S-MMP.

O BioH é uma enzima essencial na bio-síntese de biotina em *E. coli* (vide, por exemplo, Lemoine e outros, (1996) *Mol Microbiol* 19: 645-647). Foi proposto que o BioH seja responsável pela síntese de pimeloil-CoA (vide, por exemplo, Guillen-Navarro e outros, (2005) *FEMS Microbiol Lett* 246: 159-165), porém sua função bioquímica exata não foi confirmada. Interessantemente, a estrutura cristalina de BioH de *E. coli* foi determinada com uma resolução de 1,7 Å em um esforço para prever a função de proteína de características estruturais (vide, por exemplo, Sanishvili e outros, (2003) *J Biol Chem* 278: 26039-26045). Uma análise estrutural de alto rendimento desvendou uma tríade catalítica em BioH que é igualmente encontrada em hidrolases conhecidas, o que apontou a possibilidade de o BioH possuir atividade hidrolítica. Ensaaios com utilização de ésteres de p-nitrofenol demonstraram que o BioH apresenta atividades de carboxilesterase com preferência para ésteres de ácidos graxos de cadeia curta (vide, por exemplo, Sanishvili e outros, (2003) *J Biol Chem* 278: 26039-26045). O trabalho dos presentes requerentes, tanto in vivo quanto in vitro, elabora adicionalmente as propriedades bioquímicas do BioH e demonstra que a enzima tem uma especificidade de substrato muito ampla para frações éster. Em contraste, o BioH não apresentou atividades de tioesterase para a ligação tioéster presente nos substratos analisados neste trabalho. Não foi observada degradação adicional dos ácidos de tioésteres hidrolisados.

CONSTRUÇÃO DE MUTANTE Δ BIOH YT2 DE BL21(DE3)

Após identificação e confirmação de BioH como a enzima responsável pela hidrólise de DMB-S-MMP durante a fermentação, ficou evidente que uma cepa de E. coli
5 deficiente em BioH deveria ser utilizada como hospedeiro para a bio-síntese de célula inteira de ácido de sinvastatina. Os presentes requerentes construíram diversos vetores de expressão de LovD que não requerem a polimerase T7 e transformaram os mesmos em JW3357. A avaliação das
10 taxas de bio-conversão de ácido de sinvastatina nestas cepas demonstraram que a atividade de LovD é significativamente menor que a de BL21(DE3)/pAW31. As velocidades de reação mais lentas são substancialmente atribuídas ao níveis de expressão reduzidos de LovD nestas
15 combinações de hospedeiro/vetor, conforme foi determinado por análise SDS-PAGE. Como resultado, os presentes requerentes concluíram que é necessário um derivado Δ bioH de BL21(DE3) para obtenção de taxas de conversão máximas, com simultânea eliminação de hidrólise de substrato.

20 Cada um dos mutantes de "knockout" de gene único da Coleção Keio continha um gene de resistência à kanamicina ao invés do gene alvo (vide, por exemplo, Baba e outros, (2006) Mol Syst Biol 2: 2006 0008). O marcador é flanqueado por sítios FRT que facilitam a remoção do marcador pela
25 enzima FLP. Os presentes requerentes utilizaram transdução de P1 para deslocar o marcador Δ bioH::FRT-kan-FRT de JW3357 para BL21(DE3). Devido às diferenças de restrição entre a

cepa K doadora e a cepa B recipiente, os presentes requerentes utilizaram WA837 de *E. coli* (menos-restrição, mais-modificação) como hospedeiro intermediário para transdução de P1 (vide, por exemplo, Dien e outros, (2001) J Ind Microbiol Biotechnol 27: 259-264). Após transplante do marcador para BL21(DE3) para obtenção de YT1, o plasmídeo auxiliar pCP20 que contém um replicon sensível à temperatura e um gene de FLP induzível termicamente (vide, por exemplo, Datsenko e outros, (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 6640-6645; e Wanner, 2000), foi utilizado para remoção do gene de kan para obtenção de YT2 (BL21(DE3) ΔbioH::FRT). Uma análise de PCR com utilização de "primers" com associação às regiões de montante e de jusante confirmou a deleção de bioH, bem como a remoção do marcador kan (dados não ilustrados).

O YT2 foi então cultivado em mídia LB e foi realizado o ensaio de hidrólise de DMB-S-MMP. Conforme previsto, a nova cepa não catalisou nenhuma hidrólise detectável do tioéster e não pôde ser encontrado nenhum resíduo de DMB-S-MPA no caldo de cultura. O DMB-S-MMP pode ser recuperado quase quantitativamente da cultura saturada que foi cultivada durante > 24 horas, reassegurando que o substrato pode permanecer intacto durante uma fermentação prolongada com utilização desta cepa.

25 BIOCATÁLISE DE CÉLULA INTEIRA UTILIZANDO YT2

Os presentes requerentes examinaram em primeiro lugar a viabilidade de YT2 como hospedeiro para a síntese

bio-catalítica de célula inteira de ácido de sinvastatina. O plasmídeo de expressão pAW31 foi transformado em YT2 através de eletroporação para obtenção de YT2/pAW31. Foram individualmente cultivados BL21(DE3)/pAW31 e YT2/pAW31 para
5 OD₆₀₀ de 0,5, com subsequente indução de síntese de proteína com 100 µM de IPTG a 20° C durante até 16 horas. As duas cepas apresentaram cinéticas de crescimento idênticas quando foi utilizada mídia LB, alcançando o mesmo valor OD₆₀₀ (3,9 ~ 4,0) ao final do período de expressão de
10 proteína. Quando foi utilizada mídia mínima F1, as duas cepas cresceram comparavelmente antes da indução (Figura 16A). Em contraste, o YT2/pAW31 cresceu consideravelmente mais devagar que o BL21(DE3)/pAW31 em mídia sem suplementação de biotina após a indução. A densidade
15 celular pós-indução para a cepa mutante foi de ~ 60% da cepa parental. Os presentes requerentes atribuíram a taxa de crescimento retardada a incapacidade do YT2/pAW31 para sintetizar biotina e suportar um crescimento robusto de células na mídia mínima. Quando a cepa YT2/pAW31 foi
20 cultivada em mídia F1 suplementada com 0,15 mg/L de biotina, a cinética de crescimento da cepa mutante não foi distinta da cinética de BL21(DE3)/pAW31.

Os presentes requerentes compararam então a eficiência de YT2/pAW31 com BL21(DE3)/pAW31 no ensaio
25 celular inteiro. Ambas as cepas foram cultivadas em mídia LB e foram concentradas dez vezes para mimetizarem um ambiente de densidade celular elevada após 12 horas de

expressão de LovD. Foram adicionados ácido de MJ e DMB-S-MMP para concentrações finais de 15 mM e 25 mM respectivamente, para início da bio-conversão. A Figura 16B mostra que o YT2/pAW31 foi significativamente mais eficiente no ensaio em resultado da deleção de bioH. A conversão completa (> 99%) foi observada para a cepa mutante em menos de 12 horas de incubação sem sinais de hidrólise de DMB-S-MMP. Em contraste, o BL21(DE3)/pAW31 obteve a mesma conversão em 24 horas, requerendo simultaneamente adição de mais 25 mM de DMB-S-MMP durante a fermentação como resultado da hidrólise do substrato. Durante a faixa linear da reação, o YT2/pAW31 sintetizou ácido de sinvastatina a uma taxa de 1,5 mM/hora, significativamente maior que a taxa de 0,75 mM/hora medida para BL21(DE3)/pAW31 (vide, por exemplo, Xie e outros, (2007) Appl Environ Microbiol 73: 2054-2060). Com utilização de YT2/pAW31, os presentes requerentes foram igualmente capazes de reduzir a concentração mínima de DMB-S-MMP necessária para levar a reação até o final. A conversão completa para ácido de sinvastatina pode ser obtida com taxas idênticas com uma razão molar inicial de DMB-S-MMP (18 mM) para ácido de MJ (15 mM) tão baixa quanto 1,2.

A melhoria da taxa é substancialmente devida ao acréscimo de concentração intracelular de DMB-S-MMP na ausência de BioH. Com base nos estudos in vitro, os presentes requerentes demonstraram que o bioH hidrolisa

DMB-S-MMP com extrema rapidez. Desta forma, mesmo em baixas concentrações intracelulares de BioH, a reação de hidrólise de substrato pode competir para o conjunto de substratos que se encontram presentes no citoplasma. A manutenção de
5 uma concentração intracelular elevada de DMB-S-MMP é crítica, particularmente considerando que a LovD pode catalisar a reação reversível em que o ácido de sinvastatina pode ser hidrolisado para ácido de MJ na ausência de doadores de tioéster de acila (vide, por
10 exemplo, Xie e outros, (2006) Chem Biol 13: 1161-1169).

A purificação do ácido de sinvastatina após bio-conversão foi igualmente aperfeiçoada conforme é demonstrado mediante realização de uma fermentação de escala aumentada de YT2/pAW31 (200 mL, 15 mM de MJ, 18 mM
15 de DMB-S-MMP). Após confirmação da conversão completa de ácido de MJ para ácido de sinvastatina mediante utilização de análise HPLC (Figura 17, indicação a), a combinação de caldo de fermentação e extrato de células foi lavada com hexano, acidificada com 6 M de HCl e filtrada para colheita
20 do ácido de sinvastatina precipitado (indicação b). Após lavagem da torta de filtração com 1 volume de dH₂O, o ácido de sinvastatina foi solubilizado em ACN, filtrado e analisado por HPLC (indicação c). Não foram necessárias etapas de lavagem adicionais para remoção do DMB-S-MPA que
25 se encontrava presente no BL21(DE3)/pAW31. A recuperação final de ácido de sinvastatina com utilização desta abordagem foi de 94%.

CONCLUSÃO

Conforme foi ilustrado acima, os presentes requerentes utilizaram uma biblioteca de "knockout" de gene único Keio para identificação BioH como a carboxilesterase que hidrolisa DMB-S-MMP durante a conversão bio-catalítica de célula inteira de ácido de sinvastatina a partir de ácido de MJ. O BioH apresenta taxas de hidrólise muito rápidas, esgotando a concentração intracelular de DMB-S-MMP disponível como doador de acila na transesterificação catalisada por LovD. Utilizando a cepa YT2 de expressão de bioH, os presentes requerentes puderam eliminar completamente a degradação de DMB-S-MMP e aumentar significativamente a robustez do biocatalisador de célula inteira. Esta cepa pode constituir um hospedeiro útil em outras aplicações de bio-catálise e bio-síntese orientadas a precursor quando um ou mais substratos utilizados contêm uma ligação éster lábil (vide, por exemplo, Murli e outros, (2005) Appl Environ Microbiol 71: 4503-4509).

EXEMPLO 4: SÍNTESE EFICIENTE DE SINVASTATINA UTILIZANDO
BIOCATÁLISE DE CÉLULA INTEIRA

Este exemplo descreve um processo bio-catalítico de célula inteira, de uma etapa, para síntese de sinvastatina a partir de monacolina J. Conforme é discutido detalhadamente mais abaixo, utilizando uma cepa de Escherichia coli sob-expressando LovD de A terreus, os presentes requerentes puderam alcançar uma conversão de > 99% de monacolina J para sinvastatina sem utilização de

quaisquer etapas químicas de proteção. Uma descoberta fundamental consistiu em um substrato com permeabilidade para membrana, α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), que foi utilizado com eficiência pela LovD
5 como doador de acila. O processo foi aumentado em escala para síntese de sinvastatina em uma escala em gramas. Os presentes requerentes também demonstram que a sinvastatina sintetizada por este método pode ser prontamente purificada do caldo de fermentação com > 90% de recuperação e > 98% de
10 pureza conforme determinados por HPLC. Foi igualmente examinada a bio-conversão com utilização de fermentação de alimentação em lotes, de elevada densidade celular. A bio-catálise de célula inteira pode constituir portanto uma alternativa atraente para as atuais transformações semi-
15 sintéticas de múltiplas etapas.

Atualmente, dois processos semi-sintéticos (vide, por exemplo, Askin e outros, 1991, J. Org. Chem. 56; e Hoffman e outros, 1986 J Med Chem 29: 849-52) são amplamente utilizados para síntese de sinvastatina a partir
20 de lovastatina (Figura 18). Um processo adaptado comum (vide, por exemplo, Hoffman e outros, 1986 J Med Chem 29: 849-52) começa com a hidrólise da lovastatina para obtenção do principal intermediário monacolina J, seguida pela lactonização do ácido para proteção do grupo hidroxila C11,
25 e proteção de trimetilsililação da hidroxila C13. A monacolina J protegida é então submetida a acilação por cloreto de α -dimetilbutiril para obtenção da forma

protegida de sinvastatina, que é subsequente-
desprotegida para obtenção de sinvastatina. Ambos os
processos de múltiplas etapas ilustrados na Figura 18 são
laboriosos, contribuindo assim para o fato de a
5 sinvastatina ser quase cinco vezes mais dispendiosa que a
lovastatina. Desta forma, um novo esquema semi-sintético
capaz de reduzir o número de transformações químicas e
aumentar a eficiência em geral da conversão poderá ter uma
utilidade significativa.

10 Os presentes requerentes descreveram anteriormente
a clonagem e caracterização de uma aciltransferase dedicada
do agrupamento genético bio-sintético de lovastatina que
transfere regioseletivamente o grupo α -metilbutiril da
lovastatina dicetideo sintase (LDKS) para o grupo hidroxila
15 C8 da monacolina J para obtenção de lovastatina (vide, por
exemplo, Xie e outros, 2006, Chem Biol 13: 1161-1169). Os
presentes requerentes demonstraram que a LovD tem uma
especificidade de substrato ampla para o transportador de
acila, o grupo acila e o núcleo de decalina. Mais
20 notavelmente, a LovD foi capaz de catalisar a acilação
direta da monacolina J por uma α -dimetilbutiril-S-N-
acetilcisteamina (DMB-S-NAC) para obtenção de sinvastatina.
A reação é altamente regioespecífica para o álcool C8
apenas, e constitui portanto um potencial processo de uma
25 etapa para produção de sinvastatina a partir de monacolina
J sem emprego de química protetora.

Neste Exemplo, descrevemos o desenvolvimento de um

processo bio-catalítico de célula inteira capaz de converter monacolina J em sinvastatina de uma forma altamente eficiente. Utilizando um novo tioéster como doador de acila, os presentes requerentes puderam obter uma
 5 conversão > 99% de sinvastatina a partir de monacolina J em uma única etapa. O processo de fermentação pode facilmente ter sua escala aumentada para produção de sinvastatina com rendimento de escala industrial.

SÍNTESE DE α -DIMETILBUTIRIL-S-METIL 3-MERCAPTOPROPIONATO
 10 (DMB-S-MMP):

Cloreto de dimetilbutiril (1,76 mL, 12 mmol) foi adicionado lentamente a uma solução de 50 mL de metil-3-mercaptopropionato (1,30 mL, 12 mmmol) e trietilamina (3,340 mL, 24 mmol) em dietil éter a 0° C e a solução foi
 15 submetida a agitação durante 2 horas. A reação foi temperada com NH₄Cl aquoso e foi extraída duas vezes com 100 mL de acetato de etila. A camada orgânica é combinada, submetida a secagem e evaporada para obtenção de um líquido incolor (2,6 g). O resíduo foi purificado com cromatografia
 20 de sílica-gel (EA/hexano, 20/80) para obtenção de DMB-S-MMP puro (2,25 g, 90% de rendimento). ¹H NMR: δ 3,87 (s, 3H), 3,09 (t, 2H, 7,1 Hz), 2,58 (t, 2H, 7,0 Hz), 1,59 (q, 2H, 7,5 Hz), 1,18 (s, 6H), 0,83 (t, 3H, 7,4 Hz), ¹³C NMR: δ 206,16, 172,26, 51,81, 50,04, 34,38, 33,73, 24,71, 23,60,
 25 8,92.

ENSAIO CINÉTICO DE ENSAIO DE LOVD:

A expressão e purificação de LovD foram anteriormente descritas detalhadamente (vide, por exemplo, Xie e outros, 2006, Chem Biol 13: 1161-1169). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente em 50 mM de HEPES, pH 7,9. As velocidades iniciais (k_i) dos substratos de acila foram determinadas com 10 μ M de LovD, 1 mM de monacolina J e 4 mM do tioéster. A mistura de reação em diferentes pontos no tempo foi temperada por ácido trifluoroacético (TFA), extraída com acetato de etila, evaporada até secar e re-dissolvida em acetonitrilo. A porcentagem de conversão de monacolina J para sinvastatina foi determinada por análise de cromatografia HPLC (C18). A faixa limiar da taxa de conversão é relatada como k_i na Tabela 1B. Para determinação do valor k_m de DMB-S-MMP, a concentração de monacolina J tem um valor fixo de 2 mM, enquanto que a concentração de DMB-S-MMP foi variada de 0,2 mM até 10 mM. Foi adicionado DMSO até uma concentração final de 5% para facilitar a solubilização do DMB-S-MMP. Para obtenção do valor k_m da monacolina J, a concentração de DMB-S-MMP tem um valor fixo de 2 mM, enquanto que a concentração de monacolina J foi variada de 0,2 mM até 5 mM.

