2000-7110

Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

2000-7110

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO** PROCESO MICROBIAL PARA LA PREPARACIÓN DE PRAVASTATINA

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12P 1/00

71. **SOLICITANTE** INSTITUTE FOR DRUG RESEARCH LTD.

DOMICILIO BUDAPEST, HUNGRIA.

74. **APODERADO** (RODOLFO RODRIGUEZ MADRID) CAMBIO DE APODERADO > CARLOS HAYA RODRIGUEZ

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 4 DE FEB. 2000

020108.

201090

63

2004-01-16.

(FORMA P-10)

2000-7110

Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

2000-7110

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO** PROCESO MICROBIAL PARA LA PREPARACIÓN DE PRAVASTATINA

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12P 1/00

71. **SOLICITANTE** INSTITUTE FOR DRUG RESEARCH LTD.

DOMICILIO BUDAPEST, HUNGRIA.

74. **APODERADO** (RODOLFO RODRIGUEZ MADRID) CAMBIO DE APODERADO > CARLOS HAYA RODRIGUEZ

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 4 DE FEB. 2000

020108.

201090

63

2004-01-16.

(FORMA P-10)

SUPERINTENDENCIA

RY

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No. 2000 0-7110

TITULO Proceso microbial para la preparación DE PRAVASTATINA

CLASIFICACION INTERNACIONAL C12P 1/00

SOLICITANTE INSTITUTE FOR DRUG RESEARCH LTD.

DOMICILIO Budapest, HUNGRIA

APODERADO Rodolfo Rodriguez MADRID)
Cambio de Apoderado → CARLOS MAYA RODRIGUEZ

SANTAFE DE BOGOTA, D.C. 4 de FEBRERO, 2000

2-70108

63
2004-01-16

ORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

00 7110

...CITUD DE ...ENTE ...ENCI...

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00007110 00000000 Folios: 81
Fecha (ACD): 2000-02-04 16:16:54
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) **Nombres y Apellidos o Razón Social** INSTITUTE FOR DRUG RESEARCH LTDA.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio HUNGRIA

Departamento o Estado

...ción Budapest H-1325, P.O. Bpx 82.

Ciudad BUDAPEST **Teléfono**

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre RODOLFO RODRIGUEZ MADRID

Dirección y Domicilio Tranv. 6 27-10 Pent House

Ciudad SANTAFE DE BOGOTA D.C. **Teléfono** 431-7003

DATOS DEL INVENTOR

Nombre del Inventor (es) JEKKEL,Antonia;KONYA,Attila;BARTA,Istvan;ILKOY,Eva;SOMOGYL Gyorgy;AMBRUS,Gabor;HORVATH,Gyula;ALBRECHT,Karoly;SZABO, Istvan M.;MOZES,NEE SUTO,Julianna;SALAT,Janos;ANDOR,Attila;BIRINCSIK,Laszlo;BOROS, ...dor;LANG,Itdiko;BIDLO NEE IGLOY,Margit.

...dentificación Ciudadanos de Hungria

Dirección 38 Damjanich U.;13 Lovas I.U.;10 KassaiU.;37 Munkacsy M.U;70 Jemey U;45/b Csalan U.;4/6 Kigyo U.;44 Mexikoi UT.;11 Bertalan L.U.;56Borso U.;21 Veresegyhaz U.;4 Peres U.;9Racz A.U.;66Nyar U.;13 Izabella U.;86Bartok B.U..

Ciudad Budapest;Szolnok;Budapest;Budapest;Budapest;Budapest;Budapest;Budapest; Budapest;Budapest;Budapest;Budapest;Miskolc;Szod; Budapest;Budapest. **Teléfono**

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) **Título de la Invención** PROCESO MICROBIAL PARA LA PREPARACION DE PRAVASTATINA

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ **TIPO DE PRIORIDAD** ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País	(32) Fecha	(31) No. Solicitud
EE.UU	FEBRERO 23/99	60/118.458
EE.UU	MAYO 18/99	60/134.759

...ra Publicar a los ☒ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses **a partir de la fecha de la presente solicitud**

...SIFICACION INTERNACIONAL C12 P1/00

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

VER HOJA ANEXA.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☐
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista: Si	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☒
Otros Documentos	☐

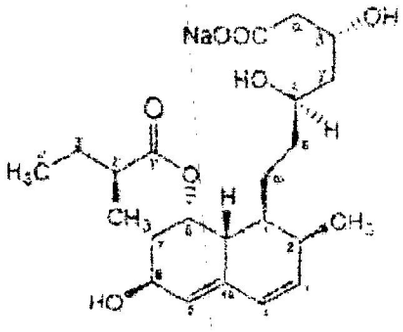
SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA RODOLFO RODRIGUEZ MADRID

NOMBRE

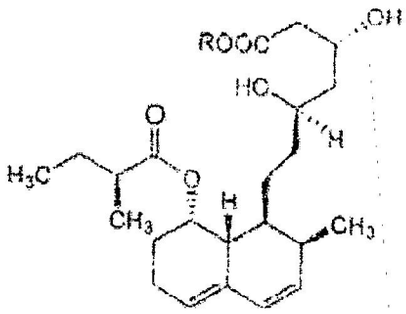
CC.3'792.584-Cartagena **T.P No**50.36

La presente invención se relaciona con un nuevo proceso microbiano para la preparación del compuesto de la fórmula (I)



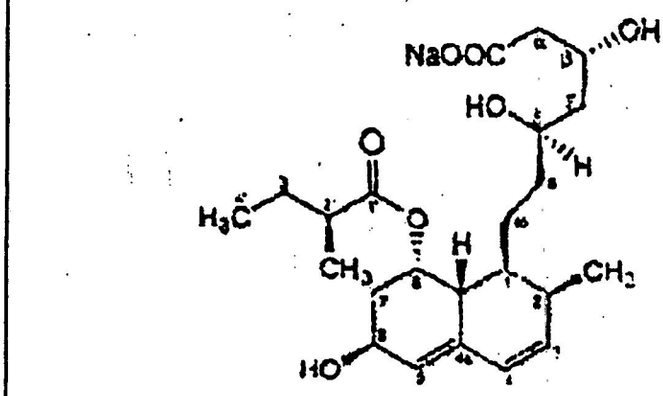
(I)

de un compuesto de la fórmula general (II)

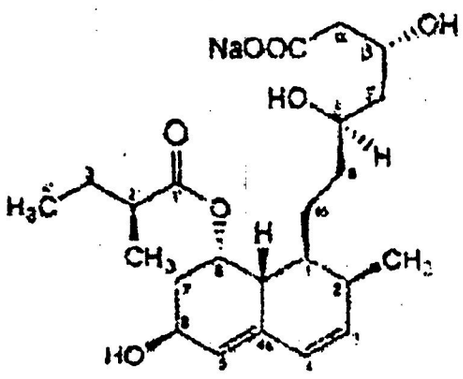


(II)

donde R representa un ion de metal alcalino o de amonio, por el cultivo sumergido de una cepa de moho capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la Fórmula (I) en fermentación aeróbica y por separación y purificación del producto de la Fórmula (I) formada en el curso de la bioconversión. El proceso comprende cultivar una cepa de especie de moho filamentoso *Mortierella maculata* que es capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la Fórmula general (II), en un medio nutriente que contiene caldo de fermentación asimilable, aislando luego el compuesto de la fórmula (I) y purificándolo. También se revelan cepas nuevas de *Mortierella maculata*.



(I)



(I)

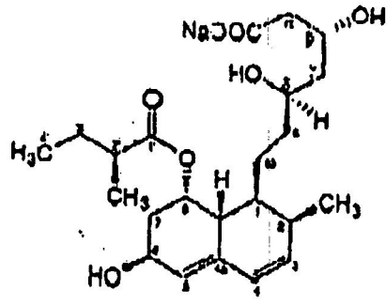
PROCESO MICROBIAL PARA LA PREPARACION DE PRAVASTATINA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un proceso para la preparación de pravastatina, y, particularmente, con un proceso microbiano para la elaboración de pravastatina en una escala industrial.

ANTECEDENTE DE LA INVENCIÓN

El factor de riesgo más elevado de aterosclerosis y, especialmente, oclusión coronaria es el alto nivel de colesterol del plasma. En las últimas dos décadas se examinó extensamente la coenzima A reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril (EC.1.1.1.34) como el índice que limita la enzima clave de la biosíntesis de colesterol. La pravastatina, un compuesto de la Fórmula I,



(I)

y otros compuestos relacionados (compactina, mevinolina, simvastatina) son inhibidores competitivos de la enzima reductasa HMG-CoA [A. Endo et al., J. Antibiot. 29, 1346-1348

(1976); A. Endo et al., FEBS Lett. 72, 323-326 (1976); C.H. Kuo et al., J. Org. Chem. 48, 1991 (1983)].

La pravastatina fue primero aislada por M. Tabaka et al. (resultados sin publicar) a partir de la orina de un perro durante el examen del metabolismo de compactina (Arai, M. et al., Sankyo Kenkyusyo Nenpo, 40, 1-38, 1988). Actualmente, la pravastatina es un agente que reduce el colesterol con el mecanismo de acción más ventajoso en la terapia. Su característica más importante es la selectividad del tejido, es decir, inhibe la síntesis de colesterol en los dos sitios principales de la colesterogénesis, tales como el hígado y el intestino delgado, mientras en los demás órganos la enzima intracelular que limita el efecto es apenas detectable. Al mismo tiempo la biosíntesis del colesterol que limita el efecto de mevinolina y simvastatina es significativa en la mayoría de los órganos (T. Koga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1045, 115-120, 1990).

La pravastatina difiere esencialmente en la estructura química de mevinolina y simvastatina que tienen un carácter más lipofílico. En el caso de los últimos compuestos el sustituyente conectado al átomo de carbono C-1 del esqueleto hexahidronaftaleno termina en un anillo de lactona de 6

miembros, mientras en el caso de la pravastatina, en vez del anillo de lactona, se encuentra presente una forma de sal de sodio de ácido dihidroxi abierta, biológicamente activa. Otra diferencia estructural importante es que en vez del grupo metilo de mevinolina y simvastatina en la posición C-6 del anillo hexahidronaftaleno, se puede hallar un grupo hidroxilo en pravastatina, que resulta en un aumento adicional en su carácter hidrofílico.

Como resultado de las diferencias estructurales antes mencionadas, la pravastatina es capaz de penetrar la membrana lipofílica de las células periféricas sólo en un grado mínimo (A.T.M., Serajuddin et al., J. Pharm. Sci. 80, 830-834, 1991).

La producción industrial de pravastatina se puede lograr mediante dos procesos de fermentación. En el primero, se prepara la compactina en etapa microbiológica, luego durante el curso de una segunda fermentación la sal de sodio del ácido de compactina como un sustrato se convierte en pravastatina mediante hidroxilación microbiana en la posición 6β.

De acuerdo con las patentes publicadas, la hidroxilación microbiana de compactina se puede lograr en diversos grados con especies de mohos que pertenecen a diferentes géneros, y

con bacterias filamentosas que pertenecen al género *Nocardia*, con géneros *Actinomadura* y *Streptomyces* (especificación patente belga No. 895090, memoria descriptiva de la patente japonesa No. 5.810.572, Patente de los Estados Unidos Nos. 4.537.859 y 4.346.227 y solicitud de patente europea publicada No. 0605230). La bioconversión del sustrato de compactina se publicó en una concentración de 500 µg/mL usando mohos filamentosos tales como *Mucor hiemalis*, *Syncephalastrum nigricans*, *Cunninghamella echimulata* y en 2000-4000 µg/mL con cepas *Nocordia*, *Actinomodura* y *Streptomyces* que pertenecen a las procariotas.