ENSAIO DE ATIVIDADE DE LISADO DE CÉLULA INTEIRA

Foi utilizado um ensaio de lisado de célula inteira para determinação do nível de atividade de LovD em diferentes condições de fermentação. Por exemplo, a cepa

BL21(DE3) de *E. coli* transformada com pAW31 foi cultivada em mídia LB a 37° C com um valor OD600 de 0,5, e nessa ocasião foram adicionadas à cultura 100 µM de IPTG e a expressão foi realizada à temperatura ambiente ("Room
5 Temperature" - RT) durante 16 horas. Foi então colhida por centrifugação (4000 g, 20 minutos) uma alíquota de 70 ml da cultura. O sobrenadante foi removido, e a pelota de células foi re-suspensa em 7 ml de tampão de lise (20 mM de tris-HCl, pH 7,9, 500 mM de NaCl). As células foram lisadas por
10 sonicação em gelo e os detritos de células foram removidos por centrifugação (13.000 rpm, 10 minutos, 4° C). O lisado foi então adicionado diretamente ao ensaio in vitro. Condição final do ensaio: 50 mM de HEPES, pH 7,9, 1 mM de monacolina J, 4 mM de DMB-S-MMP, 5 µl de lisado de células,
15 25 µl de volume final. A concentração efetiva de LovD no caldo de fermentação foi então calculada da velocidade inicial utilizando-se 0,6 min⁻¹ como taxa de conversão.

FERMENTAÇÃO DE BAIXA DENSIDADE

A cepa de *E. coli* BL21(DE3)/pAW31 foi cultivada em
20 mídia LB a 37° C com um valor OD600 de 0,5, e nessa ocasião foram adicionadas à cultura 100 µM de IPTG e a expressão foi realizada à temperatura ambiente (RT) durante 16 horas. Uma cultura de 10 ml foi transferida para um tubo de centrifugação de 15 mL. As células foram colhidas por
25 centrifugação (4000 g, 10 minutos). A pelota de células foi re-suspensa em 957 µl do sobrenadante. O pH foi ajustado

para pH 7,9 com 1,0 N de NaOH, com subsequente adição de 33 μ l de MJ a 450 mM (concentração final 15 mM) e 6 μ l de DMB-S-MMP puro (concentração final ~ 25 mM). A cultura foi então submetida a agitação a 300 rpm à temperatura ambiente. Em cada ponto no tempo foi removida uma alíquota de 4 μ l da mistura de reação, temperada em 300 μ l de acetato de etila contendo 1% de TFA. A fase orgânica foi removida, evaporada, e re-dissolvida em acetonitrilo para análise de cromatografia HPLC.

10 Para síntese de sinvastatina em maior escala, o procedimento acima teve sua escala aumentada com início com uma cultura da cepa de E. coli BL21(DE3)/pAW31 em um frasco de agitação de 2x1L. Após 16 horas de expressão com temperatura RT, o volume da cultura foi concentrado para 15 200 mL para um valor final OD600 de 22. Monacolina J (forma de sal de sódio) e DMB-S-MMP foram adicionados para uma concentração final de 15 mM e 25 mM, respectivamente. As células foram agitadas à temperatura ambiente e foi utilizada cromatografia HPLC para monitoração do progresso 20 da reação. Para purificação da sinvastatina da fermentação após a reação ter sido completada (> 99% de conversão conforme a avaliação feita com cromatografia HPLC), foi utilizado o procedimento descrito a seguir. As células foram removidas por centrifugação. A sinvastatina 25 intracelular foi extraída mediante agitação da pelota de células em acetona. A acetona foi então removida sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em dH2O e

filtrado. O filtrado e o caldo de fermentação transparente foram combinados, lavados duas vezes com volume igual de n-hexano, e acidificados para pH 2,0 com 6N HCl. O precipitado branco foi recuperado por filtração e foi
5 lavado excessivamente com dH₂O gelada para remoção do DMB-S-MPA co-precipitado. Após secagem da torta de filtração sob vácuo, os sólidos foram agitados em 200 mL de acetonitrilo durante 1 hora, com subsequente filtração para remoção de materiais insolúveis. O filtrado foi evaporado
10 até secar sob pressão reduzida para obtenção da forma ácida de sinvastatina.

FERMENTAÇÃO DE ALIMENTAÇÃO EM LOTES DE F1 DE ALTA DENSIDADE

A fermentação de alimentação em lotes de F1 e composição de mídia foram adotados das técnicas de Pfeifer e outros (vide, por exemplo, Pfeifer e outros, 2002, Appl
15 Environ Microbiol 68:3287-92). Os presentes requerentes excluíram a solução de vitamina tanto da mídia de fermentação quanto da mídia de alimentação. Uma cultura inicial foi cultivada durante a noite em 5 mL de mídia LB
20 (com 35 mg/L de kanamicina) a 37° C e 250 rpm e foi utilizado 1 mL para inocular um frasco de agitação de 100 mL de semente com mídia F1 (com 35 mg/L de kanamicina). Foram utilizados 10 mL da cultura de semente de F1 para inocular um recipiente Applikon Biobundle de 2 litros
25 contendo 1 L de mídia F1. Foi realizada fermentação a 37° C e o pH foi mantido em 7,1 durante todo o experimento com 1 M de H₂SO₄ e NH₄OH semi-concentrado. A aeração foi

controlada a 0,2 até 0,4 L/min e a agitação foi mantida a 900 rpm. Quando a leitura OD600 alcançou um valor entre 5 e 10, a temperatura da fermentação foi reduzida para RT, com subsequente adição de 200 μ M de IPTG para indução de expressão de proteína. Simultaneamente, uma bomba peristáltica forneceu 0,08 mL/min da solução de alimentação para o fermentador.

Os valores efetivos de atividade e concentração de LovD em diferentes estágios da fermentação foram medidos conforme descrito acima. Para preparação de células em repouso para estudos de bio-conversão, as células foram centrifugadas a 5000 g durante 10 minutos, com subsequente re-suspensão suave no mesmo volume de tampão PBS, pH 7,4. Foram então adicionados monacolina J e DMB-S-MMP às alíquotas de células para início da síntese de sinvastatina.

RESULTADOS

IDENTIFICAÇÃO DE UM DOADOR DE ACILA CINETICAMENTE SUPERIOR

Foi anteriormente demonstrado que a LovD pode utilizar tioésteres permeadores de membrana como doadores de acila na reação de transesterificação (vide, por exemplo, Xie e outros, 2006, Chem Biol 13: 1161-1169). Foi constatado que tanto DMB-S-NAC quanto DMB-S-MTG (Tabela 1B) são substratos de LovD. Os dois substratos, entretanto, proporcionaram conversões deficientes na síntese de sinvastatina, com valores k_i aparentes de $\sim 0,02$ por minuto. Adicionalmente, quando qualquer um dos substrato é

utilizado, a reação sofre uma grave inibição de substrato com concentrações crescentes de monacolina J. Desta forma, a principal prioridade no desenvolvimento de LovD para obtenção de um catalisador industrialmente útil para a

5 químio-bio-síntese de sinvastatina consiste na identificação de melhores substratos que possam superar estas duas limitações.

Os presentes requerentes sintetizaram diversas variantes adicionais de DMB-S-MTG e realizaram ensaios

10 quanto a propriedades catalíticas in vitro. Foram individualmente sintetizados DMB-S-metil mercaptopropionato (DMB-S-MMP), DMB-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e DMB-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB) mediante reação de cloreto de α -dimetilbutiril com os correspondentes tióis

15 livres. As taxas de conversão iniciais são comparadas na Tabela 1B. Surpreendentemente, o aumento da extensão do transportador de tioéster em um carbono (de C2 em S-MTG para C3 em S-MMP e S-EMP) aumentou significativamente a taxa de conversão da reação. A inserção de um carbono

20 adicional em S-MMB (C4) produziu como resultado um aumento adicional da taxa de transesterificação. Na condição de reação padrão (1 mM de MJ, 4 mM de substrato de acila, 10 μ M de LovD, 50 mM de HEPES, pH 7,9), as taxas de conversão iniciais de esterificação são 0,6, 0,7, 0,78 min⁻¹ para

25 DMB-S-MMP, DMB-S-EMP e DMB-S-MMB respectivamente. Os aumentos de > 30 vezes nas taxas refletem que a posição relativa dos grupos carbonila com relação à ligação

tioéster é crítica para ligação à LovD. Em contraste, quando foi utilizado DMB-S-MPA como doador de acila, a taxa de conversão inicial decresceu significativamente para 0,08 por minuto, indicando que o ácido livre (provavelmente um sal de sódio) se liga deficientemente ao sítio ativo de LovD.

Os presentes requerentes selecionaram DMB-S-MMP como o tioéster de acila mais adequado para bio-catálise devido ao fato de o tiol precursor (metil mercaptopropionato) ser significativamente menos dispendioso que outros materiais de partida. Os parâmetros cinéticos da reação de acilação quando foi utilizado DMB-S-MMP como doador de acila foram determinados e encontram-se ilustrados na Figura 19. Para obtenção dos valores k_m de cada substrato na reação de transacilação, os presentes requerentes fixaram a concentração de um substrato, simultaneamente variando a concentração do outro substrato para obtenção de uma curva de cinética de Michaelis-Menten. A Figura 19A ilustra a taxa de conversão da reação (V/E_0) como função de concentração de monacolina J. Em contraste com substratos anteriormente ensaiados, não foi observada inibição de substrato por monacolina J e o valor k_m foi determinado como sendo $0,78 \pm 0,12$ mM. A taxa de conversão de LovD em quantidades variáveis de DMB-S-MMP é semelhante determinada fixando-se a concentração de monacolina J em 2 mM (Figura 19B). O valor k_m de DMB-S-MMP é ilustrado como sendo $0,67 \pm 0,04$ mM. Em ambas as

titulações o valor k_{cat} da reação foi determinado como sendo $0,66 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$. A análise cinética realizada pelos presentes requerentes demonstra claramente que o DMB-S-MMP é um substrato cineticamente superior em comparação com

5 tioésteres anteriormente relatados. O nível de inibição de substrato em uma reação Ping Pong Bi Bi depende do valor relativo k_m dos dois substratos. Quando DMB-S-MMP é utilizado como substrato de acila, seu valor k_m relativamente mais baixo permite que o mesmo se ligue a

10 LovD prontamente e não seja portanto inibido por concentrações crescentes de monacolina J. Esta importante propriedade permite portanto o desenvolvimento de um processo bio-catalítico em lotes em contraste com um processo de alimentação em lotes em que é necessário

15 fornecer continuamente a monacolina J para manter sua concentração baixa e minimizar a inibição de substrato.

Os presentes requerentes observaram anteriormente que a acila-S-MTG era rapidamente hidrolisada quando adicionada a uma reação de caldo de fermentação de *E. coli*

20 (vide, por exemplo, Xie e outros, 2006, *Chem Biol* 13: 1161-1169). Para testar a estabilidade do doador de acila agora identificado em condições *in vivo*, foi adicionado DMB-S-MMP puro a mídia LB inoculada com células de *E. coli* BL21(DE3) e a cultura foi cultivada a 37°C durante a noite (16

25 horas). Foi observada uma degradação de $\sim 20\%$ do substrato para um composto predominantemente mais polar. Em comparação com compostos conhecidos utilizando

cromatografia HPLC, os presentes requerentes identificaram o principal produto de degradação como sendo DMB-S-MPA, que pode surgir através da ação de lipases de *E. coli* endógenas. Os presentes requerentes concluíram que quando o

5 DMB-S-MMP é fornecido em excesso para a reação em lotes, a baixa degradação não limitará a bio-conversão de monacolina J para sinvastatina.

BIO-CATÁLISE DE CÉLULA INTEIRA

Equipados com o significativamente mais eficiente

10 tioéster DMB-S-MMP, os presentes requerentes estudaram a conversão de monacolina J para sinvastatina utilizando *E. coli* como um bio-catalisador de célula inteira. Uma cepa BL21(DE3) transformada com o plasmídeo de expressão pAW31 derivado de pET28a foi utilizada como hospedeiro

15 microbiano. A expressão de LovD foi realizada durante 16 horas à temperatura ambiente e o nível de expressão foi visualizado com SDS-PAGE. Para quantificação da quantidade ativa de LovD expressada em diferentes condições de cultura e mídias, os presentes requerentes empregaram um ensaio de

20 atividade em que o lisado de célula inteira foi diretamente adicionado a um ensaio de reação contendo 1 mM de monacolina J, 4 mM de DMB-S-MMP em 50 mM de HEPES, pH 7,9. A conversão de monacolina J para sinvastatina foi quantificada por cromatografia HPLC e a concentração

25 aparente de LovD foi estimada com utilização do valor k_i de 0,6 min⁻¹ (Tabela 1B). Em condições de baixa densidade de células, a expressão de LovD é quase três vezes maior com

mídia LB do que com mídia mínima F1 (Tabela 3).

Os presentes requerentes testaram então a quimio-bio-síntese de sinvastatina em mídia LB. Após expressão de LovD durante a noite, uma alíquota de 10 mL das células foi concentrada dez vezes para 1 mL em LB. A etapa de concentração foi realizada para obtenção de um ambiente de alta densidade celular mimetizando condições de fermentação e para obtenção de uma concentração efetiva mais elevada de LovD (concentração final de aproximadamente 20 μ M). A forma de sal de sódio de monacolina J foi adicionada para uma concentração final de 15 mM (de um material de 450 mM em água) e foi adicionado DMB-S-MMP puro para um concentrado final de 25 mM. A mistura de reação foi então agitada vigorosamente à temperatura ambiente. Foram tomados periodicamente pontos no tempo para verificação da conversão de monacolina J em sinvastatina (Figura 20A).

Conforme se encontra ilustrado na Fig. 20B, a cultura simples de baixa densidade de BL21(DE3)/pAW31 constituiu um bio-catalisador robusto de célula inteira para síntese de sinvastatina. Uma fase de intervalo inicial de 2 horas foi observada no início da adição dos dois substratos, seguida por uma rápida conversão com uma velocidade de reação linear de ~ 0,73 nm por hora. A taxa de reação torna-se mais lenta em conversões mais elevadas (> 95%) em resultado do esgotamento de monacolina J. Em 24 horas, 99% da monacolina J foi convertida em sinvastatina. Com base na análise de cromatografia HPLC, não foi

observada degradação de monacolina J nem de sinvastatina por metabolismo celular. Os presentes requerentes observaram uma redução de ~ 20% nas leituras OD600 da cultura após 24 horas, sugerindo que o processo de célula inteira pode ser mantido para catálise prolongada.

Os presentes requerentes relataram que a LovD é capaz de hidrolisar lovastatina para monacolina J in vitro com um valor k_{cat} de 0,21 min⁻¹ de reação (vide, por exemplo, Xie e outros, 2006, Chem Biol 13: 1161-1169). Para examinar se é possível acoplar a etapa de hidrólise à etapa de acilação em uma única etapa de fermentação, os presentes requerentes ensaiaram a taxa de hidrólise de lovastatina por BL21(DE3)/pAW31. Nas mesmas condições in vivo referidas acima, foi observada uma baixa taxa de formação de monacolina J. Começando com 0,5 mM de lovastatina (forma de sal de sódio), os presentes requerentes alcançaram 91% de hidrólise em 48 horas, com uma taxa de conversão de ~ 0,01 mM por hora, quase 75 vezes mais lenta que a taxa da reação de acilação. Isto contrasta vivamente com os resultados cinéticos in vitro, em que a taxa de hidrólise é apenas três vezes mais lenta que a reação de acilação. A significativa atenuação da taxa de hidrólise de lovastatina in vivo é provavelmente devida à barreira de permeação das membranas celulares para a lovastatina que é mais hidrofóbica. Os presentes requerentes tentaram aliviar a barreira de permeabilidade de membrana utilizando uma cepa alternativa BL21(DE3)/pXXK2, em que a LovD é clonada com

uma sequência de sinal pelB de terminal N para localização no espaço periplásmico. Não foi observado nenhum aperfeiçoamento de atividade hidrolítica para esta cepa, indicando que a impermeabilidade da membrana de plasma externa constitui o principal obstáculo de transporte.

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE SINVASTATINA

Para obter acesso ao rendimento de recuperação de sinvastatina do processo bio-catalítico de célula inteira, os presentes requerentes aumentaram a escala da bio-conversão para um volume final de 200 mL. Isto foi obtido mediante concentração de 2 x 1L da cepa de expressão em mídia LB após expressão de LovD durante a noite. A forma de sal de sódio de monacolina J e DMB-S-MMP foram adicionados para uma concentração final de 15 mM e 25 mM respectivamente e o progresso da reação foi monitorado por cromatografia HPLC. Os presentes requerentes observaram uma cinética de conversão idêntica no processo de escala maior e foi obtida uma conversão de > 99% 24 horas após a adição de substrato. A sinvastatina obtida da via quimio-bio-sintética pode ser prontamente purificada do caldo de fermentação sem utilização de etapas de cromatografia. Uma etapa de centrifugação foi utilizada para separar as células e o caldo de fermentação. A sinvastatina intracelular foi recuperada mediante agitação da pelota de células em acetona, seguida por evaporação, e re-dissolução em dH₂O. A solução aquosa contendo a sinvastatina intracelular foi combinada com o caldo de fermentação e foi

lavada com n-hexano para remoção de DMB-S-MMP. A solução aquosa foi então acidificada com 6N HCl para pH 2,0, resultando em precipitação das formas de ácido livre de sinvastatina e DMB-S-MPA. Conforme é conhecido na técnica, as formas de ácido livre de sinvastatina podem ser convertidas em sódio, potássio, amônio, ou qualquer outro sal derivado de elementos alcalinos terrosos ou outros sais metálicos. Estes sais podem então ser convertidos em sinvastatina pura, por exemplo mediante utilização de metodologias comuns conhecidas na técnica. O contaminante DMB-S-MPA pode ser removido por filtração e lavagem da placa de filtração com excesso de dH₂O. O filtrado acidificado continha < 1% das quantidades totais de sinvastatina recuperadas. A sinvastatina quase pura pode ser recuperada mediante lavagem da torta de filtração com acetronitrilo, seguida por evaporação do filtrado (Recuperação final: 1,13 g, 90%; pureza final conforme determinada por cromatografia HPLC: 98%).