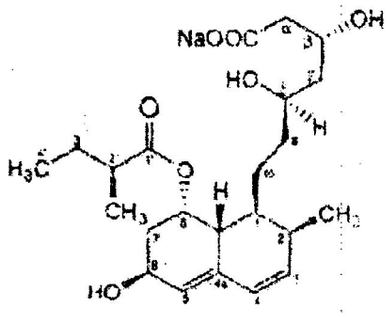
Un problema general experimentado en los casos de elaboración de pravastatina con mohos filamentosos es que debido al efecto antifúngico de la compactina, los microorganismos no son capaces de tolerar la alimentación del sustrato de compactina al cultivo aún con concentraciones bajas (Serizawa et al., J. Antibiotics, 36, 887-891, 1983). La toxicidad celular de este sustrato también se observó en la hidroxilación con *Streptomyces carbophilus* extensamente estudiadas por los investigadores japoneses (M. Hosobuchi et al., Biotecnología y Bioingeniería, 42, 815-820, 1993).

Los autores japoneses trataron de mejorar la capacidad de hidroxilación de la cepa *Streptomyces carbophilus* con técnicas de ADN recombinante. Para la hidroxilación de la compactina se necesita un sistema monooxigenasa citocromo P-450 (Matsuoka et al., Eur. J. Biochem. 184, 707-713, 1989). Sin embargo, de acuerdo con los autores, en el sistema bactericida monooxigenasa citocromo P-450 no una sino varias proteínas actúan en el transporte de electrones, esto agrava la aplicación de las técnicas de ADN. El desarrollo de un método de hidroxilación microbiológico efectivo en cuanto a los costos para la elaboración de la pravastatina es una tarea compleja y sumamente difícil.

El objetivo de la presente invención es elaborar un nuevo proceso microbiano para la preparación de pravastatina a partir de compactina en escala industrial, que produciría pravastatina en condiciones más ventajosas que las ya conocidas. Durante nuestro trabajo de investigación, anteriormente tratamos de hallar una cepa de microorganismos con una enzima hidroxilasa que se pueda adaptar a la transformación microbiana de compactina a pravastatina en una concentración elevada.

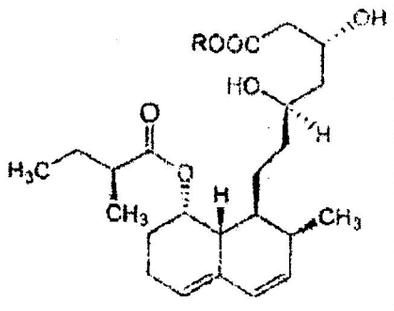
RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un proceso microbiano para la preparación del compuesto de fórmula (I)



(I)

de un compuesto sustrato de fórmula (II)



(II)

donde R representa un ión de metal alcalino o de amonio, que comprende los pasos de (a) cultivar una cepa de especies de moho filamentoso *Mortierella maculata* capaces de 6β-hidroxilar un compuesto de fórmula (II) o un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno y sales minerales, (b) alimentar el sustrato para que se transforme en un cultivo desarrollado de *Mortierella maculata*, (c) fermentar el sustrato hasta el final de la bioconversión, (d) separar el compuesto de fórmula (I) del caldo de cultivo y (e) aislar el compuesto de fórmula (I).

La presente invención también se relaciona con un cultivo biológicamente puro de la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97 depositado en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo número de acceso NCAIM(P)F 001266 y un cultivo biológicamente puro de su mutante, la cepa *Motierella maculata* n. sp. E-97/15/13 depositado en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo número de acceso NCAIM(P)F 001267.

BREVE DESRCIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura 1 es una ilustración de las características físicas de *Mortierella maculata* n. sp. E-97.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En el curso de nuestro programa de clasificación, que abarcó alrededor de 5500 cepas procarióticas y eucarióticas, se seleccionaron 23 microorganismos, que fueron capaces de hidroxilar la compactina en oposición. Entre estas cepas un moho filamentoso demostró ser más adecuado para la producción de pravastatina debido a su mayor resistencia contra la compactina cuando se comparó con cepas conocidas de patentes publicadas. De acuerdo con la investigación taxonómica, esta cepa demostró ser un nuevo representante de las especies que pertenecen al género *Mortierella* (*Mortierella maculata* n. sp.). De los mohos seleccionados, se aisló una nueva cepa por un lado mediante la aplicación de métodos de selección de mutación, y por otro lado, mediante la inducción de la enzima hidroxilasa de la cepa, una fue capaz de hidroxilar el sustrato de compactina a pravastitina en una concentración superior a la publicada hasta el momento. Como agentes mutagénicos, se aplicaron mutágenos físicos y químicos (radiación UV, sulfonato metil metano, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina). Después de los tratamientos mutagénicos,

para preparar células haploides, la suspensión de esporas se esparció sobre placas de benomilo que contienen agar, luego para inducir la enzima hidroxilasa se inocularon las colonias desarrolladas en placas de agar que contenían 100 µg/mL de compactina 8-de-(2-metil-butiril) o compactina. Mediante la aplicación de estos métodos se preparó una cepa mutante de la nueva cepa que es capaz de convertir la compactina en pravastatina en un grado significativamente superior a la cepa madre.

En el curso de los experimentos de optimización se determinó la composición del inóculo más beneficioso y el medio de bioconversión más ventajoso para la hidroxilación de la compactina, así como el método óptimo para la alimentación repetida de compactina en una concentración elevada.

En consecuencia, esta invención se basa en el reconocimiento de que las cepas designadas E-97 y E-97/15/13 del moho aislado denominadas *Mortierella maculata*, que se depositaron bajo los números de acceso de NCAIM(P)F 001266 y NCAIM(P)F 001267 respectivamente, en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria (Departamento de Microbiología y Biotecnología, Universidad de Horticultura e Industria Alimenticia de Budapest), bajo condiciones adecuadas

de fermentación son capaces de elaborar pravastatina en un grado mayor, mientras los compuestos relacionados no deseados tales como las formas ácidas de 6α-hidroxi-compactina, 2α-hidroxi-compactina, 8-de-(2-metil-butiril)-compactina, 3α,5β-dihidroxi-5,6-dihidro-isocompactina, 8a,β-hidroxi-compactina y los derivados hidroxilados en posiciones 2 y 3 de la cadena lateral 2-metil-butiril de compactina se obtienen, solamente, en cantidades pequeñas o menores durante la bioconversión. Así, estas cepas son especialmente adecuadas para la elaboración de pravastatina en un escala industrial.

Teniendo en cuenta que la elaboración económica del principio activo en una escala industrial constituye una función de la concentración del sustrato de compactina, es importante tener un cepa que sea capaz de tolerar las altas concentraciones de compactina y pravastatina. En consecuencia, una parte adicional importante de la invención es el reconocimiento de que la capacidad de hidroxilación del moho original aislado se puede mejorar mediante la aplicación de métodos de mutación-selección e inducción enzimática y, además, que mediante el desarrollo de un método adecuado para la alimentación del sustrato se puede realizar la hidroxilación de grandes cantidades de compactina y pravastatina en un procedimiento individual. En conclusión,

la nueva cepa mutante diseñada como *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 es especialmente adecuada para la elaboración de pravastatina.

Las características taxonómicas de las especies aisladas de moho nuevo que se comparan con los atributos de diagnóstico más importantes de la *especie Mortierella* conocida se resumen a continuación.

Descripción taxonómica de la cepa holotipo *Mortierella maculata* nov. spec. E-97.

En un medio almidón-caseína-malta extracto-agar el micelio aéreo se desarrolla bien (más de 10 µm de espesor que cubre la capa sobre el micelio sustrato). En el comienzo aparece como una red blanca ajustadamente tejida de hifa, en la que, posteriormente, las manchas amarillentas que esporulan con un diámetro mm aparecen escasamente (el nuevo nombre "maculatus" se refiere al anterior: manchado). Esta coloración amarillenta puede a veces ocupar las superfices contínuas más largas de la red aérea. El color del micelio sustrato es en medio agar Czapek-, Czapek-sangriento, tirosina, almidón-caseína, extracto de malta, etc. mayormente incoloro o amarillento suave. El color de la red micelial de

sustrato es rojizo suave en medio levadura extracto-glucosa-peptona. La producción de pigmentos difusibles y solubles en los medios listados anteriormente no se experimentó, o sólo raramente se presenta una coloración amarillenta insignificante en estos medios. Las colonias de cepas E-97, debido a su producción de aceite volátil y similarmente a varias otras especies de *Mortierella*, (excepto a especies de sección Isabelina), pueden exudar un muy fuerte olor característico.

Los esporangióforos, diseñados mediante números de referencia 1-7 en la Figura 1, con frecuencia se desarrollan localmente en la hifa aérea (pero menos en las de sustrato) en grandes cantidades a distancias muy diferentes entre sí. No se ramifican, pero son principalmente rectos o curvos. Su longitud es generalmente entre 60-80 µm. El punto de partida en la abrumadora mayoría de casos es una sección hifa más o menos corta fuertemente dilatada de la red aérea, de la cual están separadas por paredes. Los mismos esporangióforos también se pueden dilatar (a veces fuertemente), como se demuestra por el número de referencia **6**, pero en la dirección del esporangio se angostan gradualmente, de 5,0-9,0 µm a 1,0-2,0 µm. Constituye un importante carácter taxonómico que

establece que debajo de los esparangióforos nunca se ensanchan (ver número de referencia **8**).

Los esporangios son esféricos; en algunos casos esferas ligeramente achatadas. Su diámetro es de 6,0-7,0 µm, relativamente pequeño en comparación con las medidas de esporangio de otras especies *Mortierella*. Los esporangios pueden contener muchas esporas, pero también existen esporangios que sólo tienen una espora. Las esporas **9** son cilíndricas y menos ovales. Su tamaño es 3,0-5,0 x 1,5-2,0 µm. Dentro de las esporas individuales, pueden estar presentes una o dos gotas de aceite **10** esféricas, oscuras y pequeñas. Debido a la fácil desintegración de la pared de los esporangios, en medios húmedos las esporas se esparcen rápidamente. Después de la desintegración del esporangio, algunas veces al final de los esporangióforos, se puede observar un fino "collar" similar a una horquilla y una columela rudimentaria muy corta (y no típica). Pueden presentarse gemas **15-28** que son esféricas o cilíndricas en la mayoría de los diferentes medios diagnósticos. Generalmente el tamaño es 10-25 µm. En las cadenas de cultivo de gemas esféricas **13**, también se pueden hallar células con brotes, gemas **15-23** intercaladas, asociaciones hifales de crecimiento espiral particular de una hifa alrededor de otras **11**,

estructuras tipo anastomóticas y células gigantes, etc. En el micelio aéreo también se pueden observar redes **14** hifales grandes (50-250 pm diámetro) muy densas pero sin la presencia de zigotas detectables.

Los cultivos de cepa E-97 son capaces de reducir nitratos a nitritos, no hidrolizar almidón, esculina, arginina o letanina pero hidrolizar polisorbatos Tween y no descomponer hidrocarburos de parafina. Los cultivos de cepa E-97 tienen actividad ureasa muestran un buen crecimiento entre pH 7,9 y 9,0 toleran un máximo de NaCl 2%. El efecto de xantina, hipoxantina, lecitina, tirosina y adenina es negativo. Se ha detectado una fuerte producción de ácido de los cultivos de glucosa, fructosa, glicerina y galactosa, pero muy débil o sin producción de xilosa, arabinosa, rafinosa, sorbitol, inositol, inulina, etc. El débil crecimiento se detecta en piruvato y acetato pero no se pudo hallar crecimiento con benzoato, salicilato, citrato, lactato, succinato, tartarato y malonato. Se observó un buen crecimiento con glucosa y fructosa como fuentes únicas de carbono en el medio. Las pruebas de utilización con xilosa, arabinosa, ramnosa, sacarosa, rafinosa, manitol e inositol demostraron ser negativas. Los cultivos no descomponen la celulosa.

Posición sistemática: La cepa E-97 pertenece a la familia *Mortierellaceae* y es un miembro típico del género *Mortierella*: el esporangio contiene, generalmente, muchas esporas, la columela es sumamente reducida, las gemas están frecuentemente presentes, la ocurrencia de zigotas no se ha detectado y las colonias exudan un fuerte olor muy característico. Dentro del género *Mortierella*, la cepa E-97 es un representante típico de la "Sección Alpina". La última se puede caracterizar por esporangióforos no ramificados muy cortos (longitud máxima de 200 µm) y esporangias muy pequeñas (Zycha, H. Und Siepmann, R. Mucorales, Eine Beschreibung aller Gattungen und Arter dieser Pilzgruppe. D-3301 Lehre, Verl. Von J. Cramer, 1969). Entre los miembros de la sección Alpina, la cepa E-97 muestra la mayor similitud con las especies M. *thaxteri* Björling 1936 y *M. renispora* Dixon-Stewart 1932. Sin embargo, los datos en la Tabla I muestran claramente las diferencias en las propiedades diagnósticas de la cepa E-97 y de estas dos especies. De manera acorde, como especies nuevas en la presente introducimos la cepa bajo el nombre *Mortierella maculata* nov. spec. E-97.

Tabla I

Una comparación de la cepa holotipo E-97 de *Mortierella maculata* n. sp. Con las especies *M. renispora* y *M. thaxteri* en base a propiedades diagnósticas clave

	Mortierella renispora	Cepa Mortierella E-97	Mortierella thaxteri
Origen de esporangióforos	Comunes, sin embargo las hifas son más anchas que las regulares, lateralmente de hifas hinchadas, dilatadas.	Lateralmente de hifa aérea (hinchada a normal) o secciones no separadas de hifa sustrato.	Lateralmente de segmentos separados hinchados de hifa aérea a segmentos no separados de hifa sustrato.
Forma y tamaño de esporangióforos	Gradualmente disminuyen hacia la parte superior de 10 µm a 3 µm. Longitud de 200 µm	Mayormente rectos o curvos, no ramificados. El ancho disminuye gradualmente hacia el extremo de 5-9 µm a 1,5-2,5 µm. La longitud es de 60-80 µm. En el extremo nunca se dilata.	Longitud de 60-90 µm. El ancho en el punto inicial es de 5-7 µm, en el extremo se reduce a 1,5-2 µm. Inmediatamente bajo el esporangio se dilata.
Forma y tamaño	Incoloro,	Mayormente	Esférico (12-20

del esporangio	diámetro 25 µm	esférico (6-17 µm diámetro) pero raramente menos achatado. Generalmente contiene varias esporas, raramente una espora.	µm diámetro). Contienen varias esporas pero en ciertos medios también hay sólo un esporangio que contien una espora.
Pared (membrana) del esporangío	Membrana de extensión. Después de la desintegración permanece una estructura tipo collar.	Desintegración. Permanece un collar tipo horquilla.	Desintegración, permanece un collar pequeño que se tuerce hacia atrás.
Forma y tamaño de las esporas	Aproximadamente de la forma de un riñón, mediante estructuras alineadas, los tamaños son de 2x4 µm.	Cilíndricas. Longitud (3-5 µm) puede exceder doblemente el ancho (1,5-2 µm)	Esporas hialinas elipsoidales de dimensiones de 3,5-4 x 1,5-2 µm
Gemas	Ocurren en los medios más diferentes	Frecuentes en medios muy diferentes, mayormente en el micelio aéreo. Esféricos o	Gemas ovales intercaladas (10-14 µm) en el micelio sustrato.

		elongados (10-25 µm)	
Zigotas	Frecuentes en todos los medios diagnósticos. Diámetro junto con la hifa que recubre es de 500 µm sin ella 30 µm	No detectada	No observada
Focos densos de la red hifal		Focos hifales extensos densamente tejidos (50-250 µm) frecuentes pero sin zigotas	En extensos cultivos viejos (100-125 µm diám.) redes hifales densas amarillentas-grises, sin zigotas
Color y hábito del micelio aéreo	Suelto, siempre red hifal blanca	Blanco con manchas amarillentas	Primero red similar a la de la araña, luego más densa

En el proceso para la preparación de pravastatina de acuerdo con la presente invención, se usó, preferentemente, el cultivo de la cepa de moho diseñada como *Mortierella maculata* n. sp. E-97 o su mutante diseñado como E-97/15/13. La cepa seleccionada es sumamente ventajosa debido a su rápido crecimiento. Como una fuente de carbono fácilmente utiliza

glucosa, glicerina, fructosa o galactosa. Como una fuente de nitrógeno, se puede utilizar extracto de levadura, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja, solución de infusión de maíz, nitrato de sodio o sulfato de amonio.

En el medio de cultivo usado para la producción de pravastatina aparte de las fuentes de carbono y nitrógeno anteriores pueden estar presentes sales minerales, por ejemplo, fosfato de potasio dihidrogenado, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, elementos menores (sales ferrosas, manganosas), aminoácidos y agentes antiespuma.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la suspensión de esporas que se ha preparado del cultivo agar inclinado de *Mortierella maculata* n. sp. diseñado como cepa E-97 o su mutante [NCAIM(P)F 001267] diseñado como E-97/15/13, se siembra en un medio inóculo, luego 10% del cultivo inóculo, que se cultiva durante 3 días a 25-30 °C, preferentemente a 24-28 °C, más preferentemente a 28 °C, se transfiere al medio de bioconversión. Luego se incuba durante 4 días a 25-28 °C, preferentemente 28 °C, luego la glucosa y la sal de sodio de ácido de compactina se alimentan en el cultivo. Dependiendo de la concentración de la alimentación del sustrato de compactina, el cultivo continúa durante 2-12

días adicionales bajo condiciones aeróbicas, mientras el pH se mantiene entre 5,5-7,5, preferentemente a 7,0. La bioconversión se realiza bajo condiciones de agitación y aereadas, mientras la velocidad de flujo de aire es 0,2 vvm, la velocidad de rotación del agitador es 400/min.

Durante el curso de la fermentación la bioconversión del sustrato compactina es seguido por un método cromatográfico líquido de alta presión (HPLC). De acuerdo con este método, la muestra del caldo se diluye dos veces con metanol y se centrifuga, y el sobrenadante se usa para al análisis de HPLC bajo los siguientes parámetros: Equipo de HPLC analítico Waters; columna: Nucleosil C18 10 µm; longitud de onda de detección: 238 nm; volumen de inyección: 20 µL, velocidad de flujo: 1 mL/min; se usa elución gradiente, eluyentes: A=0,05% solución acuosa de ácido fosfórico, B=acetonitrilo.

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	70	30
20	0	100
25	0	100
25,1	70	30
35	70	30

Tiempos de retención aproximados: pravastatina 8,6-9,0 min; ácido de compactina 11,6-12,0 min; lactona de pravastatina 15,0-15,5 min, compactina 16,5-17,0 min.

Para la producción de pravastatina la solución acuosa de la sal de sodio del ácido de compactina se agrega en la hora 96 del cultivo. Para este procedimiento el sustrato se prepara en forma sólida de la siguiente manera. La lactona de compactina se hidroliza en una solución de hidróxido de sodio 0,2M durante 2 horas a 40 °C, luego el pH de la mezcla reactiva se ajusta a 7,5 mediante ácido clorhídrico y la solución neutralizada se coloca en capas en una columna Diaion HP-20 adsorbente; el cloruro de sodio formado durante la neutralización se elimina mediante lavado acuoso de la columna y luego la sal de sodio del ácido de compactina se eluye de la columna mediante acetona acuosa al 50%. De ahí en más el eluyente se destila al vacío y el residuo acuoso se liofiliza. Después de la neutralización la solución acuosa del hidrolizado alcalino de compactina también usar directamente como sustrato. En este caso el contenido de sal de sodio del ácido de compactina del hidrolizado se mide mediante HPLC y la solución se mantiene a -20 °C hasta que se aplica.

Cuanto más alto sea el pH alcanzado por el caldo al cabo del cuarto día de la fermentación, más ventajoso será para la hidroxilación del sustrato de compactina. Se permite que la alimentación del sustrato de compactina comience cuando el pH del caldo excede 6,3. En el día 4 de la fermentación una tanto como sea necesario de la solución acuosa filtrada estéril de la sal de sodio de ácido de compactina se agrega para alcanzar la concentración de 500 µg/mL. La glucosa también se alimenta al cultivo de su solución al 50% esterilizada a 121 °C durante 25 minutos de la siguiente manera: si el pH del caldo es superior al valor 6,7, 1% de glucosa se agrega relacionada con el volumen del caldo, mientras si el pH está dentro de la gama de 6,3-6,7 la cantidad de la glucosa alimentada es 0,5%. La sal de sodio de ácido de compactina se consume del caldo después de 24 horas, su transformación se analiza mediante medición por HPLC. En este caso, para cada mL del caldo se agregan otros 500 µg de compactina. Además del sutrato de compactina, la glucosa también se alimenta como se describió anteriormente. La morfología del cultivo de 120 horas se caracteriza por el crecimiento de pequeñas bolitas (diámetro de la bolita: 0,5-3,0 mm). Después de 24 horas también se consume la segunda dosis de sustrato del caldo, así una porción adicional de sal de sodio de ácido de compactina que produce una concentración de 500 µg/mL de la misma en el caldo

total se agrega en forma paralela con la alimentación de glucosa dependiente del valor de pH del caldo. A partir del 4to día de la fermentación el sustrato y la alimentación de glucosa se repite en frecuencias diarias como se describió anteriormente hasta los días 17 y 18 de la fermentación.