FERMENTAÇÃO DE ALTA DENSIDADE DE CÉLULAS

Os presentes requerentes exploraram a atividade do biocatalisador de célula inteira utilizando um fermentador de alta densidade de célula. A concentração efetiva de LovD medida de um fermentador de lote utilizando TB como mídia e a de um processo de alimentação em lotes utilizando mídia mínima F1 encontram-se ilustradas na Tabela 3. Com utilização do processo de alimentação em lotes adotado daquele relatado por Pfeifer e outros (vide, por exemplo,

Pfeifer e outros, 2002, Appl Environ Microbiol 68: 3287-92), os presentes requerentes foram capazes de obter culturas com densidades celulares e atividades de LovD muito elevadas (Figura 21A). Os presentes requerentes
5 puderam obter ~ 1,5 g/L de expressão de LovD ativa com um valor OD600 de 75, 40 horas após a inoculação (Figura 21A).

Devido ao elevado custo dos materiais de partida, os presentes requerentes não puderam realizar uma bio-conversão utilizando o caldo de fermentação inteiro. Ao
10 invés disso, foram obtidas alíquotas de amostras da cultura em diversos pontos durante o processo de fermentação (Figura 21A). As atividades de LovD em cada ponto no tempo foram determinadas com utilização do ensaio de lisado de célula inteira descrito em Materiais e Métodos. Os
15 presentes requerentes realizaram então a bio-conversão utilizando 1 mL da cultura diretamente e mediram a taxa de formação de sinvastatina (Células não repousantes, Figura 21B). Alternativamente, foram igualmente examinadas as propriedades do biocatalisador de célula inteira após re-
20 suspensão das pelotas de células em PBS, pH 7,4 (Células em repouso). Conforme pode ser observado na Figura 21B, em cada ponto no tempo puderam ser obtidas altas taxas de conversão quando as células são dispostas em um ambiente de repouso. Adicionalmente, a atividade total de LovD na
25 cultura não é correlacionada linearmente com a taxa de conversão. Por exemplo, as células em repouso do ponto 3 no tempo apresentaram a taxa mais elevada de conversão em

sinvastatina de aproximadamente 1 g/L/hora, apesar de a atividade de LovD total ser menor em comparação com as células obtidas do ponto 4 no tempo. A excepcional robustez destas células foi capaz de completar a conversão de 15 mM de monacolina J para sinvastatina em menos de 8 horas.

Uma descoberta importante neste exemplo consiste na identificação de um outro tioéster de acila adicional que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase, que é significativamente mais eficiente nesta reação de acilação. Os presentes requerentes identificaram anteriormente o DMB-S-NAC como um substrato de LovD (vide, por exemplo, Xie e outros, 2006, Chem Biol 13: 1161-1169). Entretanto, a reação de acilação ocorreu com uma conversão menos que ideal, e como resultado da fraca ligação de substrato a LovD, o segundo substrato monacolina J tornou-se um inibidor competitivo de DMB-S-NAC. Esta última propriedade é particularmente prejudicial devido ao fato de forçar a concentração de monacolina J a ser mantida em um nível mínimo durante a bio-conversão. Tanto DMB-S-MMP quanto DMB-S-MMB são superiores a DMB-S-NAC como doadores de acila. O valor k_{cat} de DMB-S-MMP é aproximadamente 30 vezes mais elevado através de uma sutil alteração estrutural do transportador de acila, ao passo que o valor K_m é agora comparável ao da monacolina J, dessa forma eliminando a inibição de substrato da monacolina J. Adicionalmente, o precursor de tiol S-MMP é significativamente menos

dispendioso em comparação com S-NAC. Considerando que os tioésteres S-NAC de acila são utilizados predominantemente na bio-síntese orientada para precursor de produtos naturais (vide, por exemplo, Jacobsen e outros, 1977, Science 277:367-9), os transportadores de tioéster de acila descritos neste trabalho podem ser também muito importantes em outras aplicações de bio-síntese de engenharia.

Os presentes requerentes tentaram desenvolver um processo bio-catalítico in vitro para conversão de monacolina J em sinvastatina. Partiu-se do princípio de que uma LovD basicamente purificada poderia ser útil para superar quaisquer dificuldades de transporte e purificação associadas com a fermentação de célula inteira. A LovD pode ser prontamente fracionada de uma maioria de outras proteínas celulares através de uma única etapa de precipitação de 30% de sulfato de amônio. Mais de 98% da atividade de LovD medida do lisado de célula inteira pode ser reconstituída mediante ressolubilização da pelota precipitada em 50 mM de HEPES, pH 7,9. Entretanto, a LovD precipita-se prontamente (horas) em elevadas concentrações de proteína (~ 100 μ M), e lentamente (dias) em concentrações mais baixas (~ 10 μ M) em condições de ensaio à temperatura ambiente. Interessantemente, a proteína LovD precipitada pode ser ressolubilizada após diluição no mesmo tampão e recupera praticamente toda a atividade.

Quando quantidades moderadas de monacolina J (> 5 mM) foram utilizadas em um processo in vitro em lote, os

presentes requerentes não conseguiram obter > 60% de conversão de equilíbrio de monacolina J para sinvastatina, mesmo após uma incubação prolongada. Isto é provavelmente devido a uma reação de competição em que a sinvastatina é novamente hidrolisada para monacolina J por LovD. Quando a concentração de sinvastatina alcança a faixa milimolar, a velocidade da reação de hidrólise alcança o valor máximo ($k_{cat} = 0,3 \text{ min}^{-1}$) e portanto impede significativamente a taxa líquida geral de acilação.

Interessantemente, a reação inversa não constituiu um fator limitativo em condições in vivo quando a concentração de estatina era de entre 10 e 15 mM (4 g/L - 6 g/L), conforme fica evidente na elevada conversão (> 99%) de monacolina J para sinvastatina obtida neste estudo. Pensa-se que após a monacolina J ter sido convertida em sinvastatina, exportadores multidrogas tais como o complexo tripartite AcrAB-TolC são capazes de extrudar a sinvastatina da membrana interna ou do periplasma para a mídia (vide, por exemplo, Murakami e outros, 2006, Nature 443:173-9). A impermeabilidade da membrana externa de *E. coli* impede o reingresso da sinvastatina hidrofóbica. A mais polar monacolina J é capaz de se difundir continuamente através da membrana e servir como um substrato de LovD. Em conjunto, a membrana externa de *E. coli* e suas bombas de efluxo reduzem efetivamente a concentração intracelular de sinvastatina disponível para hidrólise, dessa forma atenuando a taxa da reação inversa

indesejável, e maximizando a conversão da reação desejada. Entretanto, as bombas de efluxo normalmente expressadas por *E. coli* podem ser sobrecarregadas quando a concentração de substrato é aumentada para > 20 mM. Em concentrações elevadas de monacolina J (e portanto de sinvastatina) e DMB-S-MMP, os presentes requerentes puderam obter uma conversão máxima de 85 ~ 90%. O exame da distribuição de sinvastatina na cultura revelou que uma quantidade significativa ($> 20\%$) se encontra localizada dentro das células, dessa forma causando provavelmente níveis aumentados de hidrólise de produto. Não é sabido se a sinvastatina foi particionada na membrana interna, no citoplasma ou no periplasma. Os presentes requerentes examinam atualmente métodos para aumento da taxa de exportação de sinvastatina mediante super-expressão de bombas de efluxo multidrogas selecionadas (vide, por exemplo, Masi e outros, 2003, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 786:197-205).

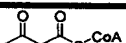
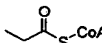
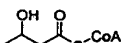
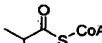
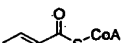
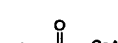
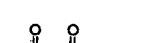
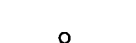
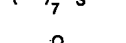
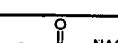
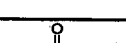
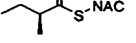
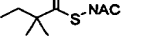
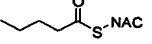
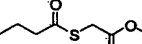
Neste exemplo, os presentes requerentes desenvolveram um processo bio-catalítico de célula inteira altamente robusto para síntese de sinvastatina a partir de monacolina J. Utilizando *E. coli* como hospedeiro, foi implementado um processo de escala laboratorial capaz de síntese em escala de gramas. Adicionalmente, foi criado um esquema de purificação de jusante simples para fácil recuperação e purificação do produto. Os presentes requerentes utilizam atualmente abordagens racionais e

orientadas para evolução para aperfeiçoamento das taxas de conversão catalítica de LovD. Com otimização das propriedades de LovD, bem como engenharia metabólica do hospedeiro para aperfeiçoamento do rendimento de produção da conversão, a via quimio-bio-sintética de obtenção de sinvastatina pode constituir uma alternativa competitiva e atraente para as vias sintéticas ilustradas na Figura 18.

A presente invenção não tem seu escopo limitado pelas configurações aqui divulgadas, que pretendem constituir simples ilustrações de aspectos individuais da invenção, e quaisquer configurações funcionalmente equivalentes são abrangidas no escopo da invenção. Diversas modificações dos modelos e métodos da invenção, adicionalmente àquelas aqui descritas, irão tornar-se aparentes para aqueles que são versados na técnica a partir dos ensinamentos e da descrição acima, e situam-se similarmente dentro do escopo da invenção. Essas modificações ou outras configurações podem ser praticadas sem afastamento do verdadeiro escopo e espírito da invenção.

TABELAS

Tabela 1A. Tioésteres de acila como substratos de LovD^[a]

Substrato de Tioéster de Acila	de Conversão ^[b] , RT (min) ^[c]	Substrato de Tioéster de Acila	de Conversão, RT (min)
	7%, 5,1		89%, 4,6
	35%, 6,0		35%, 4,2
	52%, 6,8		6%, 6,5
	87%, 6,8		N.R. ^[d]
	32%, 8,7		N.R.
	7%, 10,6		69%, 7,6
	50%, 6,8		58%, 7,6
	22%, 7,6		10%, 8,5
	52%, 7,8		92%, 6,8
	33%, 8,7		70%, 7,6
	2%, 7,5		17%, 8,5

[a] Os produtos das reações foram verificados por LC-MS.

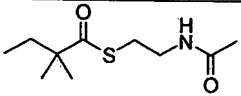
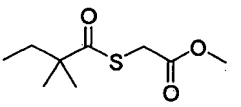
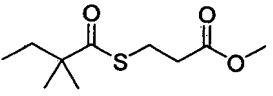
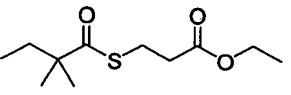
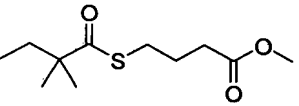
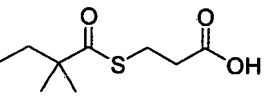
Condições de reação: 10 μ M de LovD, 1 mM de monacolina J, 4

5 mM de tioéster de acila, 50 mM de HEPES, pH 7,9, 25° C, 10

horas. [b] A conversão é medida pela porcentagem de monacolina J convertida para o correspondente análogo de lovastatina com utilização de cromatografia HPLC (238 nm).

[c] Tempo de retenção da forma de ácido livre do produto medida por HPLC (C18 fase reversa). O Gradiente de HPLC é idêntico àquele descrito na Figura 5.

Tabela 1B: Comparação de velocidades iniciais de substratos de tioéster.

Substrato de Tioéster	Abreviação	Velocidade Inicial (k_i , min^{-1}) ^a
	DMB-S-NAC	0.02
	DMB-S-MTG	0.03
	DMB-S-MMP	0.60
	DMB-S-EMP	0.70
	DMB-S-MMB	0.78
	DMB-S-MPA	0.08

^a Condições de reação: 1 mM de MJ, 4 mM de substrato de tioéster, 10 uM de LovD pura, 50 mM de HEPES, pH 7,9; a
 5 velocidade inicial é definida como a taxa de conversão inicial na faixa linear.

Tabela 2. Lista de mutantes de *E. coli* BW25113 triados neste trabalho. Os números correspondem às pistas de TLC ilustradas na Figura 14A. A BioH foi demonstrada ser a única enzima responsável pela hidrólise de DMB-S-MMP.

N°	Deleção	N°	Deleção	N°	Deleção	N°	Deleção
	de Gene		de Gene		de Gene		de Gene
1	<i>ΔgloB</i>	16	<i>ΔyegU</i>	31	<i>Δpaal</i>	46	<i>ΔyidA</i>
2	<i>ΔmhpC</i>	17	<i>ΔpxL</i>	32	<i>ΔyegX</i>	47	<i>ΔyieH</i>
3	<i>ΔybhA</i>	18	<i>ΔpxM</i>	33	<i>ΔyfbT</i>	48	<i>ΔyigB</i>
4	<i>ΔybiV</i>	19	<i>ΔyedL</i>	34	<i>ΔypfH</i>	49	<i>ΔyigL</i>
5	<i>ΔycaC</i>	20	<i>Δddg</i>	35	<i>ΔypfI</i>	50	<i>ΔysgA</i>
6	<i>ΔrarA</i>	21	<i>ΔcaiE</i>	36	<i>ΔygaP</i>	51	<i>ΔeptA</i>
7	<i>ΔymdC</i>	22	<i>ΔwbbJ</i>	37	<i>ΔyqaB</i>	52	<i>ΔyjfP</i>
8	<i>ΔycfH</i>	23	<i>ΔwcaF</i>	38	<i>ΔyghX</i>	53	<i>ΔcheB</i>
9	<i>ΔycgM</i>	24	<i>ΔwcaB</i>	39	<i>ΔyghY</i>	54	<i>ΔyeiG</i>
10	<i>ΔyciA</i>	25	<i>ΔfrmB</i>	40	<i>ΔygiP</i>	55	<i>ΔyqiA</i>
11	<i>ΔycjT</i>	26	<i>ΔtesB</i>	41	<i>ΔuxaA</i>	56	<i>ΔbioH</i>
12	<i>ΔycjY</i>	27	<i>Δaes</i>	42	<i>ΔyheT</i>	57	<i>ΔyjjU</i>
13	<i>ΔynbC</i>	28	<i>ΔtesA</i>	43	<i>Δphp</i>	58	BW25113
14	<i>ΔyniC</i>	29	<i>ΔybgC</i>	44	<i>ΔyrfG</i>	59	BL21(DE3)
15	<i>ΔyecD</i>	30	<i>ΔybhC</i>	45	<i>ΔeptB</i>	60	BL21/pAW31

Tabela 3: Comparação de rendimento de proteínas de diferentes condições de expressão^a

Condição de Fermentação	Concentração de LovD (mg/L) ^b
LB baixa densidade	96
F1 baixa densidade	34
TB alta densidade	980
F1 alimentação por lotes alta densidade	1500

^a Os rendimentos relatados representam o rendimento mais elevado que foi observado nas respectivas condições.

5 ^b O rendimento de proteína é estimado do ensaio in vitro utilizando lisado de célula inteira conforme descrito em Materiais e Métodos. A conversão observada é utilizada para estimar a concentração de LovD utilizando uma taxa de conversão de 0.6 min^{-1} .

10

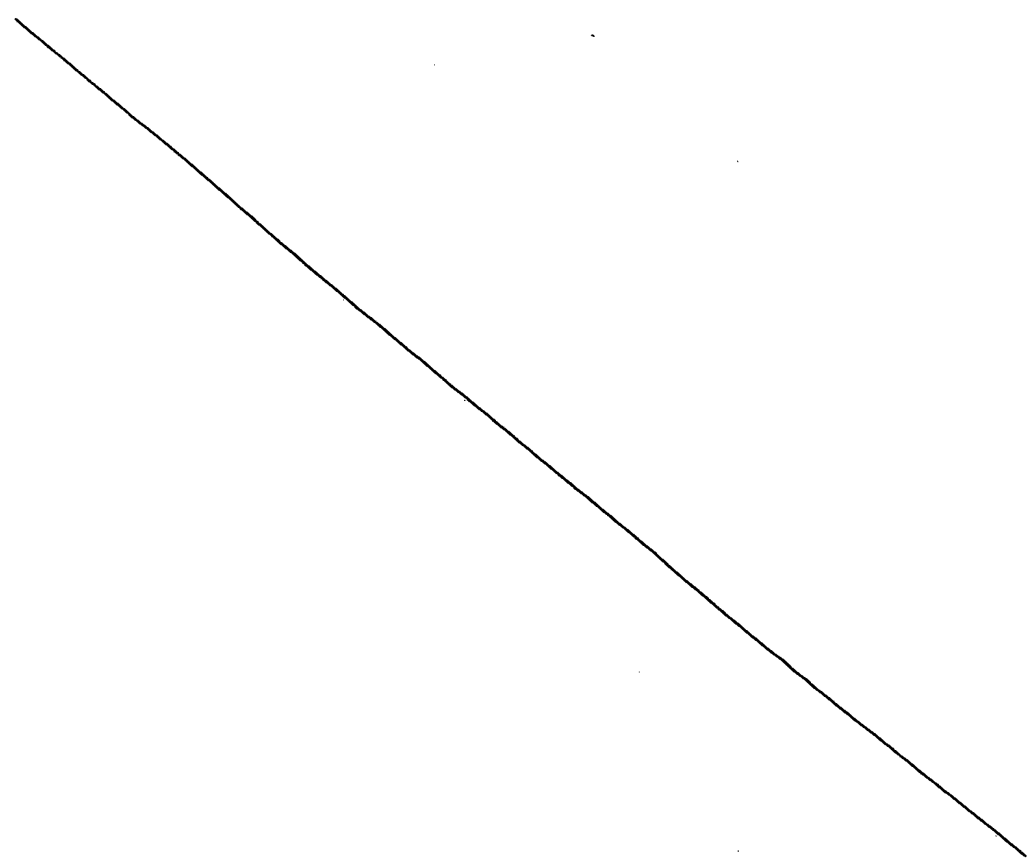


Tabela 4: Informação de Sequência de Polipeptídeos

LOVD transesterase de *Aspergillus terreus*. N° de Acesso
AAD34555

Kennedy e outros. Science. 21 de maio de 1999; 284(5418):
5 1368-72

MGSIIDAAAAADPVVLMETAFRKAVKSRQIPGAVIMARDCSGNLNYTRCFGARTVRRDE
CNQLPPLQVDTPCRLASATKLLTTIMALQCMERGLVDLDETVDRLLPDLSAMPVLEGFD
DAGNARLRERRGKITLRHLLTHTSGLSYVFLHPLLREYMAQGHLSAEKFGIQSRLAPP
AVNDPGAEWIYGANLDWAGKLVERATGLDLEQYLQENICAPLGITDMTFKLQQRPDMLA
10 RRADQTHRNSADGRLRYDDSVYFRADGEECFGGQGVFSGPGSYMKVLHSLKRDGLLLO
PQTVDLMFQPALEPRLEEQMNQHMDASPHINYGGPMPVLRRSFGLGGIIALEDLDGEN
WRRKGS�TFGGGPNIWQIDPKAGLCTLAFFQLEPWNDPVCRLTRTFEHAIYAQYQQG
(SEQ ID NO: 1).