Para la recuperación del producto del caldo, es ventajoso tomar en consideración el hecho de que durante la bioconversión la pravastatina se forma en un forma ácida, así se puede aislar del filtrado del caldo por su adsorción en una columna de resina de intercambio aniónico. Para el aislamiento del producto es ventajoso usar una resina de intercambio aniónico sumamente básica que es un polímero poliestireno-divinilbenceno que porta grupos activos de amonio cuaternario. El producto se puede adsorber directamente del filtrado del caldo mezclando la resina de intercambio aniónico que se encuentra en forma hidroxilo en la misma. El producto que se adsorbe en la resina de intercambio iónico se puede eluir de la columna por ácido acético o una mezcla de cloruro de sodio que contiene acetona-agua, preferentemente 1% de cloruro de sodio que contiene mezcla de acetona-agua (1:1). Las fracciones que contienen pravastatina se combinan y la acetona que está en el eluyente se destila al vacío. El pH del concentrado se ajusta con 15% de ácido sulfúrico en la

gama de 3,5-4,0 y la solución acuosa se extrae mediante acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se lava con agua y se seca con sulfato de sodio anhidro. Luego el derivado de lactona se prepara a partir de la pravastatina. El cierre del anillo de lactona se lleva a acabo en solución de acetato de etilo seco a temperatura ambiente, bajo agitación contínua induciendo la formación de lactona con ácido trifluoroacético presente en cantidad de catalizador. El procedimiento de transformación se controla mediante análisis cromatográfico de capa delgada (TLC). Después de terminar la formación de lactona la solución de acetato de etilo se lava primero con solución de carbonato de sodio hidrogenada al 5% y luego con agua, luego se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora al vacío. El residuo evaporado se trata con solución de acetona con carbón de leña, luego se evapora nuevamente y se recristaliza de un átomo con 1-4 carbonos que contiene alcohol alifático, preferentemente de etanol. El residuo de evaporación de la solución madre de recristalización se purifica con cromatografía de columna de sílica gel aplicando la mezcla de etil acetato-n-hexano aumentado gradualmente el contenido de acetato de etilo como el eluyente.

De la lactona de pravastatina obtenida después de recritalización y purificación cromatográfica, la pravastatina se prepara mediante hidrólisis a temperatura ambiente en acetona con cantidad equivalente de hidróxido de sodio. Cuando la formación de sal de sodio de pravastatina se completa, la mezcla reactiva de eluye con agua y se neutraliza, y el contenido de acetona se destila al vacío. La pravastaina se adsorbe del residuo acuoso obtenido en una columna que contiene resina HP-20 Diaion, se lava con agua deionizada y se eluye de la columna con mezcla de agua deionizada de acetona. Luego la pravastatina que contiene fracciones se combina, el contenido de acetona se destila y después de la liofilización del residuo acuoso la pravastatina se puede obtener en pureza alta, que se puede recristalizar a partir de una mezcla acetato de etilo-etanol.

Durante el curso del procedimiento, se puede adsorber la cantidad total de pravastatina. Durante el cierre de lactona de pravastatina también se pueden formar 3α-hidroxi-iso-compactina y otros subproductos. Si bien estas últimas reacciones disminuyen la producción del aislamiento pero dichos compuestos se pueden separar mediante el método de purificación antes descripto y consecuentemente, la

pravastatina se puede elaborar de esta manera en una calidad farmacéuticamente aceptable.

Después de terminar la bioconversión la pravastatina se puede extraer del caldo de fermentación o del filtrado obtenido después de la separación de las células de moho filamentoso. Las células de moho filamentoso se pueden eliminar por filtración o centrifugación, sin embargo, es ventajoso especialmente en una escala industrial realizar una extracción total de caldo. Antes de la extracción, el pH del caldo de fermentación o el filtrado del caldo se ajusta a 3,5-3,7 con un ácido mineral, preferentemente con ácido sulfúrico diluido. La extracción se realiza con un éster de ácido acético y un átomo de carbono 24 que contiene alcohol alifático, preferentemente con acetato de etilo o acetato de isobutilo. Los pasos de la extracción se deben realizar muy rápidamente para evitar la formación del derivado de lactona de pravastatina con pH ácido.

Del extraco de solvente orgánico la pravastatina en forma ácida se puede transferir como la sal de sodio en la fase acuosa. Por ejemplo, de un extracto de acetato de etilo la pravastatina se puede extraer por relación de volumen 1/10 y 1/20 de carbonato de sodio hidrogenado al 5% o agua débilmente

alcalina (pH 7,5-8,0). Se halló que la pravastatina se puede recuperar en una forma pura del extracto acuoso alcalino anteriormente obtenido por cromatografía de columna con la aplicación de una resina de adsorción no iónica. Un método ventajoso consiste en remover primero el solvente disuelto en una fase acuosa mediante destilación al vacío del extracto acuoso alcalino, y luego el extracto acuoso se carga en una columna HP-20 Diaion.

La sal de sodio de pravastatina que se adsorbe en la columna se purifica por elución que aumenta gradualmente el contenido de acetona de las soluciones acuosas, luego las fracciones principales que contienen pravastatina se combinan y concentran al vacío. El concentrado acuoso se purifica de manera adicional mediante cromatografía en otra columna HP-20 Diaion, obteniendo una pravastina pura que contiene eluyente a partir del cual, después de la clarificación con carbono y liofilización la pravastatina, se puede obtener en una calidad farmacéuticamente aceptable.

Este procedimiento de aislamiento consiste en menos etapas que el anterior, ya que la formación de lactona de pravastatina y su hidrólisis no está involucrada en el procedimiento. Durante el aislamiento, la pravastatina está

expuesta a la condición ácida sólo durante un tiempo limitado, bajo el que es menos estable que en soluciones neutrales o alcalinas, en consecuencia, durante este procedimiento de aislamiento no se forman prácticamente artefactos.

Además, se halló que la cromaografía en gel Sephandex LH-20 Dextrán (derivado hidroxipropilado) se usa, ventajosamente, para purificar la pravastatina. Mediante aplicación de este método se puede producir la pravastatina que excede la pureza del 99,5% (medida por HJPLC).

En el curso de nuestros experimentos, se ha reconocido que del extracto de solvente orgánico, preferentemente del acetato de etilo o extracto de acetato de isobutilo del caldo o del nitrato de caldo del moho filamentoso o de las cepas de bacterias filamentosas entre ellas la cepa *Mortierella manulata* n. sp. capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la fórmula (II), la pravastatina se puede precipitar como una sal cristalina con aminas secundarias. Además se halló que para la formación de sal son adecuadas diversas aminas secundarias que contienen sustituyentes alquilo, cicloalquilo, aralquilo o arilo. Convenientemente, se seleccionaron aminas secundarias no tóxicas entre ellas, por ejemplo, dioctilamina, diciclohexilamina, dibencilamina. El aislamiento de los

intermediarios de sal amina secundaria orgánica, por ejemplo, la sal dibencilamina se llevó a cabo agregando dibencilamina en cantidad 1,5 equivalente relacionada con el contenido del extracto de pravastatina, luego el extracto se concentró mediante destilación al vacío a 5% de su volumen original, luego otra cantidad de dibencilamina se agregó en el concentrado en relaciones equivalentes 0,2. La sal de dibencilamina cristalina se precipitó del concentrado. El producto crudo cristalino se filtró y secó al vacío. Luego se aclaró con carbón de leña y se recristalizó en acetona.

En el procedimiento mencionado anteriormente en el que la extracción de solvente orgánico y la reextracción en pH alcalino está involucrada, el método de aislamiento en base a la formación de sal de amina secundaria se puede usar también para el reemplazo de la purificación cromatográfica de columna. En este caso es ventajoso precipitar la sal de dibencilamina de pravastatina del extracto de acetato de isobutilo obtenido después de la acidificación del extracto acuoso alcalino.

Las sales de amina secundaria orgánica de pravastatina se pueden transformar en pravastatina mediante hidróxido de sodio o una alcóxido de sodio, preferentemente etóxido de sodio.

La transformación se detalla en el caso de la sal de dibencilamina de pravastatina. La sal de dibencilamina recristalizada se suspende en una mezcla de acetato de isobutilo-agua, luego se agrega la cantidad equivalente de hidróxido de sodio en solución acuosa a la suspensión manteniendo bajo agitación el pH en la gama de 8,0-8,5. Después de la desaparición de la suspensión las fases se separan y la solución acuosa que contiene pravastatina se lava dos veces con acetato de isobutilo. La solución acuosa se acalra con carbono activado y se liofiliza para producir pravastatina en una calidad farmacéuticamente aceptable.

Un método preferido para la transformación de sal de dibencilamina de pravastatina en pravastatina es suspender la sal de dibencilamina recristalizada en etanol, luego se agrega la cantidad equivalente o exceso pequeño de etóxido de sodio bajo agitación a la suspensión, luego la mezcla reactiva se concentra al vacío y agregando acetona, la pravastatina se precipita en forma cristalina a partir del concentrado.

Otro método preferido para la transformación de sal de dibencilamina de pravastatina para pravastatina es disolver la sal de dibencilamina recristalizada en mezcla de acetato de etilo-etanol y se precipita agregando cantidad equivalente o

exceso pequeño de hidróxido de sodio en etanol a la pravastatina de la solución.

El aislamiento de pravastatina mediante un intermedio de sal de amina secundaria es un procedimiento más simple que cualquier método de aislamiento previamente conocido. Durante el procedimiento no se forman artefactos, y la separación de pravastatina de los subproductos de la bioconversión y de los diversos productos metabólicos biosintetizados por los microorganismos de hidroxilación, se puede resolver sin la aplicación de ningún método cromatográfico.

Las estructuras de pravastatina, la lactona de pravastatina y las sales de amina secundaria aisladas de pravastatina se han probado por métodos UV, IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR y espectroscópicos de masa.

EJEMPLOS

La invención se describirá y comprenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos, que se dan a modo de ilustración y no intentan limitar el alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Se preparó una suspensión de esporas con 5 mL de una solución de cloruro de sodio al 0,9% obtenida de un cultivo inclinado de agar extracto de levadura-extracto de malta de 7-10 días de cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 [NCAIM(P)F 001266] capaz de 6β-hidroxilar la compactina, y la suspensión se usó para inocular 100 mL de medio inóculo PI esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.

Composición del medio PI:

Glucosa	50 g
Harina de soja	20 g

en 1000 mL de agua corriente

Antes de la esterilización el pH del medio se ajustó a 7,0 luego se esterilizó a 121 °C durante 25 minutos. El cultivo se agitó en un agitador giratorio (250 rpm, 2,5 cm de amplitud) durante 3 días a 28 °C, luego se transfirieron 10 mL del cultivo obtenido a 100-100 mL del medio de bioconversión MU/4 esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL durante 25 minutos a 121 °C.

Composición del medio MU/4:

Glucosa	40 g
Harina de soja	20 g
Caseína-peptona	1 g
Asparagina	2 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	0,5 g

en 1000 mL de agua corriente

Antes de la estrilización el pH del medio se ajustó a 7,0, luego se esterilizó a 121 °C durante 25 minutos.

Los matraces se agitaron en un agitador giratorio (250 rpm, 2,5 cm de amplitud) durante 4 días a 25 °C, luego se agregaron 50-50 mg de sustrato de compactina (sal de sodio de ácido de compactina) en forma acuosa filtrada estéril en el cultivo, luego se continuó el cultivo. De manera similar, en el día 5to se agregaron otros 50-50 mg de sal de sodio de ácido de compactina en los cultivos de moho, y la fermentación se continuó durante unas 24 horas adicionales. El contenido de pravastatina del caldo se determinó mediante HPLC. La fermentación se continuó durante 168 horas. Al final de la bioconversión la concentración promedio de pravastatina del caldo de fermentación fue de 620 µg/mL.

Ejemplo 2

En un fermentador de escala de laboratorio con 5 litros de volumen de trabajo, se preparó un medio de cultivo de bioconversión MU/S, los componentes del medio de cultivo se agregaron correspondiendo a 5 litros de volumen pero se cargaron sólo 4,5 litros, luego se esterilizó durante 45 minutos a 121 °C y se sembró con 500 mL del cultivo inóculo de acuerdo con el Ejemplo 1.

Composición del medio MU/8:

Glucosa	20 g
Glicerina	20 g
Harina de soja	20 g
Peptona	5 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	0,5 g
Polipropilenglicol 2000	1 g

en 1000 mL de agua corriente

Antes de la esterilización el pH del medio se ajustó al valor 7,0.

La fermentación se llevó a cabo a 28 °C con una velocidad de agitación de 400 rpm y con una velocidad de aireación de dirección de la parte inferior de 60 litros/hora durante 4

días. En el día 2do después de la transferencia, el cultivo comenzó a formar espuma de manera espesa, que se puede disminuir mediante el agregado adicional de propilenglicol 2000. En el comienzo de la fermentación (16-20 horas) el pH disminuyó del valor inicial de 6,5 a 5,0-5,5, luego del 3er día comenzó a aumentar y alcanzó 6,3-7,5 en el día 4to. La alimentación del sustrato de compactina se deja comenzar si el pH del caldo es superior a 6,3. En el día 4to de la fermentación, se agregaron 2,5 g de sustrato de compactina en solución acuosa filtrada estéril. Calculada para el volumen del caldo se agregó glucosa 0,5-1,0% en el cultivo dependiendo del pH en la forma de solución al 50% esterilizada a 121 °C durante 25 minutos en paralelo con la alimentación del sustrato. Después de 24 horas el sustrato de compactina se consumió del cultivo, que se detectó por HPLC de las muestras tomadas del fermentador. En este caso se agregaron otros 2,5 g de sustrato de compactina y glucosa como se describió anteriormente, y la bioconversión continuó durante 24 horas adicionales cuando el sustrato se convirtió en pravastatina.

Después de terminar la fermentación, se filtraron 5,1 litros de caldo que contiene 630 µg/mL de pravastatina en un paño de filtro. Se agregaron dos litros de agua al micelio separado, luego la suspensión de micelio se agitó durante una

hora y se filtró. Estos dos filtrados se combinaron y se pasaron con una velocidad de flujo de 500 mL/hora en una columna que contiene 138 g (250 mL) resina Dowex A1 400 (OH) (diámetro de la columna 3,4 cm, altura del lecho de resina: 28 cm), luego el lecho de resina se lavó con 300 mL de agua deionizada. Subsiguientemente, la elución de la resina se llevó a cabo con una mezcla de 1 litro de acetona-agua (1:1) que contiene 10 g de cloruro de sodio. El volumen de las fracciones fue 100 mL cada una. El eluyente se analizó mediante el siguiente método cromatográfico de capa delgada (TLC): adsorbente: Kieselgel 60 F 254 DC (Merck) papel de aluminio; solvente de desarrollo: mezcla acetona-benceno-ácido acético (50:50:3): detección: con reactivo de ácido fosfomolíbdico. El valor R_f de pravastatina es 0,5. Las fracciones que contienen el producto se combinaron y la acetona se destiló al vacío. El pH del concentrado de 400 mL se ajustó a 3,5-4,0 meidante ácido sulfúrico 15%, luego se extrajo tres veces con 150 mL de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combinaron y secaron con sulfato de sodio anhidro. Subsiguientemente, la lactona de pravastatina se preparó a partir de ácido de pravastatina agregando a temperatura ambiente bajo agitación contínua ácido trifluoroacético en cantidad catalítica. La formación de lactona de pravastatina se controló mediante TLC (el valor R_f

de lactona de pravastatina en el sistema TLC anterior es 0,7). Después de completar la formación de lactona, el acetato de etilo se lavó con 2x50 mL de 5% de solución carbonato de sodio hidrogenada acuosa, luego se lavó con 50 mL de agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó al vacío. El residuo de evaporación obtenido en una cantidad de 3 g se disolvió en 100 mL de acetona y se aclaró con 0,3 g de carbono. Luego el carbono se filtró y la acetona se evaporó al vacío. El producto crudo obtenido se cristalizó de 20 mL de etanol. La lactona de pravastatina cristalina precipitada se filtró y se lavó en el filtro con 30 mL de n-hexano y se secó a temperatura ambiente al vacío. De este modo se obtuvo 1,5 g de lactona de pravastatina cromatográficamente pura. El punto de fusión 140-142 °C, $[\alpha]_D$ = +194 ° (c=0,5, metanol). La otra solución madre de la cristalización se evaporó al vacío y se obtuvo 1,2 g de residuo de evaporación, que se cromatografeó en 24 g de columna que contiene adsorbente Kieselgel 60 (diámetro de la columna: 1,6 cm, altura del lecho. 20 cm). El producto crudo disuelto en 5 mL de benceno se dispuso en capas en la columna. Para la elución se usaron mezclas de acetato de etilo-n-hexano en las que el contenido de acetato de etilo aumentó gradualmente. La lactona de pravastatina se puede eluir de la columna con la mezcla de 60% de acetato de etilo - 40% n-hexano. Las fracciones se

controlaron mediante TLC usando la mezcla de acetato de etilo-n-hexano (9:1) y el solvente de desarrollo. Las fracciones que contienen lactona de pravastatina se combinaron y se evaporaron al vacío. De acuerdo con este método se obtuvieron 0,3 g de producto crudo, su cantidad idéntica a la de la lactona de pravastatina obtenida por cristalización.

Los dos lotes de lactona de pravastatina se combinaron y la sal de sodio se preparó de acuerdo con el siguiente método: 1,8 g de lactona de pravastatina se disolvieron en 20 mL de acetona y bajo agitación se agregaron 4,5 mL de hidróxido de sodio acuoso 1M, luego la solución se agitó durante media hora a temperatura ambiente. Cuando la formación de sal se completó, se agregaron 20 mL de agua en la mezcla y la solución se neutralizó, luego la acetona se evaporó al vacío. El concentrado acuoso se cromatografeó en una columna rellena con 150 mL de resina HP 20 Diaion (diámetro de la columna: 2,6 cm, altura del lecho: 30 cm). A medida que se usaron las mezclas de agente de elución de acetona-agua deionizada, donde la concentración de la acetona aumentó en pasos de 5%. La pravastatina puede eluir de la columna en una mezcla de 15% de acetona que contiene acetona-agua deionizada. Las fracciones se analizaron mediante TLC. Las fracciones que contienen el producto se combinan y la acetona se evaporó al vacío.

Mediante liofilización del residuo acuoso se obtuvieron 1,3 g de pravastatina. El produto cromatográficamente puro se cristalizó a partir de una mezcla de etanol y acetato de etilo.

Punto de fusión: 170-173 °C (decomp.)

$[\alpha]^{D}_{20}$ = +156°, (c=0,5, en agua]

Espectro de absorción ultravioleta (20 µg/mL, en metanol): λ_{max} = 231, 237, 245 nm

(log ε - 4,263; 4,311; 4,136)

Espectro de absorción infrarrojo (KBr): uOH3415. UCH296.5, uC=O 1730, uCOO 1575 cm-1,

Espectro ^{1}H-NMR (D2O, δ, ppm): 0,86, d, 3H (2-CH3), 5,92. Dd, J=10,0 y 5,4 Hz, 1H (3-H); 5,99, d, J=10,0 Hz, 1H (4-H); 5,52, br 1H (5-H); 4,24, m 1H (6-H); 5,34, br, 1H (8-H); 4,06, m, 1H (β-H), 3,65, m, 1H (δ-H), 1,05, d, 3H (2'-CH_3); 0,82, t, 3H (4'-H_3)

Espectro ^{13}C-NMR (D_2O,δ, ppm): 15,3, q(2-CH3); 139,5, d (C-3); 129,5, d, (C-4); 138,1, s (C-4a), 127,7, d(C-5); 66,6, d(C-6); 70,1, d(C-8); 182,6s(COO);72,6,d(C-β);73,0,d(C-δ);182,0, s(C-1')18,8;q(2'-CH_3);13,7,q(C-4')

Espectro de masa FAB positivo (iones característicos):

$[M+Na]^{+}$ 469; $[M+H]^{+}$ 447

Espectro de masa FAB negativo (iones característicos):

$[M-H]^{-}$ 445, $[M-Na]^{-}$ 423, *m/z* 101 [2-metil-acido butírico-H]

Ejemplo 3

En el fermentador de escala del laboratorio con 5 litros de volumen de trabajo, se preparó el medio de cultivo de bioconversión MU/4 como se describe en el Ejemplo 1, aunque se cargó hasta 4,5 litros, la composición del medio de cultivo se calculó hasta 5 litros. Luego, se esterilizó durante 45 minutos a 121°C y se inoculó con 500 ml del cultivo del inóculo de acuerdo con el Ejemplo 1. La fementación se llevó a cabo a 25°C mediante la aplicación de una velocidad de agitación de 300 rpm y una velocidad de aireación de 50 litros/hora durante 4 días. Después de la alimentación de 5 g de sustrato de compactina al cultivo, se llevó a cabo la bioconversión de acuerdo con el Ejemplo 2.

Después de terminar la bioconversión, el caldo de 4,9 litros, que contenía 660 µg/ml de pravastatina, se filtró y el micelio separado se lavó por suspensión en 2x1 litros de agua deionizada. El pH del filtrado de 5,6 litros combinado del caldo se ajustó con ácido sulfúrico al 20% a 3,5-3,7, luego el filtrado ácido se agitó con 2750 ml de acetato de etilo durante 30 minutos. Subsecuentemente, las fases se separan. La fase acuosa se extrajo nuevamente con 2x 1375 ml de acetato de etilo. Se agregó 470 ml de agua deionizada al extracto de

acetato de etilo combinado de 4740 ml, luego se ajustó el pH de la mezcla acuosa de acetato de etilo a 7,5-8,0 con hidróxido de sodio 1M. Después de 20 minutos de agitación, las fases se separaron, luego el extracto de acetato de etilo se extrajo con 2x235 ml de agua deionizada como se describió anteriormente. Luego, la solución acuosa débilmente alcalina combinada de 1080 ml de volumen se concentró al vacío a un volumen de 280 ml. La solución acuosa concentrada se estratificó en una columna cromatográfica (relación de altura-diámetro = 6,5) rellena con 280 ml de resina no iónica Diaion HP-20 (Mitsubishi Co., Japón). La adsorción en la columna se llevó a cabo con una velocidad de flujo de 250-300 ml/hora, luego la columna se lavó con 840 ml de agua deionizada. Subsecuentemente, la columna se eluyó en el siguiente orden con 800 ml 5%, 1000 ml 10%, 500 ml 15% y 500 ml 20% de agua que contiene acetona. En el curso de la elución se recolectaron 50 ml fracciones, que se analizaron por el método TLC dado en el Ejemplo 2. Las fracciones con contenido de pravastatina como el componente principal se combinaron y la solución obtenida se concentró al vacío a un volumen de 260 ml. La solución acuosa concentrada se sometió a cromatografía en una columna con resina Diaion HP-20 en un volumen de 260 ml. Después de la adsorción de pravastatina, la columna se lavó con 790 ml de agua deionizada, luego se eluyó con

soluciones de acetona acuosa en 260-260 ml porciones que aumentaban gradualmente el contenido de acetona de la siguiente manera: 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 y 20,0%. En el curso de la cromatografía de columna, se recolectaron 25 ml de fracciones, y el contenido de pravastatina de las fracciones se analizó como se describió anteriormente. Las fracciones que contenían pravastatina como el único componente por TLC se combinaron y evaporaron al vacío. Subsecuentemente, se agregó 0,3 g de carbón de leña a la solución acuosa concentrada (aproximadamente 30 ml) y la pravastatina se aclaró a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se removió el carbón de leña mediante filtración de la solución y el filtrado fue liofilizado. De esta manera se obtuvieron 1,62 g de pravastatina en forma liofilizada.