MlcH transesterase de *Penicillium citrinum*. N° de ACESSO
15 BAC20561

Abe e outros, Mol. Genet. Genomics 267 (5), 636-646 (2002)
MAPSIDVIPTAASTAAGMISDMEAAFKSAVKLKQIPGAVVMARSMNGDIDYTRCFGART
VERDECQRLPPMEIDTPLRLASATKLLTTIMALQCMEQGLVDLDENVNRLLPDLSDMQV
LTGFDAAGNAIMRDREGIIKLRHLLTHTSGLSYAFLHPLLQEYMAKGYLKTAEKFGIQS
20 RLAPPAINDPGVEWIYGANLDWAGKLIERATGVDLEEFMQKNICEPLGITDMTFKLQQR
PDMLARRSDQTRRNENGLRYDDSVYFRHDGEECFGGQGVFCGPESYMKVLNSLMKHG
LLLKKDTIELMFQPALDAELEKKMNDHMDTTPHINYGAALPPVMRRNFGLGGIIAMGDL
DGHNWRREGSLTFGGGPNIWQIDPTVGLCTLVVFQLEPWNDPICKDLTRKFEEKAMYSQ
VKCRN

25 (SEQ ID NO: 2).

LOVF Policetideo Sintase de *Aspergillus terreus*. AAD34559

Kennedy e outros. Science 21 de maio de 1999; 284(5418):

1368-72

MTPLDAPGAPAPIAMVGMGCRFGGGATDPQKLWKLLEEGGSAWSKIPPSRFNVGGVYHP
 NGQRVGSMHVRGGHFLDEDPALFDASFFNMSTEVASCMDPQYRLILEVVYEALEAAGIP
 LEQVSGSKTGVFAGTMYHDYQGSFQRQPEALPRYFITGNAGTMLANRVSHFYDLRGPSV
 5 SIDTACSTTLTALHLAIQSLRAGESDMAIVAGANLLLNPDVFTTMSNLGFLSSDGISYS
 FDSRADGYGRGEGVAAIVLKTLPDAVRDGDPIRLIVRETAINQDGRTPAISTPSGEAQE
 CLIQDCYQKAQLDPKQTSYVEAHGTGTRAGDPLELAVISAAFFGQQIQVGSVKANIGHT
 EAVSGLASLIKVALAVEKGVIPPNARFLQPSKLLKDTHIQIPLCSQSWIPTDGVRRAS
 INNFGFGGANAHAIVEQYGPFAETSICPPNGYSGNYDGNLGTDAQHIYVLSAKDENSCM
 10 RMVSRLCDYATHARPADDLQLLANIAYTLGSRRSNFRWKAVCTAHSLTGLAQNLAGEGM
 RPSKSADQVRLGWVFTGQGAQWFAMGRELIEMYPVFKEALLECDGYIKEMGSTWSIIIEE
 LSRPETESRVDQAEFSLPLSTALQIALVRLLSWNIQPVAVTSHSSGEAAAAYAIGALT
 ARSAIGISYIRGALTARDRLASVHKGGMLAVGLSRSEVGIYIRQVPLQSEECLVVGCVN
 SPSSVTVSGDLSAIAKLEELLHADRIFARRLKVTQAFHSSHMNSMTDAFRAGLTELFGA
 15 DPSDAANASKDVIYASPRGTARLHDMNRLRDPIHWVECM LHPVEFESA FRRMCLDENDH
 MPKVDRVIEIGPHGALGGPIKQIMQLPELATCDIPYLSCLSRGKSSLSTLRLLASELIR
 AGFPVDLNAINFPRGCEAARVQVLSDLPPYPWNHETRYWKEPRISQSARQRKGPVHDLI
 GLQEPLNLPLARSWHNVLRVSDLPWLRDHVVGSHIVFPGAGFVCMAMGISTLCSSDHE
 SDDISYILRDVNFAQALILPADGEEGIDLRLTICAPDQSLGSQDWQRFLVHSITADKND
 20 WTEHCTGLVRAEMDQPPSSLSNQQRIDPRPWSRKTAPELWDSLHRVGIRHGPFFRNIT
 CIESDGRGSWCTFAIADTASAMPHAYESQHIVHPTTLDSAVQAAYTTLPFAGSRIKSAM
 VPARVGCMKISSRLADLEARDMLRAQAKMHSQSPSALVTDVAVFDEADPVGGPVMELEG
 LVFQSLGASLGTSDRDSTDPGNTCSSWHWAPDISLVNPGWLEKTLGTGIEHEISLILE
 LRRCSVHFIQEAMESLSVG DVERLSGHLAKFYAWMQQLACAQNGELGPRESSWTRDSE
 25 QARCSLRSRVVAGSTNGEMICRLGSLVPAILRREVDPLEVMMDGHLLSRY YVDALKWSR
 SNAQASELVRLCCHKNP RARILEIGGGTGGCTQLVVDSLGNPPVGRYDFTDVSAGFFE
 AARKRFAGWQNVMDFRKLDIEDDPEAQGFVCGSYDVVLACQVLHATSNMQRTLTNVRKL

LKPGGKLILVETTRDELDLFFTFGLLPGWWLSEEPERQSTPSLSPTMWRSMLHTTGFGNG
 VEVEARDCDSHEFYMISTMMSTAVQATPMSCSVKLPEVLLVYVDSSTPMSWISDLQGEI
 RGRNCSVTSLQALRQVPPTGQICVFLGEVEHSMLGSVTNDDFTLLTSMLQLAGGTLWV
 TQGATMKSDDPLKALHLGLLRTMRNESHGKRFSVSLDLDPSRNPWTGDSRDAIVSVLDLI
 5 SMSDEKEFDYAERDGVIVPRAFSDSINGGEEDGYALEPFQDSQHLLRLDIQTPGLLDS
 LHFTKRNVDTYEPDKLPDDWVEIEPRAFGNFRDIMVAMGQLESNVMGFECAGVVTSL
 ETARTIAPGLAVGDRVCALMNGHWASRVTTSRNTNVVRIPETLSFPHAASIPLAFTTAYI
 SLYTVARILPGETVLIHAGAGGVQAAIILAQLTGAEVFTTAGSETKRNLLIDKFHLDP
 DHVFSSRDSSFVDGIKTRTRGKGVDDVLNSLAGPLLQKSFDCLEARFGRFVEIGKKDLEQ
 10 NSRLDMSTFVRNVSFSSVDILYWQQAQPAEIFQAMSEVILLWERTAIGLIHPISEYPMS
 ALEKAFRTMQSGQHVGKIVVTVAPDDAVLVRQERMPLFLKPNVSYLVAGGLGGIGRRIC
 EWLVDRGARYLIILSRTARVDPVVTSLQERGCTVSVQACDVADESQLEAALQQCRAEEM
 PPIRGVIQGAMVLKDALVSQMTADGFHAALRPKVQGSWNLHRIASDVDFVMLSSLVGV
 MGGAGQANYAAAGAFQDALAEHRMAHNQPAVTIDLGMVQSIGYVAETDSAVAERLQORIG
 15 YQPLHEEEVLVDVLEQAISPVCSAPAATRPVAVITGINTRPGPHWAHADWMQEARFAGIK
 YRDPLRDNHGALS LTPAEDDNLHARLNRAISQQESIIVIMEAMSKLISMFGGLTDSEMS
 ATQTLAGIGVDSLVAIELRNWITAKFNVDISVFELMEGRTIAKVAEVLQRYKA
 (SEQ ID NO: 3).

Carboxilesterase bioH de Escherichia coli. ACESSO Q8FCT4
 20 Welsch e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26),
 17020-17024 (2002)
 MNNIWWQTKGQGNVHLVLLHGWGLNAEVWRCIDEELSSHFTLHLVDLPGFGRSRGFGAL
 SLADMAEAVLQQAPDKAIWLGWSLGGLVASQIALTHPERVQALVTVASSPCFSARDEWP
 GIKPDVLAGFQQQLSDDFQRTVERFLALQTMGTETARQDARALKKTVLALPMPEVDVLN
 25 GGLEILKTVDLRQPLQNVSMPLRLYGYLDGLVPRKVVPMLDKLWPHSESYIFAKAAHA
 PFISHPAEFCHLLVALKQRV
 (SEQ ID NO: 4).

LISTA DE SEQUÊNCIAS

Depositante: The Regents of the University of California

Inventores:

5 Yi Tang
Xinkai Xie

Título da Invenção: MÉTODOS E MATERIAIS PARA FABRICAÇÃO DE
SINVASTATINA E COMPOSTOS ASSOCIADOS

10

<130> 30435187WOU1

Prioridade Norte Americana No. 60/808,088

Data de Depósito: 2006-05-24

15

Número de Sequências: 9

Programa de Computador: FastSEQ para Windows Versão 4.0

20

Número da Sequência: 1

Tamanho: 413

Tipo: PRT

Descrição: LOVD transesterase de *Aspergillus terreus*

25

Sequência No. 1

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

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
 5 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
 10 130 135 140
 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
 15 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
 20 210 215 220
 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
 25 Val Tyr Phe Arg Ala Asp Gly Glu Glu Cys Phe Gly Gly Gln Gly Val
 260 265 270
 Phe Ser Gly Pro Gly Ser Tyr Met Lys Val Leu His Ser Leu Leu Lys
 275 280 285
 Arg Asp Gly Leu Leu Leu Gln Pro Gln Thr Val Asp Leu Met Phe Gln
 30 290 295 300
 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 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Pro Asn
 5 355 360 365
 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
 10 Thr Phe Glu His Ala Ile Tyr Ala Gln Tyr Gln Gln Gly
 405 410

Número da Sequência: 2

Tamanho: 418

15 Tipo: PRT

Descrição: MlcH transesterase de *Penicillium citrinum*

Sequência No. 2

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

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

Thr Leu Val Val Phe Gln Leu Glu Pro Trp Asn Asp Pro Ile Cys Lys
 385 390 395 400
 Asp Leu Thr Arg Lys Phe Glu Lys Ala Met Tyr Ser Gln Val Lys Cys
 405 410 415

5 Arg Asn

Número da Sequência: 3

Tamanho: 2532

10 Tipo: PRT

Descrição: LOVF Policetídeo Sintase de *Aspergillus terreus*

Sequência No. 3

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

	420	425	430
	Pro Phe Ala Glu Thr Ser Ile Cys Pro Pro Asn Gly Tyr Ser Gly Asn		
	435	440	445
	Tyr Asp Gly Asn Leu Gly Thr Asp Gln Ala His Ile Tyr Val Leu Ser		
5	450	455	460
	Ala Lys Asp Glu Asn Ser Cys Met Arg Met Val Ser Arg Leu Cys Asp		
	465	470	475
	480		
	Tyr Ala Thr His Ala Arg Pro Ala Asp Asp Leu Gln Leu Leu Ala Asn		
	485	490	495
10	Ile Ala Tyr Thr Leu Gly Ser Arg Arg Ser Asn Phe Arg Trp Lys Ala		
	500	505	510
	Val Cys Thr Ala His Ser Leu Thr Gly Leu Ala Gln Asn Leu Ala Gly		
	515	520	525
	Glu Gly Met Arg Pro Ser Lys Ser Ala Asp Gln Val Arg Leu Gly Trp		
15	530	535	540
	Val Phe Thr Gly Gln Gly Ala Gln Trp Phe Ala Met Gly Arg Glu Leu		
	545	550	555
	560		
	Ile Glu Met Tyr Pro Val Phe Lys Glu Ala Leu Leu Glu Cys Asp Gly		
	565	570	575
20	Tyr Ile Lys Glu Met Gly Ser Thr Trp Ser Ile Ile Glu Glu Leu Ser		
	580	585	590
	Arg Pro Glu Thr Glu Ser Arg Val Asp Gln Ala Glu Phe Ser Leu Pro		
	595	600	605
	Leu Ser Thr Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Arg Leu Leu Trp Ser Trp		
25	610	615	620
	Asn Ile Gln Pro Val Ala Val Thr Ser His Ser Ser Gly Glu Ala Ala		
	625	630	635
	640		
	Ala Ala Tyr Ala Ile Gly Ala Leu Thr Ala Arg Ser Ala Ile Gly Ile		
	645	650	655
30	Ser Tyr Ile Arg Gly Ala Leu Thr Ala Arg Asp Arg Leu Ala Ser Val		
	660	665	670
	His Lys Gly Gly Met Leu Ala Val Gly Leu Ser Arg Ser Glu Val Gly		
	675	680	685

Ile Tyr Ile Arg Gln Val Pro Leu Gln Ser Glu Glu Cys Leu Val Val
 690 695 700
 Gly Cys Val Asn Ser Pro Ser Ser Val Thr Val Ser Gly Asp Leu Ser
 705 710 715 720
 5 Ala Ile Ala Lys Leu Glu Glu Leu Leu His Ala Asp Arg Ile Phe Ala
 725 730 735
 Arg Arg Leu Lys Val Thr Gln Ala Phe His Ser Ser His Met Asn Ser
 740 745 750
 Met Thr Asp Ala Phe Arg Ala Gly Leu Thr Glu Leu Phe Gly Ala Asp
 10 755 760 765
 Pro Ser Asp Ala Ala Asn Ala Ser Lys Asp Val Ile Tyr Ala Ser Pro
 770 775 780
 Arg Thr Gly Ala Arg Leu His Asp Met Asn Arg Leu Arg Asp Pro Ile
 785 790 795 800
 15 His Trp Val Glu Cys Met Leu His Pro Val Glu Phe Glu Ser Ala Phe
 805 810 815
 Arg Arg Met Cys Leu Asp Glu Asn Asp His Met Pro Lys Val Asp Arg
 820 825 830
 Val Ile Glu Ile Gly Pro His Gly Ala Leu Gly Gly Pro Ile Lys Gln
 20 835 840 845
 Ile Met Gln Leu Pro Glu Leu Ala Thr Cys Asp Ile Pro Tyr Leu Ser
 850 855 860
 Cys Leu Ser Arg Gly Lys Ser Ser Leu Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ala
 865 870 875 880
 25 Ser Glu Leu Ile Arg Ala Gly Phe Pro Val Asp Leu Asn Ala Ile Asn
 885 890 895
 Phe Pro Arg Gly Cys Glu Ala Ala Arg Val Gln Val Leu Ser Asp Leu
 900 905 910
 Pro Pro Tyr Pro Trp Asn His Glu Thr Arg Tyr Trp Lys Glu Pro Arg
 30 915 920 925
 Ile Ser Gln Ser Ala Arg Gln Arg Lys Gly Pro Val His Asp Leu Ile
 930 935 940
 Gly Leu Gln Glu Pro Leu Asn Leu Pro Leu Ala Arg Ser Trp His Asn

	945		950		955		960
	Val	Leu	Arg	Val	Ser	Asp	Leu
				Ser	Asp	Leu	Pro
				Trp	Leu	Arg	Asp
				His	Val	Val	Gly
			965			970	
							975
	Ser	His	Ile	Val	Phe	Pro	Gly
				Ala	Gly	Phe	Val
				Cys	Met	Ala	Val
5			980			985	
							990
	Gly	Ile	Ser	Thr	Leu	Cys	Ser
				Ser	Asp	His	Glu
				Ser	Asp	Asp	Ile
			995			1000	
							1005
	Tyr	Ile	Leu	Arg	Asp	Val	Asn
				Phe	Ala	Gln	Ala
				Leu	Ile	Leu	Pro
			1010			1015	
							1020
10	Asp	Gly	Glu	Glu	Gly	Ile	Asp
				Leu	Arg	Leu	Thr
				Ile	Cys	Ala	Pro
			1025			1030	
							1035
							1040
	Gln	Ser	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp
				Trp	Gln	Arg	Phe
				Leu	Val	His	Ser
							Ile
			1045			1050	
							1055
	Thr	Ala	Asp	Lys	Asn	Asp	Trp
				Thr	Glu	His	Cys
				Thr	Gly	Leu	Val
15			1060			1065	
							1070
	Ala	Glu	Met	Asp	Gln	Pro	Pro
				Ser	Ser	Leu	Ser
				Asn	Gln	Gln	Arg
			1075			1080	
							1085
	Asp	Pro	Arg	Pro	Trp	Ser	Arg
				Lys	Thr	Ala	Pro
				Gln	Glu	Leu	Trp
			1090			1095	
							1100
20	Ser	Leu	His	Arg	Val	Gly	Ile
				Arg	His	Gly	Pro
				Phe	Phe	Arg	Asn
			1105			1110	
							1115
							1120
	Thr	Cys	Ile	Glu	Ser	Asp	Gly
				Arg	Gly	Ser	Trp
				Cys	Thr	Phe	Ala
							Ile
			1125			1130	
							1135
	Ala	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Met
				Pro	His	Ala	Tyr
				Glu	Ser	Gln	His
25			1140			1145	
							1150
	Val	His	Pro	Thr	Thr	Leu	Asp
				Ser	Ala	Val	Gln
				Ala	Ala	Ala	Tyr
				Thr	Thr		
			1155			1160	
							1165
	Leu	Pro	Phe	Ala	Gly	Ser	Arg
				Ile	Lys	Ser	Ala
				Met	Val	Pro	Ala
			1170			1175	
							1180
30	Val	Gly	Cys	Met	Lys	Ile	Ser
				Ser	Arg	Leu	Ala
				Asp	Leu	Glu	Ala
			1185			1190	
							1195
							1200
	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Gln	Ala
				Lys	Met	His	Ser
				Gln	Ser	Pro	Ser
							Ala
			1205			1210	
							1215