Ejemplo 4

Del cultivo inclinado de la cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 [NCAIM(P)F001266] cultivada durante 10-12 días, se preparó una suspensión de espora con 5 ml de solución de cloruro de sodio estéril al 0,9%, y esta suspensión se usó para inocular 500 ml de medio inóculo VHIG siendo esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 3000 ml.

Composición del medio VHIG:

Glucosa	30g
Extracto de carne	8g
Extracto de levadura	1g
Tween-80 (polioxietileno(20)monooleato de sorbitán)	0,5g

en 1000 ml de agua corriente

Antes de la esterilización, el pH del medio se ajustó a 7,0 y la esterilización se llevó a cabo a 121°C durante 25 minutos. El cultivo se cultivó durante 3 días en un agitador giratorio (250 rpm, amplitud 2,5 cm), luego el cultivo del inóculo obtenido se usó para inocular un fermentador de escala de laboratorio con medio de cultivo de bioconversión PK en 5 litros de volumen de trabajo.

Composición del medio PK:

Glucosa	40g
Peptona	5g
Harina de soja	20g
K_2HPO^4	2g
KH_2PO_4	1g
$NaNO_3$	2g
KCl	0,5g

en 1000 ml de agua corriente

Antes de la esterilización el pH del medio se ajustó a 7,0. Después de la inoculación, se llevó a cabo el cultivo, la alimentación del sustrato y la bioconversión de acuerdo con el Ejemplo 2, luego la pravastatina fue aislada del caldo en el cual su concentración fue 650 µg/ml al final de la fermentación.

Al terminar la fermentación, el pH de los 4,9 litros del caldo con 650 µg/ml de pravastatina se ajustó bajo agitación contínua con hidróxido de sodio 2M a 9,5-10,0, luego después de una hora de agitación el pH se ajusta a 3,5-3,7 con ácido sulfúrico 20%. Subsecuentemente, la solución ácida se extrajo con 2,45 litros de acetato de etilo. Las fases se separan, y con centrifugación se preparó un extracto límpido de la fase orgánica emulsionada. El caldo se extrajo nuevamente con 2x1,22 litros de acetato de etilo mediante el método descripto anteriormente. Los extractos de acetato de etilo se combinaron y se agregaron 0,4 litros de agua deionizada, luego el pH de la mezcla se ajustó a 8,0-8,5 con hidróxido de sodio 1M. Las fases se separaron y la fase de acetato de etilo se extrajo con 2x0,2 litros de agua deionizada de pH 8,0-8,5 como se describió anteriormente. El pH de la pravastatina combinada

que contiene solución acuosa débilmente alcalina se ajustó bajo agitación con una solución de ácido sulfúrico al 20% a 3,5-3,7. La solución ácida obtenida se extrajo con 4x0,2 litros de acetato de etilo. Los extractos combinados de acetato de etilo se lavaron con 2x0,2 litros de agua deionizada, luego se agregaron 150 mol% de dibencilamina, calculada para el contenido de pravastatina medido por HPLC, en la solución de acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se concentró al vacío a un volumen de 0,2 litros. Se agregó más 20 mol% de dibencilamina al concentrado obtenido, y la solución precipitada se mantuvo durante toda la noche a 0-5°C. La sal de dibencilamina de pravastatina precipitada se filtró, luego el precipitado se lavó en el filtro con acetato de etilo frío y luego dos veces con n-hexano, y por último se secó al vacío a 40-50°C. El producto crudo obtenido (3,9g) se disolvió en 100 ml de metanol a temperatura ambiente, luego la solución se aclaró por 0,45g de carbón de leña. Luego, el filtrado alcohólico de metilo se concentró al vacío. El residuo evaporado se disolvió en 120 ml de acetona a una temperatura externa de 62-66°C, luego la solución se enfrió a temperatura ambiente. Subsecuentemente, la recristalización se continuó durante toda la noche a 0-5°C. Los cristales precipitados fueron filtrados, luego los cristales se lavaron en el filtro dos veces con acetona fría y dos veces con n-

001266] cultivada durante 10-12 días con 5 ml de solución de cloruro de sodio estéril al 0,9%, y luego se inocularon 500 ml de medio inóculo como se describe en el Ejemplo 4. En un fermentador de escala de laboratorio con 5 litros de volumen de trabajo, el medio de cultivo de bioconversión PC/4 se esteriliza durante 4 minutos a 121°C y luego se inocula con el cultivo de semilla.

Composición del medio PC/4:

Extracto de malta	5,0%
Harina de soja	1,0%
Peptona	1,0%
Solución de infusión de maíz	1,0%
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,1%
en 1000 ml de agua corriente	

Antes de la esterilización, el pH del medio se ajusta a 7,0. Después de la inoculación, se llevó a cabo el cultivo y la alimentación del sustrato de acuerdo con el Ejemplo 2, y luego se obtuvieron 5,1 litros de caldo con una concentración de 610 µg/ml.

Del caldo de 3,7g de sal de dibencilamina de pravastatina, se produjo el producto crudo mediante el método descripto en el Ejemplo 4, del que se obtuvo 2,9g de sal de dibencilamina de pravastatina después de la recristalización. La sal de dibencilamina de pravastatina recristalizada se suspendió en 45 ml de etanol, luego bajo agitación se agregó 110 mol% de hidróxido de sodio por la alimentación de solución de hidróxido de sodio etanólico 1M. La agitación de la solución se continúa durante media hora, luego se agregó 0,3g de carbón de leña y se agitó durante otra media hora. La solución se filtró, y el filtrado se concentró a 15 ml. Luego se agregaron 60 ml de acetona al concentrado a 56-60°C. La solución obtenida se enfrió a temperatura ambiente, luego se mantuvo durante toda la noche a +5°C. Subsecuentemente, el precipitado se filtró, luego se lavó con 2x20ml de acetona, 2x20ml de acetato de etilo y 2x20ml de n-hexano, y finalmente se secó al vacío. Los 1,7g de pravastatina cruda resultante se disolvieron en etanol, luego se aclararon con carbón de leña y se cristalizaron de una mezcla de etanol-acetato de etilo. De este modo, se obtuvieron 1,54 g de pravastatina que fue idéntica al producto del Ejemplo 2.

Ejemplo 6

Como se describió en el Ejemplo 4, del cultivo inclinado de la cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 [NCAIM(P)F001266] cultivada durante 7-10 días, un medio inóculo de 500 ml MI esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 3000 ml, se inoculó y se incubó a 28âC durante 3 días en un agitador giratorio.

Composición del medio MI:

Glucosa	40g
Caseína	5g
KCl	0,5g
$NaNO_3$	3g
KH_2PO_4	2g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5g
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,01g

en 1000 ml de agua corriente

Antes de la esterilización, el pH de la solución se ajustó a 6,0 y la esterilización se lleva a cabo a 121°C durante 35 minutos. El cultivo de semilla obtenido se inocula en 5 litros de medio P12 de bioconversión en un fermentador.

Composición del medio P12:

Glucosa	10g
Extracto de malta	50g
Extracto de levadura	5g
Solución de infusión de maíz	5g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1g
Tween-80	0,5g

en 1000 ml de agua corriente

Antes de la esterilización, el pH del medio se ajustó a 7,0, luego la esterilización se llevó a cabo a 121°C durante 45 minutos. La fermentación, la alimentación del sustrato y la bioconversión se llevaron a cabo de acuerdo con el Ejemplo 2. Después de terminar la bioconversión la pravastatina formada en la concentración de 620 µg/ml se aisló de la siguiente manera:

El pH de 5,15 litros de caldo que contenía 620 µg/ml de pravastatina se ajustó con hidróxido de sodio 2M a un valor de 9,5, luego se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El caldo se filtró y el micelio se lavó con suspensión en 1x2 litros y luego 1x0,5 litros de agua. Los filtrados se combinan y el pH de la solución acuosa se ajustó con ácido sulfúrico al 20% a un valor de 3,7 y se extrajo con 2,5 litros, luego con 1,5 litros de acetato de etilo. Los extractos de acetato de

etilo fueron combinados, lavados con 2x0,5 litros de agua y se agregó 1,95 g de diciclohexilamina. El extracto de acetato de etilo se concentró 40°C a 200 ml bajo presión reducida, y se agregó 0,195 g de diciclohexilamina nuevamente en el concentrado, que luego se agitó a 15°C durante 6 horas. El material cristalino precipitado se filtró, se lavó con 20 ml y con 15 ml de acetato de etilo y se secó a 40°C. De este modo, se obtuvo 3,51 g de producto crudo. Después de la recristalización del producto crudo en una mezcla de acetona-etanol, se obtuvo 3,05 g de sal de dibencilamina de pravastatina (punto de fusión: 162-168°C), que se convirtió en pravastatina de acuerdo con el Ejemplo 5.

Ejemplo 7

La fermentación, la alimentación del sustrato y la bioconversión se llevaron a cabo con la cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 [NCAIM(P)F001266] como se describe en el ejemplo 2. La pravastatina obtenida como un resultado de la bioconversión se aisla del caldo de la siguiente manera:

Se filtraron 5 litros de caldo de cultivo en una concentración de pravastatina de 650 µg/ml en un paño de filtro. El micelio del moho se agitó en 2 litros de solución de hidróxido de sodio 0,1M durante una hora, luego se filtró. Los dos filtrados se combinaron y el pH se ajustó con ácido

sulfúrico al 15% a 3,5-4,0. Subsecuentemente, la solución se extrajo con 2x1,8 litros de acetato de etilo. Las fases de acetato de etilo combinado se lavaron con 800 ml de agua. Luego, se agregaron 400 ml de agua deionizada y el pH de la mezcla se ajustó con hidróxido de sodio 1M a un valor de 8,0-8,5. La mezcla se agitó durante 15 minutos, luego las fases se separaron. Se agregaron 300 ml de agua a la fase de acetato de etilo y el pH se ajustó a 8,0-8,5. Después de agitar durante 15 minutos las fases se separaron. Se agregaron 300 ml de agua nuevamente a la fase de acetato de etilo y el pH se ajustó a 8,0-9,5. Luego, la mezcla se agitó durante 15 minutos. Las dos fases se separaron nuevamente. Todas las fases acuosas se combinaron y el pH se ajustó con ácido sulfúrico al 15% a 3,5-4,0, luego se extrajeron con 3x300 ml de acetato de etilo. Los extractos de etilo combinados se lavaron con 150 ml de agua, se secaron con sulfato de sodio anhidro, y se filtraron. Luego, se agregó 150 mol% de dioctilamina, calculada para el contenido de pravastatina, al extracto de acetato de etilo. El acetato de etilo se evaporó a aproximadamente 1/10 de volumen y la acetona se agregó hasta precipitación. La mezcla se mantuvo a +5°C durante toda la noche. El precipitado se filtró en un filtro G-4, se lavó con 20 ml de acetona y luego con 20 ml de n-hexano y se secó al vacío a temperatura ambiente. Los 3,3 g de sal dioctilamina de pravastatina obtenida se

recristalizó de 20 ml de acetona resultando en 2,7 g de sal dioctilamina de pravastatina pura. Punto de fusión: 143-146°C. La sal diotilamina de pravastatina se convirtió en pravastatina con el método descripto en el Ejemplo 5.

Ejemplo 8

Por el desarrollo de la capacidad de hidroxilación de la cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 aislada del hábitat natural, que es capaz de 6-β-hidroxilar compactina, en la mutación-selección y experimentos de inducción de enzima discutidos en detalle más adelante, se produce la cepa mutante *Mortierella maculata* nov. spec. E-97/15/13 [NCAIM(P)F001267].

La cepa *Mortierella maculata* nov. spec. E-97 [NCAIM(P)F001266] aislada por nosotros se cultivó en un medio agar inclinado MS a 28°C durante 7 días.

Composición del medio agar MS:

Glucosa	4g
Extracto de malta	10g
Extracto de levadura	4g
agar	20g

en 1000 ml de agua corriente

Las esporas se lavaron para remover los cultivos inclinados con 5 ml de solución de cloruro de sodio al 0,9%, luego, después de transferir la suspensión de espora en una palca de Petri estéril, se irradió con luz ultravioleta durante 1 minuto. Subsecuentemente, se agregó N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a la suspensión de espora en la concentración final de 2000 µg/ml. Luego, la suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 100 ml y se agitó a 28°C con una velocidad de 150 rpm durante 20 minutos.

Subsecuentemente, las esporas se sedimentaron por centrifugación con una velocidad de 4000 rpm durante 10 minutos, luego se suspendieron en solución de cloruro de sodio estéril al 0,9%. La suspensión se distribuyó en la placa de agar MU-VB que contenía 10 µg/ml de benomilo y 1% de sangre defibrilada.

Composición del medio agar MU-VB:

Glucosa	40g
asparagina	2g
peptona	2,5g
fosfato de potasio dihidrogenado	0,5g
agar	20g

en 990 ml de agua destilada; después de la esterilzación el medio se completó con 10 ml de sangre bovina y 10 mg de benomilo.

Las placas de agar se incubaron a 28°C durante 7 días, luego las colonias crecidas se transfierieron por selección aleatoria a tubos de ensayo con medio agar PS.

Composición del medio agar PS:

Glucosa	40g
Peptona micológica	10g
agar	15g

en 1000 ml de agua corriente

Antes de la esterilización el pH del medio se ajustó a un valor de 5,6-5,7. La esterilización se lleva a cabo a 121°C durante 20 minutos.

Los cultivos inclinados se incubaron a 28°C durante 12 días, y su productividad de pravastatina se analizó en experimentos de matraz agitado como se describe en el Ejemplo 1. La cepa mutante *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 [NCAIM(P)F001267] se seleccionó por este método, que produjo una pravastatina que excedió el 60% de la velocidad de

conversión del sustrato de sal sódica ácida de compactina aplicada estando en una concentración de 1000 µg/ml.

La enzima hidrolasa de la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 se indujo por el cultivo en medio agar MU-VB con 100 µg/ml de compactina 8-de-(2-metil-butiril) y/o compactina. Después de la selección aleatoria de las colonias crecidas, se transfirieron a un inductor con medio inclinado MU-VB. La productividad de pravastina de los cultivos inclinados se examinó por el método escrito en el Ejemplo 1 con las diferencias que la alimentación del sustrato de compactina en la cantidad de 500 µg/ml se llevó a cabo desde el cuarto día de la fermentación durante 11 días más el sustrato de sodio de compactina se agregó gradualmente durante los doce días convertido completamente en pravastatina. Al final de la bioconversión realizada en 50 cultivos de matraz de agitación, se midieron de 30 g de sustrato de sodio de compactina, se midió por HPLC la formación de 18,5 g de pravastatina. La recuperación de la pravastatina de los caldos de fermentación combinados se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente método.

Después de terminar la fermentación, se ajustó el pH de 5,5 litros de caldo con concentración de pravastatina de 3360 µg/ml, con solución de ácido sulfúrico al 20% a 3,5-3,7.

Subsecuentemente, la solución ácida se extrajo por 2,75 litros de acetato de etilo. Las fases se separaron, y se preparó un extracto límpido mediante centrifugación de la fase orgánica emulsionada. El caldo se extrajo dos veces más con 1,37 litros de acetato de etilo como se describió previamente. Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con 2x1,15 litros de agua deionizada, luego se agregó 150 mol% de dibencilamina, calculada para el contenido de pravastatina medido por HPLC, a la solución de acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se concentró al vacío a un volumen de 0,23 litros. Se agregó otr 20 mol% de dibencilamina al concentrado y la solución precipitada se mantuvo durante toda la noche a 0-5°C. La sal de dibencilamina de pravastatina precipitada se filtró, luego el precipitado se lavó suspendiéndolo en acetato de etilo enfriado y luego dos veces en n-hexano, finalmente se secó a 40-50°C al vacío. El producto crudo obtenido (22,4g) se disolvió en 0,67 litros de acetona a 62-66°C de temperatura, y la solución se aclaró con 2,2 g de carbón de leña. Después de la clarificación, el filtrado de acetona se concentró al vacío hasta un volumen de 0,56 litros. Los cristales precipitaron del concentrado, se disolvieron nuevamente a la misma temperatura, luego la solución se enfrió a temperatura ambiente. Subsecuentemente, la recristalización se continuó durante toda la noche a 0-5°C.

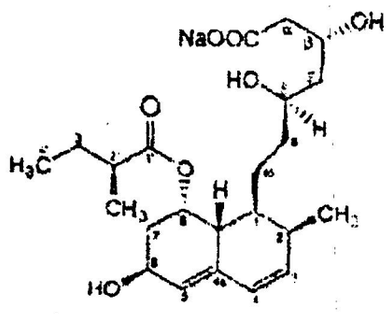
Los cristales precipitados se filtraron, y se lavaron mediante suspensión dos veces en acetona enfriada y dos veces en n-hexano. La sal ácida dibencilamina de pravastatina recristalizada se secó al vacío a 40-50°C. La sal ácida dibencilamina de pravastatina obtenida (14,8g) se disolvió a 40-44°C en 740 ml de una mezcla de acetato de etilo-etanol (9:1), luego se agregó 110 mol% de hidróxido de sodio a la solución en forma de una solución etanólica 1M. La agitación de la solución precipitada obtenida se continuó durante media hora a temperatura ambiente, luego se logró una precipitación completa como resultado de la aplicación de enfriamiento por hielo durante 1-1,5 horas. Subsecuentemente, el precipitado se filtró y se lavó con 2 x 150 ml de acetato de etilo enfriado y 2x150 ml de n-hexano, finalmente secado al vacío a 40-50°C. la pravastatina obtenida se disolvió en etanol, se aclaró por 1,0g de carbón de leña, luego se cristalizó de la mezcla de etanol-acetato de etilo. De este modo se obtuvieron 9,4 g de pravastatina, con constantes físicas correspondientes a los datos descriptos en el Ejemplo 2.

Aunque ciertas realizaciones preferidas actuales de la invención se han descripto en la presente, será obvio para los especialistas en el arte, que se pueden hacer variaciones y modificaciones de las realizaciones descriptas sin alejarse

del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, se intenta que la invención se limite solamente a lo solicitado por las reivindicaciones adjuntas y las normas legales vigentes.

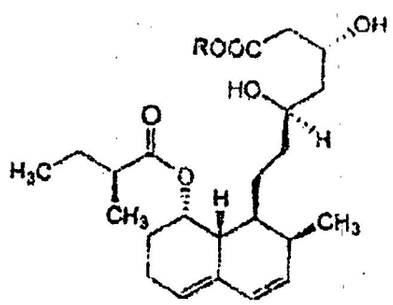
REIVINDICACIONES:

1. Un proceso microbiano para la preparación del compuesto de la fórmula (I)



(I)

a partir de un compuesto sustrato de la fórmula (II)



(II)

donde R representa un ion de metal alcalino o de amonio, que comprende los pasos de:

a) cultivar una cepa de la especie de moho filamentoso *Mortierella maculata* capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la fórmula (II) en un medio nutriente que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno y sales minerales,

b) alimentar el sustrato para ser transformado en el cultivo desarrollado de *Mortierella maculata*,

c) fermentar el sustrato hasta el final de la bioconversión,

d) separar el compuesto de la fórmula (I) del caldo de cultivo, y

e) aislar el compuesto de la fórmula (I).

2. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio es un caldo nutriente.

3. El proceso de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho paso de separar el compuesto de la fórmula (I) del caldo de cultivo se lleva a cabo mediante adsorción en una resina de intercambio de iones aniónicos.

4. El proceso de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho paso de separar el compuesto de la fórmula (I) del caldo de cultivo se lleva a cabo mediante extracción con

solvente orgánico inmiscible en agua, seguido de la preparación de su derivado lactona o su sal de amina secundaria como un intermedio.

5. El proceso de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho paso de separar el compuesto de la fórmula (I) del caldo de cultivo se lleva a cabo por purificación del extracto acuoso alcalino obtenido del extracto solvente orgánico del caldo de fermentación con la cromatografía en una resina de adsorición no iónica.

6. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa *Mortierella maculata* es la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001266.

7. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa *Mortierella maculata* es la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001267.

8. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima hidroxilasa de la cepa usada para la transformación es inducida por compactina 8-de(2-metil-butiril) o compactina.

9. El proceso de la reivindicación 2, caracterizado porque un compuesto de la fórmula (II) como un sustrato se agrega al cultivo en paralelo al paso de alimentación, donde el paso de alimentación depende del pH del cultivo y su cantidad está 0,5-1,0% relacionada con el volumen del caldo.

10. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque el paso de fermentación se lleva a cabo en un medio que contiene fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste de glucosa, fructosa y glicerina.

11. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque el paso de fermentación se lleva a cabo en un medio que contiene fuente de nitrógeno seleccionada del grupo que consiste de harina de soja, peptona, caseína, extracto de levadura y extracto de carne.

12. El proceso de la reivindicación 2, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (I) formado durante la bioconversión se separa del caldo de cultivo por adsorción del filtrado del caldo y del agua de lavado del micelio en una resina de intercambio aniónico, eluyendo el compuesto de la fórmula (I) de la resina, transformando el compuesto de la fórmula (I) completamente hasta su forma lactona, aislando el derivado de lactona, hidrolizando el derivado de lactona por hidróxido de sodio, y desalando el compuesto de la fórmula (I) en una resina de adsorción no iónica.

13. El proceso de la reivindicación 12, caracterizado porque dicha resina de intercambio aniónico tiene grupos activos de amonio cuaternario que llevan esqueleto de poliestireno-divinilbenceno, se usa para la separación del compuesto de la fórmula (I) del filtrado del caldo.

14. El proceso de a reivindicación 4, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (I) formado durante la bioconversión se extrae en forma ácida del caldo, el caldo es acidificado al pH de 3,5-3,7, o del filtrado del caldo por un solvente orgánico inmiscible en agua.

15. El proceso de la reivindicación 14, caracterizado porque dicho solvente orgánico inmiscible en agua es acetato de etilo.

16. El proceso de la reivindicación 14, caracterizado porque dicho solvente orgánico inmiscible en agua es acetato de isobutilo.

17. El proceso de la reivindicación 5, caracterizado porque dicho compuesto de la fórmula (I) se extrae en forma de sal sódica del solvente orgánico por solución de hidróxido de sodio acuosa, y se purifica en una resina de adsorción no iónica.

18. El proceso de la reivindicación 14, caracterizado porque dicho compuesto de la fórmula (I) se precipita del extracto en forma cristalina con una amina secundaria que contiene sustituyentes alquilo, cicloalquilo, aralquilo, o arilo.