Leu Val Thr Asp Val Ala Val Phe Asp Glu Ala Asp Pro Val Gly Gly
 1220 1225 1230
 Pro Val Met Glu Leu Glu Gly Leu Val Phe Gln Ser Leu Gly Ala Ser
 1235 1240 1245
 5 Leu Gly Thr Ser Asp Arg Asp Ser Thr Asp Pro Gly Asn Thr Cys Ser
 1250 1255 1260
 Ser Trp His Trp Ala Pro Asp Ile Ser Leu Val Asn Pro Gly Trp Leu
 1265 1270 1275 1280
 Glu Lys Thr Leu Gly Thr Gly Ile Gln Glu His Glu Ile Ser Leu Ile
 10 1285 1290 1295
 Leu Glu Leu Arg Arg Cys Ser Val His Phe Ile Gln Glu Ala Met Glu
 1300 1305 1310
 Ser Leu Ser Val Gly Asp Val Glu Arg Leu Ser Gly His Leu Ala Lys
 1315 1320 1325
 15 Phe Tyr Ala Trp Met Gln Lys Gln Leu Ala Cys Ala Gln Asn Gly Glu
 1330 1335 1340
 Leu Gly Pro Glu Ser Ser Ser Trp Thr Arg Asp Ser Glu Gln Ala Arg
 1345 1350 1355 1360
 Cys Ser Leu Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ser Thr Asn Gly Glu Met
 20 1365 1370 1375
 Ile Cys Arg Leu Gly Ser Val Leu Pro Ala Ile Leu Arg Arg Glu Val
 1380 1385 1390
 Asp Pro Leu Glu Val Met Met Asp Gly His Leu Leu Ser Arg Tyr Tyr
 1395 1400 1405
 25 Val Asp Ala Leu Lys Trp Ser Arg Ser Asn Ala Gln Ala Ser Glu Leu
 1410 1415 1420
 Val Arg Leu Cys Cys His Lys Asn Pro Arg Ala Arg Ile Leu Glu Ile
 1425 1430 1435 1440
 Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Gln Leu Val Val Asp Ser Leu Gly
 30 1445 1450 1455
 Pro Asn Pro Pro Val Gly Arg Tyr Asp Phe Thr Asp Val Ser Ala Gly
 1460 1465 1470
 Phe Phe Glu Ala Ala Arg Lys Arg Phe Ala Gly Trp Gln Asn Val Met

	1475	1480	1485
	Asp Phe Arg Lys Leu Asp	Ile Glu Asp Asp Pro	Glu Ala Gln Gly Phe
	1490	1495	1500
	Val Cys Gly Ser Tyr Asp	Val Val Leu Ala Cys	Gln Val Leu His Ala
5	1505	1510	1515
	Thr Ser Asn Met Gln Arg	Thr Leu Thr Asn Val	Arg Lys Leu Leu Lys
	1525	1530	1535
	Pro Gly Gly Lys Leu Ile	Leu Val Glu Thr Thr	Arg Asp Glu Leu Asp
	1540	1545	1550
10	Leu Phe Phe Thr Phe Gly	Leu Leu Pro Gly Trp	Trp Leu Ser Glu Glu
	1555	1560	1565
	Pro Glu Arg Gln Ser Thr	Pro Ser Leu Ser Pro	Thr Met Trp Arg Ser
	1570	1575	1580
	Met Leu His Thr Thr Gly	Phe Asn Gly Val Glu	Val Glu Ala Arg Asp
15	1585	1590	1595
	Cys Asp Ser His Glu Phe	Tyr Met Ile Ser Thr	Met Met Ser Thr Ala
	1605	1610	1615
	Val Gln Ala Thr Pro Met	Ser Cys Ser Val Lys	Leu Pro Glu Val Leu
	1620	1625	1630
20	Leu Val Tyr Val Asp Ser	Ser Thr Pro Met Ser	Trp Ile Ser Asp Leu
	1635	1640	1645
	Gln Gly Glu Ile Arg Gly	Arg Asn Cys Ser Val	Thr Ser Leu Gln Ala
	1650	1655	1660
	Leu Arg Gln Val Pro Pro	Thr Glu Gly Gln Ile	Cys Val Phe Leu Gly
25	1665	1670	1675
	Glu Val Glu His Ser Met	Leu Gly Ser Val Thr	Asn Asp Asp Phe Thr
	1685	1690	1695
	Leu Leu Thr Ser Met Leu	Gln Leu Ala Gly Gly	Thr Leu Trp Val Thr
	1700	1705	1710
30	Gln Gly Ala Thr Met Lys	Ser Asp Asp Pro Leu	Lys Ala Leu His Leu
	1715	1720	1725
	Gly Leu Leu Arg Thr Met	Arg Asn Glu Ser His	Gly Lys Arg Phe Val
	1730	1735	1740

Ser Leu Asp Leu Asp Pro Ser Arg Asn Pro Trp Thr Gly Asp Ser Arg
 1745 1750 1755 1760
 Asp Ala Ile Val Ser Val Leu Asp Leu Ile Ser Met Ser Asp Glu Lys
 1765 1770 1775
 5 Glu Phe Asp Tyr Ala Glu Arg Asp Gly Val Ile His Val Pro Arg Ala
 1780 1785 1790
 Phe Ser Asp Ser Ile Asn Gly Gly Glu Glu Asp Gly Tyr Ala Leu Glu
 1795 1800 1805
 Pro Phe Gln Asp Ser Gln His Leu Leu Arg Leu Asp Ile Gln Thr Pro
 10 1810 1815 1820
 Gly Leu Leu Asp Ser Leu His Phe Thr Lys Arg Asn Val Asp Thr Tyr
 1825 1830 1835 1840
 Glu Pro Asp Lys Leu Pro Asp Asp Trp Val Glu Ile Glu Pro Arg Ala
 1845 1850 1855
 15 Phe Gly Leu Asn Phe Arg Asp Ile Met Val Ala Met Gly Gln Leu Glu
 1860 1865 1870
 Ser Asn Val Met Gly Phe Glu Cys Ala Gly Val Val Thr Ser Leu Ser
 1875 1880 1885
 Glu Thr Ala Arg Thr Ile Ala Pro Gly Leu Ala Val Gly Asp Arg Val
 20 1890 1895 1900
 Cys Ala Leu Met Asn Gly His Trp Ala Ser Arg Val Thr Thr Ser Arg
 1905 1910 1915 1920
 Thr Asn Val Val Arg Ile Pro Glu Thr Leu Ser Phe Pro His Ala Ala
 1925 1930 1935
 25 Ser Ile Pro Leu Ala Phe Thr Thr Ala Tyr Ile Ser Leu Tyr Thr Val
 1940 1945 1950
 Ala Arg Ile Leu Pro Gly Glu Thr Val Leu Ile His Ala Gly Ala Gly
 1955 1960 1965
 Gly Val Gly Gln Ala Ala Ile Ile Leu Ala Gln Leu Thr Gly Ala Glu
 30 1970 1975 1980
 Val Phe Thr Thr Ala Gly Ser Glu Thr Lys Arg Asn Leu Leu Ile Asp
 1985 1990 1995 2000
 Lys Phe His Leu Asp Pro Asp His Val Phe Ser Ser Arg Asp Ser Ser

	2005	2010	2015
	Phe Val Asp Gly Ile Lys Thr Arg Thr Arg Gly Lys Gly Val Asp Val		
	2020	2025	2030
	Val Leu Asn Ser Leu Ala Gly Pro Leu Leu Gln Lys Ser Phe Asp Cys		
5	2035	2040	2045
	Leu Ala Arg Phe Gly Arg Phe Val Glu Ile Gly Lys Lys Asp Leu Glu		
	2050	2055	2060
	Gln Asn Ser Arg Leu Asp Met Ser Thr Phe Val Arg Asn Val Ser Phe		
	2065	2070	2075
10	2080		
	Ser Ser Val Asp Ile Leu Tyr Trp Gln Gln Ala Lys Pro Ala Glu Ile		
	2085	2090	2095
	Phe Gln Ala Met Ser Glu Val Ile Leu Leu Trp Glu Arg Thr Ala Ile		
	2100	2105	2110
	Gly Leu Ile His Pro Ile Ser Glu Tyr Pro Met Ser Ala Leu Glu Lys		
15	2115	2120	2125
	Ala Phe Arg Thr Met Gln Ser Gly Gln His Val Gly Lys Ile Val Val		
	2130	2135	2140
	Thr Val Ala Pro Asp Asp Ala Val Leu Val Arg Gln Glu Arg Met Pro		
	2145	2150	2155
20	2160		
	Leu Phe Leu Lys Pro Asn Val Ser Tyr Leu Val Ala Gly Gly Leu Gly		
	2165	2170	2175
	Gly Ile Gly Arg Arg Ile Cys Glu Trp Leu Val Asp Arg Gly Ala Arg		
	2180	2185	2190
	Tyr Leu Ile Ile Leu Ser Arg Thr Ala Arg Val Asp Pro Val Val Thr		
25	2195	2200	2205
	Ser Leu Gln Glu Arg Gly Cys Thr Val Ser Val Gln Ala Cys Asp Val		
	2210	2215	2220
	Ala Asp Glu Ser Gln Leu Glu Ala Ala Leu Gln Gln Cys Arg Ala Glu		
	2225	2230	2235
30	2240		
	Glu Met Pro Pro Ile Arg Gly Val Ile Gln Gly Ala Met Val Leu Lys		
	2245	2250	2255
	Asp Ala Leu Val Ser Gln Met Thr Ala Asp Gly Phe His Ala Ala Leu		
	2260	2265	2270

Arg Pro Lys Val Gln Gly Ser Trp Asn Leu His Arg Ile Ala Ser Asp
 2275 2280 2285
 Val Asp Phe Phe Val Met Leu Ser Ser Leu Val Gly Val Met Gly Gly
 2290 2295 2300
 5 Ala Gly Gln Ala Asn Tyr Ala Ala Ala Gly Ala Phe Gln Asp Ala Leu
 2305 2310 2315 2320
 Ala Glu His Arg Met Ala His Asn Gln Pro Ala Val Thr Ile Asp Leu
 2325 2330 2335
 Gly Met Val Gln Ser Ile Gly Tyr Val Ala Glu Thr Asp Ser Ala Val
 10 2340 2345 2350
 Ala Glu Arg Leu Gln Arg Ile Gly Tyr Gln Pro Leu His Glu Glu Glu
 2355 2360 2365
 Val Leu Asp Val Leu Glu Gln Ala Ile Ser Pro Val Cys Ser Pro Ala
 2370 2375 2380
 15 Ala Pro Thr Arg Pro Ala Val Ile Val Thr Gly Ile Asn Thr Arg Pro
 2385 2390 2395 2400
 Gly Pro His Trp Ala His Ala Asp Trp Met Gln Glu Ala Arg Phe Ala
 2405 2410 2415
 Gly Ile Lys Tyr Arg Asp Pro Leu Arg Asp Asn His Gly Ala Leu Ser
 20 2420 2425 2430
 Leu Thr Pro Ala Glu Asp Asp Asn Leu His Ala Arg Leu Asn Arg Ala
 2435 2440 2445
 Ile Ser Gln Gln Glu Ser Ile Ala Val Ile Met Glu Ala Met Ser Cys
 2450 2455 2460
 25 Lys Leu Ile Ser Met Phe Gly Leu Thr Asp Ser Glu Met Ser Ala Thr
 2465 2470 2475 2480
 Gln Thr Leu Ala Gly Ile Gly Val Asp Ser Leu Val Ala Ile Glu Leu
 2485 2490 2495
 Arg Asn Trp Ile Thr Ala Lys Phe Asn Val Asp Ile Ser Val Phe Glu
 30 2500 2505 2510
 Leu Met Glu Gly Arg Thr Ile Ala Lys Val Ala Glu Val Val Leu Gln
 2515 2520 2525
 Arg Tyr Lys Ala

2530

Número da Sequência: 4

Tamanho: 256

5 Tipo: PRT

Descrição: Carboxilesterase bioH de Escherichia coli

Sequência No. 4

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

	195		200		205
	Leu Val Pro Arg Lys Val Val Pro Met Leu Asp Lys Leu Trp Pro His				
	210		215		220
	Ser Glu Ser Tyr Ile Phe Ala Lys Ala Ala His Ala Pro Phe Ile Ser				
5	225		230		235
	His Pro Ala Glu Phe Cys His Leu Leu Val Ala Leu Lys Gln Arg Val				
		245		250	
					255

Número da Seqüência: 5

10 Tamanho: 25

Tipo: DNA

Descrição: Seqüência Artificial

<220>

15 <223> Primer

Seqüência No. 5

aacatatgaa

taacatctgg

tgga

25

.20

Número da Seqüência: 6

Tamanho: 27

Tipo: DNA

Descrição: Seqüência Artificial

25

<220>

<223> Primer

Seqüência No. 6

30 aagaattcta

caccctctgc

ttcaacg

27

Número da Seqüência: 7

Tamanho: 20

Tipo: DNA

Descrição: Sequência Artificial

5 <220>

<223> Primer

Sequência No. 7

tgacggcttc

gctatcccat

10 20

Número da Sequência: 8

Tamanho: 19

Tipo: DNA

15 Descrição: Sequência Artificial

<220>

<223> Primer

20 Sequência No. 8

tacaccctct

gcttcaacg

19

Número da Sequência: 9

25 Tamanho: 20

Tipo: DNA

Descrição: Sequência Artificial

<220>

30 <223> Primer

Sequência No. 9

gctggattgt

ttcgccgac

20



- REIVINDICAÇÕES -

1. MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SINVASTATINA,
caracterizado por compreender as etapas de:

(1) combinação entre si de monacolina J; um
5 tioéster de acila doador de uma fração acila para o grupo
hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD
aciltransferase; e LovD aciltransferase; e

(2) deixando-se a LovD aciltransferase utilizar um
grupo acila do tioéster de acila para acilar
10 regioseletivamente o grupo hidroxila C8 da monacolina J;
sendo dessa forma produzida sinvastatina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por a sinvastatina ser produzida in vitro na
ausência de um organismo isolado.

15 3. Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado por a monacolina J; o tioéster de acila e a
LovD aciltransferase serem combinados em uma mídia de
fermentação na presença de um organismo isolado que produz
LovD aciltransferase e em que adicionalmente o organismo
20 consiste em *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus*
ruber, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus*
vitreus, *Monascus pubigerus*, *Candida cariosilognicola*,
Aspergillus oryzea, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces*
virioti, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*,
25 *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3,
caracterizado por o organismo isolado ser pelo menos um de:

(a) *Aspergillus terreus* que expressa polipeptídeo LovD da SEQ ID NO: 1;

(b) *Aspergillus terreus* que não expressa polipeptídeo LovF da SEQ ID NO: 3;

5 (c) *Escherichia coli* que expressa polipeptídeo LovD da SEQ ID NO: 1; ou

(d) *Escherichia coli* que não expressa polipeptídeo bioH da SEQ ID NO: 4.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, 10 caracterizado por a LovD aciltransferase ter a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 ou da SEQ ID NO: 2.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o tioéster de acila ser selecionado de forma a possuir pelo menos uma das seguintes propriedades:

15 (a) ser um tioéster de butirlila, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato;

(b) compreender frações de grupo acila de extensão de cadeia média (C3-C6);

(c) ser capaz de transpor as membranas celulares de 20 células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas em uma mídia de fermentação; ou

(d) ser selecionado do grupo que consiste em α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e 25 dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB).

7. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o tioéster de acila ser α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato, e por o α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato se encontrar presente na mídia de fermentação em uma faixa de concentração de 1 mM-100 mM.

8. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por a monacolina J ser produzida por um organismo isolado em uma mídia de fermentação.

9. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o organismo isolado ser cultivado em pelo menos uma das seguintes condições:

(a) a uma temperatura entre 30-40° C;

(b) por um período de tempo de entre pelo menos 4 e pelo menos 48 horas;

15 (c) a um pH entre 7-8; ou

(d) em uma mídia de fermentação compreendendo mídia LB, F1 ou TB.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente a purificação da sinvastatina obtida pelo método por meio de pelo menos uma etapa de purificação compreendendo:

(a) lise de células de um organismo isolado presente na combinação;

(b) centrifugação;

25 (c) precipitação de uma forma de ácido livre de sinvastatina;

(d) conversão de uma forma de ácido livre de sinvastatina em um sal de sinvastatina;

(e) filtração; ou

(f) cromatografia líquida de alto desempenho)

5 "High Performance Liquid Chromatography" - HPLC).

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o método:

(a) produzir uma composição de matéria compreendendo 0%-1% da monacolina J que foi inicialmente
10 combinada com o tioéster de acila doador de uma fração acila para o grupo hidroxila C8 de monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e/ou

(b) resultar em pelo menos 95% da monacolina J adicionada à combinação sendo convertida em sinvastatina.

15 12. COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA, caracterizado por compreender:

monacolina J;

um tioéster de acila que doa uma fração acila ao grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD
20 aciltransferase;

LovD aciltransferase; e

sinvastatina.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por compreender adicionalmente um organismo
25 isolado, em que o organismo consiste em *Escherichia coli*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus*, *Monascus pubigerus*,

Candida cariosilognicola, *Aspergillus oryzae*, *Doratomyces stemonitis*, *Paecilomyces virioti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Scopulariopsis brevicaulis* ou *Trichoderma viride*.

5 14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por o organismo isolado ser pelo menos um de:

(a) *Aspergillus terreus* que expressa polipeptídeo LovD da SEQ ID NO: 1;

(b) *Aspergillus terreus* que não expressa polipeptídeo LovF da SEQ ID NO: 3;

(c) *Escherichia coli* que expressa polipeptídeo LovD da SEQ ID NO: 1; ou

(d) *Escherichia coli* que não expressa polipeptídeo bioH da SEQ ID NO: 4.

15 15. Composição, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o tioéster de acila possuir pelo menos uma das seguintes propriedades:

(a) ser um tioéster de butirlila, um tioéster de N-acetilcisteamina ou um tioéster de metil-tioglicolato;

20 (b) compreender frações de grupo acila de extensão de cadeia média (C3-C6);

(c) ser capaz de transpor as membranas celulares de células de *Escherichia coli* ou *Aspergillus terreus* cultivadas em uma mídia de fermentação; ou

25 (d) ser selecionado do grupo que consiste em α -dimetilbutiril-S-metil-mercaptopropionato (DMB-S-MMP), dimetilbutiril-S-etil mercaptopropionato (DMB-S-EMP) e

dimetilbutiril-S-metil tioglicolato (DMB-S-MTG) e
dimetilbutiril-S-metil mercaptobutirato (DMB-S-MMB).

16. Composição, de acordo com a reivindicação 12,
caracterizada por compreender adicionalmente um organismo
5 isolado transduzido com um vetor de expressão que codifica
LovD de *Aspergillus terreus* (SEQ ID NO: 1).

17. Composição, de acordo com a reivindicação 12,
caracterizada por a composição compreender adicionalmente
lovastatina e a quantidade de sinvastatina na composição
10 ser maior que a quantidade de lovastatina na composição.

18. COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA, caracterizada por
compreender:

tetra-ol de pravastatina hidrolisado;

um tioéster de acila que doa uma fração acila para o
15 grupo hidroxila C8 do tetra-ol de pravastatina hidrolisado
na presença de LovD aciltransferase;

LovD aciltransferase; e

huvastatina.

19. MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE HUVASTATINA,
20 caracterizado por compreender as etapas de:

(1) inter-combinação de tetra-ol de pravastatina
hidrolisado; um tioéster de acila que doa uma fração acila
para o grupo hidroxila C8 do tetra-ol de pravastatina
hidrolisado na presença de LovD aciltransferase; e LovD
25 aciltransferase; e

(2) deixando-se a LovD aciltransferase utilizar um
grupo acila do tioéster de acila para acilar

regioseletivamente o grupo hidroxila C8 do tetra-ol de pravastatina hidrolisado;

sendo dessa forma produzida huvastatina.

20. MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE SINVASTATINA,
5 caracterizado por compreender as etapas de:

(1) inter-combinação de lovastatina; um tioéster de acila que doa uma fração acila para o grupo hidroxila C8 da monacolina J na presença de LovD aciltransferase; e LovD aciltransferase; e

10 (2) deixando-se a LovD aciltransferase:

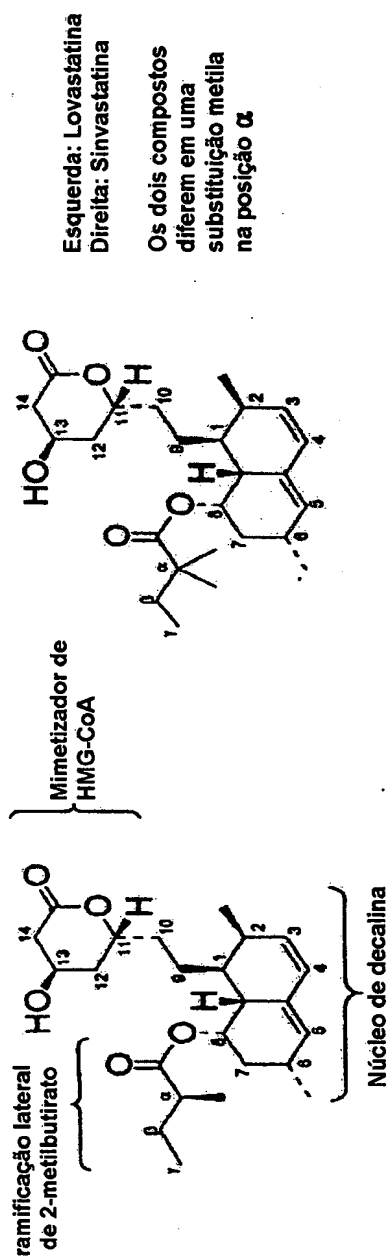
(a) hidrolisar lovastatina para monacolina J; e

(b) utilizar um grupo acila do tioéster de acila para acilar regioseletivamente o grupo
15 hidroxila C8 da monacolina J;

sendo dessa forma produzida sinvastatina.

21. MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE
MATÉRIA DE SINVASTATINA OU HUVASTATINA, caracterizado por
ser substancialmente conforme aqui descrito e
20 exemplificado.

Figura 1



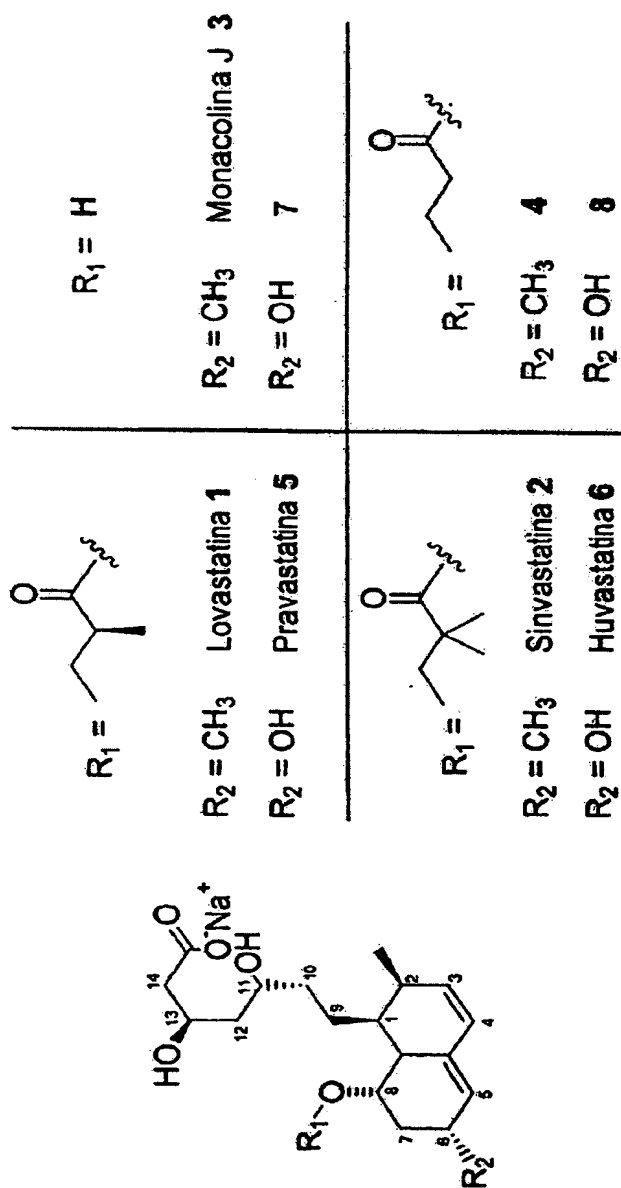


Figura 2

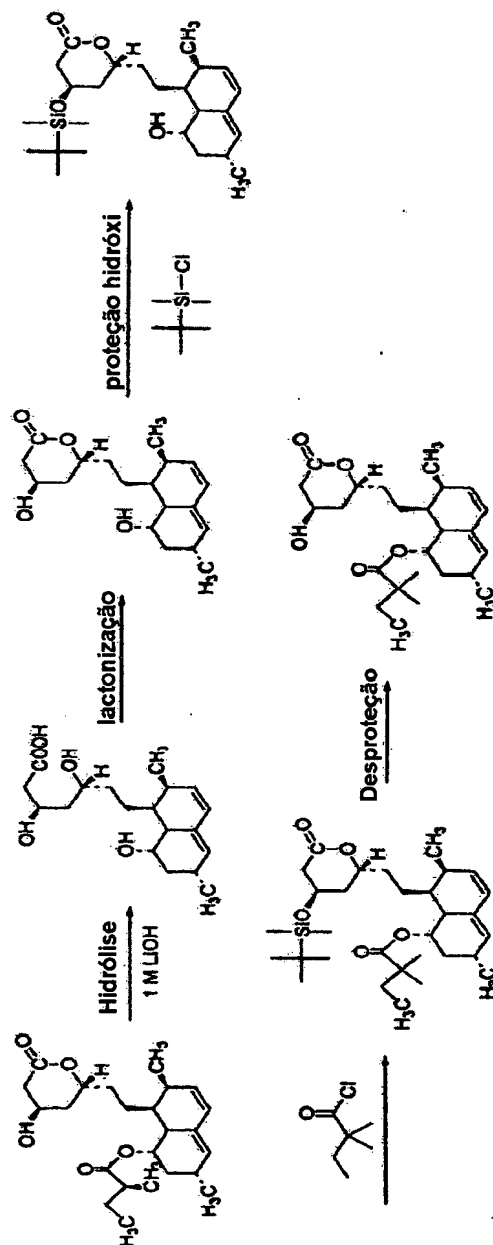


Figura 3

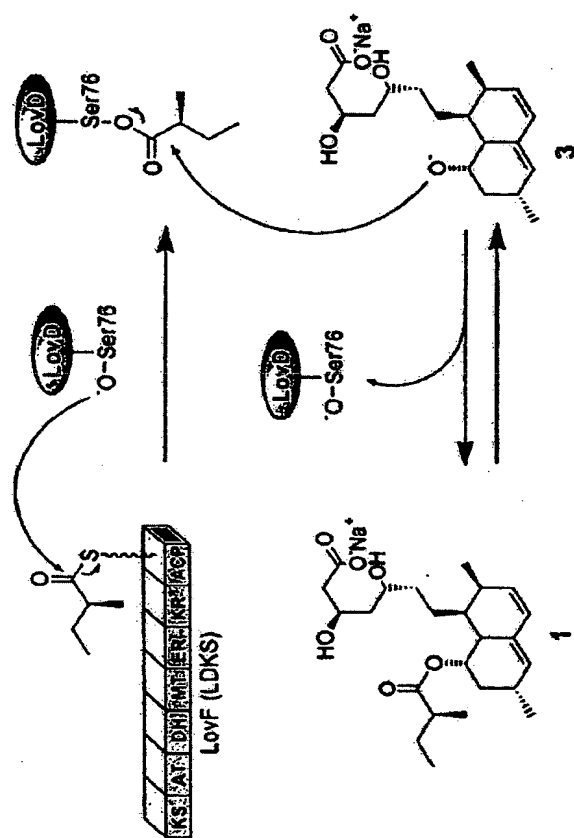


Figura 4

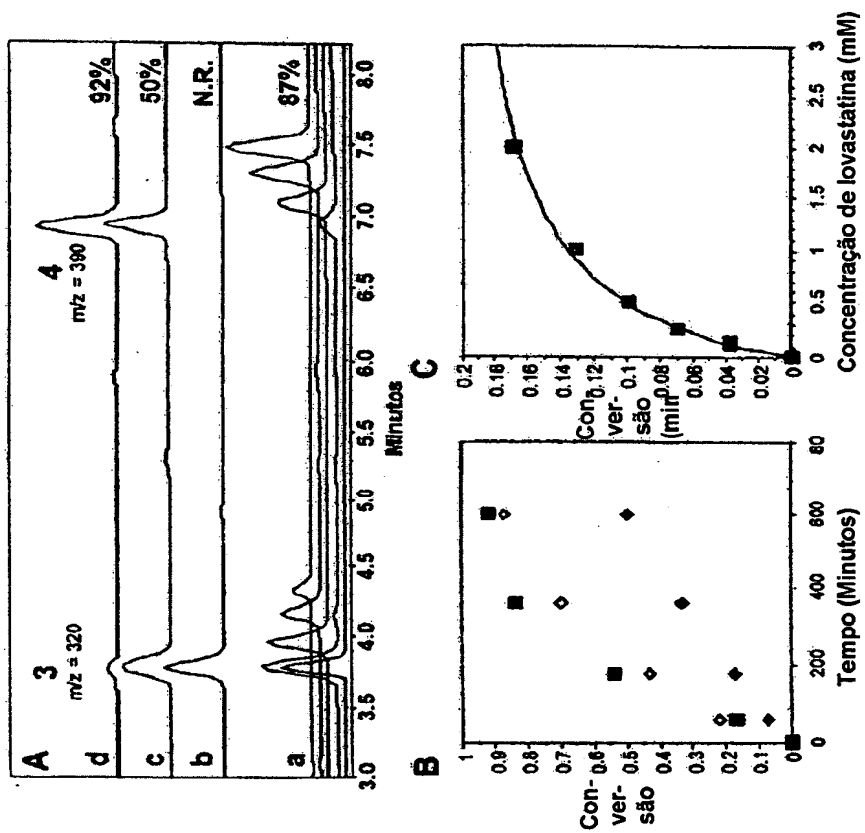
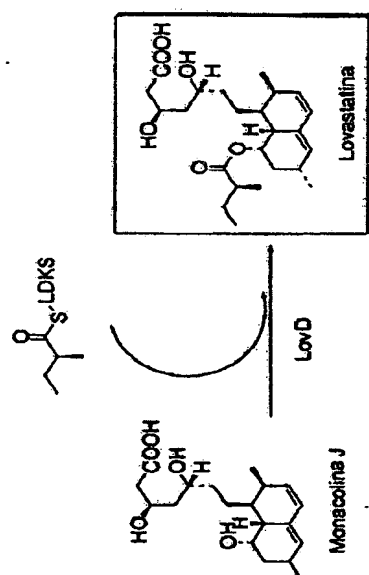
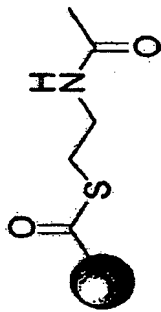


Figura 5



A LovD Catalisa a transferência de acila
para obtenção de lovastatina.
O doador de acila é acoplado a LDKS.

Figura 6



Acila-SNAC

O círculo sombreado indica
qualquer grupo funcional.

Figura 7

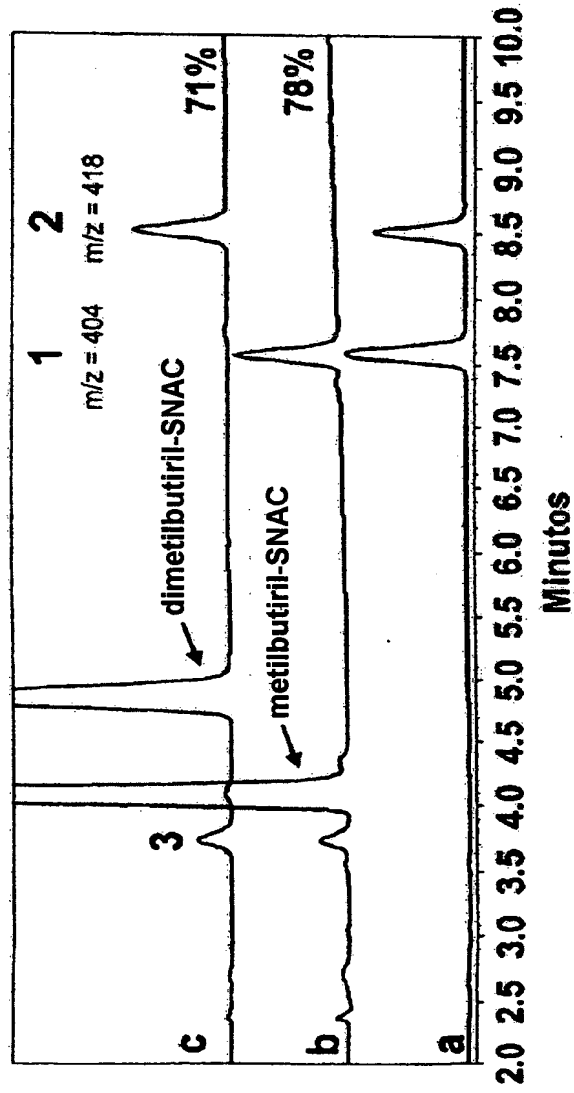


Figura: 8

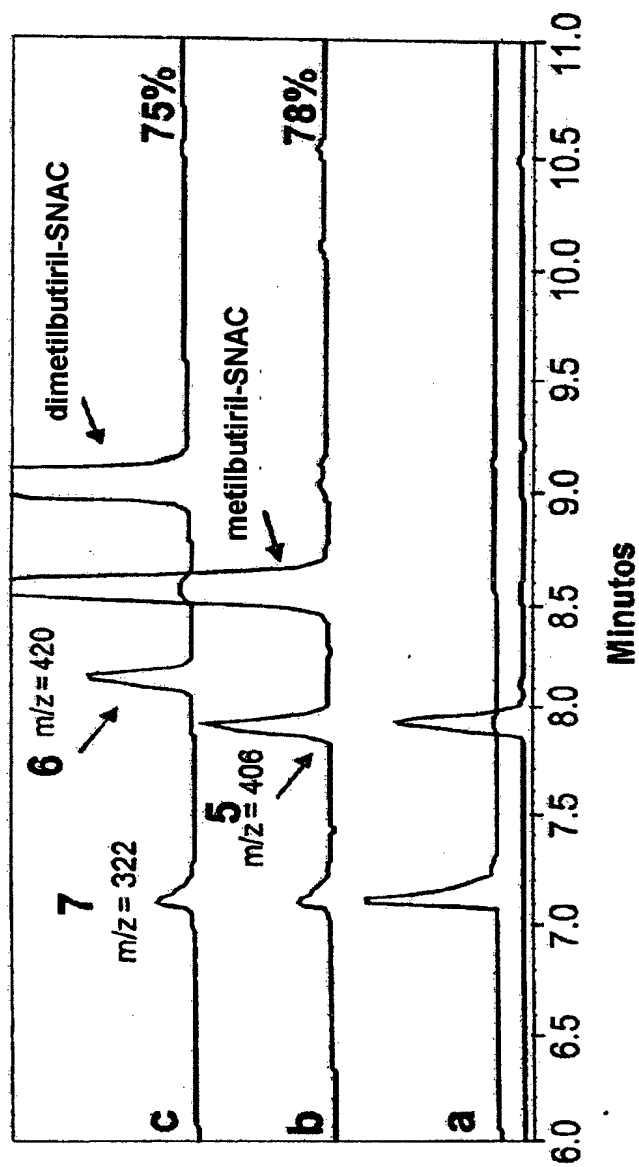


Figura 9



Figura 10

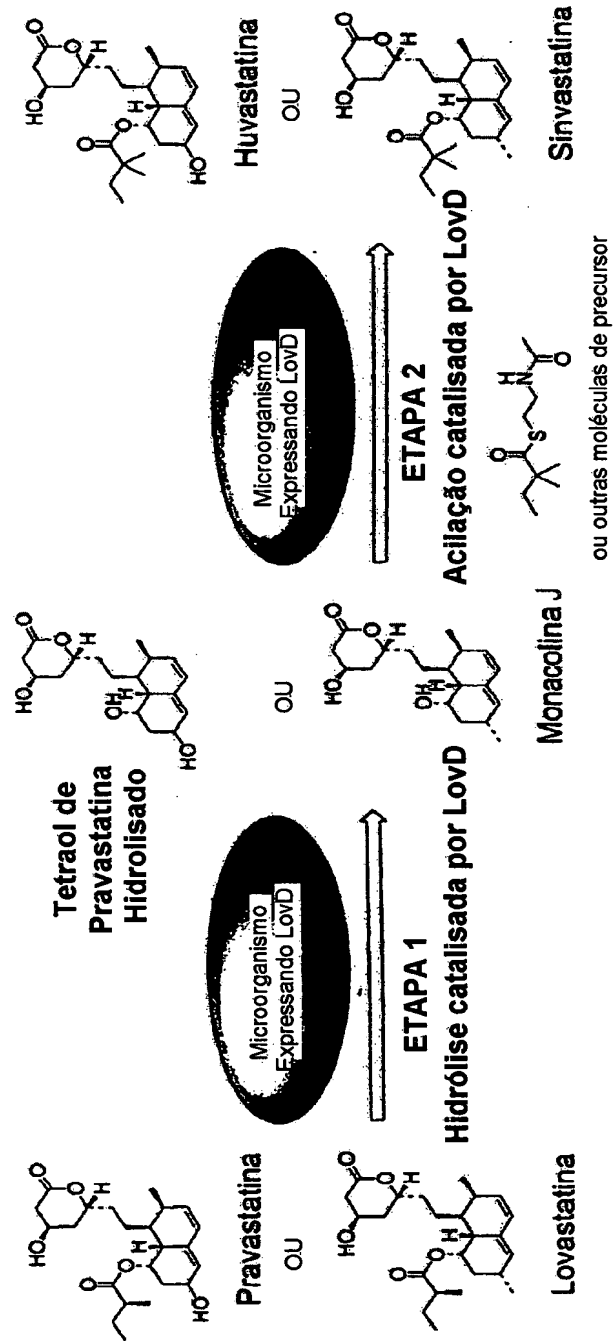


Figura 11

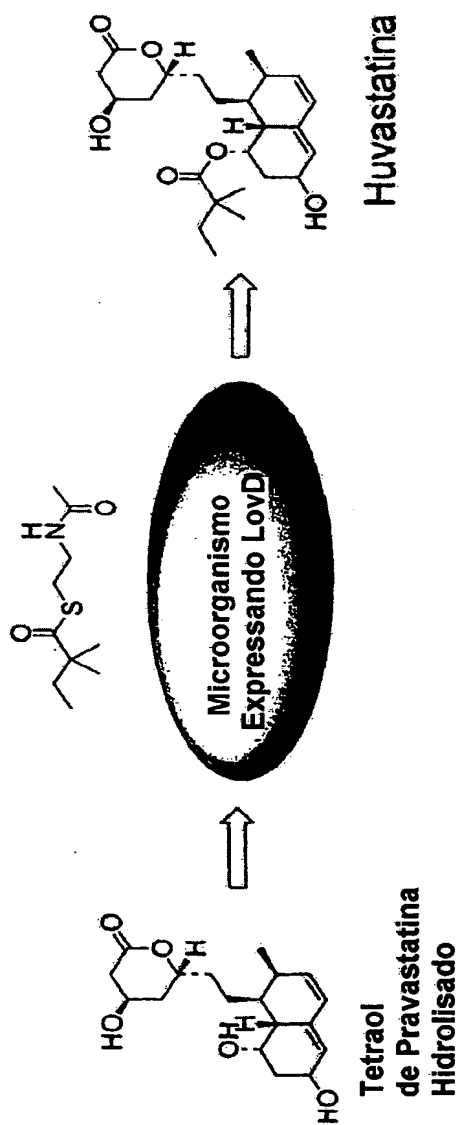


Figura 12

Figura 13

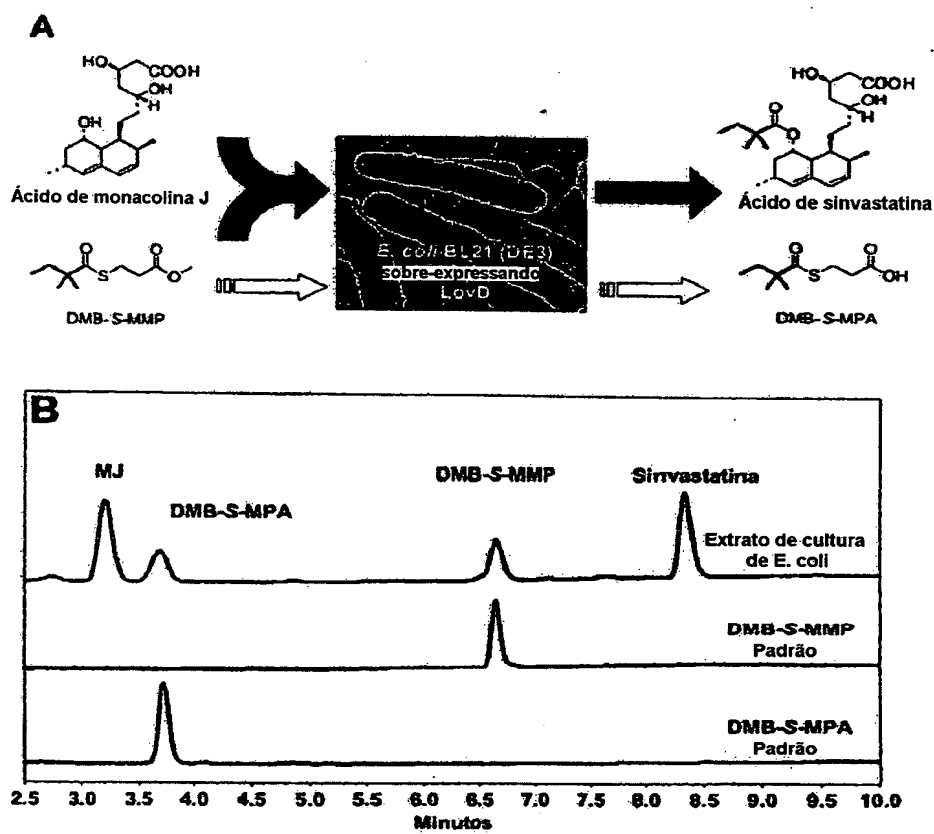
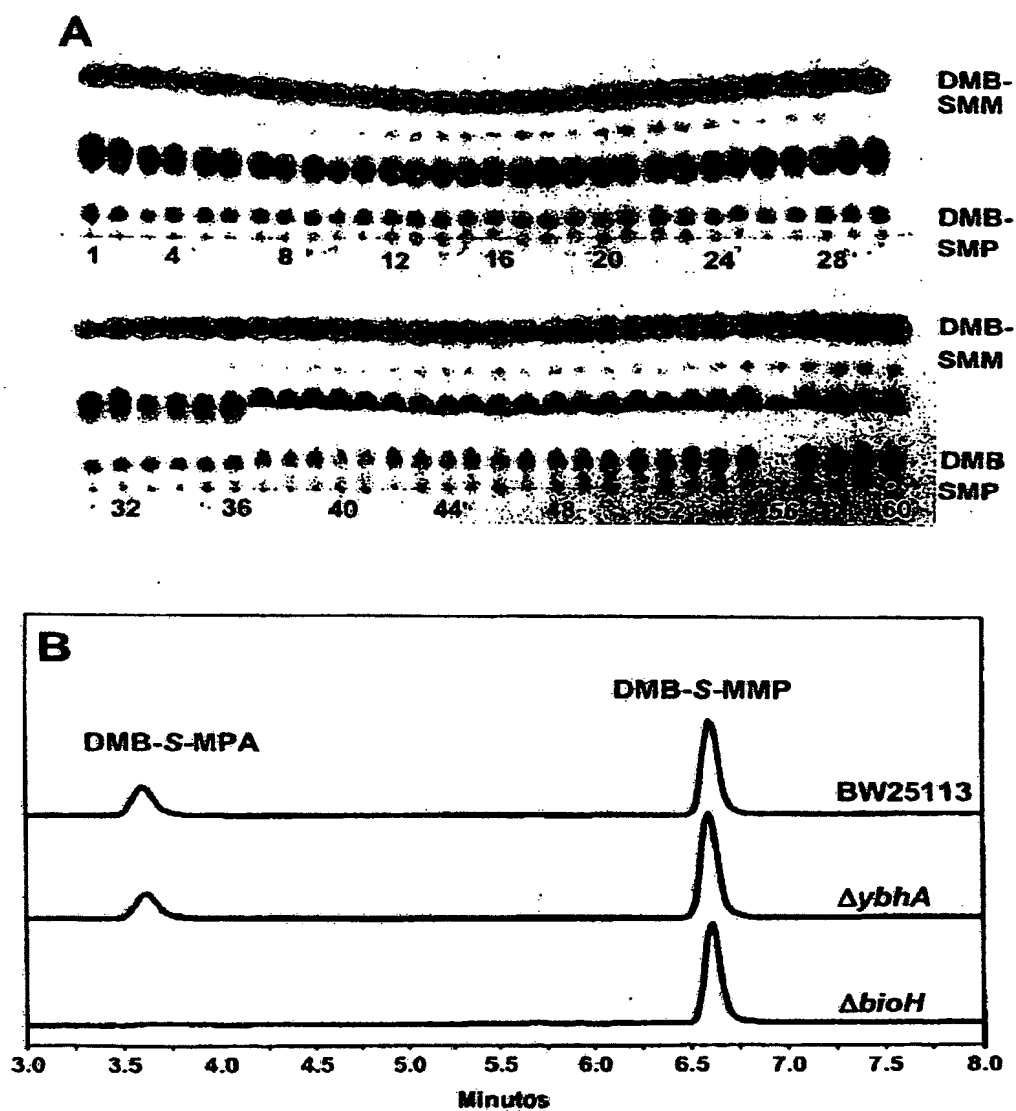


Figura 14



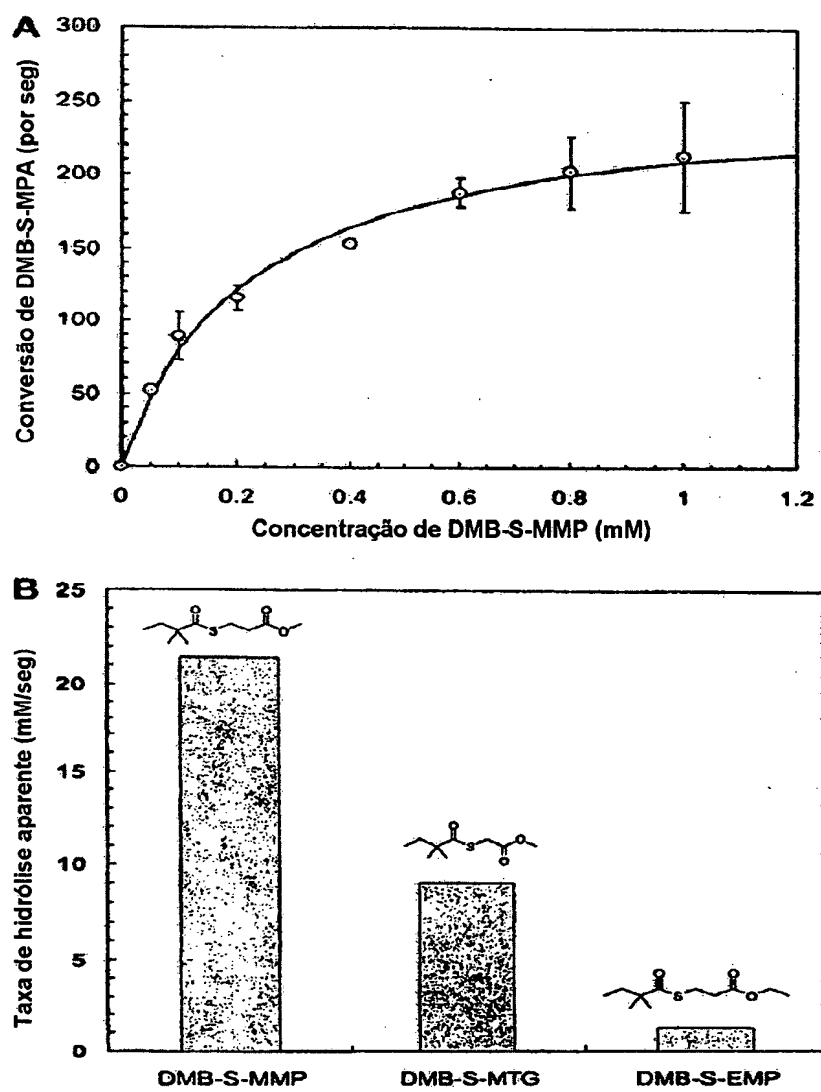


Figura 15

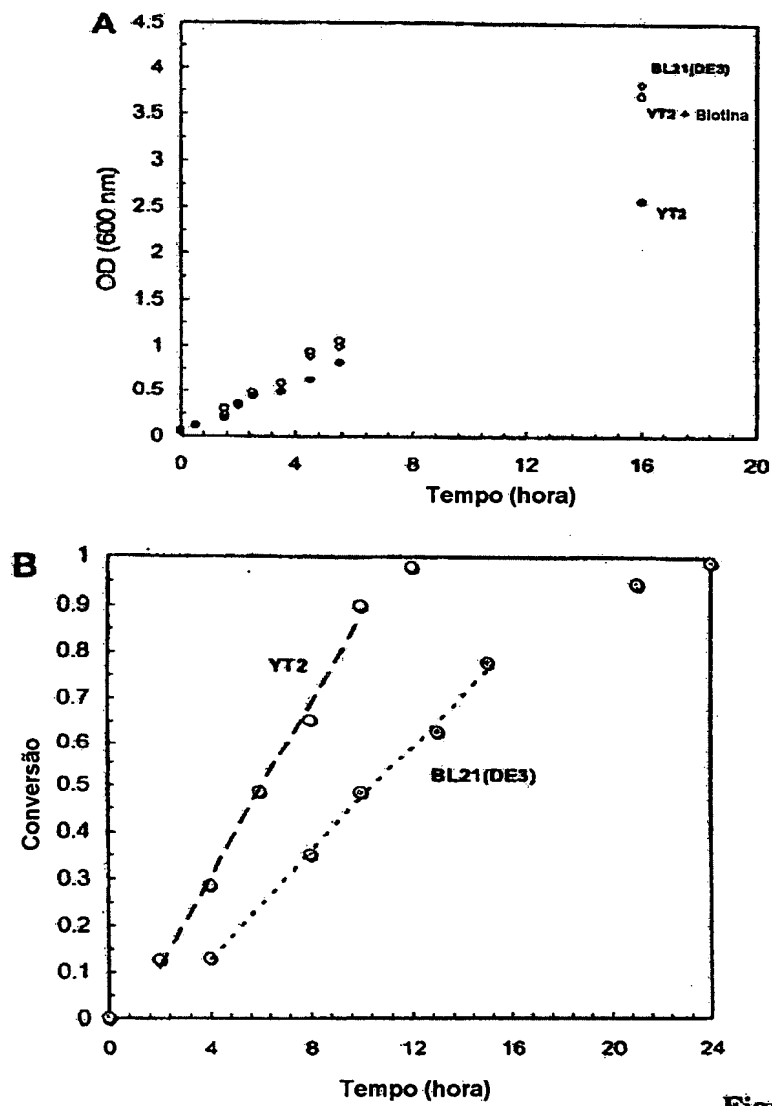
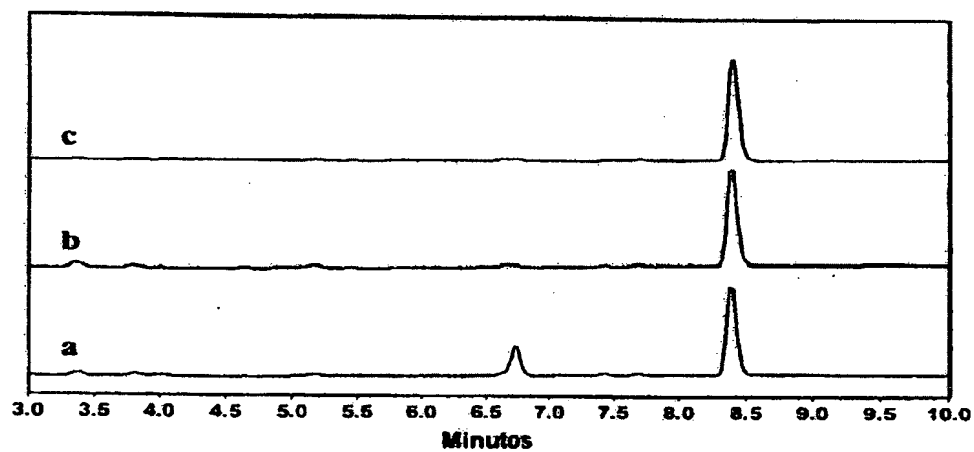


Figura 16

Figura 17



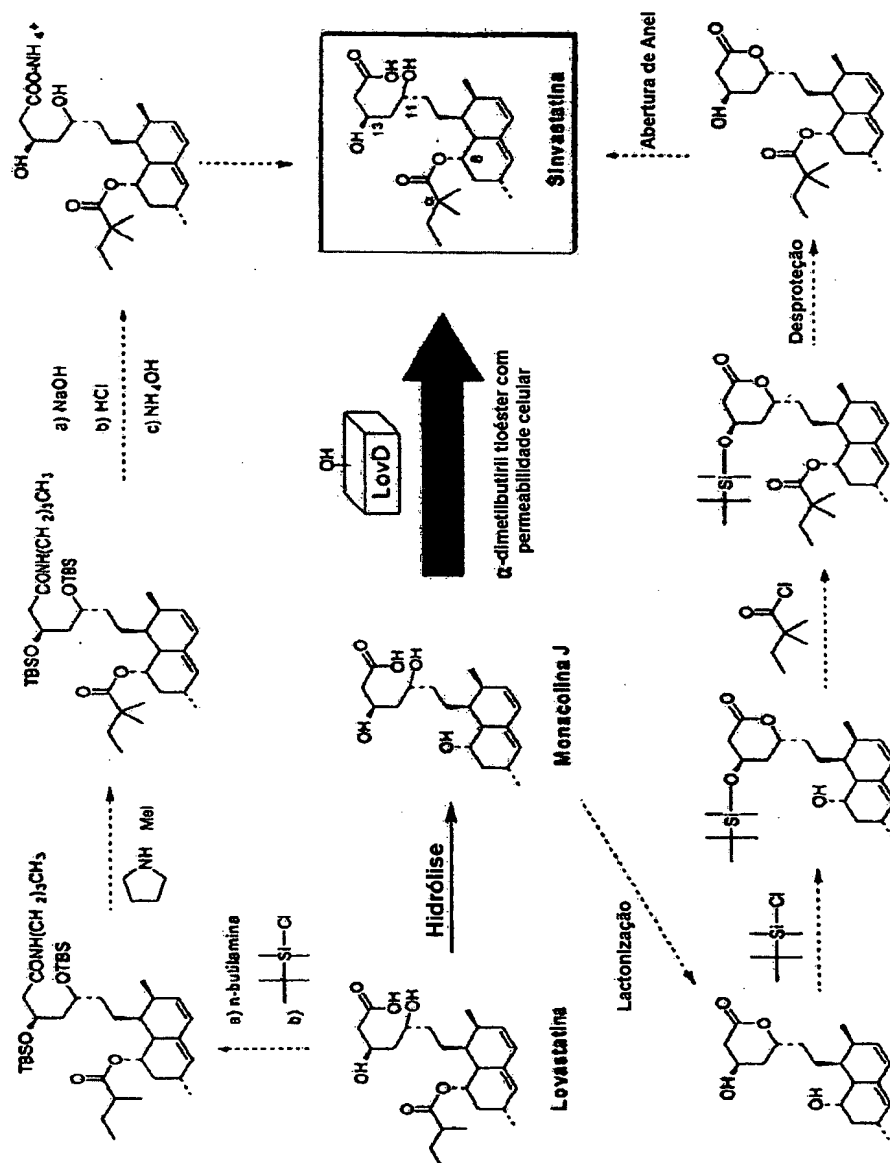


Figura 18

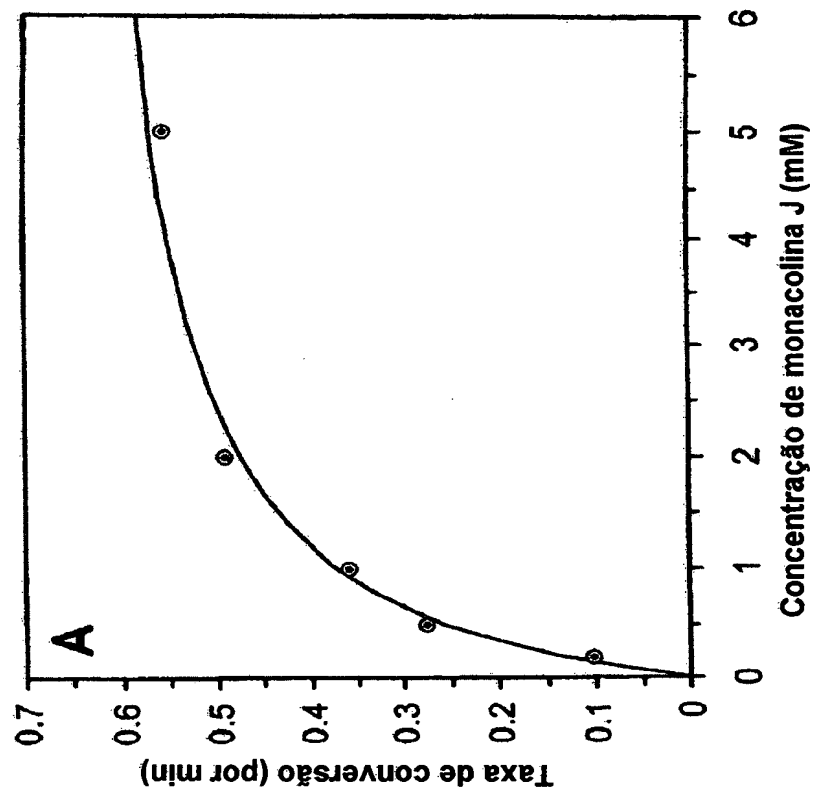


Figura 19A

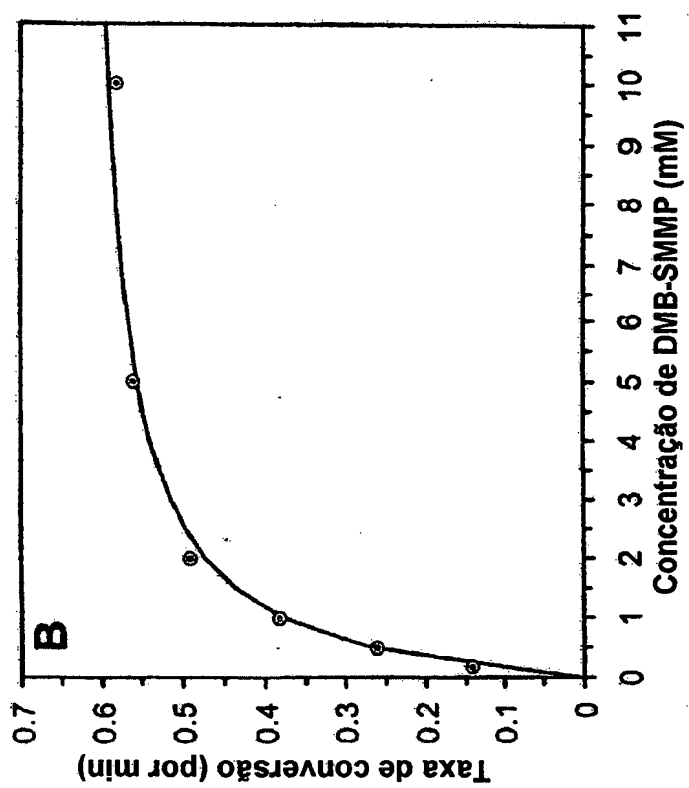


Figura 19B

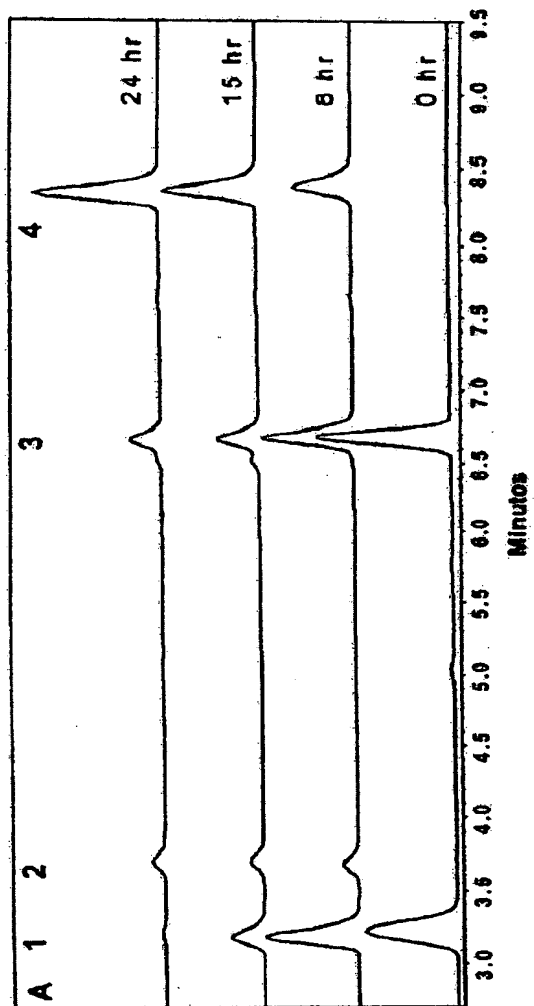


Figura 20A

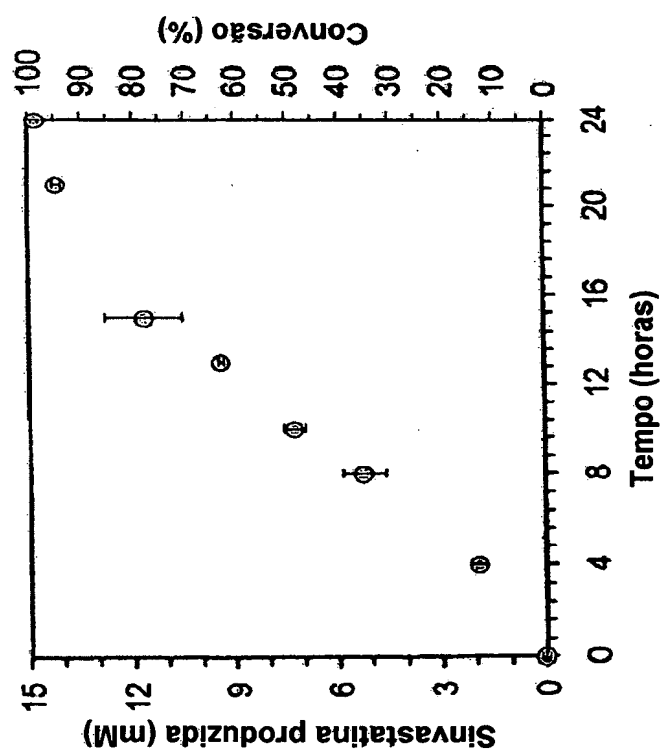


Figura 20B

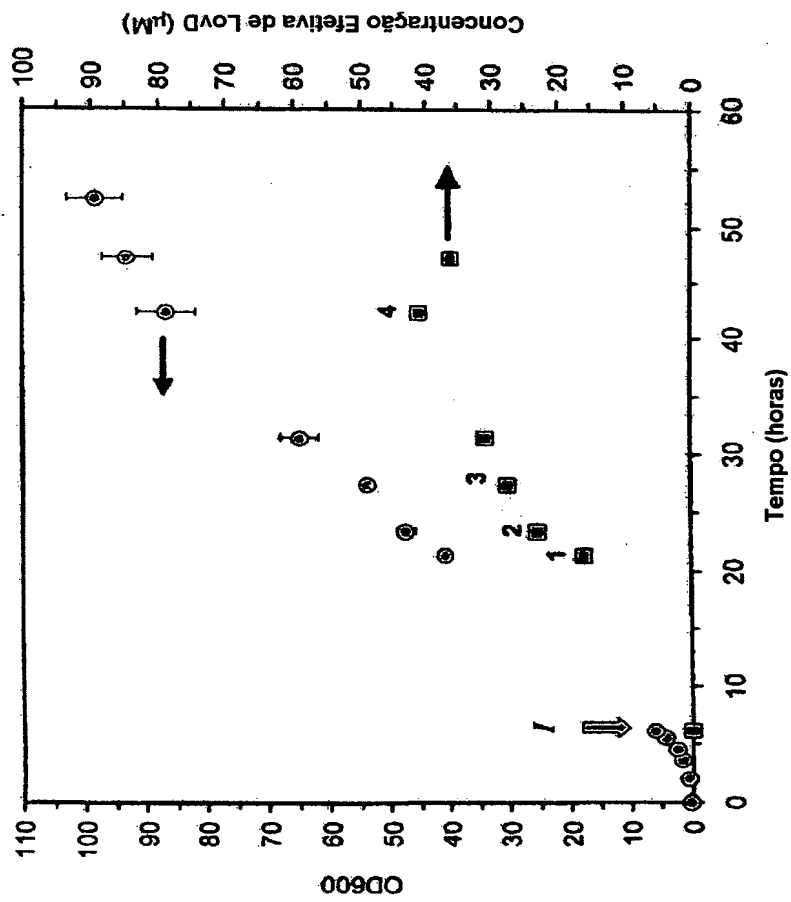


Figura 21A

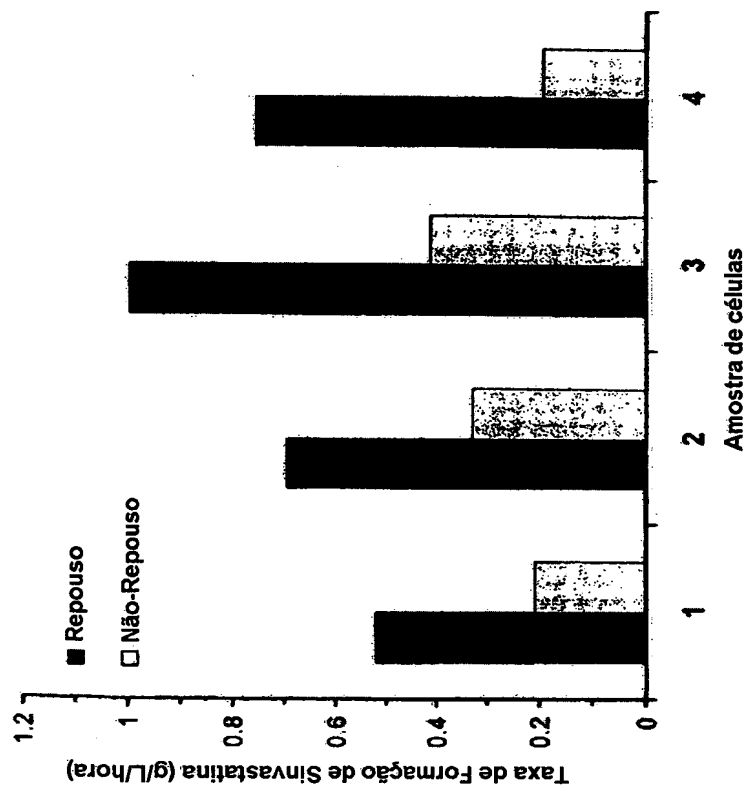


Figura 21B

- RESUMO -

MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SINVASTATINA, COMPOSIÇÃO DE
MATÉRIA, MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE HUVASTATINA, MÉTODO PARA
FABRICAÇÃO DE SINVASTATINA, E MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE
5 UMA COMPOSIÇÃO DE MATÉRIA DE SINVASTATINA OU HUVASTATINA

A invenção aqui divulgada refere-se a métodos e
materiais para produção de sinvastatina e compostos
associados tal como huvastatina.