19. El proceso de la reivindicación 18, caracterizado porque la sal de amina secundaria cristalina se suspende en una mezcla de un éster de alquilo de 1-4 átomos de carbono de ácido acético y agua; se agrega una cantidad equivalente

de hidróxido de sodio en solución acuosa a la suspensión de modo que se forman una fase orgánica y una fase acuosa; las fases orgánica y acuosa se separan; la fase acuosa se lava con acetato de isobutilo, luego se aclara con carbono activado; y la solución acuosa se liofiliza.

20. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque dicho éster de alquilo es éster de isobutilo.

21. El proceso de la reivindicación 18, caracterizado porque la sal de amina secundaria cristalina se suspende en un alcohol de 1-4 átomos de carbono; de la suspensión se prepara una solución del compuesto de la fórmula (I), agregando una solución etanóliaca de hidróxido de sodio; y el compuesto de la fórmula (I) se precipita de la solución por la acetona.

22. El proceso de la reivindicación 21, caracterizado porque dicho alcohol de 1-4 átomos de carbono es etanol.

23. El proceso de la reivindicaición 18, caracterizado porque la sal de amina secundaria cristalina se disuelve en una mezcla de éster de alquilo de 1-4 átomos de carbono de un ácido carboxílico de alcano con 1-4 átomos de carbono y

un alcohol con 1-4 átomos de carbono; y de la solución del compuesto de la fórmula (I) se precipita en forma cristalina agregando el hidróxido de sodio.

24. El proceso de la reivindicación 23, caracterizado porque dicha mezcla es una mezcla de acetato de etilo-etanol.

25. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque la pravastatina se aisla del caldo de fermentación a través de la sal de dibencilamina de la forma ácida del compuesto de la fórmula (I).

26. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque el derivado ácido del compuesto de la fórmula (I) es purificado a través de su sal diciclohexilamina.

27. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque el derivado ácido del compuesto de la fórmula (I) es purificado a través de su sal dioctilamina.

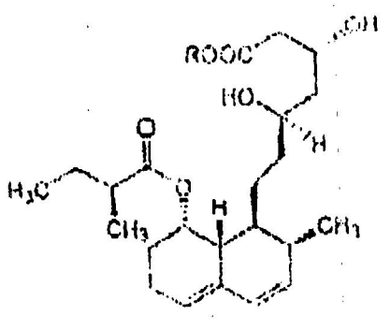
28. El proceso de la reivindicación 19, caracterizado porque el compuesto de la fórmula (I) se purificada hasta al menos 99,5%, medido por HPLC, usando cromatografía de gel.

29. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque dicha cepa de *Mortierella maculata* se cultiva de 25° a 30°C.

30. Un cultivo biológicamente puro de la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001266.

31. Un cultivo biológicamente puro de la cepa *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001267.

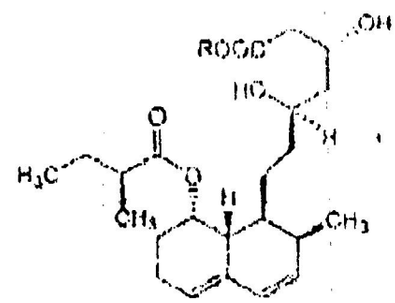
32. Un cultivo de *Mortierella* capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la fórmula (II)



(II)

donde R representa un ion de metal alcalino o de amonio, que consiste esencialmente de un cepa nueva *Mortierella maculata* n. sp. E-97 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001266.

33. Un cultivo de *Mortierella* capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la fórmula (II)

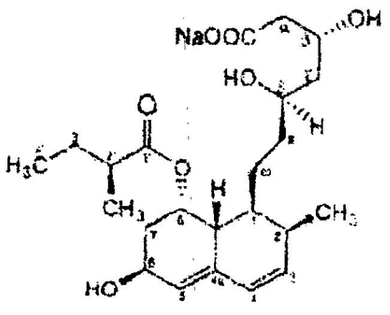


(II)

donde R representa un ion de metal alcalino o de amonio, que consiste esencialmente de un cepa nueva *Mortierella maculata* n. sp. E-97/15/13 depositada en la Colección Nacional de Microorganismos de Agricultura e Industria, Budapest, Hungría bajo el número de acceso NCAIM(P)F001267.

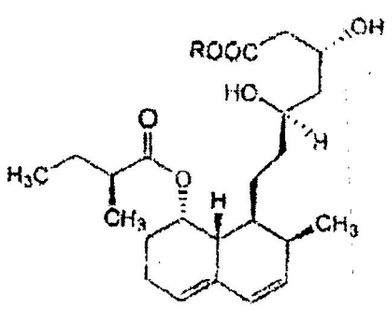
RESUMEN

La presente invención se relaciona con un nuevo proceso microbiano para la preparación del compuesto de la fórmula (I)



(I)

de un compuesto de la fórmula general (II)



(II)

donde R representa un ion de metal alcalino o de amonio, por el cultivo sumergido de una cepa de moho capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la Fórmula (I) en fermentación aeróbica y por separación y purificación del producto de la Fórmula (I) formada en el curso de la bioconversión. El proceso comprende cultivar una cepa de especie de moho filamentoso *Mortierella maculata* que es capaz de 6β-hidroxilar un compuesto de la Fórmula general (II), en un medio nutriente que contiene caldo de fermentación asimilable, aislando luego el compuesto de la fórmula (I) y purificándolo. También se revelan cepas nuevas de *Mortierella maculata*.

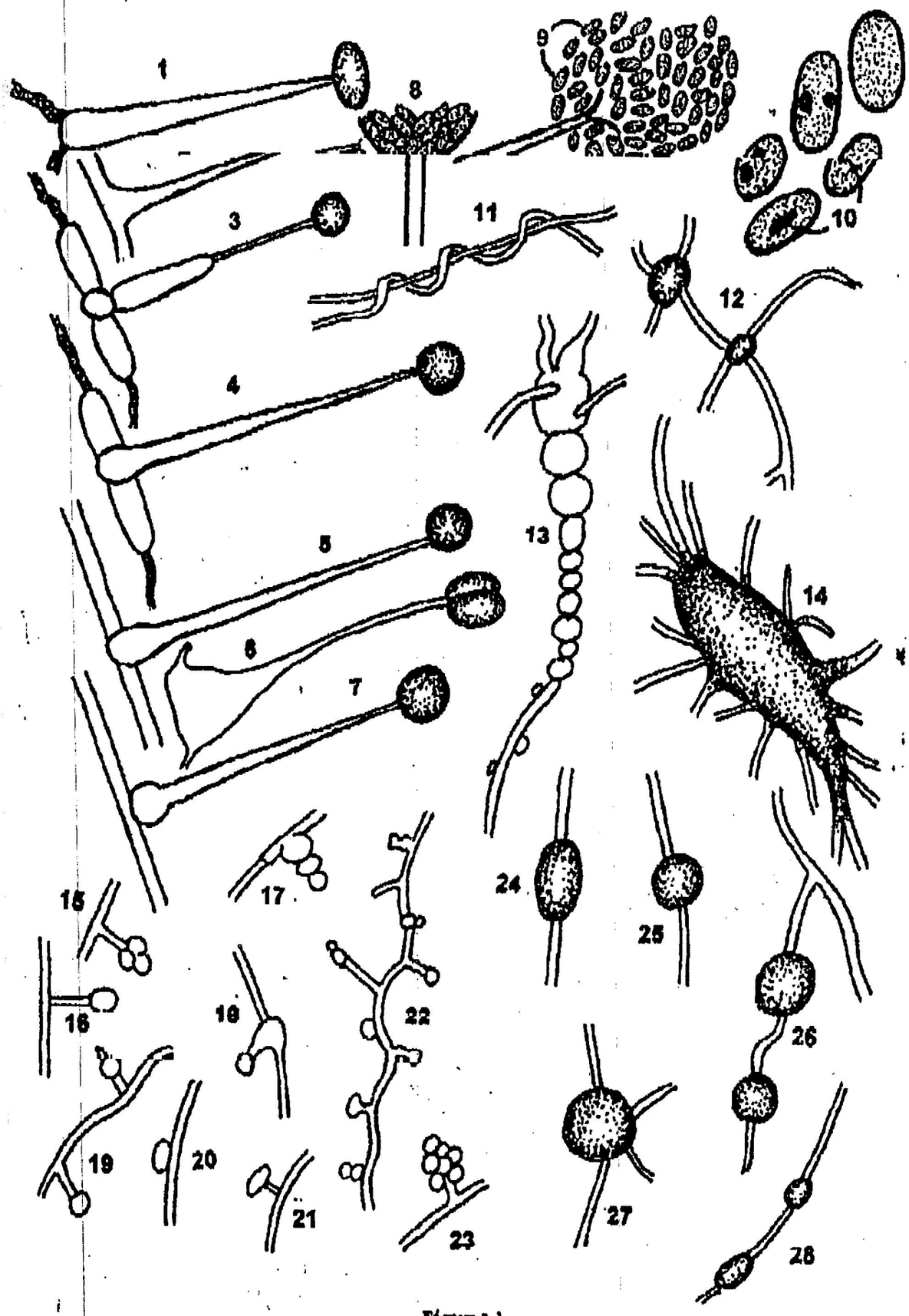


Figure 1

81
77

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 02037110 00000000 Folios: 81
Fecha (AMD): 2000-02-04 16:16:54
Tramite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800170089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 8,389
FECHA : FEBRERO 4 DE 2000

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
RODRIGUEZ MADRID Y ASOCIADOSCONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA		050-00024-9	871020	608,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTIC	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	9008-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL : $	608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
BOGOTA

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

78-82

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN/TRÁMITE

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03007110 03003003 Folios: 81
Fecha (AMD): 2003-02-04 16:16:54
Tramite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Patente de Invención ☐ **Modelo de Utilidad**

☑	Nombre e identificación del solicitante	☐
☑	Nombre e identificación del inventor	☐
☑	Título o nombre de la invención	☐
☑	Descripción	☐
☑	Reivindicaciones	☐
☑	Resumen	☐
☑	Comprobante de pago	☐

COMPLETA INCOMPLETA

Diseño Industrial ☐

☐	Nombre e identificación del solicitante
☐	Nombre e identificación del inventor o diseñador
☐	Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
☐	Representación gráfica
☐	Comprobante de pago

COMPLETA INCOMPLETA

FIRMA RESPONSABLE

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

83
79

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

Ubo
Junio 7/2000

2000-02-07
430

EXPEDIENTE 0-07110

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentaciòn establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y el Decreto 298 del 17 de febrero de 1999).

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [ ] **NO [x]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [ ] **NO [x]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [ ] **NO [x]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 7 de Febrero del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

80

Folio 84

2000-04-19
4330

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Primer EXAMEN DE FORMA

Radicación no 00-7110.
Concepto Técnico no 599. Clasificación Internacional de Patentes C12P 1/00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI ☒ NO ☐	Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
SI ☒ NO ☐	Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
SI ☒ NO ☐	Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
SI ☒ NO ☐	Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
SI ☒ NO ☐	Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
SI ☒ NO ☐	Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
SI ☒ NO ☐	Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
SI ☒ NO ☐	Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
SI ☒ NO ☐	Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
SI ☐ NO ☐	Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
SI ☒ NO ☐	Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI ☒ NO ☐	Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI ☒ NO ☐	**CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☐ NO ☒ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 19 de abril de 2000.

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

81

2000-04-27
430

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE0-07110

AUTO 0299

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor XXXXXXXX como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 25 ABR 2000

EL JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 27 ABR 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO 12-06-00

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia