(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 772**

(51) Int. CI.:

C07J 63/00	(2006.01)	***A61K 9/16***	(2006.01)
C07J 71/00	(2006.01)	***A61K 9/20***	(2006.01)
C12P 33/06	(2006.01)		
A61K 9/52	(2006.01)		
A61K 31/277	(2006.01)		
A61K 31/336	(2006.01)		
A61K 47/34	(2007.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61K 31/58	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2015 PCT/JP2015/075535**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16039359**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2015 E 15840177 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3192875**

(54) Título: **Composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento y prevención de enfermedades oculares**

(30) Prioridad:

10.09.2014 JP 2014183854

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2020

(73) Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426 , JP

(72) Inventor/es:

KASUYA, YUJI;
NAKAGAMI, YASUHIRO;
HATANO, EMIKO;
INOUE, TATSUYA;
YOSHIDA, KAZUHIRO;
KOMORIYA, SATOSHI;
MURAKAMI, YOKO;
IWASAKI, MASARU;
SAKAMOTO, ATSUNOBU;
MASUDA, KAYOKO;
MINAMI, MASAKO;
IIZUKA, MAYUMI;
ONO, YASUNORI y
OHNUKI, TAKASHI

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento y prevención de enfermedades oculares

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo, un derivado terpenoide que tiene la capacidad de activar la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE y es excelente en la acción antiinflamatoria y acción citoprotectora, en la que la composición farmacéutica presenta un efecto extraordinario sobre el tratamiento y prevención de una enfermedad ocular causada por estrés oxidativo.

Técnica antecedente

Al detectar las especies de oxígeno activo, etc., que se generan en el curso del metabolismo energético, se inician los sistemas de defensa del huésped tales como grupos enzimáticos antioxidantes, grupos enzimáticos de metabolismo de la detoxificación o similares. La ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE controla el inicio de este sistema de defensa del huésped.

Se sabe que la activación de la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE induce su gen diana de NAD(P)H: quinona oxidorreductasa-1 (NQO1), hemo oxigenasa-1 (HO-1), unidad catalítica de la γ-glutamato cisteína ligasa (GCLC), o similares (Bibliografía no patente 1). La NQO1 es una enzima de fase 2 del metabolismo xenobiótico y es importante para la detoxificación. La HO-1 y GCLC se conocen como enzimas antioxidantes típicas. Cuando estas enzimas aumentan en cantidad o en activadas, las células se vuelven resistentes a venenos, el estrés oxidativo, la inflamación, etc. Los compuestos que activan esta ruta de señalización se consideran por lo tanto que sirven como fármacos terapéuticos para distintas enfermedades (Bibliografía no patente 2 a 5). Los ejemplos específicos de las enfermedades diana se dan posteriormente.

Se ha publicado que los ratones deficientes en Nrf2 presentan una vulnerabilidad en el sistema de isquemia/reperfusión retiniana (Bibliografía no patente 6). Esta sugiere la aplicación de los compuestos en enfermedades oculares tal como enfermedad alérgica conjuntival, conjuntivitis vírica, pterigión, infección corneal, trastorno corneal endotelial, cataratas, uveítis, enfermedad de Behcet, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, oclusión de la vena retiniana, coriorretinopatía grave central, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, enfermedad macular, retinitis pigmentaria, glaucoma y cataratas (Bibliografías no patente 7 y 8).

Se ha publicado que los ratones deficientes en Nrf2 presentan una vulnerabilidad a la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino (Bibliografía no patente 9). Esta sugiere que la aplicación de los compuestos en enfermedades renales tales como la nefritis aguda, nefritis crónica, fallo renal agudo, fallo renal crónico, síndrome nefrótico, nefropatía por IgA, nefropatía diabética, riñón gotoso, nefroesclerosis, hidronefrosis, nefritis tubulointersticial, e infección del tracto urinario (Bibliografía no patente 10).

Se ha publicado que los ratones deficientes en Nrf2 presentan una vulnerabilidad a la exposición de humo de cigarrillo (Bibliografía no patente 11). Esta sugiere la aplicación de los compuestos en enfermedades respiratorias tales como bronquitis, neumonía, pleuritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, panbronquiolitis difusa, enfisema pulmonar, y asma (Bibliografías no patentes 12 y 13).

Se ha publicado que los ratones deficientes en Nrf2 es más probable que desarrollen esteatohepatitis no alcohólica cuando se alimentan con una dieta deficiente en metionina/colina (Bibliografía no patente 14). Esta sugiere que la aplicación de los compuestos en las enfermedades hepáticas tales como hígado graso alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, y cirrosis hepática (Bibliografías no patente 2 y 15).

También se ha publicado que los activadores de Nrf2 presentan una acción hipoglucémica en ratones (Bibliografía no patente 16). Esta sugiere la aplicación de los compuestos en diabetes mellitus y sus complicaciones (retinopatía diabética, nefropatía diabética, y neuropatía diabética) o similares.

Entre las sustancias que activan la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE, se ha publicado que el sulforafano contenido en los brotes de brócoli, la curcumina contenida en la cúrcuma del curry, o similares, activan el Nrf2 y promueven la detoxificación de carcinógenos (Bibliografía no patente 17). También se ha publicado que un anillo triterpenoide de 5 miembros que comprende metil 2-ciano-3,12-di-oxoleana-1,9 (11)-dien-28-ácido (Bibliografía no patente 18 y Bibliografías de patente 1 a 10) descubierto por Honda y col., activa la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE. Se ha publicado que estos compuestos dan lugar a la producción de varias proteínas antiinflamatorias y proteínas antioxidantes (por ejemplo, NQO1, HO-1, y GCLC) (Bibliografía de patente 9).

Las bibliografías no patentes 21 y 22 desvelan derivados de CDDO no sustituidos en 21, con actividad inhibidora de NO y antiinflamatoria.

Entre tanto, se han diseñado composiciones farmacéuticas en distintas formas tal como nanopartículas, microesferas, y bastones que utilizan distintos materiales básicos, con el fin de maximizar el efecto farmacológico del compuesto que tiene una acción antioxidante como se ha descrito anteriormente sobre las enfermedades de la parte posterior del

ojo mientras que se reduce las molestias de administración en los pacientes. También se han hecho estudios sobre el aprovechamiento de distintas técnicas DDS tales como la iontoforesis y microagujas (Bibliografía no patente 19). Esto indica que hay una necesidad extremadamente alta de procedimientos de administración especiales para conseguir un suministro de fármacos en las áreas afectadas, retención y sostenimiento de fármacos, y la eficacia de los fármacos en el campo de las enfermedades oculares. Los materiales posibles son metales, plásticos no degradables y plásticos biodegradables, y las formas posibles son distintas formas tales como microesferas y bastones. El ácido poliláctico o poli(láctico-co-glicólico) es un material básico que tiene una biocompatibilidad y biodegradabilidad excelentes (Bibliografía no patente 20). Como existen algunos productos farmacéuticos que tienen este material básico como componente, el uso práctico de este material básico se ha establecido de manera evidente. La forma de microesfera o bastoncillo es una forma adecuada para la administración intravítrea como un implante.

Aunque los principios activos (fármacos) y distintas técnicas DDS para la prevención o tratamiento de las enfermedades de la parte posterior del ojo se han diseñado como se ha descrito anteriormente, los fármacos que tienen propiedades compatibles con las técnicas DDS se han encontrado en casos muy raros. Como para la combinación de fármacos y técnicas DDS, solo se han lanzado unos pocos artículos de productos farmacéuticos, y en el campo de las enfermedades del ojo solo existe una inyección de implante de dexametasona. Esta dificultad está causada por distintos factores, sin embargo, en muchos casos, se atribuye presumiblemente a que dicha dosis es insuficiente porque no es fácil hacer posible que una dosis incluya el fármaco en la cantidad suficiente necesaria para el periodo de sostenimiento necesario.

En consecuencia, existe una demanda de que se desarrolle un compuesto que tenga excelentes efectos preventivos y terapéuticos en una enfermedad de la parte posterior del ojo, que contenga el compuesto como principio activo y que ejerza sus efectos preventivos o terapéuticos en intervalos de dosificación largos aceptables en la práctica médica.

Listado de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patente 1: WO 99/65478
Bibliografía de patente 2: WO 2012/125488
Bibliografía de patente 3: WO 2011/130302
Bibliografía de patente 4: WO 2009/146216
Bibliografía de patente 5: WO 2009/129546
Bibliografía de patente 6: WO 2009/129548
Bibliografía de patente 7: WO 2009/023232
Bibliografía de patente 8: WO 2004/064723
Bibliografía de patente 9: WO 2009/089545
Bibliografía de patente 10: WO 2013/188818

Bibliografía no patente

Bibliografía no patente 1: Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2012; 44: 1315-1320
Bibliografía no patente 2: Clin. Pharmacol. Ther. 2012; 92: 340-348
Bibliografía no patente 3: Adv. Pharmacol. 2012; 63: 43-79
Bibliografía no patente 4: Med. Res. Rev. 2012; 32: 687-726
Bibliografía no patente 5: Mol. Aspects. Med. 2011; 32: 234-246
Bibliografía no patente 6: Free Radic Biol. Med. 2011; 51: 216-224
Bibliografía no patente 7: Front Biosci. (Elite Ed.) 2012; 4: 141-115
Bibliografía no patente 8: Curr. Med. Chem. 2011; 18: 931-942
Bibliografía no patente 9: J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010; 335: 2-12
Bibliografía no patente 10: Int. J. Nephrol. 2012; 321714
Bibliografía no patente 11: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009; 106: 250-255
Bibliografía no patente 12: Trends Mol. Med. 2011; 17: 363-371
Bibliografía no patente 13: Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010; 244: 43-56
Bibliografía no patente 14: Free Radic Biol. Med. 2010; 48: 357-371
Bibliografía no patente 15: J. Nutr. Biochem. 2012; 23: 1201-1206
Bibliografía no patente 16: J. Biol. Chem. 2010; 285: 40581-40592
Bibliografía no patente 17: The Journal of The Japanese Biochemical Society, 2009; 81: 447-9
Bibliografía no patente 18: Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998: 8: 2711-2714
Bibliografía no patente 19: Drug Discovery Today 2011: 16: 1-8
Bibliografía no patente 20: Advanced Drug Delivery Reviews 2013; 65: 104-120
Bibliografía no patente 21: Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002: 12: 1027-1030 (2002)
Bibliografía no patente 22: Med. Res. Rev. 2009: 29(5): 767-820

Sumario de la invención

Problema técnico

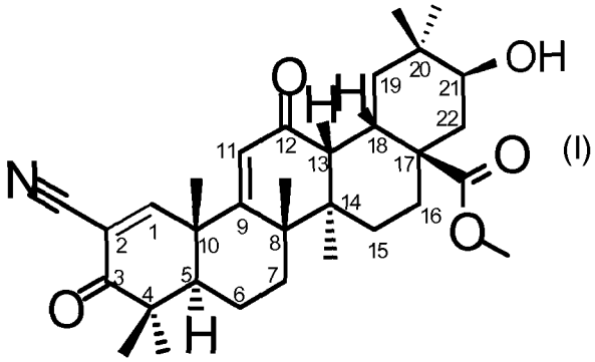
Los presentes inventores han llevado a cabo estudios diligentes de compuestos que activan la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE y sean útiles para la prevención y tratamiento de una enfermedad de la parte posterior del ojo, y composiciones farmacéuticas que comprendan los compuestos como principios activos, y en consecuencia se completa la presente invención mediante el hallazgo de que los derivados de un terpenoide específico tienen una acción antiinflamatoria y una acción citoprotectora y el hallazgo de que una composición farmacéutica que contiene el compuesto como ingrediente activo es capaz de ejercer sus efectos preventivos y terapéuticos en intervalos de dosificación largos aceptables en la práctica médica.

Solución al problema

Específicamente, la presente invención proporciona

(1) un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (I):

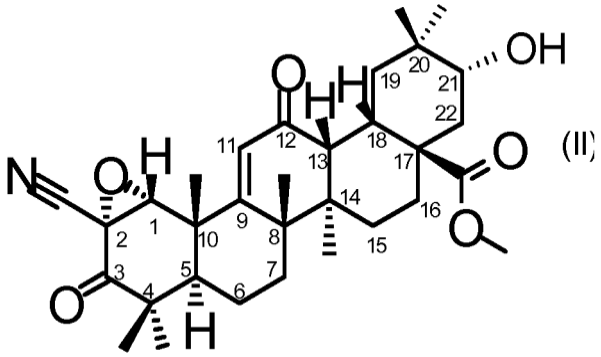
[Fórmula 1]



(I)

(2) un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (II):

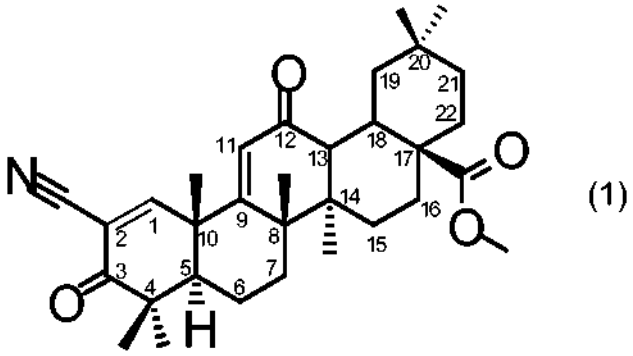
[Fórmula 2]



(II)

(3) un procedimiento para la producción de un compuesto de acuerdo con (1) que comprende la utilización de un compuesto representado por la siguiente fórmula (1):

[Fórmula 3]



(1)

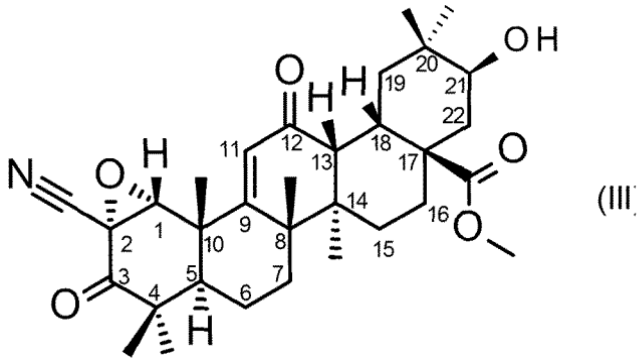
como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de una cepa para la biotransformación del género *Chaetomium* capaz de la transformación del compuesto en el compuesto de acuerdo con (1), y la recolección del compuesto de acuerdo con (1) a partir del cultivo,

(4) el procedimiento para la producción de un compuesto de acuerdo con (3), en el que la cepa para la biotransformación es SANK 10312 de *Chaetomium globosum* (N.º de depósito NITE BP-1486) que pertenece al género *Chaetomium*,

(5) el procedimiento para la producción de un compuesto de acuerdo con (3), en el que la cepa para la biotransformación es SANK 11867 de *Chaetomium sp.* (N.º de depósito NITE BP-01916) que pertenece al género *Chaetomium*,

(6) un procedimiento para la producción de un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (III):

[Fórmula 4]

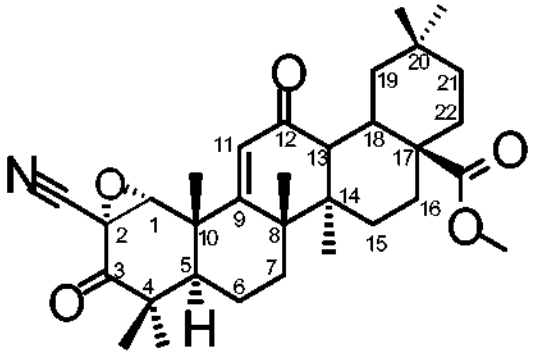


(III)

que comprende la utilización de un compuesto representado por la fórmula (1) como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de SANK 11867 de *Chaetomium sp.* (N.º de depósito NITE BP-01916) que pertenece al género *Chaetomium* capaz de la transformación del compuesto en el derivado terpenoide representado por la fórmula (III), y la recolección del derivado terpenoide representado por la fórmula (III) a partir del cultivo,

(7) un procedimiento para la producción de un compuesto de acuerdo con (2) o un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) que comprende la producción de un compuesto representado por la siguiente fórmula (2):

[Fórmula 5]



(2)

a partir de un compuesto de fórmula (1) mediante una reacción de epoxidación utilizando un peróxido orgánico, posteriormente utilizando el compuesto representado por la fórmula (2) como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de una cepa para la biotransformación capaz de transformar el compuesto en el compuesto de acuerdo con (2) o el derivado terpenoide representado por la fórmula (III), y recolectando el compuesto de acuerdo con (2) o el derivado terpenoide representado por la fórmula (III) del cultivo,

(8) el procedimiento de acuerdo con (7), en el que la cepa para la biotransformación es *Bacillus sp.* SANK 70214 (N.º de depósito NITE BP-01914) que pertenece al género *Bacillus*,

(9) el procedimiento de acuerdo con (7), en el que la cepa para la biotransformación es *Bacillus megaterium* SANK 70314 (N.º de depósito NITE BP-01915) que pertenece al género *Bacillus*,

(10) el procedimiento de acuerdo con (7), en el que la cepa para la biotransformación es un transformante obtenido por transformación de un huésped con un gen que codifica la siguiente proteína (a), (b), (c) o (d):

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (Figura 11),

(b) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (Figura 12),

(c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína (a) o (b) mediante eliminación, sustitución, inserción o adición de un aminoácido,

(d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína (a) o (b), y
(e) una proteína codificada por un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína (a) o (b),

(11) el procedimiento de acuerdo con (10), en el que el huésped es *Escherichia coli* o una bacteria,
(12) el procedimiento de acuerdo con (11), en el que la bacteria es el *Bacillus subtilis*,
(13) una secuencia de nucleótidos que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos (f) a (j) y que codifican una proteína que tiene una actividad hidroxilasa contra un compuesto de sustrato representado por la fórmula (2):

(f) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 3 (Figura 9),
(g) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 4 (Figura 10),
(h) la secuencia de nucleótidos de un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas al ADN que comprende una secuencia complementaria de cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f),
(i) una secuencia de nucleótidos que tienen un 90 % o más de identidad con cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f), y
(j) una secuencia de nucleótidos que no se hibrida en condiciones rigurosas con el ADN que comprende una secuencia complementaria de cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f) debido a la degeneración del código genético, pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de (f) a (h),

(14) una proteína que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos (k) a (n) y que tiene una actividad hidroxilasa contra un compuesto de sustrato representado por la fórmula (2):

(k) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 5 (Figura 11),
(l) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6 (Figura 12),
(m) una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos definida en la secuencia de aminoácidos (k) mediante eliminación, sustitución, inserción o adición de un aminoácido, y
(n) una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % o más identidad con cualquier secuencia de aminoácidos definida en la secuencia de aminoácidos (k),

(15) un plásmido recombinante de replicación autónoma o replicación de manera integrada que lleva una secuencia de nucleótidos de acuerdo con (13),
(16) un transformante obtenido mediante la transformación de un huésped no humano con un plásmido recombinante de acuerdo con (15),
(17) un *Bacillus subtilis* SANK 70214T transformante obtenido mediante la transformación de un *Bacillus subtilis* con un plásmido recombinante de acuerdo con (15),
(18) un *Bacillus subtilis* SANK 70314T transformante obtenido mediante la transformación de un *Bacillus subtilis* con un plásmido recombinante de acuerdo con (15),
(19) un *Bacillus sp.* SANK 70214 (N.º de depósito NITE BP-01914) que pertenece al género *Bacillus*,
(20) un *Bacillus sp.* SANK 70314 (N.º de depósito NITE BP-01915) que pertenece al género *Bacillus*,
(21) un fármaco farmacéutico para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular (la enfermedad ocular es una enfermedad alérgica conjuntival, conjuntivitis vírica, pterigión, infección corneal, ojo seco, trastorno corneal (que es un trastorno corneal epitelial y/o trastorno corneal endotelial), uveítis, enfermedad de Behcet, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, oclusión de la vena retiniana, coriorretinopatía serosa central, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, enfermedad macular, retinitis pigmentaria, glaucoma y cataratas),
una enfermedad renal (la enfermedad renal es una nefritis aguda, nefritis crónica, fallo renal agudo, fallo renal crónico, síndrome nefrótico, nefropatía por IgA, nefropatía diabética, riñón gotoso, nefroesclerosis, hidronefrosis, nefritis tubulointersticial, disminución de la función renal después de una revascularización quirúrgica de arterias coronarias, o infección del tracto urinario),
una enfermedad respiratoria (la enfermedad respiratoria es bronquitis, neumonía, pleuritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión pulmonar aguda (ALI), panbronquiolitis difusa, enfisema pulmonar, o asma),
una enfermedad hepática (la enfermedad hepática es hígado graso alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, o disfunción hepática asociada con el trasplante de hígado),
una enfermedad cerebral (la enfermedad cerebral es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), infarto cerebral, o esclerosis múltiple),
o una enfermedad cardíaca (la enfermedad cardíaca es infarto de miocardio), que comprende un derivado terpenoide de acuerdo con (1) o (2) como ingrediente activo,
(22) una composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular, que comprende un derivado terpenoide de acuerdo con (1) o (2) o un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) como principio activo, en el que la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica de la misma durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del derivado terpenoide en condiciones fisiológicas y tiene un material básico que se puede administrar en el cuerpo vítreo y una forma que se puede administrar en el cuerpo vítreo, en la que la forma es de microesferas, o en la que el contenido del principio activo es del 5 % en peso al 80 % en peso, o

en la que el contenido de principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso, la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica de la misma durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del principio activo en condiciones fisiológicas, el material básico es ácido poliláctico o ácido láctico ácido glicólico, y la forma es una microesfera,

(23) una composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con (22) que comprende un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) como principio activo,

(24) una composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con (22) o (23) en la que el material básico es un polímero biodegradable,

(25) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con (22) o (23) en la que el material básico es ácido poliláctico o ácido poli(láctico-co-glicólico),

(26) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con uno cualquiera de (22) a (25) en la que la forma es de microesferas,

(27) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con uno cualquiera de (22) a (26), en la que el contenido del principio activo es del 5 % en peso al 80 % en peso,

(28) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con uno cualquiera de (22) a (26), en la que el contenido del principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso,

(29) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con (22) o (23), en la que el contenido de principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso, la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica de la misma durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del principio activo en condiciones fisiológicas, el material básico es ácido poliláctico o ácido láctico ácido glicólico, y la forma es una microesfera,

(30) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con uno cualquiera de (22) a (29) en la que la enfermedad de la parte posterior del ojo es la degeneración macular relacionada con la edad, y

(31) la composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con uno cualquiera de (22) a (29) en la que la enfermedad de la parte posterior del ojo es el edema macular diabético y/o la oclusión de la vena retiniana.

Los derivados terpenoides (I), (II), y (III) de la presente invención (de aquí en adelante, se hará referencia también a estos compuestos colectivamente como el derivado terpenoide de la presente invención) pueden formar un solvato. También, el derivado terpenoide de la presente invención, cuando se deja al aire, puede absorber agua o formar un hidrato mediante absorción de la humedad. Dicho solvato o hidrato también se incluyen en la presente invención.

Efectos ventajosos de la invención

El derivado terpenoide de la presente invención es excelente en su acción antiinflamatoria y acción citoprotectora y es útil como fármaco terapéutico para una enfermedad ocular, una enfermedad renal, una enfermedad respiratoria, una enfermedad hepática, y la diabetes mellitus y sus complicaciones, particularmente en una enfermedad ocular.

La composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención que comprende un derivado terpenoide de la presente invención como principio activo puede mantener una acción farmacológica del mismo durante 1 semana o más mediante una dosis. La composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención es capaz de ejercer sus efectos a intervalos de dosificación largos en la práctica médica con el objetivo de prevenir y tratar una enfermedad de la parte posterior del ojo y por lo tanto es útil como composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular.

El procedimiento de producción de la presente invención que utiliza una cepa para la biotransformación de la presente invención puede sintetizar un derivado terpenoide de la presente invención a partir de un sustrato con una alta tasa de biotransformación.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra el espectro ^{1}H-NMR del derivado terpenoide (I).

[Figura 2] La Figura 2 muestra el espectro ^{1}H-^{13}C HSQC del derivado terpenoide (I).

[Figura 3] La Figura 3 muestra el espectro ^{1}H-^{1}H NOESY del derivado terpenoide (I).

[Figura 4] La Figura 4 muestra el espectro ^{1}H-NMR del derivado terpenoide (II).

[Figura 5] La Figura 5 muestra el espectro ^{1}H-^{13}C HSQC del derivado terpenoide (II).

[Figura 6] La Figura 6 muestra el espectro ^{1}H-^{1}H NOESY del derivado terpenoide (II).

[Figura 7] La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S del SANK 70214 (SEQ ID NO: 1).

[Figura 8] La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S del SANK 70314 (SEQ ID NO: 2).

[Figura 9] La Figura 9 muestra la secuencia de ADN de una proteína del SANK 70214 (SEQ ID NO: 3) que tiene actividad de hidroxilación.

[Figura 10] La Figura 10 muestra la secuencia de ADN de una proteína del SANK 70314 (SEQ ID NO: 4) que tiene actividad de hidroxilación.

[Figura 11] La Figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína del SANK 70214 (SEQ ID NO: 5) que tiene actividad de hidroxilación.
[Figura 12] La Figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína del SANK 70314 (SEQ ID NO: 6) que tiene actividad de hidroxilación.
[Figura 13] La Figura 13 muestra el árbol filogenético de SANK 70214 y SANK 70314.

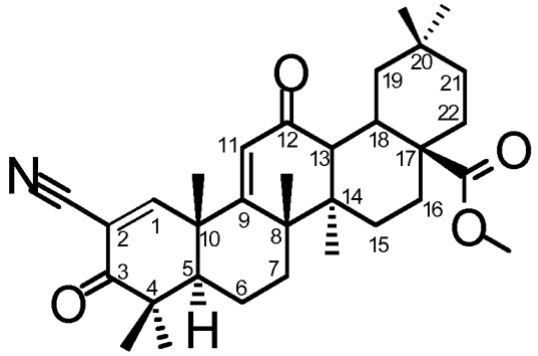
Descripción de las realizaciones

El derivado terpenoide de la presente invención se puede aislar y purificar de acuerdo con un procedimiento de rutina a partir de los cultivos de un microbio que tenga la capacidad para transformar un compuesto de sustrato específico en el derivado terpenoide de la presente invención [a la que se hace referencia en la presente invención como una cepa para la biotransformación].

1. Compuesto de sustrato

(1) Se puede utilizar un compuesto representado por la siguiente fórmula (1) como sustrato para la producción del derivado terpenoide representado por la fórmula (I) (al que se hace referencia de aquí en adelante como derivado terpenoide (I)) y el derivado terpenoide representado por la fórmula (III) (al que se hace referencia de aquí en adelante como derivado terpenoide (III)) de la presente invención.

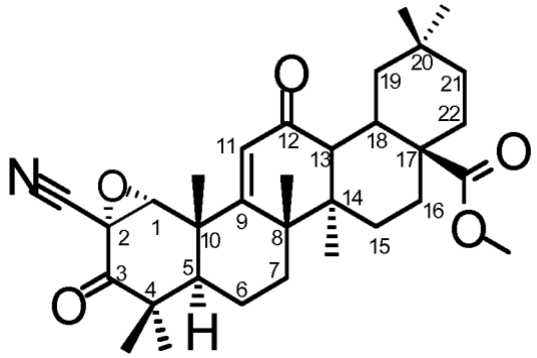
[Fórmula 6]



(1)

El compuesto se describe como el compuesto N.º 17 en el Esquema de Síntesis 2 en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 8 (1998) 2711-2714 y al que también se hace referencia como metil 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dieno-28-ato (CDDO-Me). De aquí en adelante, también se hace referencia al compuesto de sustrato como CDDO-Me.
El CDDO-Me se puede producir de acuerdo con un procedimiento de síntesis descrito en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7 (1997) 1623-1628 y Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 8 (1998) 2711-2714.
(2) Se puede utilizar un compuesto representado por la siguiente fórmula (2) como sustrato para la producción del derivado terpenoide representado por la fórmula (II) (al que se hace referencia de aquí en adelante como derivado terpenoide (II)) y el derivado terpenoide representado por la fórmula (III) de la presente invención.

[Fórmula 7]



(2)

El compuesto representado por la fórmula (2) se puede producir a partir de CDDO-Me mediante una reacción de epoxidación utilizando un peróxido orgánico. Ejemplos del peróxido orgánico pueden incluir, pero no se limita particularmente a, ácido perfórmico, ácido peracético, ácido perbenzoico, y ácido 3-cloroperbenzoico. Se prefiere el ácido 3-cloroperbenzoico .

2. Cepa de biotransformación utilizada para la producción del derivado terpenoide de la presente invención a partir del compuesto de sustrato

(1) <SANK 10312>

La cepa de biotransformación utilizada para la producción del derivado terpenoide (I) o el derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir del compuesto de sustrato (1) no está particularmente limitada y preferentemente es un hongo. Ejemplos del mismo incluyen un hongo que pertenezca al género *Chaetomium*.

El hongo que pertenece al género *Chaetomium* es preferentemente el *Chaetomium globosum*, más preferentemente el *Chaetomium globosum* SANK 10312 (N.º de depósito NITE BP-1486) (se hace referencia a esta cepa de aquí en adelante como "SANK 10312").

Se extrajo la SANK 10312 del agua dulce de la prefectura de Kioto en noviembre de 2000.

Con el fin de identificar cepas fúngicas SANK 10312, se utilizaron los siguientes 4 tipos de medio, y sus composiciones eran las siguientes:

<Medio PDA (medio de patata, dextrosa, agar)>

Medio de patata , dextrosa, agar Nissui (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.)	39 g
Agua destilada	1000 ml

<Medio OA (medio de harina de avena, agar)>

Extracto de harina de avena*	1000 ml
Agar	20 g

* A 30 g de harina de avena, se añadió agua destilada, y la mezcla se coció un máximo de 2 horas y se filtró a través de un paño, seguido por un relleno hasta los 1000 ml para preparar el extracto de harina de avena.

<Medio MEA (medio de extracto de malta, agar)>

Extracto de malta Bacto (fabricado por Becton, Dickinson and Company)	30 g
Bacto Soytone (fabricado por Becton, Dickinson and Company)	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

<Medio CMA (medio de harina de maíz, agar)>

Harina de maíz, agar "Nissui" (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.)	17 g
Agua destilada	1000 ml

En la descripción posterior, el color se indica de acuerdo con Kornerup, A. & Wanscher, J. H. 1978. Methuen handbook of colour (3ª edición). Erye Methuen, Londres.

Las propiedades micológicas del SANK 10312 son las que se dan posteriormente.

Se inoculó el SANK 10312 en los 4 tipos de medio (medio PDA, medio OA, medio CMA, y medio MEA), y se observaron sus propiedades micológicas.

La temperatura de crecimiento de SANK 10312 en el medio PDA era de 9 a 33 ºC, y esta cepa crecía bien, particularmente, de 18 a 31 ºC.

Las propiedades micológicas del SANK 10312 son las siguientes:
Las colonias en el medio OA tienen 80 mm o más de diámetro en un cultivo a 28 ºC durante 10 días. Las colonias eran finas y compuestas por hifas algodonosas cortas y blancas, y son amarillo grisáceas con un marrón grisáceo o marrón amarillento concéntricamente en un sitio ligeramente distante del centro. La parte central de la colonia forma densamente pequeños ascomas granulares en la superficie y es verde oscuro. El lado inverso es de amarillo pálido a naranja marronáceo con un color marrón oliva concéntricamente en un sitio ligeramente distante del centro.

Las colonias en el medio MEA tienen 80 mm o más de diámetro en un cultivo a 28 ºC durante 10 días. Las colonias son finas y están compuestas de hifas algodonosas cortas y blancas, y son naranja marronáceo. No se forman ni conidios ni ascomas. El lado inverso es similar a este.

Las colonias en el medio CMA tienen 60 mm de diámetro en un cultivo a 28 ºC durante 10 días. Las colonias son muy finas y simplemente tiene hifas dispersas sobre la superficie del agar. El color de la superficie de la colonia es casi incoloro y transparente, y el lado inverso es similar a este.

La temperatura de crecimiento de SANK 10312 en el medio PDA es de 9 a 33 ºC, y esta cepa crece bien, particularmente, de 18 a 31 ºC.

La estructura microscópica de SANK 10312 en el medio OA el día 10 a 28 ºC es la siguiente: Los ascomas son de marrón oscuro a negro, tienen forma de subesférica a ovalada de 175 a 240 µm de ancho y 275 a 400 µm de alto, y tienen un peridio compuesto por una *textura intricata* y un ostiolo en el ápex. Los pelos laterales son rectos o ligeramente ondulados, oliva pálido y de 3,5 µm o menos de diámetro, y están integrados con pelos terminales en la región superior de los ascomas. Una gran cantidad de los pelos terminales son densos y ondulados o enrollados de manera suelta hacia la punta y tienen una superficie rugosa como un todo, tienen septos, y una punta redondeada. Los pelos terminales tienen 3 a 4 µm de anchura en la base y son color oliva y se vuelven más delgados y ligeros hacia la punta. Las ascas tienen forma de basto y son octoesporuladas. Las ascosporas tienen forma de limón y son marrón claro cuando son inmaduras y verde pálido a oliva marrón oscuro y 6,0 a 9,0 x 8,0 a 11,0 µm cuando son maduras. No se observan conidios.

Las características mencionadas anteriormente son bien consistentes con la descripción acerca del *Chaetomium globosum* Kunze en Compendium of Soil Fungi (K.H. Domsch, W. Gams y T.-H. Anderson (2007)). Por lo tanto, esta cepa fúngica se identificó como *Chaetomium globosum* y se denominó como *Chaetomium globosum* SANK 10312.

La SANK 10312 se depositó internacionalmente con el N.º de depósito NITE BP-1486 en el Depositario de Microorganismos Patentados NITE (NPMD), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (dirección: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) el 18 de diciembre de 2012.

Como es bien conocido, los hongos son susceptibles a mutaciones en el mundo natural o mediante una operación artificial (por ejemplo, radiación ultravioleta, radiación, o tratamiento con agentes químicos). Presumiblemente, la SANK 10312 de la presente invención también es susceptible a dichas mutaciones. En la presente invención, la SANK 10312 engloba todas sus variantes.

Estas variantes también engloban las que se obtienen por un procedimiento genético, por ejemplo, recombinación, transducción o transformación.

Específicamente, la SANK 10312 como cepa de biotransformación que se utiliza para la producción del derivado terpenoide de la presente invención, sus variantes, y cepas fúngicas que no se distingan claramente de esta se incluyen todas en la SANK 10312.

(2) <SANK 11867>

La cepa de biotransformación utilizada para la producción del derivado terpenoide (I) o el derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir del compuesto de sustrato (1) no está particularmente limitada y preferentemente es un hongo. Ejemplos del mismo pueden incluir un hongo que pertenezca al género *Chaetomium*.

El hongo que pertenece al género *Chaetomium* es preferentemente un *Chaetomium sp.*, más preferentemente el *Chaetomium sp.* SANK 11867 (N.º de depósito NITE BP-01916) (se hace referencia a esta cepa como "SANK 11867").

La SANK 11867 que se extrajo del suelo en Japón es una cepa de materia prima de la compañía de los inventores.

Con el fin de identificar la cepa fúngica SANK 11867, se utilizaron los 4 tipos de medio (medio PDA, medio OA, medio MEA, y medio CMA) que se utilizaron para la identificación de la cepa fúngica SANK 10312.

En la descripción posterior, el color se indica de acuerdo con "Methuen handbook of colour".

Las propiedades micológicas del SANK 11867 son las que se dan posteriormente.

Se inoculó el SANK 11867 en los 4 tipos de medio (medio PDA, medio OA, medio CMA, y medio MEA), y se observaron sus propiedades micológicas.

La temperatura de crecimiento de SANK 11867 en el medio PDA era de 5 a 33 ºC, y esta cepa crecía bien, particularmente, de 13 a 31 ºC.

Las propiedades micológicas del SANK 11867 son las siguientes:

Las colonias en el medio OA el día 10 a 20 ºC tienen 80 mm o más de diámetro. Las colonias son finas y están compuestas de hifas algodonosas cortas y blancas, y son amarillo grisáceo. La parte central de la colonia forma densamente pequeños ascomas granulares en la superficie y es verde oscuro. El lado inverso tiene el mismo color que el de la superficie.

Las colonias en el medio MEA el día 10 a 20 ºC tienen 80 mm o más de diámetro. Las colonias son finas y están compuestas de hifas algodonosas cortas y blancas, y son naranja marronáceo. No se forman ni conidios ni ascomas. El lado inverso es similar a este.

Las colonias en el medio CMA el día 10 a 20 ºC tienen 52 a 55 mm de diámetro. Las colonias son muy finas y simplemente tiene hifas dispersas sobre la superficie del agar. El color de la superficie de la colonia es casi incoloro y transparente, y el lado inverso es similar a este.

La estructura microscópica de SANK 11867 en el medio OA el día 10 a 20 ºC es la siguiente: Los ascomas son marrón de oscuro a negro, tienen forma de subesférica a ovalada de 145 a 350 µm de ancho y 225 a 625 µm de alto, y tienen un peridio compuesto por una *textura intricata* y un ostiolo en el ápex. Los pelos laterales son rectos o ligeramente ondulados, oliva pálido y están integrados con pelos terminales en la región superior de los ascomas. Una gran cantidad de los pelos terminales son densos y ondulados o enrollados de manera suelta hacia la punta y tienen una superficie rugosa como un todo, tienen septos, y una punta redondeada. Los pelos terminales tienen 2,5 a 6,5 µm de anchura en la base y son color oliva y se vuelven más delgados y ligeros hacia la punta. Las ascas tienen forma de basto y son octoesporuladas. Las ascosporas tienen forma de limón y son marrón claro cuando son inmaduras y verde pálido a oliva oscuro y tienen de 8,5 a 10,5 x 7,0 a 8,5 µm cuando son maduras. No se observan conidios.

Las características mencionadas anteriormente son bien consistentes con la descripción acerca del género *Chaetomium* en Compendium of Soil Fungi (K.H. Domsch, W. Gams y T.-H. Anderson (2007)). Por lo tanto, esta cepa fúngica se identificó como una *Chaetomium sp.* y se denominó como *Chaetomium sp.* SANK 11867.

La SANK 11867 se depositó internacionalmente con el N.º de depósito NITE BP-01916 en el Depositario de Microorganismos Patentados NITE (NPMD), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (dirección: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) el jueves, 7 de agosto de 2014.

Como es bien conocido, los microbios son susceptibles a mutaciones en el mundo natural o mediante una operación artificial (por ejemplo, radiación ultravioleta, radiación, o tratamiento con agentes químicos). Presumiblemente, la SANK 11867 de la presente invención también es susceptible a dichas mutaciones. En la presente invención, la SANK 11867 engloba todas sus variantes.

Estas variantes también engloban las que se obtienen por un procedimiento genético, por ejemplo, recombinación, transducción o transformación.

Específicamente, la SANK 11867 como cepa de biotransformación que se utiliza para la producción del derivado terpenoide de la presente invención, sus variantes, y cepas fúngicas que no se distingan claramente de esta se incluyen todas en la SANK 11867.

(3) <SANK 70214>

La cepa de biotransformación utilizada para la producción del derivado terpenoide (II) o el derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir del compuesto de sustrato (2) no está particularmente limitada y preferentemente es una bacteria que tiene actividad hidroxilasa. Ejemplos del mismo pueden incluir una bacteria que pertenezca al género *Bacillus*.

La bacteria que pertenece al género *Bacillus* es preferentemente un *Bacillus sp.*, más preferentemente el *Bacillus sp.* SANK 70214 (N.º de depósito NITE BP-01914) (al que se hace referencia de aquí en adelante como SANK 70214).

La secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S de SANK 70214 se muestra en la SEQ ID NO: 1 (Figura 7).

Se extrajo la SANK 70214 de una muestra de agua dulce recolectada en Hokkaido en septiembre de 1997.

Con el fin de identificar la cepa bacteriana SANK 70214, la composición de un medio que se utilizó en el cultivo bacteriano era la siguiente:

<Medio TSB (Caldo Pearlcore Trypto-Soy), agar>

Caldo Pearlcore Trypto-Soy (Eiken Chemical Co., Ltd.)	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

(El pH se ajustó a 8,0 antes de meterlo en el autoclave).

La SANK 70214 se describirá posteriormente.

[1] Propiedades morfológicas

La bacteria observada tras el cultivo a 28 ºC durante 24 horas en el medio TSB (pH 8,0) es una bacteria con forma de bastoncillo que tienen células de 1 µm de anchura y 4 a 5 µm de longitud y no presenta movimiento.

[2] Propiedades del cultivo

El color de las colonias después del cultivo a 28 ºC durante 24 horas en el medio TSB (pH 8,0) es un color blanco cremoso semitransparente y brilla de manera apagada. Las colonias tienen una forma redondeada que sobresale en el centro con una forma tipo lente convexa y tiene una superficie suave y márgenes completos.

[3] Propiedades biológicas

(1) Catalasa: +
(2) Temperatura de cultivo: de 14 a 39 ºC
(3) Tinción de Gram positiva
(4) Generación de ácido (se utilizó API 50 CH)
Eritritol: -
D-Arabinosa: -
L-Arabinosa: -
D-Ribosa: +
L-Xilosa: +
Metil-β-D-xilopiranósido: -
D-Galactosa: -
D-Manosa: +
L-Ramnosa: +
Dulcitol: -
Inositol: -
D-sorbitol: -
Metil-α-D-manopiranósido: -
Metil-α-D-manopiranósido: -
N-Acetil glucosamina: -
Amigdalina: +
Salicina: +
D-Lactosa: -
D-Melibiosa: -
D-Melecitosa: -
D-Rafinosa: -
Almidón: -
Glucógeno: -
Xilitol: -
Gentiobiosa: +
D-Turanosa: -
D-Lixosa: -
D-Tagatosa: -
D-Arabitol: -
Ácido Glucónico: -
Ácido 2-ceto-glucónico: -
(5) pH del cultivo
pH 6: +
pH 7: +
pH 8: +
pH 9: +
pH 10: +
(6) Crecimiento en medio que contiene NaCl
0 %: +
2 %: +
4 %: +
6 %: +
8 %: +
10 %: -

[4] Propiedades genéticas

(1) Contenido en G + C: 40,8 %
(2) Análisis de ADNr 16S: Como resultado de la comparación la secuencia de nucleótidos determinada (1478 pb: SEQ ID NO: 1 del Listado de secuencias) con los datos de distintos tipos de cepas de bacterias registradas en el Proyecto de Base de Datos Ribosómicos (RDP) (Lanzamiento 11, (actualizado el 7 de marzo de 2014)), la homología era la mayor para *B. gibsonii* DSM 8722 con un valor de homología del 99,5 %. Se llevó a cabo adicionalmente el análisis filogenético por el procedimiento de unión de vecinos de Saitou y Nei (Saitou N., y M. Nei, Molecular Biology and Evolution, 4, p. 406-425 (1987)) para obtener los resultados que se muestran en la Figura 13.

La SANK 70214 que tiene estas propiedades micológicas se identificó en referencia al Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology, Vol. 3 (publicado en 2009). A partir de los resultados del análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S, SANK 70214 presentaba una estrecha relación genealógica con el *B. gibsonii* DSM 8722. Las propiedades morfológicas, propiedades de cultivo, propiedades biológicas, y propiedades genéticas de SANK 70214 son bien consistentes con las del género *Bacillus*. Por lo tanto, la SANK 70214 se identificó como una cepa que perteneciente al género *Bacillus*. La SANK 70214 se diferencia de *B. gibsonii*, que presenta la relación genealógica más estrecha con esta en la utilización de las fuentes de carbono de L-arabinosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-melecitosa, D-rafinosa, y D-turanosa. También, la SANK 70214 se distinguía claramente de las especies bacterianas conocidas del género *Bacillus* en términos de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S. Por lo tanto, la SANK 70214 se denominó como *Bacillus sp.* SANK 70214.

La SANK 70214 se depositó internacionalmente con el N.º de depósito NITE BP-01914 en el Depositario de Microorganismos Patentados NITE (NPMD), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (dirección: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) el jueves, 7 de agosto de 2014.

Como es bien conocido, los microbios son susceptibles a mutaciones en el mundo natural o mediante una operación artificial (por ejemplo, radiación ultravioleta, radiación, o tratamiento con agentes químicos). Presumiblemente, la SANK 70214 de la presente invención también es susceptible a dichas mutaciones. En la presente invención, la SANK 70214 engloba todas sus variantes.

Estas variantes también engloban las que se obtienen por un procedimiento genético, por ejemplo, recombinación, transducción o transformación.

Específicamente, la SANK 70214 como cepa de biotransformación que se utiliza para la producción del derivado terpenoide de la presente invención, sus variantes, y cepas bacterianas que no se distingan claramente de esta se incluyen todas en la SANK 70214.

(4) <SANK 70314>

Otro ejemplo de la bacteria que pertenece al género *Bacillus* como la cepa de transformación que se utiliza para la producción del derivado terpenoide (II) o el derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir de un compuesto de sustrato (2) puede incluir preferentemente *Bacillus megaterium* SANK 70314 (N.º de depósito NITE BP-01915) (al que se hace referencia de aquí en adelante como SANK 70314).

La secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S de SANK 70314 se muestra en la SEQ ID NO: 2 (Figura 8).

Se extrajo la SANK 70314 de una muestra de suelo recolectada en la prefectura de Okinawa en septiembre de 2013.

Con el fin de identificar la cepa bacteriana SANK 70314, la composición de un medio que se utilizó en el cultivo bacteriano era la siguiente:

<Medio NA (Pearlcore Nutrient Agar)>

Pearlcore Nutrient Agar (Eiken Chemical Co., Ltd.)	35 g
Agua destilada	1000 ml

La SANK 70314 se describirá posteriormente.

[1] Propiedades morfológicas

La bacteria observada tras el cultivo a 28 ºC durante 24 horas en el agar nutritivo (fabricado por Eiken Chemical CO., Ltd.) es una bacteria con forma de bastoncillo que tienen células de 1 µm de anchura y 4 a 5 µm de longitud y no presenta movimiento.

[2] Propiedades del cultivo

El color de las colonias después del cultivo a 28 ºC durante 24 horas en el agar nutritivo es un color blanco cremoso opaco y brilla de manera apagada. Las colonias tienen una forma redondeada que sobresale en el centro con una forma tipo lente convexa y tiene una superficie suave y márgenes completos.

[3] Propiedades biológicas

(1) Catalasa: +
(2) Temperatura de cultivo: de 13 a 46 ºC
(3) Tinción de Gram positiva
(4) Utilización de una fuente de carbono(se utilizó API 50 CH)
Glicerol: +
Eritritol: -

D-Arabinosa: -
D-Ribosa: +
L-Xilosa: -
D-Adonitol: -
Metil-β-D-xilopiranósido: -
D-Galactosa: +
D-Fructosa: +
L-Sorbosa: -
L-Ramnosa: -
Dulcitol: -
Inositol: -
D-sorbitol: -
Metil-α-D-manopiranósido: -
N-Acetil glucosamina: +
Amigdalina: +
Arbutina: +
D-Celobiosa: +
D-Maltosa: +
D-Lactosa: -
D-Melibiosa: +
D-Sacarosa: +
D-Trehalosa: +
Inulina: -
D-Melecitosa: +
D-Rafinosa: +
Xilitol: -
Gentiobiosa: +
D-Turanosa: +
D-Lixosa: -
D-Tagatosa: -
D-Fucosa: -
L-Fucosa: -
D-Arabitol: -
L-Arabitol: -
Ácido Glucónico: -
Ácido 2-ceto-glucónico: -
Ácido 5-ceto-glucónico: -
(5) pH del cultivo
pH 6: +
pH 7: +
pH 8: +
pH 9: -

[4] Propiedades genéticas

(1) Contenido en G + C: 38,0 %
(2) Análisis de ADNr 16S: Como resultado de la comparación la secuencia de nucleótidos determinada (1383 pb: SEQ ID NO: 2 del Listado de secuencias) con los datos de distintos tipos de cepas de bacterias registradas en el Proyecto de Base de Datos Ribosómicos (RDP) (Lanzamiento 11, (actualizado el 7 de marzo de 2014)), la mayor homología era para *Bacillus* megaterium IAM 13418 con un valor de homología del 99,9 %. Se llevó a cabo adicionalmente el análisis filogenético por el procedimiento de unión de vecinos de Saitou y Nei (Saitou N., y M. Nei, Molecular Biology and Evolution, 4, p. 406-425 (1987)) para obtener los resultados que se muestran en la Figura 13.

La SANK 70314 que tiene estas propiedades micológicas se identificó en referencia al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 (publicado en 2009). A partir de los resultados del análisis de la secuencia de nucleótidos del ADNr 16S, SANK 70314 presentaba una estrecha relación genealógica con el *Bacillus megaterium* IAM 13418. Las propiedades morfológicas, propiedades de cultivo, propiedades biológicas, y propiedades genéticas de SANK 70314 son bien consistentes con las del *Bacillus megaterium*. Por lo tanto, la SANK 70314 se identificó como *Bacillus megaterium* y se denominó como *Bacillus megaterium* SANK 70314.

La SANK 70314 se depositó internacionalmente con el N.º de depósito NITE BP-01915 en el Depositario de Microorganismos Patentados NITE (NPMD), Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (dirección: 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, Japón) el jueves, 7 de agosto de 2014.

Como es bien conocido, los microbios son susceptibles a mutaciones en el mundo natural o mediante una operación artificial (por ejemplo, radiación ultravioleta, radiación, o tratamiento con agentes químicos). Presumiblemente, la

SANK 70314 de la presente invención también es susceptible a dichas mutaciones. En la presente invención, la SANK 70314 engloba todas sus variantes.

Estas variantes también engloban las que se obtienen por un procedimiento genético, por ejemplo, recombinación, transducción o transformación.

Específicamente, la SANK 70314 como cepa de biotransformación que se utiliza para la producción del derivado terpenoide de la presente invención, sus variantes, y cepas bacterianas que no se distingan claramente de esta se incluyen todas en la SANK 70314.

(5) <Cepa transformada de SANK 70214 y cepa transformada de SANK 70314>

Con el fin de producir el derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir de un compuesto de sustrato (2), se determinó una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína implicada en la hidroxilación del compuesto de sustrato (2) a partir del microbio descrito anteriormente, y se puede utilizar un microbio que expresa la proteína de la presente invención. Específicamente, una proteína que hidroxila selectivamente el compuesto de sustrato (2) en el derivado terpenoide (III) se determinar a partir de cada una de SANK 70214 y SANK 70314, y se permite que un microbio que expresa la proteína actúe sobre el compuesto de sustrato (2) para producir el derivado terpenoide (III).

<Proteína de la presente invención>

La proteína de la presente invención se puede preparar obteniendo y utilizando el gen que codifica la proteína. De aquí en adelante, se describirá específicamente un procedimiento para la obtención del gen de la presente invención y un procedimiento para la preparación de la proteína de la presente invención.

<Procedimiento para la obtención del gen de la presente invención>

Se extrajo el ADN genómico mediante un procedimiento de rutina de cada una de SANK 70214 y SANK 70314, y se analizó todo el genoma utilizando un secuenciador genómico. Se puede identificar una proteína que tenga actividad de hidroxilación para obtener el gen de la presente invención.

La obtención de los genes relacionados con hidroxilasa de la presente invención tenía el problema de que se podían resolver fácilmente mediante una estrategia que era la que intentaban en general los expertos en la técnica. El género *Bacillus* al que pertenece el microbio que tiene la capacidad de transformar el compuesto de sustrato (2) en derivado terpenoide (III) se considera que mantiene una pluralidad de genes implicado en la hidroxilación en su genoma. Además, las funciones normales de las enzimas implicadas en la hidroxilación necesitan la ferredoxina y la reductasa que suministra electrones a estas enzimas. Por lo tanto, paree difícil obtener las hidroxilasas de interés por hibridación de Southern general o PCR degenerada utilizando solo los genes de la hidroxilasa. En consecuencia, estos genes se analizaron exhaustivamente mediante un análisis del genoma utilizando un secuenciador de próxima generación para encontrar secuencias de nucleótidos codificantes de genes de hidroxilasas implicadas en la presente invención.

La secuencia de nucleótidos obtenida de esta manera que codifica cada proteína de la presente invención que tiene actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2) se muestra en las siguientes (f), (g), (h), (i), o (j):

(f) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 3 (Figura 9) que codifica una proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación,
(g) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 4 (Figura 10) que codifica una proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación,
(h) el ADN, como la forma alterada del ADN representado por (f) o (g), que tiene la secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con cualquiera de los ADN representados por (f) o (g) y codifica una proteína que tiene actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2),
(i) el ADN que no se hibrida en condiciones rigurosas con ninguno de los ADN representados por (f) o (g) debido a la degeneración del código genético, pero que codifica una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que las de una proteína codificada por cualquier ADN representado por (f) o (g), y
(j) un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos del ADN representado por (f) mediante una eliminación, sustitución, y/o adición de una o varias bases y codifica una proteína que tiene actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2).
(k) Ejemplos de la proteína de la presente invención derivada de SANK 70214 que tiene una actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2) incluye las siguientes proteínas:

- una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (Figura 11),
- una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 5 mediante la eliminación, sustitución, inserción, o adición de uno o varios aminoácidos,
- una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 5, y
- una proteína codificada por un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de SEQ ID NO: 5.

(l) Ejemplos de la proteína de la presente invención derivada de SANK 70314 que tenga una actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2) incluye las siguientes proteínas:

- una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (Figura 12),
- una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 6 mediante la eliminación, sustitución, inserción, o adición de uno o varios aminoácidos,
- una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína de SEQ ID NO: 6, y
- una proteína codificada por un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de SEQ ID NO: 6.

3. Transformante de la presente invención

El transformante de la presente invención se obtiene transfectando un huésped con el gen que codifica la proteína (f), (g), (h), (i) o (j) mediante un procedimiento de modificación genética habitual. Específicamente, se prepara un vector de expresión que permita que el gen que codifica el transformante de la presente invención se exprese en células huésped, y se pueden transfectar las células huésped con este vector de expresión de manera que las células huésped se transforman para preparar el transformante.

El transformante utilizado para la producción del derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir del compuesto de sustrato (2) es un transformante que expresa la proteína que hidroxila el compuesto de sustrato (2) en el derivado terpenoide (III). El transformante no está particularmente limitado y es preferentemente un transformante que expresa la proteína (k) o (l) con *Escherichia coli* como huésped, más preferentemente un transformante que expresa la proteína (k) o (l) con *Bacillus subtilis* como huésped, más preferentemente *Bacillus subtilis* SANK 70214T (a la que se hace referencia de aquí en adelante como SANK 70212T) o *Bacillus subtilis* SANK 70314T (a la que se hace referencia de aquí en adelante como SANK 70314T).

El huésped para el transformante no se limita particularmente, y se puede utilizar un microbio, un alga, una planta, o un animal. El huésped es preferentemente un microbio, por la eficacia de transformación.

El microbio utilizado como huésped se preferentemente *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, más preferentemente *Bacillus subtilis*.

El vector en el que se basa el vector de expresión puede se cualquier vector que pueda transferir el ADN que codifica la proteína que tiene actividad de hidroxilación contra el compuesto de sustrato (2), sea solo o junto con un ADN que codifique una proteína que tenga funciones de ferredoxina, al huésped de manera que el gen se puede expresar en las células huésped. Por ejemplo, se puede utilizar un vector que tenga una región de control de la expresión tal como un promotor o un terminador apropiado para el tipo de huésped que se va a transfectar y tiene un origen de replicación, un marcador genético y similares. De manera alternativa, el vector puede ser un vector, tal como un plásmido, que crece de manera autónoma o se replica fuera del cromosoma, o puede ser un vector que esté integrado en el cromosoma.

El procedimiento de transformación no se limita particularmente a condición de que el procedimiento sea capaz de transfectar el huésped con el gen de interés. Por ejemplo, se puede utilizar un procedimiento que utiliza iones de calcio, un procedimiento de transformación celular competente general (Journal of Bacteriology, 93, 1925 (1967)), un procedimiento de transformación de protoplastos (Molecular and General Genetics, 168, 111 (1979)), electroporación (FEMS Microbiology Letters, 55, 135 (1990)), o un procedimiento de transformación LP (T. Akamatsu y J. Sekiguchi, Archives of Microbiology, 1987, 146, p. 353-357; y T. Akamatsu y H. Taguchi, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65, 4, p. 823-829).

El transformante que tiene el fragmento genético de interés se puede seleccionar mediante el uso de un marcador genético o similar. Por ejemplo, como resultado de la transferencia de un gen de resistencia a un fármaco derivado del vector junto con el fragmento de ADN de interés en las células huésped durante la transformación, se puede llevar a cabo la selección utilizando la resistencia al fármaco adquirida por el transformante como índice. De manera alternativa, la transferencia del fragmento de ADN de interés también puede confirmarse por PCR o similares con el genoma como matriz.

4. Procedimiento de cultivo y el procedimiento de purificación (producción y purificación de los derivados terpenoides de la presente invención)

La cepa mencionada anteriormente para la biotransformación puede cultivarse utilizando un medio que se utiliza en general en la producción de metabolitos secundarios de microbios. Dicho medio contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, una cantidad muy pequeña de factores de crecimiento, trazas metálicas, y similares que se pueden utilizar por los microbios.

Ejemplos de la fuente de carbono incluyen la glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, manitol, glicerina, dextrina, avena, centeno, almidón, patata, harina de maíz, aceite de semilla de algodón, melazas, ácido cítrico y ácido tartárico. Estas fuentes de carbono se pueden utilizar solas o en combinación.

La cantidad de la fuente de carbono añadida está habitualmente en el intervalo de 1 a 10 % en peso de la cantidad del medio.

Se utiliza habitualmente una sustancia que contiene una proteína y un hidrolizado de la misma, o sales inorgánicas como fuente de nitrógeno.

Ejemplos de dicha fuente de nitrógeno incluyen la harina de soja, salvado, harina de maní, harina de semilla de algodón, hidrolizados de caseína, Farmamina, harina de pescado, licor de macerado de maíz, peptona, extractos de carne, levadura, extractos de levadura, extractos de malta, nitrato sódico, nitrato amónico, y sulfato amónico. Estas fuentes de nitrógeno se pueden utilizar solas o en combinación.

La cantidad de la fuente de nitrógeno añadida está habitualmente en el intervalo de 0,2 a 10 % en peso de la cantidad del medio.

También se pueden añadir sales capaces de proporcionar iones de sodio, potasio, magnesio, amonio, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato o similares al medio.

Se pueden añadir adicionalmente vitaminas tales como la vitamina B1 y biotina, una sustancia promotora de la proliferación del cuerpo de los hongos, tal como tiamina, y una sal metálica tal como manganeso o molibdeno que puedan utilizar los microbios, al medio.

En el caso de un medio líquido, se puede añadir un agente antiespumante tal como aceite de silicona, o glicol éter de polialquileno, un aceite vegetal, un aceite animal, o un tensioactivo al medio con el fin de evitar la espuma del medio.

El pH del medio líquido para su uso en el cultivo de la cepa de biotransformación depende de la estabilidad del pH de la cepa fúngica y del derivado terpenoide de la presente invención, etc.

La temperatura del cultivo de la cepa de biotransformación depende de la estabilidad térmica de la cepa fúngica y el derivado terpenoide de la presente invención, etc. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la cepa SANK 10312, la temperatura de cultivo es preferentemente de 9 a 33 ºC, más preferentemente de 20 a 35 ºC. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 11867, la temperatura de cultivo es preferentemente de 5 a 33 ºC, más preferentemente de 13 a 31 ºC. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 70214, la temperatura de cultivo es preferentemente de 14 a 39 ºC, más preferentemente de 20 a 35 ºC. En el caso de SANK 70314, la temperatura de cultivo es preferentemente de 13 a 46 ºC, más preferentemente de 20 a 40 ºC. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 70214T, la temperatura de cultivo es preferentemente de 5 a 50 ºC, más preferentemente de 27 a 37 ºC. En el caso de SANK 70314T, la temperatura de cultivo es preferentemente de 5 a 50 ºC, más preferentemente de 27 a 37 ºC.

Ejemplos del procedimiento de cultivo de la cepa de biotransformación puede incluir, pero no se limita particularmente a, un cultivo que utiliza un medio sólido, un procedimiento para remover el cultivo, un procedimiento de agitado del cultivo, un procedimiento de aireación del cultivo, y un procedimiento de agitado con aireación del cultivo. El procedimiento de cultivo es preferentemente un procedimiento de agitado del cultivo, un procedimiento de agitado del cultivo, un procedimiento de aireación del cultivo, y un procedimiento de agitado con aireación del cultivo, más preferentemente un procedimiento de agitado del cultivo. El procedimiento de aireación con agitado del cultivo es más preferido para el cultivo a escala industrial.

El cultivo de la cepa de biotransformación habitualmente comienza a partir del cultivo de siembra utilizando una pequeña cantidad de un medio inoculado con un cultivo inclinado de la cepa de biotransformación y se consigue mediante el cultivo de siembra opcional que se lleva a cabo de nuevo a una escala mayor seguido por el cultivo principal a una escala mayor en el estadio final.

En el caso del cultivo de la cepa para la biotransformación a una escala pequeña, se lleva a cabo un cultivo de siembra utilizando un matraz de Erlenmeyer o similar, y si fuera necesario, se lleva a cabo la siembra del cultivo de nuevo a una escala mayor, seguido por el cultivo principal utilizando un matraz de Erlenmeyer o similar.

En el caso del cultivo de la cepa de biotransformación a una escala mayor, se utiliza preferentemente un fermentador de jarra o un depósito equipado con un aparato de agitado y un aparato de aireación. El uso de dicho aparato permite que el medio se prepare y se esterilice en el fermentador de jarra o depósito. Este procedimiento es adecuado para la producción a gran escala.

El tiempo de cultivo de la cepa de biotransformación después de la adición del sustrato depende de la cepa fúngica o bacteriana. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 10312, el tiempo de cultivo es preferentemente de 2 a 14 días, más preferentemente de 3 a 10 días. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 11867, el tiempo de cultivo es preferentemente de 2 a 14 días, más preferentemente de 3 a 10 días. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 70214, el tiempo de cultivo es preferentemente de 1 a 10 días, más preferentemente de 3 a 7 días. En el caso de SANK 70314, el tiempo de cultivo es preferentemente de 1 a 10 días, más preferentemente de 1 a 7 días. En el caso en el que la cepa de biotransformación sea la SANK 70214T, el tiempo de cultivo es preferentemente de 1 a 168 horas, más preferentemente de 2 a 24 horas. En el caso de SANK

70314T, el tiempo de cultivo es preferentemente de 1 a 168 horas, más preferentemente de 8 a 96 horas.

Después de completar el cultivo, se puede extraer el derivado terpenoide de la presente invención a partir del cultivo obtenido, el cuerpo del hongo contenido en este, y/o el sobrenadante del cultivo. Se puede utilizar un procedimiento de centrifugación o un procedimiento de filtración con tierra de diatomeas como filtro para la separación del cuerpo fúngico y otros materiales sólidos del sobrenadante del cultivo.

Para la extracción del derivado terpenoide de la presente invención, se pueden utilizar las propiedades fisicoquímicas del compuesto. El derivado terpenoide de la presente invención contenido en el filtrado del cultivo o el sobrenadante del cultivo se puede extraer con un disolvente inorgánico no miscible con agua tal como acetato de etilo, cloroformo, cloruro de etileno, cloruro de metileno, o butanol, o una mezcla disolvente de dos o más de estos disolventes. El derivado terpenoide de la presente invención contenido en el cuerpo fúngico se puede extraer del mismo utilizando acetona acuosa al 50 a 90 % o metanol acuoso y se extrae de la misma manera que en el caso en el que el derivado terpenoide está presente en el filtrado del cultivo o el sobrenadante del cultivo, después de la destilación del disolvente orgánico. El derivado terpenoide de la presente invención contenido en los cultivos completos se puede extraer mediante la adición del 20 al 80 %, preferentemente del 40 al 60 %, más preferentemente del 50 % de acetona o metanol al cultivo completo. Después de completar la extracción, los extractos se filtran con tierras de diatomeas como filtro, y el derivado terpenoide se puede extraer del material soluble obtenido de la misma manera que en el caso en el que está presente el derivado terpenoide en el filtrado del cultivo o el sobrenadante del cultivo.

La purificación para el aislamiento del derivado terpenoide de la presente invención a partir de los extractos se puede llevar a cabo mediante una técnica de purificación tal como la cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de partición, cromatografía de fase inversa, o cromatografía líquida de altas prestaciones (a la que se hace referencia de aquí en adelante como HPLC).

La cromatografía de adsorción se lleva a cabo: poniendo en contacto los extractos que contienen el derivado terpenoide de la presente invención con un adsorbente para retirar las impurezas mediante adsorción; o adsorbiendo el derivado terpenoide de la presente invención para retirar impurezas seguido por una elución. Ejemplos del adsorbente pueden incluir, el carbón activo, Amberlite XAD-2, Amberlite XAD-4, y Amberlite XAD-16 (fabricados por Rohm and Haas Company), y Diaion HP-20, Diaion HP-21, Diaion HP-20SS, Sepabeads SP-207, Sepabeads SP-850, y Sepabeads SP-700 (fabricados por Mitsubishi Chemical Corp.). Ejemplos del disolvente para su uso en la elución del derivado terpenoide adsorbido de la presente invención puede incluir disolventes orgánicos tales como metanol, acetona, butanol, y acetonitrilo, y soluciones mixtas de los mismos con agua.

La cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo mediante el uso del hecho de que el derivado terpenoide de la presente invención actúa como una sustancia neutra. Específicamente, los extractos que contienen el derivado terpenoide de la presente invención se ponen en contacto, por ejemplo, con un vehículo de intercambio iónico para adsorber el material innecesario en el vehículo mientras el derivado terpenoide de la presente invención pasa a través. Ejemplos del vehículo de intercambio iónico pueden incluir DEAE-Sephadex, DEAE-Sepharose, QAE-Sephadex, CM-Sephadex, y SP-Sephadex (fabricados por GE Healthcare Life Sciences), DEAE-Toyopearl, QAE-Toyopearl, CM-Toyopearl, y SP-Toyopearl (fabricados por Tosoh Corp.), Duolite A113LF, Duolite A116, Duolite A368S, Duolite A375LF, Duolite C20J, y Duolite C433LF (fabricados por Diamond Shamrock Chemical Company), Amberlite IRA-67, Amberlite IRA-98, Amberlite IRA400J, Amberlite IRA458RF, Amberlite IR120B, y Amberlite IRC76 (fabricados por Rohm y Haas Company), y Dowex 50WX4, Dowex HCR-S, Dowex 134, Dowex 22, Dowex 66, y Dowex SBR-P (fabricados por The Dow Chemical Company).

Ejemplos del vehículo para su uso en la cromatografía de distribución puede incluir gel de sílice, gel TSK Toyopearl HW-40F (fabricado por Tosoh Corp.), Sephadex LH-20 (fabricado por GE Healthcare Life Sciences), y celulosa (fabricada por Merck KGaA).

Ejemplos del vehículo para su uso en la cromatografía de fase inversa puede incluir Cosmosil 140C18 (fabricado por Nacalai Tesque, Inc.) y ODS-A (fabricado por YMC Co., Ltd.).

Ejemplos de la columna para su uso en la HPLC puede incluir columnas de fase inversa tal como Shodex Asahipak ODP50-4E (fabricado por Showa Denko K.K.), YMC pack ODS-A (fabricado por YMC Co., Ltd.), CAPCELL PAK UG120 (fabricado por Shiseido Co., Ltd.), y Unison C18 (fabricado por Imtakt Corp.).

El derivado de terpenoide de la presente invención se puede aislar utilizando estas técnicas de purificación solas o en una combinación apropiada. Si fuera necesario, se puede repetir la misma técnica de purificación. Se puede seleccionar un procedimiento adecuado para la purificación, tal como un procedimiento de cromatografía en columna, un procedimiento de cromatografía por lotes, un procedimiento de cromatografía de capa fina, con el fin de llevar a cabo cada técnica de purificación.

La estructura estérica del derivado terpenoide obtenido de la presente invención se deriva de la estructura estérica del compuesto de partida. Las estructuras estéricas de los sustituyentes introducidos recientemente en el compuesto de partida se determinaron utilizando espectroscopia de efecto Overhauser nuclear (NOESY).

Por ejemplo, la estructura estérica del derivado terpenoide (I) que tiene las propiedades fisicoquímicas descritas en

(2) anteriores se determinó a partir de la estructura estérica del compuesto de partida, las propiedades fisicoquímicas descritas en (2) y los resultados de la medición de NOESY descritos posteriormente en el Ejemplo 1.

De igual manera, la estructura estérica del derivado terpenoide (II) que tiene las propiedades fisicoquímicas descritas en (4) anteriores se determinó a partir de la estructura estérica del compuesto de partida, las propiedades fisicoquímicas descritas en (4), las propiedades fisicoquímicas descritas en (6), y los resultados de la medición de NOESY descritos posteriormente en el Ejemplo 3.

5. Medicamento que comprende el derivado terpenoide de la presente invención

El derivado terpenoide de la presente invención purificado como se ha mencionado anteriormente tiene la acción de activar la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE y tiene una acción antiinflamatoria y una acción citoprotectora.

La activación de la ruta de señalización Keap1/Nrf2/ARE induce su gen diana de NAD(P)H: quinona oxidorreductasa-1 (NQO1), hemo oxigenasa-1 (HO-1), unidad catalítica de la γ-glutamato cisteína ligasa (GCLC), o similares (Bibliografía no patente 1). Cuando estas enzimas aumentan en cantidad o se activan, las células se vuelven resistentes al veneno, el estrés oxidativo, la inflamación, etc. El derivado terpenoide de la presente invención por lo tanto, es útil como agente preventivo o terapéutico en enfermedades tales como una enfermedad ocular, una enfermedad renal, una enfermedad hepática, y diabetes mellitus y sus complicaciones.

Ejemplos de la enfermedad ocular incluyen enfermedades tales como la enfermedad alérgica conjuntival, conjuntivitis vírica, pterigión, infección corneal, ojo seco, trastorno corneal (que sea un trastorno corneal epitelial y/o trastorno corneal endotelial), uveítis, enfermedad de Behcet, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, oclusión de la vena retiniana (RVO), coriorretinopatía serosa central, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), edema macular diabético (DME), enfermedad macular, retinitis pigmentaria, glaucoma y cataratas.

Ejemplos de la enfermedad renal incluyen enfermedades causadas por problemas del riñón, tales como nefritis aguda, nefritis crónica, fallo renal agudo, fallo renal crónico, síndrome nefrótico, nefropatía por IgA, nefropatía diabética, riñón gotoso, nefroesclerosis, hidronefrosis, nefritis tubulointersticial, disminución de la función renal después de una revascularización quirúrgica de arterias coronarias, e infección del tracto urinario.

Ejemplos de la enfermedad respiratoria incluyen bronquitis, neumonía, pleuritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), lesión pulmonar aguda (ALI), panbronquiolitis difusa, enfisema pulmonar, Y asma.

Ejemplos de la enfermedad hepática incluyen el hígado graso alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, y disfunción hepática asociada con el trasplante de hígado.

Ejemplos de la enfermedad cerebral incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), infarto cerebral, y la esclerosis múltiple (MS).

Ejemplos de la enfermedad cardíaca incluyen el infarto de miocardio.

Ejemplos de diabetes mellitus y sus complicaciones incluyen la retinopatía diabética, nefropatía diabética, y neuropatía diabética.

El derivado terpenoide de la presente invención es particularmente útil como agente preventivo o terapéutico para, entre estas enfermedades,
el ojo seco, un trastorno corneal (sea un trastorno corneal epitelial y/o un trastorno corneal endotelial), uveítis, retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, o glaucoma como la enfermedad ocular,
la nefropatía diabética como enfermedad renal, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la lesión pulmonar aguda (ALI) como la enfermedad respiratoria,
la esteatohepatitis no alcohólica o la disfunción hepática asociada con el trasplante de hígado como la enfermedad hepática, o el infarto cerebral o la esclerosis múltiple como enfermedad cerebral.

El derivado terpenoide de la presente invención se prefiere adicionalmente como agente preventivo o terapéutico para el ojo seco, agente preventivo o terapéutico para un trastorno del epitelio corneal y/o el endotelio corneal, agente preventivo o terapéutico para la degeneración macular relacionada con la edad, agente preventivo o terapéutico para el edema macular diabético y/o la oclusión de la vena retiniana, un agente preventivo o terapéutico para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica un agente preventivo o terapéutico para el infarto cerebral o un agente preventivo o terapéutico para la esclerosis múltiple, entre estas enfermedades.

En el caso de la utilización del derivado terpenoide de la presente invención como un medicamento, este medicamento puede administrarse de distintas formas. La forma de dosificación depende de la preparación, edad, sexo, enfermedad, etc. Por ejemplo, se administran por vía oral en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, jarabes, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, o cápsulas. Por ejemplo, se administran inyecciones por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intravítrea, intracameral, subconjuntival, en la cápsula de Tenon, o intraperitoneal. Se instilan gotas oftálmicas en los ojos. Se utilizan ungüentos oftálmicos para las membranas mucosas

oftálmicas. Se administran supositorios por vía intrarrectal. Cualquiera de estos procedimientos de administración se puede conseguir mediante la administración de composiciones farmacéuticas de liberación sostenida.

En el caso de la utilización del derivado terpenoide de la presente invención como un medicamento, este medicamento puede administrarse de distintas formas. Sin embargo, en general, se utiliza a menudo la instilación en los ojos, la administración intravítrea, la administración intracameral, la administración subconjuntival, o la administración en la cápsula de Tenon, que permiten la administración directa en el punto de acción.

Se pueden producir distintas composiciones farmacéuticas que contengan el derivado terpenoide de la presente invención como principio activo de acuerdo con procedimientos de rutina utilizando aditivos conocidos que se utilizan habitualmente en el campo de las preparaciones farmacéuticas, tales como excipientes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, solubilizantes, correctores, y agentes de revestimiento.

6. Composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad ocular, que comprende el derivado terpenoide de la presente invención como principio activo

La composición farmacéutica ración sostenida para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad ocular, que comprende el derivado terpenoide de la presente invención como principio activo (a la que también se hace referencia de aquí en adelante como composición farmacéutica de la presente invención) tiene un material básico que se puede administrar en el cuerpo vítreo y una forma que se puede administrar en el cuerpo vítreo y se administra directamente en los ojos.

La administración directa de un medicamento en los ojos supone una gran molestia para los pacientes. La composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención puede mantener una acción farmacológica de la misma durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del derivado terpenoide en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, la frecuencia de administración puede disminuirse, y se reduce la molestia a los pacientes.

La composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención induce enzimas implicadas en la supresión del veneno, estrés oxidativo, inflamación, etc., y en consecuencia protege los tejidos retinianos y es útil como composición farmacéutica de liberación sostenida del tipo de administración local para el tratamiento o prevención de una enfermedad de la parte posterior del ojo. Ejemplos de una enfermedad de la parte posterior del ojo incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, el edema macular diabético, y la retinopatía diabética.

Se utiliza un polímero biodegradable como material básico de la composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención. Ejemplos del polímero biodegradable incluyen el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y ácido poli(láctico-co-glicólico). Se prefiere el ácido poliláctico o ácido poli(láctico-co-glicólico).

Estos polímeros biodegradables se pueden producir de acuerdo con procedimientos de producción conocidos en la técnica, o se pueden utilizar distintos productos disponibles en el mercado que se diferencian en el peso molecular o la relación de copolimerización (J. Biomaterials Nanobiotechnology 2012: 3: 208-252; y Biomedical Engineering, Trends in Materials Science, Laskovski, A (Ed.) pp. 489-512, InTech, Rijeka, 2011).

La forma de la composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas en polvo que tienen la intención de la liberación sostenida en forma de polvo así como formas de liberación sostenida de bastoncillos, láminas, películas, discos o microcápsulas del derivado terpenoide de la presente invención dispersados en el material básico de manera uniforme o en estado de partículas. Entre estos, se prefiere una forma de microesfera o bastoncillo como forma de composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad de la parte posterior del ojo.

La cantidad del derivado terpenoide de la presente invención contenida en la composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención no se limita particularmente y es preferentemente de un 5 a un 80 % en peso, más preferentemente de un 20 a un 60 % en peso.

Ejemplos del procedimiento para la producción de la composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención en la forma de microesferas incluye procedimientos de secado en agua (por ejemplo, procedimientos o/w, w/o, y w/o/w), un procedimiento de separación de fases, un procedimiento de secado por pulverización, un procedimiento de granulación utilizando fluidos supercríticos, procedimientos equivalentes a estos y procedimientos descritos en los Ejemplos posteriormente (R.T. Liggins, H.M. Burt / International Journal of Pharmaceutics 222 (2001) 19-33; K. Andreas y col. / Acta Biomaterialia 7 (2011) 1485-1495; J. Herberger y col. / Journal of Controlled Release 90 (2003) 181-195; y A.J. Thote, R.B. Gupta / Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 1 (2005) 85-90).

Ejemplos del procedimiento para la producción de la composición farmacéutica del liberación sostenida de la presente invención en forma de un implante de polímero tal como un bastoncillo, una lámina, una película, un disco, o microesferas incluyen un procedimiento que implica la adición apropiadamente de un tensioactivo o un emulsionante como disolvente para la formación y procesamiento de un núcleo interno de la composición farmacéutica de liberación sostenida que tenga una forma deseada mediante el uso de distintas técnicas tales como extrusión fundida, moldeado por inyección, moldeado por compresión (incluyendo la compresión de comprimidos), u otra compresión en la forma o estructura deseadas utilizando un disolvente orgánico.

Se utiliza un disolvente orgánico, tal como la acetona, que está clasificado como un disolvente de clase 3 por la FDA (un disolvente que es de baja toxicidad y permite que el disolvente residual se elimine con un uso mínimo), como el disolvente orgánico utilizado para el moldeado.

En el caso del procesamiento del núcleo central de la composición farmacéutica de liberación sostenida de la presente invención sin el uso de un disolvente orgánico, se puede llevar a cabo este procesamiento en condiciones en las que el derivado terpenoide de la presente invención se mezcla completamente con el material básico de polímero biodegradable o solo en un sitio específico de este polímero y se dispersa o disuelve en este.

7. Dosis y frecuencia de administración del derivado terpenoide de la presente invención

La dosis del derivado terpenoide de la presente invención difiere dependiendo de los síntomas, edad, etc., y es preferentemente de 0,0001 µg/sitio a 100 µg/sitio para la administración local. La dosis para la administración sistémica es preferentemente de 0,00001 mg/kg a 10 mg/kg.

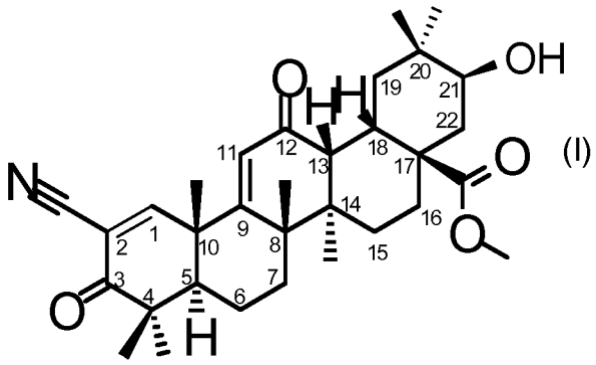
La frecuencia de administración del fármaco farmacéutico que contiene el derivado terpenoide de la presente invención como principio activo es de varias veces al día, una vez al día, o una vez cada pocos días. La composición farmacéutica de liberación sostenida se administra una vez a la semana, una vez cada cuatro semanas, una vez cada tres meses, o una vez cada seis meses como guía.

A continuación, la invención se describirá con más detalle en referencia a los Ejemplos, Ejemplos de ensayo, y Ejemplos de formulación de las composiciones farmacéuticas. Sin embargo, la presente invención no pretende estar limitada por estos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción del derivado terpenoide (I) y derivado terpenoide (III) (cepa de biotransformación: SANK 10312)

[Fórmula 8]



(1) Cultivo de la cepa del género *Chaetomium* para la biotransformación

Se colocaron 20 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición que se muestra en la Tabla 1 posteriormente en cada uno de cuatro matraces de Erlenmeyer de 100 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 20 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inoculó en el medio de cada matraz 1 ml de suspensión de esporas de SANK 10312 y se cultivó durante 2 días en condiciones de 23 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

(Tabla 1)

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de siembra para SANK 10312

Glicerina	30 g
Glucosa	30 g
Almidón soluble	20 g
Harina de soja	10 g
Gelatina	2,5 g
Extracto de levadura (Difco)	2,5 g
NH_4NO_3	2,5 g
Agar	3 g
Agente antiespumante *1	0,1 ml

Agua del grifo	1000 ml
*1 Nissan Disfoam CB-442 (fabricado por NOF Corp.)	
*2 el pH no estaba ajustado.	

Se colocaron 80 ml de un medio de cultivo de principal que tenía la composición que se muestra en la Tabla 2 posteriormente en cada uno de los trece matraces de Erlenmeyer de 500 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 20 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inocularon asépticamente 4 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 10312 en el medio de cada matraz y se cultivaron durante 2 días en condiciones de 23 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Se añadieron 0,8 ml de una solución de CDDO-Me disuelto a una concentración de 10 mg/ml en dimetil sulfóxido a esta solución de cultivo en cada matraz, y se cultivó de nuevo la mezcla a 210 rpm y 23 ºC durante 6 días en un agitador rotatorio.

(Tabla 2)

Tabla 2. Composición del medio de cultivo principal

Glicerina	30 g
Glucosa	30 g
Almidón soluble	20 g
Harina de soja	10 g
Gelatina	2,5 g
Extracto de levadura (Difco)	2,5 g
NH_4NO_3	2,5 g
Agente antiespumante *1	0,1 ml
Agua del grifo	1000 ml
*1 Nissan Disfoam CB-442 (fabricado por NOF Corp.)	
*2 el pH no estaba ajustado.	

(2) Aislamiento del derivado terpenoide (I) y derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (I) y el derivado terpenoide (III) en este Ejemplos se monitorizaron mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.

columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,3 minutos (derivado terpenoide (I))
4,9 minutos (derivado terpenoide (III)).

A los 1.040 ml de solución de cultivo obtenidos en el párrafo (1), se añadió una cantidad igual de acetona, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Entonces, se retiraron los micelios mediante filtración a presión reducida para obtener 2.000 ml de un filtrado. A este filtrado, se añadió 1 l de acetato de etilo por distribución líquido-líquido para obtener una capa orgánica que contenía los compuestos de interés. La capa orgánica obtenida se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato sódico anhidro, y el disolvente se evaporó hasta secarse para obtener 549,9 mg de un polvo que contenía el derivado terpenoide (i) y el derivado terpenoide (III). Se disolvió una alícuota de 275 mg de ese polvo en 1,37 ml de metanol. Se aplicó una alícuota de 0,2 ml de esta solución en una columna de HPLC (Unison US-C18; 20 mm de diámetro x 150 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.) equilibrada con anterioridad con disolventes de un 0,01 % de solución acuosa de ácido fórmico: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico = 45:55, seguido por elución con un caudal de 18,0 ml/min con disolventes de solución acuosa con un 0,01 % de ácido fórmico: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico = 45:55. Se detectó la absorción ultravioleta de los compuestos de interés a un longitud de onda λ = 230 nm. Se separaron 7 veces cada uno de un pico que aparecía en un tiempo de retención de 9,1 minutos (derivado terpenoide (I)) y un pico que aparecía a un tiempo de retención de 12,3 minutos (derivado terpenoide (III)). Las soluciones de las fracciones de cada compuesto se combinaron y concentraron a presión reducida, y la suspensión obtenida se liofilizó para obtener 1,4 mg de derivado terpenoide (I) como un polvo incoloro y 16,2 mg de derivado terpenoide (III) como un polvo incoloro.

La estructura estérica del derivado terpenoide (I) obtenido de la presente invención se determinó utilizando una espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional (NOESY).

En la espectroscopia por resonancia magnética nuclear bidimensional (NOESY) del derivado terpenoide (I), se observó

una correlación entre el β-protón de la posición 19 y el β-protón de la posición 21. Su estructura estérica se determinó por lo tanto como se representó por la fórmula (I).

Valores de la medición de las propiedades fisicoquímicas del derivado terpenoide (I)

1) apariencia: una sustancia en polvo incolora
2) fórmula molecular: $C_{32}H_{43}NO_5$
3) fórmula molecular: 521 (medido por espectrometría de masas ESI)
4) la masa precisa, [M+H]+, medida por espectrometría de masas LC-ESI de alta resolución era la que se da a continuación:

encontrada: 522,32062
calculada: 522,32140

5) Espectro de resonancia magnética nuclear-H^1: el espectro de resonancia magnética nuclear-H^1 (500 MHz) medido en cloroformo deuterado a 0,00 ppm utilizando TMS se da a continuación:
σ: 0,98 (3H, s), 0,99 (3H, s), 1,00 (3H, s), 1,17 (3H, s), 1,18-1,22 (1H, m), 1,25 (3H, s), 1,28-1,30 (1H, m), 1,33 (3H, s), 1,49 (3H, s), 1,51-1,55 (1H, m), 1,62-1,66 (1H, m), 1,68-1,71 (1H, m), 1,69-1,72 (1H, m), 1,70-1,80 (2H, m), 1,77-1,79 (1H, m), 1,76-1,82 (2H, m), 1,85-1,89 (2H, m), 2,96 (1H, d, J = 5,0 Hz), 3,04 (1H, ddd, J = 4,0 Hz, 4,0 Hz, 14,0 Hz), 3,49 (1H, dd, J = 5,0 Hz, 11,5 Hz), 3,71 (3H, s), 5,97 (1H, s), 8,03 (1H, s) ppm
6) Espectro de resonancia magnética nuclear-C^{13}: el espectro de resonancia magnética nuclear-C^{13} (125 MHz) medido en cloroformo deuterado referenciado a 0,00 ppm utilizando TMS se da a continuación:
σ: 16,4 (q), 18,2 (t), 21,4 (q), 21,5 (q), 23,9 (t), 24,6 (q), 26,6 (q), 27,0 (q), 28,1 (t), 29,1 (q), 31,1 (d), 31,6 (t), 35,8 (t), 35,9 (s), 40,1 (t), 42,0 (s), 42,5 (s), 45,0 (s), 45,7 (s), 47,7 (d), 48,9 (s), 49,0 (d), 52,1 (q), 73,7 (d), 114,3 (s), 114,6 (s), 124,0 (d), 165,5 (d), 168,5 (s), 176,6 (s), 196,5 (s), 198,7 (s) ppm
7) cromatografía líquida de altas prestaciones: columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.) disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
temperatura: 40 ºC
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,3 minutos
8) El espectro de la resonancia magnética nuclear-H^1 del derivado terpenoide (I) se muestra en la Figura 1, y el espectro de resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^{13}C HSQC) del mismo se muestra en la Figura 2. Como resultado del análisis del espectro de la resonancia magnética nuclear-H^1 y el espectro de la resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^{13}C HSQC), se atribuyó cada protón de la siguiente manera:

β-protón en la posición 19: 1,28 a 1,30 ppm (metileno)
β-protón en la posición 21: 3,49 ppm (metina) 9) El espectro de la resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^1H NOESY) del derivado terpenoide (I) se muestra en la Figura 3. En la Figura 3, se observa la correlación entre el β-protón de la posición 19 y el β-protón de la posición 21. Su estructura estérica se determinó por lo tanto como se representó por (I).

Ejemplo 2. Producción del derivado terpenoide (I) y derivado terpenoide (III) (cepa de biotransformación: SANK 11867)

(1) Cultivo de la cepa del género *Chaetomium* para la biotransformación

Se colocaron 20 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición que se muestra en la Tabla 1 del ejemplo 1 en cada uno de 176 matraces de Erlenmeyer de 100 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 20 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inoculó en el medio de cada matraz 1 ml de suspensión de esporas de SANK 11867 y se cultivó durante 2 días en condiciones de 23 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

Se colocaron 80 ml de un medio de cultivo de principal que tenía la composición que se muestra en la Tabla 2 del Ejemplo 1 en cada uno de 583 matraces de Erlenmeyer de 500 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 20 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inocularon asépticamente 4 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 11867 en el medio de cada matraz y se cultivaron durante 2 días en condiciones de 23 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Se añadieron 0,8 ml de una solución de CDDO-Me disuelto a una concentración de 30 mg/ml en dimetil sulfóxido a esta solución de cultivo en cada matraz, y se cultivó de nuevo la mezcla a 210 rpm y 23 ºC durante 6 días en un agitador rotatorio.

(2) Aislamiento del derivado terpenoide (I) y derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (I) y el derivado terpenoide (III) en este Ejemplos se monitorizaron mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.

columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

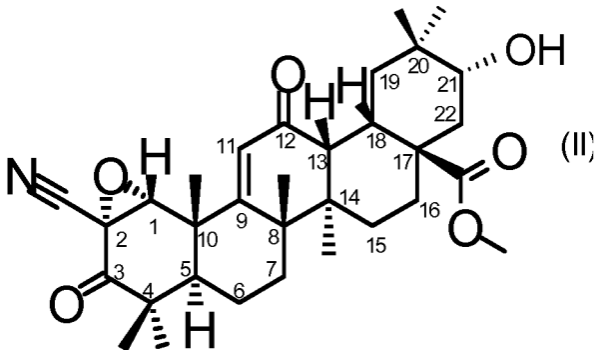
A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,3 minutos (derivado terpenoide (I)) 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)).

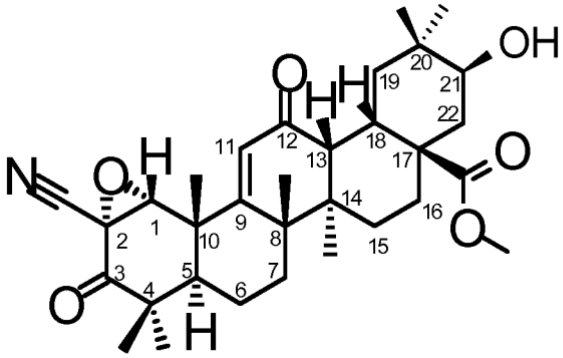
A los 42,6 l de solución de cultivo obtenidos en el párrafo (1), se añadió una cantidad igual de acetona, y la mezcla se agitó bien y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante hora. Entonces, se retiraron los micelios mediante filtración a presión reducida para obtener 78 l de un filtrado. Este filtrado se aplicó a una columna Sepabeads SP207 (2 L; fabricada por Mitsubishi Chemical Corp.) lavada anteriormente con acetona y luego con el tampón sustituido por agua. La columna se lavó con 6 l de una mezcla de disolvente de acetona: agua = 5:5 y posteriormente con 6 l de una mezcla disolvente de acetona:agua = 6:4, seguido por elución con 6 l de una mezcla disolvente de acetona:agua = 7:3. A este eluído que contenía el compuesto de interés, se le añadieron 1,2 l de agua, y posteriormente se añadieron 2,6 l de acetato de etilo por distribución líquido-líquido para separar una capa orgánica que contenía los compuestos de interés. La capa orgánica obtenida se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato sódico anhidro, y luego se concentró a presión reducida para obtener 6,92 g de extractos que contenían el derivado terpenoide (i) y el derivado terpenoide (III). Se disolvió una alícuota de 1,5 g de los extractos en 5 ml de metanol. Esta solución se adsorbió en ODS-A (7,5 g; fabricada por YMC Co., Ltd.), y se empaquetó una minicolumna con el vehículo resultante y después se aplicó a una columna ODS-A (100 g; fabricada por YMC Co., Ltd.) calibrada con anterioridad con una mezcla disolvente de acetonitrilo:agua que contenía un 0,01 % de ácido fórmico = 55:45 seguido por elución con un caudal de 15 ml/min con la misma mezcla disolvente anterior. Se detectó la absorción ultravioleta de los compuestos de interés a una longitud de onda λ = 230 nm. Se separaron 5 veces cada uno de un pico que aparecía en un tiempo de retención de 42,0 minutos (derivado terpenoide (I)) y un pico que aparecía a un tiempo de retención de 50,0 minutos (derivado terpenoide (III)). Las soluciones de las fracciones de cada compuesto se combinaron y concentraron a presión reducida para obtener 192 mg de derivado terpenoide (I) como un polvo incoloro y 2,45 g de un polvo amarillo pálido que contenía el derivado terpenoide (III). Se disolvieron 2,45 g del polvo amarillo pálido que contenía el derivado terpenoide (III) en 2 ml de acetonitrilo. Esta solución se aplicó en una columna Sepabeads SP207SS (500 ml; fabricada por Mitsubishi Chemical Corp.) en la que se había remplazado el tampón con anterioridad con una mezcla disolvente de acetonitrilo:agua = 55:45. La columna se lavó con 1.750 ml de una mezcla disolvente de acetona: agua = 60:40, seguido por elución con 2.340 ml de una mezcla disolvente de acetona:agua = 65:35. Una alícuota de 1.200 ml de los eluídos, que contenían el derivado terpenoide (III) con alta pureza se concentró a presión reducida y posteriormente se liofilizó para obtener 2,19 g de derivado terpenoide (III).

Ejemplo 3. Producción del derivado terpenoide (II) y derivado terpenoide (III) (cepa de biotransformación: SANK 70214)

[Fórmula 9]



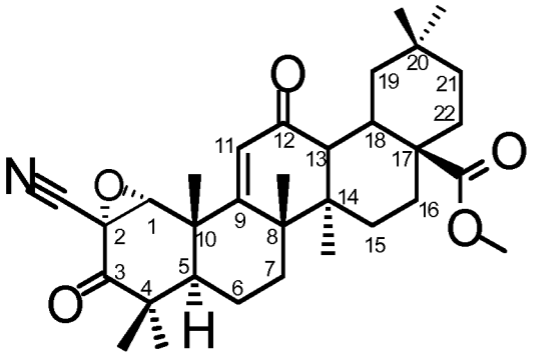
[Fórmula 10]



(III)

(1) Síntesis del compuesto de sustrato (2)

[Fórmula 11]



(2)

Se disolvió el CDDO-Me (8,00 g, 15,8 mmol) en diclorometano (40 ml). A esta solución, se le añadió ácido 3-cloroperbenzoico (>65 %) (5,04 g, 19.0 mmol) enfriando en hielo, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción, se añadió una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (40 ml), y la mezcla se agitó al a misma temperatura que anteriormente durante 15 minutos. A esta mezcla, se añadió además una solución acuosa de tiosulfato sódico al 10 % (40 ml), y la mezcla resultante se agitó a la misma temperatura que anteriormente durante 5 minutos, seguido por la extracción con acetato de etilo. La capa orgánica separada se lavó con solución salina saturada y se secó sobre sulfato magnésico, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El resto se purificó mediante una columna de cromatografía en gel de sílice (n-hexano:acetato de etilo = 4:1, v/v) para obtener el compuesto de sustrato (2) (8,16 g, 99 %) como un sólido blanco amorfo.

ESI-MS; m/z: 522 (M + + 1).
^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ: 0,91 (3H, s), 1,01 (3H, s), 1,08 (3H, s), 1,12 (3H, s), 1,19 (3H, s), 1,27 (3H, s), 1,55 (3H, s), 1,18-2,00 (15H, m), 2,94 (1H, d, J = 4,9 Hz), 3,05 (1H, dt, J = 13,8, 3,7 Hz), 3,70 (3H, s), 4,34 (1H, s), 6,07 (1H, s).
Cromatografía líquida de altas prestaciones:

pureza: 99,0 %
columna: Cosmosil 5C18-MS-II
(6,0 mm de diámetro x 150 mm de longitud; fabricada por Nacalai Tesque, Inc.)
disolvente:

A: Solución acuosa de acetato amónico a 10 mM
B: acetonitrilo

A/B = 15/85 isocrático
caudal: 1,0 ml/min
temperatura: 40 ºC
detección: absorción ultravioleta λ = 254 nm
tiempo de retención: 9,6 minutos.

(2) Cultivo de la cepa del género *Bacillus* para la biotransformación

Se colocaron 20 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición que se muestra en la Tabla 3 posteriormente en cada uno de veinte matraces de Erlenmeyer de 100 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 30 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inoculó un asa de colonias de SANK 70214 en el medio de cada matraz y se cultivó durante 24 horas en condiciones de 28 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

(Tabla 3)

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de siembra para SANK 70214

Glucosa	50 g
Harina de soja	10 g
Extracto de carne	4 g
Polipeptona	4 g
Extracto de levadura (Difco)	1 g
CaCO3	5 g
NaCl	2,5 g
Agente antiespumante *1	0,5 ml
Agua de intercambio iónico	1000 ml

(continuación)

*1 Nissan Disfoam CB-442 (fabricado por NOF Corp.)
*2 el pH se ajustó a 7,2 con NaOH o HCl antes de la esterilización.

Se colocaron 80 ml de un medio de cultivo de principal que tenía la composición que se muestra en la Tabla 3 anterior en cada uno de los 300 matraces de Erlenmeyer de 500 ml, se esterilizaron a 121 ºC durante 30 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se añadieron 0,8 ml de una solución del compuesto de sustrato (2) (sintetizado en el párrafo (1)) disuelto a una concentración de 30 mg/ml en dimetil sulfóxido a esta solución de cultivo de cada matraz. Se inocularon asépticamente 0,8 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 70214 en el medio de cada matraz y se cultivaron durante 5 días en condiciones de 28 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio.

(3) Aislamiento del derivado terpenoide (II) y derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (II) y el derivado terpenoide (III) en este Ejemplos se monitorizaron mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.
columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 5,4 minutos (derivado terpenoide (II))
4,9 minutos (derivado terpenoide (III)).

A los 22,8 l de solución de cultivo obtenidos en el párrafo (2), se añadió una cantidad igual de acetona, y la mezcla se agitó bien y luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante hora. Luego, se retiraron las células bacterianas mediante prensa en filtro para obtener 42 l de un filtrado. Este filtrado se aplicó a una columna Sepabeads SP207 (2 L; fabricada por Mitsubishi Chemical Corp.) lavada anteriormente con acetona y luego con el tampón sustituido por agua. La columna se lavó con 14 l de una mezcla disolvente de acetona: agua = 5:5 y posteriormente con 6 l de una mezcla disolvente de acetona:agua = 6:4, seguido por elución con 7,2 l de una mezcla disolvente de acetona:agua = 7:3 y elución adicional con 8 l de una mezcla disolvente de acetona:agua = 8:2. A partir de la fracción eluída con la mezcla disolvente de acetona:agua = 7:3, se recuperaron 4 l del eluído que contenía el compuesto de interés. Se añadieron a este Sepabeads SP207SS (16 ml; fabricadas por Mitsubishi Chemical Corp.). El disolvente orgánico se evaporó para adsorber el compuesto de interés en la resina. El material adsorbido se aplicó a una columna Sepabeads SP207SS (350 ml; fabricada por Mitsubishi Chemical Corp.) lavada con anterioridad con acetona y luego con el tampón sustituido por agua. La columna se lavó con 1.200 ml de una mezcla disolvente de acetonitrilo: agua = 50:50 y posteriormente con 1.050 ml de una mezcla disolvente de acetonitrilo:agua = 55:45, seguido por elución con 2.950 ml de una mezcla disolvente de acetonitrilo:agua = 60:40. Una alícuota de 920 ml de los eluídos, que contenían el derivado terpenoide (III) con alta pureza se concentró a presión reducida y posteriormente se liofilizó para obtener 1,58 g de derivado terpenoide (III). También, el disolvente orgánico en una alícuota de 580 ml, de los eluídos, que contenían el derivado terpenoide (II) se evaporó, y el resto se liofilizó para obtener 120,7 mg de un polvo que contenía el derivado terpenoide (II). Se disolvió una alícuota de 109 mg de este polvo en 1,0 ml de dimetil sulfóxido. Se aplicó una alícuota de 0,3 ml de esta solución en una columna de HPLC (Unison US-C18; 20 mm de diámetro x 150 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp,) equilibrada con anterioridad con disolventes de un 0,01 % de solución acuosa de ácido fórmico: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico = 45:55, seguido por elución con un caudal de 20,0 ml/min con disolventes de solución acuosa con un 0,01 % de ácido fórmico: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico = 45:55. Se detectó la absorción ultravioleta del compuesto de interés a un longitud de onda λ = 230 nm. Se separó 3 veces un pico que aparecía en un tiempo de retención de 13,6 minutos (derivado terpenoide (II)). Las soluciones de las fracciones se combinaron y concentraron a presión reducida, y la suspensión obtenida se liofilizó para obtener 4,5 mg de derivado terpenoide (II) como un polvo incoloro.

La estructura estérica del derivado terpenoide (II) obtenido de la presente invención se determinó utilizando una espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional (NOESY).

En la espectroscopia por resonancia magnética nuclear bidimensional (NOESY) del derivado terpenoide (II), se observó una correlación entre el α-protón de la posición 19 y el α-protón de la posición 21. Su estructura estérica se determinó por lo tanto como se representa por la fórmula (II).

Valores de la medición de las propiedades fisicoquímicas del derivado terpenoide (II)

1) apariencia: una sustancia en polvo incolora
2) fórmula molecular: $C_{32}H_{43}NO_6$
3) fórmula molecular: 537 (medido por espectrometría de masas ESI)
4) la masa precisa, [M+H]+, medida por espectrometría de masas LC-ESI de alta resolución era la que se da a

continuación:

encontrada: 538,31496
calculada: 538,31631

5) Espectro de resonancia magnética nuclear-H^1: el espectro de resonancia magnética nuclear-H^1 (500 MHz) medido en cloroformo deuterado a 0,00 ppm utilizando TMS se da a continuación:
σ: 0,96 (3H, s), 1,06 (3H, s), 1,11 (3H, s), 1,12 (3H, s), 1,19 (3H, s), 1,27 (3H, s), 1,28 (3H, s), 1,46 (1H, d, J = 13,0 Hz), 1,47 (1H, d, J = 13,0 Hz), 1,52-1,59 (2H, m), 1,61-1,65 (2H, m), 1,66-1,69 (1H, m), 1,68-1,75 (1H, m), 1,75 (1H, dd, J = 3,5 Hz, 14,5 Hz), 1,88 (1H, brd, J = 14,5 Hz), 1,98 (1H, dd, J = 5,5 Hz, 9,5 Hz), 2,03 (1H, dd, J = 3,5 Hz, 14,5 Hz), 2,38 (1H, ddd, J = 3,5 Hz, 14,0 Hz, 14,0 Hz), 2,99 (1H, d, J = 4,5 Hz), 3,10 (1H, brd, J = 13,5 Hz), 3,53 (1H, brs), 3,69 (3H, s), 4,34 (1H, s), 6,09 (1H, s) ppm
6) Espectro de resonancia magnética nuclear-C^{13}: el espectro de resonancia magnética nuclear-C^{13} (125 MHz) medido en cloroformo deuterado referenciado a 0,00 ppm utilizando TMS se da a continuación:
σ: 18,3 (t), 21,0 (q), 21,3 (q), 22,8 (q), 23,9 (q), 24,0 (q), 25,7 (t), 27,4 (q), 28,0 (q), 28,7 (t), 30,0 (t), 31,4 (t), 31,5 (d), 35,2 (s), 38,9 (t), 40,9 (s), 42,1 (s), 42,6 (d), 45,1 (s), 45,5 (s), 47,0 (s), 49,5 (d), 52,0 (q), 53,2 (s), 69,1 (d), 74,8 (d), 113,6 (s), 124,8 (d), 168,8 (s), 177,6 (s), 198,8 (s), 202,4 (s) ppm
7) cromatografía líquida de altas prestaciones: columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.) disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
temperatura: 40 ºC
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 5,4 minutos.
8) El espectro de la resonancia magnética nuclear-H^1 del derivado terpenoide (II) se muestra en la Figura 4, y el espectro de resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^{13}C HSQC) del mismo se muestra en la Figura 5. Como resultado del análisis del espectro de la resonancia magnética nuclear-H^1 y el espectro de la resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^{13}C HSQC), se atribuyó cada protón de la siguiente manera:

α-protón en la posición 19: 1,47 ppm (metileno)
α-protón en la posición 21: 3,53 ppm (metina)

9) El espectro de la resonancia magnética nuclear bidimensional (espectro ^1H-^1H NOESY) del derivado terpenoide (II) se muestra en la Figura 6. En la Figura 6, se observa la correlación entre el α-protón de la posición 19 y el α-protón de la posición 21. Por lo tanto su estructura estérica se determinó como se representó en (II).

Ejemplo 4. Producción del derivado terpenoide (III) (cepa de biotransformación: SANK 70314)

(1) Cultivo de la cepa del género *Bacillus* para la biotransformación

Se colocaron 20 ml de un medio de caldo Trypto-Soy (al que se hace referencia de aquí en adelante como un medio TSB) que se da más adelante como medio de cultivo de siembra en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml, esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos, y luego enfriado hasta la temperatura ambiente. Se inoculó un asa de colonias de SANK 70314 en el medio del matraz y se cultivó durante 24 horas en condiciones de 28 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

<Medio TSB (medio de caldo Trypto-Soy)>

Caldo Pearlcore Trypto-Soy Eiken (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.) g	30 g
Agua destilada	1.000 ml

Se colocaron 100 ml de medio TSB como medio de cultivo de principal en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos, y luego enfriado hasta la temperatura ambiente. Se añadió 1,0 ml de una solución del compuesto de sustrato (2) (sintetizado mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 (1)) disuelto a una concentración de 30 mg/ml en dimetil sulfóxido a esta solución de cultivo del matraz. Se inoculó asépticamente 1,0 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 70314 en el medio del matraz y se cultivó durante 3 días en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio.

(2) Aislamiento del derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (III) en este Ejemplo se monitorizó mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.

columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)).

La solución de cultivo obtenida en el párrafo (1) se diluyó hasta 100 ml. Luego, se añadieron a esta 100 ml de acetona, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se separó una alícuota de 1 ml y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante como extractos de solución de cultivo.

10 ml de los extractos de solución preparados de esta manera se sometieron a elución en las condiciones de HPLC descritas anteriormente. Se detectó la absorción ultravioleta del compuesto de interés a una longitud de onda λ = 230 nm. La eficacia de transformación del compuesto sustrato (2) se calculó a partir del área del pico de un pico que aparecía en un tiempo de retención de 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)). Como resultado, la eficacia de biotransformación se confirmó que era del 32 % para el derivado terpenoide (III).

Ejemplo 5. Clonación de SANK 70214 a partir de la cepa silvestre (1) Preparación de una muestra de ADN genómico de *Bacillus* sp. SANK 70214

Se colocaron 100 ml de un medio compuesto de un 3 % de Caldo Pearlcore Trypto-Soy (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.) (se ajustó el pH a 8,0 antes de meterlos en el autoclave) (al que se hace referencia de aquí en adelante como medio TSB (pH 8,0)) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se esterilizó a 121 ºC durante 15 minutos, y entonces se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Se inoculó un asa de SANK 70214 en el medio del matraz y se cultivó durante 15,5 horas en condiciones de 28 ºC y 210 rpm. La solución de cultivo se utilizó como un cultivo de siembra. Se colocaron 100 ml de medio TSB (pH 8,0) en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml, esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos, y luego enfriado hasta la temperatura ambiente. Se inoculó asépticamente 1 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 70214 en el medio del matraz y se cultivó durante 8 horas en condiciones de 28 ºC y 210 rpm. Se distribuyeron 40 ml de la solución de cultivo obtenida a cada tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos para recuperar las células bacterianas. Se preparó el ADN genómico a partir de estas.

(2) Secuenciación del genoma e identificación del gen P450

Se llevó a cabo la secuenciación del genoma en la Technology Research Association para química productos naturales de próxima generación utilizando PacBio RS II (fabricado por Pacific Biosciences of California, Inc.) y Miseq (fabricado por Illumina, Inc.). La secuencia obtenida era de 4,0 Mpb con un contenido de GC de un 40,8 %. La secuencia genómica obtenida se anotó utilizando el BASys Server 2 (https://www.basys.ca/server2/basys/cgi/text_search.pl) con el *Bacillus halodurans* como secuencia de referencia (secuencia de nucleótido de una proteína de SANK 70214 que tienen actividad de hidroxilación) (SEQ ID NO: 3, Figura 9). La secuencia de nucleótidos obtenida mantenía 3 tipos de motivos descritos en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012 1; 22 (1): 606-609. En consecuencia, se clonó el gen de la proteína (SEQ ID NO: 5, Figura 11) que tienen una actividad de hidroxilación del compuesto de sustrato (2) en el derivado terpenoide (III) de la presente invención.

(3) Clonación en *Escherichia coli*

Con el fin de amplificar la secuencia de nucleótidos de P450 de SANK 70214 mediante PCR, se preparó un conjunto de cebadores F1 (GAAGGAGATATACATATGAGTCATGCTGCGAACG) y R1 (TGTCGACGGAGCTCTT TAGAATGAAACGGGCAATG). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el SANK 70214 como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP350), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundos, y alargamiento a 72 ºC durante 10 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 1,2 kb. El fragmento de ADN de SANK 70214 de aproximadamente 1,2 kb se trató con Cloning Enhancer (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) proporcionado para la reacción de clonación In-Fusion. Con el fin de amplificar un vector pET21b para la clonación y expresión (fabricado por Novagen/EMD Biosciences, Inc.) por PCR se preparó un conjunto de cebadores de F2 (ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC) y R2 (AGAGCTCCGTCGACAAGC). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el pET21b como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP600), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundo, y alargamiento a 72 ºC durante 60 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 5 kb. Esta solución de reacción de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se escindió el fragmento de ADN de aproximadamente 5 kb y se recuperó utilizando el kit de purificación de ADN MonofasI (fabricado por GL Sciences Inc.). El fragmento de ADN de pET21b de

aproximadamente 5 kb y el fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb de longitud tratado con anterioridad con el Cloning Enhancer se ligaron utilizando el kit de clonación In-Fusion HD (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) y se utiliza en la transformación de *Escherichia coli* DH5α (Fabricado por Toyobo Co., Ltd.). Entonces, se seleccionó la *Escherichia coli* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Las colonias de la *Escherichia coli* transformada obtenida se cultivaron en un medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Se recuperó el cultivo de Escherichia coli, y se purificó el ADN del plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen N.V.) para obtener un plásmido que lleva la secuencia de nucleótidos de la proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación (pET-SANK 70214-01).

(4) Clonación en *Bacillus subtilis* 168

Con el fin de transformar el *Bacillus subtilis* 168 con la secuencia de nucleótidos de la proteína SANK 70214 que tenía actividad de hidroxilación, se reclonó esta secuencia de nucleótidos en el pHT01 (fabricado por MoBiTec GmbH), un vector lanzadera de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Con el fin de amplificar la secuencia de nucleótidos de P450 clonada en pET-SANK 70214-01 mediante PCR, se preparó un conjunto de cebadores F3 (AAGGAGGAAGGATCCATGAGTCATGCTGCGAACGTAA) y R3 (GACGTCGACTCTAGATTAGAATGAAACG GGCAATG). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el pET-SANK 70214-01 como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP350), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundos, y alargamiento a 72 ºC durante 10 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 1,2 kb. El fragmento de ADN de SANK 70214 de aproximadamente 1,2 kb se trató con Cloning Enhancer (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) proporcionado para la reacción de clonación In-Fusion. Con el fin de amplificar el pHT01 (fabricado por MoBiTec GmbH), un vector lanzadera de *B. subtilis* y *Escherichia coli*, mediante PCR, se preparó un conjunto de cebadores de F4 (TCTAGAGTCGACGTCCCCG) y R4 (GGATCCTTCCTCCTTTAATTG). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el pHT01 como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP350), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundo, y alargamiento a 72 ºC durante 60 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 8 kb. Esta solución de reacción de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se escindió el fragmento de ADN de aproximadamente 8 kb y se recuperó utilizando el kit de purificación de ADN MonofasI (fabricado por GL Sciences Inc.). El fragmento de ADN de pHT01 de aproximadamente 8 kb y el fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb de longitud tratado con anterioridad con el Cloning Enhancer se ligaron utilizando el kit de clonación In-Fusion HD (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) y se utiliza en la transformación de *Escherichia coli* DH5α (Fabricado por Toyobo Co., Ltd.). Entonces, se seleccionó la *Escherichia coli* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Las colonias de la *Escherichia coli* transformada obtenida se cultivaron en un medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Se recuperó el cultivo de Escherichia coli, y se purificó el ADN del plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen N.V.) para obtener un plásmido que lleva la secuencia de nucleótidos de la proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación (pHT01-SANK 70214-01). Se transformó la *Escherichia coli* C600 (fabricada por Zymo Research Corp.) con el pHT01-SANK 70214-01 obtenido para la transformación del *B. subtilis*. Entonces, se seleccionó la *Escherichia coli* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Las colonias de la *Escherichia coli* transformada obtenida se cultivaron en un medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Se recuperó el cultivo de *Escherichia coli*, y el ADN del plásmido se purificó utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen N.V.) para obtener el pHT01-SANK 70214-01 para la transformación del *Bacillus subtilis*. Se transformó el *B. subtilis* 168 con el pHT01-SANK 70214-01 mediante electroporación. Se seleccionó el *B. subtilis* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de cloranfenicol. Se obtuvo el *B. subtilis* que llevaba el pHT01-SANK 70214-01. Este transformante se denominó *B. subtilis* SANK 70214T.

Ejemplo 6. Clonación del SANK 70314 a partir del tipo silvestre

(1) Preparación de la muestra de ADN genómico de *Bacillus megaterium* SANK 70314

La muestra de ADN genómico de SANK 70314 se preparó de la misma manera que en el Ejemplo 5 excepto que se utilizó el SANK 70314 en vez del SANK 70214 y el tiempo de cultivo de la solución de cultivo de siembra de SANK 70314 se fijó en 6 horas.

(2) Secuenciación del genoma e identificación del gen P450

Se llevó a cabo la secuenciación del genoma utilizando PacBio RS II (fabricado por Pacific Biosciences of California, Inc.) y Miseq (fabricado por Illumina, Inc.). La secuencia obtenida era de 5,4 Mpb con un contenido de GC de un 38,0 %. La secuencia genómica obtenida se anotó utilizando el BASys Server 2 (https://www.basys.ca/server2/basys/cgi/text_search.pl) con el *Bacillus megaterium* como secuencia de referencia para obtener seis supuestas secuencias de P450 (secuencias de nucleótido de proteínas de SANK 70314 que tienen actividad de hidroxilación). Las secuencias de nucleótidos de P450 obtenidas mantenían, cada una, 3 tipos de motivos descritos en Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012 1; 22 (1): 606-609. Entre estas, se clonó el gen de la

proteína (SEQ ID NO: 6, Figura 12) que tiene una actividad de hidroxilación del compuesto de sustrato (2) en el derivado terpenoide (III) de la presente invención (SEQ ID NO: 4, Figura 10).

(3) Clonación en *Escherichia coli*

Con el fin de amplificar la secuencia de nucleótidos de P450 de SANK 70314 mediante PCR, se preparó un conjunto de cebadores F5 (GAAGGAGATATACATATGAAAACCGAAAGAGAAAAC) y R5 (TGTCGACGGAGCTCTTATACAT GTTTACGAATCA). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el SANK 70314 como matriz.

Se llevaron a cabo procedimientos posteriores de la misma manera que en el Ejemplo 5 para obtener un plásmido que lleva la secuencia de la proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación (pET-SANK 70314-01).

(4) Clonación en *Bacillus subtilis* 168

Con el fin de transformar el *Bacillus subtilis* 168 con la secuencia de nucleótidos de la proteína SANK 70314 que tenía actividad de hidroxilación, se reclonó esta secuencia de nucleótidos en el pHT01 (fabricado por MoBiTec GmbH), un vector lanzadera de *B. subtilis* y *Escherichia coli*.

Con el fin de amplificar la secuencia de nucleótidos de P450 clonada en pET-SANK 70314-01 mediante PCR, se preparó un conjunto de cebadores F6 (AAGGAGGAAGGATCCATGAAAACCGAAAGAGAAAAC) y R6 (GACGTCGA CTCTAGATTATACATGTTTACGAATCAATAATTC). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el pET-SANK 70214-01 como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP350), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundos, y alargamiento a 72 ºC durante 10 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 1,2 kb. El fragmento de ADN de SANK 70314 de aproximadamente 1,2 kb se trató con Cloning Enhancer (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) proporcionado para la reacción de clonación In-Fusion. Con el fin de amplificar el pHT01 (fabricado por MoBiTec GmbH), un vector lanzadera de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, mediante PCR, se utilizó un conjunto de cebadores de F4 (TCTAGAGTCGACGTCCCCG) y R4 (GGATCCTTCCTCCTTTAATTG). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando este conjunto de cebadores y el pHT01 como matriz. La reacción de PCR empleaba PrimeSTAR Max (fabricado por Takara Bio Inc.) y un aparato PCR (fabricado por Takara Bio Inc., TP350), y se repitió 30 veces una reacción en 3 estadios que implica la desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, hibridación a 55 ºC durante 5 segundo, y alargamiento a 72 ºC durante 60 segundos. Como resultado, se amplificó un fragmento de ADN que tenía una longitud de aproximadamente 8 kb. Esta solución de reacción de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se escindió el fragmento de ADN de aproximadamente 8 kb y se recuperó utilizando el kit de purificación de ADN MonofasI (fabricado por GL Sciences Inc.). El fragmento de ADN de pHT01 de aproximadamente 8 kb y el fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb de longitud tratado con anterioridad con el Cloning Enhancer se ligaron utilizando el kit de clonación In-Fusion HD (fabricado por Clontech Laboratories, Inc.) y se utiliza en la transformación de *Escherichia coli* DH5α (Fabricado por Toyobo Co., Ltd.). Entonces, se seleccionó la *Escherichia coli* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Las colonias de la *Escherichia coli* transformada obtenida se cultivaron en un medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Se recuperó el cultivo de Escherichia coli, y se purificó el ADN del plásmido utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen N.V.) para obtener un plásmido que lleva la secuencia de nucleótidos de la proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación (pHT01-SANK 70314-01). Se transformó la *Escherichia coli* C600 (fabricada por Zymo Research Corp.) con el pHT01-SANK 70314-01 obtenido para la transformación del *B. subtilis*. Entonces, se seleccionó la *Escherichia coli* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Las colonias de la *Escherichia coli* transformada obtenida se cultivaron en un medio LB líquido que contenía 100 mg/ml de carbenicilina. Se recuperó el cultivo de *Escherichia coli*, y el ADN del plásmido se purificó utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (fabricado por Qiagen N.V.) para obtener el pHT01-SANK 70314-01 para la transformación del *B. subtilis*. Se transfectó el *B. subtilis* 168 con el pHT01-SANK 70314-01 mediante electroporación. Se seleccionó el *B. subtilis* en un medio LB agar que contenía 100 mg/ml de cloranfenicol. Se obtuvo el *B. subtilis* que llevaba el pHT01-SANK 70314-01. Este transformante se denominó *B. subtilis* SANK 70314T.

Ejemplo 7. Producción del derivado terpenoide (III) (cepa de biotransformación: SANK 70214T)

(1) Cultivo de SANK 70214T

Se colocaron 20 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición que se muestra en la Tabla 4 posteriormente, en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml, esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inoculó un asa de colonias de SANK 70214T en el medio del matraz y se cultivó durante 24 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

[Tabla 4]

Tabla 4. Composición del medio de cultivo de siembra para SANK 70214T

Difco 2 x caldo YT (fabricado por Becton, Dickinson and Company)	31 g
Agua de intercambio iónico	1000 ml
* el pH no estaba ajustado.	

Se colocaron 100 ml de un medio de cultivo principal-1 que tenía la composición que se muestra en la Tabla 5 posteriormente, en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizó a 121 ºC durante 30 minutos. Entonces, se añadió asépticamente a este el medio de cultivo principal-2 que tiene la composición de la Tabla 6 posterior, para preparar un medio de cultivo principal. Se inoculó asépticamente 1,0 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 70214T en este y se cultivó durante 2 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Luego, se añadió IPTG (isopropil-β-tiogalactopiranósido) a esto con 0,1 mM (de concentración final), y la mezcla se cultivó durante 1 hora en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Luego, se añadió a este 1,0 ml de solución de compuesto de sustrato (2) (sintetizado por el procedimiento del Ejemplo 3 (1)) disuelto a una concentración de 30 mg/ml en dimetil sulfóxido, y la mezcla se cultivó durante 5 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio.

[Tabla 5]

Tabla 5. Composición del medio de cultivo principal - 1

Bacto Tryptone (fabricado por Becton, Dickinson and Company)	10 g
Bacto Yeast Extract (fabricado por Becton, Dickinson and Company)	5 g
Hidrógeno fosfato disódico anhidro	6,78 g
Dihidrógeno fosfato potásico	3 g
Cloruro sódico	5,5 g
Cloruro amónico	1 g
Hidroxipropil-p-ciclodextrina	30 g
Glicerol	20 g
Agua de intercambio iónico	1000 ml

(Tabla 6)

Tabla 6. Composición del medio de cultivo principal - 2

100 mM de sulfato ferroso	1 ml
Ácido 5-aminolevulínico a 80 mg/ml	1 ml
Timina a 2 mg/ml	10 ml
Cloranfenicol a 100 mg/ml	1 ml

(2) Aislamiento del derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (III) en este Ejemplo se monitorizó mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.

columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,9 minutos (derivado terpenoide (III))

La solución de cultivo obtenida en el párrafo (1) se diluyó hasta 100 ml. Luego, se añadieron a esta 100 ml de acetona, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se separó una alícuota de 1 ml y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante como extractos de solución de cultivo.

10 ml de los extractos de solución preparados de esta manera se sometieron a elución en las condiciones de HPLC descritas anteriormente. Se detectó la absorción ultravioleta del compuesto de interés a una longitud de onda λ = 230 nm. La eficacia de transformación del compuesto sustrato (2) se calculó a partir del área del pico de un pico que

aparecía en un tiempo de retención de 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)). Como resultado, la eficacia de biotransformación se confirmó que era del 77 % para el derivado terpenoide (III).

(1) Cultivo de SANK 70314T

Se colocaron 20 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición que se muestra en la Tabla 4 del Ejemplo 7, en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml, esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos, y luego se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se inoculó un asa de colonias de SANK 70314T en el medio del matraz y se cultivó durante 10 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. De aquí en adelante se hace referencia a la solución de cultivo obtenida como "solución de cultivo de siembra".

Se colocaron 100 ml de un medio de cultivo principal-1 que tenía la composición que se muestra en la Tabla 5 del Ejemplo 7, en un matraz de Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizó a 121 ºC durante 15 minutos. Entonces, se añadió asépticamente a este el medio de cultivo principal-2 que tiene la composición de la Tabla 6 anterior, para preparar un medio de cultivo principal. Se inoculó asépticamente 1,0 ml de la solución de cultivo de siembra de SANK 70314T en este y se cultivó durante 2 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Luego, se añadió IPTG a esto con 0,1 mM (de concentración final), y la mezcla se cultivó durante 1 hora en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio. Luego, se añadió a este 1,0 ml de solución de compuesto de sustrato (2) (sintetizado por el procedimiento del Ejemplo 3 (1)) disuelto a una concentración de 30 mg/ml en dimetil sulfóxido, y la mezcla se cultivó durante 84 horas en condiciones de 37 ºC y 210 rpm en un agitador rotatorio.

(2) Aislamiento del derivado terpenoide (III)

El comportamiento del derivado terpenoide (III) en este Ejemplo se monitorizó mediante HPLC en las condiciones que se dan posteriormente.

columna: Unison UK-C18 (4,6 mm de diámetro x 75 mm de longitud; fabricada por Imtakt Corp.)
disolvente:

A: 10 mM de solución acuosa de formiato amónico que contenía un 0,01 % de ácido fórmico
B: acetonitrilo que contenía un 0,01 % de ácido fórmico

A/B = calibración con 5/5 seguido por un gradiente lineal durante 7 minutos hasta una A/B = 1/9
caudal: 1,0 ml/min
detección: absorción ultravioleta λ = 230 nm
tiempo de retención: 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)).

La solución de cultivo obtenida en el párrafo (1) se diluyó hasta 100 ml. Luego, se añadieron a esta 100 ml de acetona, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se separó una alícuota de 1 ml y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se utilizó el sobrenadante como extractos de solución de cultivo.

10 ml de los extractos de solución preparados de esta manera se sometieron a elución en las condiciones de HPLC descritas anteriormente. Se detectó la absorción ultravioleta del compuesto de interés a una longitud de onda λ = 230 nm. La eficacia de transformación de RNR-0014 se calculó a partir del área del pico de un pico que aparecía en un tiempo de retención de 4,9 minutos (derivado terpenoide (III)). Como resultado, la eficacia de biotransformación se confirmó que era del 39 % para el derivado terpenoide (III).

Ejemplo 9. Producción de microesferas como composición farmacéutica de liberación sostenida

El derivado terpenoide (III) de la presente invención se utilizó como principio activo en la composición farmacéutica de liberación sostenida. Se utilizó el ácido poliláctico o ácido poli(láctico-co-glicólico) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que se muestra en la Tabla 7 como material básico.

[Tabla 7]

Tabla 7. Material básico

	Relación de copolimerización (ácido glicólico/ácido láctico)	Peso molecular
PLA-0005	0/100	5000

(continuación)

	Relación de copolimerización (ácido glicólico/ácido láctico)	Peso molecular
PLA-0020	0/100	20000
PLGA-5020	50/50	20000
PLGA-7520	75/25	20000

Se produjeron microesferas que tenían un contenido de fármaco del 10 % en peso mediante el siguiente procedimiento: el material básico y el derivado terpenoide (III) de la presente invención se disolvieron a concentraciones de aproximadamente un 17 % y aproximadamente un 1,7 % (p/v), respectivamente, en diclorometano. Posteriormente, la solución obtenida se añadió adicionalmente en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,05 %, y se formó una emulsión o/w utilizando un agitador. En esta emulsión, el volumen de la fase acuosa era aproximadamente de 6,7 veces el volumen de la fase oleosa.

El tamaño de partícula de las microesferas obtenidas se controló ajustando apropiadamente la velocidad de agitado para la formación de la emulsión o/w. Por ejemplo, las microesferas obtenidas tenían un tamaño de partícula pequeño con un gran número de revoluciones y tenía un tamaño de partícula grande con un número pequeño de revoluciones.

El disolvente de la fase oleosa se evaporó mediante la adopción del procedimiento de secado en agua (procedimiento o/w). Esta evaporación se llevó a cabo a una presión normal con agitado utilizando u agitador magnético. Las microesferas así obtenidas se separaron mediante filtración. Después, se lavó el emulsionante, etc., unidos a la superficie de las microesferas varias veces repetidas con agua purificada o similares. Después, se dispersaron de nuevo las microesferas en agua destilada (agua purificada) y se liofilizaron para obtener las microesferas de interés.

Se produjeron microesferas que tenían un contenido de fármaco del 30 % en peso mediante el siguiente procedimiento: el material básico y el derivado terpenoide (III) de la presente invención se disolvieron a concentraciones de aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 5 % (p/v), respectivamente, en diclorometano. Posteriormente, la solución obtenida se añadió adicionalmente en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,05 %, y se formó una emulsión o/w utilizando un agitador. En esta emulsión, el volumen de la fase acuosa era aproximadamente de 6,7 veces el volumen de la fase oleosa.

El tamaño medio de partícula de las microesferas obtenidas se midió utilizando un aparato de medición de distribución del tamaño de partícula por difracción de un láser (Helos & Cuvette, Sympatec GmbH). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Tabla 8. Resultados de la medición de la distribución del tamaño de las partículas

Material básico	Contenido en fármaco (% pp)	X_{10}	X_{50}	X_{90}
PLGA-0005	10	3,70	14,4	24,3
PLGA-5020	10	6,52	16,9	27,4
PLGA-5020	30	5,88	17,1	27,8
PLGA-7520	10	11,1	27,9	41,6
PLA-0020	10	5,41	17,3	27,3

El contenido del derivado terpenoide (III) de la presente invención de las microesferas obtenidas (fracción en peso del fármaco en las microesferas que contienen el fármaco) se midió por el procedimiento que se da posteriormente.

Las microesferas producidas (se pesó con precisión aproximadamente 1 mg) se disolvieron en dimetil sulfóxido para hacer 1 ml con precisión. La cantidad de derivado terpenoide (III) de la presente invención contenida en esta solución se calculó a partir del valor de medición de la cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). El contenido de derivado terpenoide (III) de la presente invención en las microesferas se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

Contenido (% en peso) = (Valor de medición de la cantidad de derivado terpenoide (III) de la presente invención contenida / Cantidad de microesferas) x 100.

Las condiciones de la HPLC eran las siguientes:

<Condiciones de HPLC>

aparato: cromatografía (Acquity, Waters Corp.), detector UV (Acquity, Waters Corp.), analizador de datos (Empower, Waters Corp.)
Columna de HPLC: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 mm (2.1 mm I.D. x 50 mm, Waters Corp.) tiempo de análisis: 14 min

fase móvil A: agua:acetonitrilo:ácido fosfórico (95:5:0,1)
fase móvil B: acetonitrilo:agua:ácido fosfórico (95:5:0,1)

caudal: 0,75 ml/min (las condiciones del gradiente se muestran en la Tabla 9)
temperatura de la columna: temperatura constante de aproximadamente 40 ºC
temperatura de la muestra: temperatura constante de aproximadamente 25 ºC longitud de onda detección: UV-245 nm.

[Tabla 9]

Tabla 9. Condiciones del gradiente

Tiempo (min)	0	0,5	3,5	6,0	11,0	11,1	14,0
Fase móvil A (%)	80	80	50	50	1	80	80
Fase móvil B (%)	20	20	50	50	99	20	20

El contenido en fármaco determinado mediante este procedimiento era del 85 % al 95 % de la relación de peso calculada a partir de la composición del material básico y el fármaco en el momento de la producción de la microesfera y se confirmó por tanto que era cuantitativa. En consecuencia, en la presente invención, se indicaba un contenido de fármaco calculado a partir de la composición en el momento de la producción para la composición por motivos de conveniencia.

Ejemplo 10. Producción de un implante con forma de bastoncillo como composición farmacéutica de liberación sostenida

Un implante con forma de bastoncillo se produjo utilizando microesferas que contenían PLA-0020 como material básico y un 10 % en peso del derivado terpenoide (III) de la presente invención. Las microesferas son capaces de fundirse completamente calentándolas aproximadamente a 200 ºC. Se llenó un tubo metálico con las microesferas fundidas y se dejó enfriar. Después, el producto resultante se saca del mismo y se enfría completamente para obtener el implante en forma de bastoncillos de interés (diámetro: aproximadamente 1 mm).

El implante con forma de bastoncillo obtenido se disolvió en dimetil sulfóxido para producir de manera precisa 1 mg/ml. La cantidad de derivado terpenoide (III) contenido en esta solución se midió de la misma manera que en el Ejemplo 4 para calcular el contenido del derivado terpenoide (III) en el implante de forma de bastoncillo.

Se produjeron microesferas que tenían un contenido de fármaco del 10 % en peso mediante el siguiente procedimiento: el material básico y el derivado terpenoide (III) de la presente invención se disolvieron a concentraciones de aproximadamente un 17 % y aproximadamente un 1,7 % (p/v), respectivamente, en diclorometano. Posteriormente, la solución obtenida se añadió adicionalmente en una solución acuosa de alcohol polivinílico al 0,05 %, y se formó una emulsión o/w utilizando un agitador. En esta emulsión, el volumen de la fase acuosa era aproximadamente de 6,7 veces el volumen de la fase oleosa.

Ejemplo de ensayo 1. Ensayo NQO1

Se cultivaron células Hepa1c1c7 (línea celular de ratón, ATCC, N.º de catálogo CRL-2026) (con un 5 % de CO_2, 37 ºC). Se utilizó un medio DMEM (Life Technologies Japan Ltd., N.º de catálogo 11965-092) que también contenía un 10 % de FBS inactivado. El medio contenía 100 unidades /ml (de concentración final) de penicilina y 100 µg/mg (de concentración final) de estreptomicina. Se llevó a cabo el ensayo NQO1 de acuerdo con las publicaciones previas (Anal Biochem 1998; 169: 328-; y Methods Enzymol 2004; 382: 243-).

Las células Hepa 1c1c7 se sembraron a 10000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Aproximadamente 24 horas después, el medio se remplazó con un medio que contenía el derivado terpenoide (III), derivado terpenoide (I), o derivado terpenoide (II), y se llevó a cabo el cultivo adicionalmente durante aproximadamente 48 horas. Se prepararon una solución de lisis (una solución que contiene 2 mM de EDTA y 0,8 % de digitonina), una solución de reacción (una solución que contiene 0,025 M de Tris-HCl, un 0,067 % de albúmina, un 0,01 % de Tween-20, 2 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 5 mM de dinucleótido flavina adenina, 1 mM de glucosa-6-fosfato, 30 mM de dinucleótido fosfato nicotinamida adenina, un 0,03 % de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), y 50 mM de menadiona) y una solución de parada (una solución que contiene 0,3 mM de dicumarol y 5 mM de dihidrógeno fosfato potásico, pH 7,4). Tras la retirada del medio, se añadieron a este 50 ml de solución de lisis, y la mezcla se dejó en reposo a 37 ºC durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se añadieron a esta doscientos ul de la solución, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron cincuenta ml de la solución de parada, y se midió la absorbancia a 490 nm.

Los resultados del ensayo se analizaron utilizando Prism (GraphPad Software, Inc., Ver. 5) para calcular el valor de CD (concentración de doble actividad de NQO1) de la concentración a la que la actividad de NQO1 aumentó 2 veces.

Cada grupo consistía en 3 pocillos y se indicó como una media de los valores de la CD. Los valores de la CD eran de 1,0 nM para el derivado terpenoide (III), 0,3 nM para el derivado terpenoide (I), y 0,1 nM para el derivado terpenoide (II).

Ejemplo de ensayo 2. Ensayo de liberación del fármaco *in vitro* de microesferas que contienen el derivado terpenoide (III)

Las microesferas contenían un 10 % en peso de derivado terpenoide (III) de la presente invención se produjeron por el procedimiento descrito en el Ejemplo 7. Se permitía que una solución de irrigación intraocular (Opeguard MA, fabricada por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) que contenía un 1 % p/v de un tensioactivo (Tween 80). A esta solución, se añadieron las microesferas de manera que la concentración del derivado terpenoide (III) de la presente invención era de 50 mg/ml. La mezcla se agitó en una incubadora ajustado a 37 ºC. A los 1, 2, 3 y 7 días después del inicio de la incubación, esta solución mixta se centrifugó (3.750 rpm, 10 minutos), y se mezclaron 200 ml del sobrenadante obtenido con 800 ml de acetonitrilo al 50 %. La cantidad de derivado terpenoide (III) de la presente invención disuelta se midió por HPLC. Las condiciones de la HPLC eran las mismas que las descritas en el Ejemplo 4.

La tasa de disolución (%) del derivado terpenoide (III) de la presente invención se calculó cuando la concentración del fármaco del derivado terpenoide (III) de la presente invención completamente disuelto se definió como el 100 %.

Los resultados del cálculo se muestran en la Tabla 10. Estos resultados demostraban que todas las microesferas ensayadas liberaban el fármaco de manera sostenida.

[Tabla 10]

Tabla 10. Tasa acumulada de disolución (%) del derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir de las microesferas

Material básico Día	PLA-0005 (10 %* pp)	PLGA-7520 (10 %* pp)	PLA-0020 (10 %* pp)
1	91	5	4
2	102	9	6
3	104	12	7
7	104	26	13

Día	PLGA-5020 (10 %* pp)	PLGA-5020 (30 %* pp)
1	19	19
2	38	30
3	58	41
7	93	75

* muestra el contenido de derivado terpenoide (III) en la composición farmacéutica.

Ejemplo de ensayo 3. Ensayo de liberación del fármaco *in vitro* de un implante con forma de bastoncillo que contiene el derivado terpenoide (III)

Se produjo un implante con forma de bastoncillo mediante el procedimiento de producción del Ejemplo 8. Se permitió que una solución de irrigación intraocular (Opeguard MA, fabricada por Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) contuviera un 1 % p/v de un tensioactivo (Tween 80). A esta solución, se añadió el implante con forma de bastoncillo de manera que la concentración del derivado terpenoide (III) de la presente invención era de 50 mg/ml. La mezcla se agitó en una incubadora ajustado a 37 ºC. A los 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 días después del inicio de la incubación, esta solución mixta se centrifugó (3.750 rpm, 10 minutos), y se mezclaron 200 ml del sobrenadante obtenido con 800 ml de acetonitrilo al 50 %. La cantidad de derivado terpenoide (III) de la presente invención disuelta se midió por HPLC. Las condiciones de la HPLC eran las mismas que las descritas en el Ejemplo 7. El procedimiento para el cálculo de la tasa de disolución era el mismo que en el Ejemplo de ensayo 2.

Los resultados del cálculo se muestran en la Tabla 11. Estos resultados demuestran que el implante con forma de bastoncillo que tiene un material básico de PLGA-5020 libera el fármaco de una manera sostenida.

[Tabla 11]

Tabla 11. Tasa acumulada de disolución (%) de derivado terpenoide (III) de la presente invención a partir de un implante con forma de bastoncillo (contenido de derivado terpenoide (III): un 10 % en peso)

Día	PLGA-5020
1	0
2	0
3	0
7	4
15	30

21	61
30	84.

Ejemplo de ensayo 4. Ensayo farmacocinético de microesferas que contienen el derivado terpenoide (III) en el ojo de conejo

Se prepararon suspensiones utilizando cada uno de el derivado terpenoide (III) de la presente invención, derivado terpenoide (III) de la presente invención-PLA-0005 [preparado utilizando PLA-0005 como material básico y ajustando la relación de mezcla del derivado terpenoide (III) de la presente invención y PLA-0005 a 1:9], y derivado terpenoide (III) de la presente invención-PLA0020 [preparado utilizando PLA-0020 como material básico y ajustando la relación de mezcla del derivado terpenoide (III) de la presente invención y PLA-0020 a 1:9], y solución salina como disolvente de manera que la concentración del derivado terpenoide (III) era de 3 mM.

Se administraron 50 ml de cada una de las suspensiones por vía intravítrea a cada conejo blanco (Oriental Yeast Co., Ltd., Kbl:NZW, macho, 8 semanas de edad). Después de la administración intravítrea, el conejo se sometió a eutanasia, y se obtuvieron muestras del fluido intravítreo y la retina. Se midió la concentración de derivado terpenoide (III) contenido en estas muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y 14. Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 12 a continuación se indican por la media de 4 ojos y la desviación típica. La concentración de fármaco en cada tejido se midió por LC/MS/MS. El tejido se pretrató mediante la dilución con agua purificada en una cantidad correspondiente con 10 veces el peso del tejido y la homogeneización posterior para obtener una medición de la muestra. Se añadió una solución de agua/acetonitrilo (1:1) que contenía una solución interna convencional (IS; ácido niflúmico) a la muestra obtenida para extraer el fármaco. Luego, se filtró la solución mediante un filtro y se inyectó para la LC/MS/MS.

Las condiciones de la LC/MS/MS eran las siguientes:

<Condiciones de UPLC>: Waters Acquity UPLC
columna de análisis: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 mm temperatura de la columna: 50 ºC

fase móvil A: Un 95 % de acetonitrilo (5 mM de acetato amónico)
fase móvil B: Un 5 % de acetonitrilo (5 mM de acetato amónico).

(Tabla 12)

Tabla 12. Tabla de gradiente

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	5	95
0,2	50	50
0,6	95	50
0,9	95	5
1	5	95
Caudal: 0,8 ml/min.		

<Condiciones de la MS/MS>: aparato de análisis API4000
Modo de ionización: ESI
Modo de polarización iónica: Positiva
Monitor iónico
derivado terpenoide (III) (Precursor iónico (m/z): 538,5, producto iónico (m/z): 460)
IS(precursor iónico (m/z): 283,2, producto iónico (m/z): 265).

[Tabla 13]

Tabla 13. Concentración intravítrea (nM) de derivado terpenoide (III) de la presente invención

Día	Sin material básico	PLA-0005	PLA-0020
0,25	-	1080 ± 125	235±14
1	79667 ± 22084	543 ± 138	100±11
2	0,1 ± 0,0	-	-

(continuación)

Día	Sin material básico	PLA-0005	PLA-0020
7	0,1 ± 0,0	1 ± 5	37 ± 3
17	-	0 ± 0	1 ± 2
24	-	0 ± 0	0 ± 0
28	-	0 ± 0	0 ± 0

(Tabla 14)

Tabla 14. Concentración intrarretiniana (ug/g de tejido) del derivado terpenoide (III) de la presente invención

Día	PLA-0020
0,25	0,84 ± 0,11
1	2,66 ± 2,89
7	0,03 ± 0,02
17	0,25 ± 0,15
24	0,13 ± 0,11
28	0,04 ± 0,02

Por lo tanto, era posible confirmarse que las concentraciones intravítrea e intrarretiniana del derivado terpenoide (III) de la presente invención se mantienen significativamente utilizando un polímero biodegradable como material básico.

Ejemplo de ensayo 5. Ensayo farmacocinético de un implante con forma de bastoncillo que contiene el derivado terpenoide (III) en el ojo de conejo

Se produjeron microesferas compuestas del derivado terpenoide (III) de la presente invención-PLGA-5020 [preparadas utilizando PLGA-5020 como material básico y ajustando la relación de mezcla del derivado terpenoide (III) de la presente invención y PLGA-5020 a 1:9]. Se preparó una suspensión utilizando las microesferas y solución salina como disolvente de manera que la concentración de derivado terpenoide (III) era 3 mM.

50 ul de esta suspensión se administró por vía intravítrea a cada conejo blanco (Oriental Yeast Co., Ltd., Kbl:NZW, macho, 8 semanas de edad). La dosis era 810 ug de las microesferas (81 ug de derivado terpenoide (III) de la presente invención).

Se produjo un implante con forma de bastoncillo compuesto por el derivado terpenoide (III)-PLGA-5020 [producido utilizando PLGA-5020 como material básico y ajustando la relación de mezcla del derivado terpenoide (III) de la presente invención y PLGA-5020 a 1:9] y se administró por vía intravítrea a cada conejo. La dosis era 6,5 mg del implante con forma de bastoncillo (650 ug de derivado terpenoide (III) de la presente invención).

Después de la administración intravítrea, el conejo se sometió a eutanasia, y se obtuvieron muestras del fluido intravítreo. Se midió la concentración de derivado terpenoide (III) de la presente invención en estas. Los resultados se muestran en la Tabla 15. Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 15 a continuación se indican por una media de 2 ojos. Se confirmó que el implante con forma de bastoncillo permitía que el fármaco se mantenía en el cuerpo vítreo durante 28 días. Se descubrió adicionalmente que el implante con forma de bastoncillo, en comparación con las microesferas, era capaz de mantener significativamente la concentración intravítrea del derivado terpenoide (III).

(Tabla 15)

Tabla 15. Concentración intravítrea (nM) de derivado terpenoide (III) de la presente invención

Día	Microesfera	Implante con forma de bastoncillo
3	9,4	3,7
7	0,0	7,9
21	0,0	8,6
28	0,0	2,5

Ejemplo de ensayo 6. Acción de microesferas del derivado terpenoide (III) sobre un gen de retina en el conejo

Se ensayó la dinámica del gen Nqo1 como gen diana de Nrf2 en la retina.

Se administraron 50 ul de una suspensión de microesferas por vía intravítrea a cada conejo blanco (Oriental Yeast Co., Ltd., Kbl:NZW, macho, 8 semanas de edad). La dosis era 810 ug de las microesferas (81 ug de derivado terpenoide (III) de la presente invención). Se recuperó el ARNm de las muestras de retina de los conejos sometidos a

eutanasia utilizando un kit de extracción (fabricado por Qiagen N.V., RNeasy Mini Kit, N.º de catálogo 74106). A partir del ARNm obtenido, se preparó un ADNc utilizando un kit de síntesis de ADNc (fabricado por GE Healthcare Life Sciences, First-Strand cDNA Synthesis Kit). El ADNc obtenido se amplificó utilizando un reactivo (fabricado por Applied Biosystems, Inc., TaqMan(R) Gene Expression Master Mix (N.º de catálogo 4369016)) y se utilizó una sonda, y se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real (Real-time PCR HT7900 fabricada por Applied Biosystems, Inc.). Cuando el nivel de expresión del gen Nqo1 en la retina sin la administración intravítrea se definía como 1, las dinámicas se muestran en la Tabla 16. Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 16 a continuación se indicaban por una media de 2 ojos.

(Tabla 16)

Tabla 16. Dinámica del gen Nqo1 en la retina

Día	PLA-0005	PLA-00
0,25	2,01	2,05
1	4,39	2,47
7	2,08	1,89
17	1,29	1,58
24	1,47	1,91
28	1,52	2,04

Se descubrió que el uso de PLA-0020 que se confirmó en el Ejemplo de ensayo 3 para mantener alto el contenido del derivado terpenoide (III), como material básico inducía el gen diana Nrf2 más fuertemente que el uso del PLA-0005 como material básico.

Ejemplo de ensayo 7. Acción de microesferas del derivado terpenoide (III) sobre un gen de retina en el conejo cuando se cambió el contenido

Se ensayó la dinámica del gen Nqo1 como un gen diana Nrf2 en la retina cambiando la proporción del compuesto contenido en las microesferas. Se produjo el derivado terpenoide (III) de la presente invención-PLGA-5020 [producido utilizando PLGA-5020 como material básico y ajustando la relación de mezcla del derivado terpenoide (III) de la presente invención y PLA-0005 a 1:9 (un 10 % en peso) o 3:7 (un 30 % en peso)]. Se preparó las suspensiones utilizando cada muestra de ensayo y utilizando solución salina como disolvente de manera que la concentración de derivado terpenoide (III) era de 3 mM. 50 ul de cada una de las suspensiones contenían 81 ug del derivado terpenoide (III).

Se administraron 50 ul de cada una de las suspensiones por vía intravítrea a cada conejo blanco (Oriental Yeast Co., Ltd., Kbl:NZW, macho, 8 semanas de edad). Después de la administración intravítrea, el conejo se sometió a eutanasia, y se obtuvieron muestras de la retina. La dinámica del gen Nqo1 de la retina determinada por PCR cuantitativa en tiempo real se muestran en la Tabla 17. Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 17 a continuación se indican por la media de 4 ojos y la desviación típica.

(Tabla 17)

Tabla 17. Dinámica del gen Nqo1 en la retina

Tiempo	10 % pp	30 % pp
0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
3	1,3 ± 0,6	1,5 ± 0,6
6	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,1
24	2,1 ± 0,4	1,4 ± 0,3

Se descubrió que incluso una composición farmacéutica que tenía un alto contenido en derivado terpenoide (III) inducía el gen Nrf2 diana.

La concentración del derivado terpenoide (III) en el fluido intravítreo se muestra en la Tabla 18. Los valores numéricos que se muestran en la Tabla 18 a continuación se indican por una media de 4 ojos y la desviación típica.

(Tabla 18)

Tabla 18. Concentración intravítrea (nM) de derivado terpenoide (III) de la presente invención

Tiempo	10 % pp	30 % pp
0	0 ± 0	0 ± 0

(continuación)

Tiempo	10 % pp	30 % pp
3	213 ± 156	152 ± 111
6	220 ± 163	440 ± 438
24	57 ± 27	37 ± 41

Ejemplo de ensayo 8. Cálculo de la concentración necesaria para ejercer la acción farmacológica

Se llevó a cabo un estudio sobre la concentración farmacológicamente eficaz para ejercer la acción farmacológica mediante la administración local de una composición farmacéutica de liberación sostenida que comprendía el derivado terpenoide (III) de la presente invención como principio activo en el cuerpo vítreo. La concentración a la que la actividad del gen Nrf2 diana Nqo1 se inducía 2 veces se utilizó como un índice (Anal Biochem 1988; 169: 328-). De acuerdo con este procedimiento, se estudió la farmacocinética *in vivo* en seres humanos utilizando, como índice, la concentración de derivado terpenoide (III) a la que el gen Nrf2 diana Hmox1 se inducía 2 veces en la retina.

Se produjo una composición farmacéutica de liberación sostenida que contenía un 10 % en peso de derivado terpenoide (III) de la presente invención utilizando PLA-0020 como el material básico y se administró por vía intravítrea. Los resultados sobre la inducción dependiente del tiempo de Hmox1 se muestra en la Tabla 19.

(Tabla 19)

Tabla 19. Cambio de la dinámica del gen Nqo1 en la retina mediante administración intravítrea de la composición de terpenoide (III) (microesferas) que contenía PLA-0020 como material básico

Día	PLA-0020
0,25	6,89
1	11,2
7	2,08
17	1,87
24	2,35
28	1,95

Como es evidente a partir de esta tabla, se mantenía una inducción de aproximadamente 2 veces durante 28 días, es decir, aproximadamente 1 mes, desde la administración de la composición farmacéutica de liberación sostenida.

A continuación se llevó a cabo un estudio sobre la concentración del fármaco en el tejido diana (retina) necesaria para presentar estas relaciones de inducción. El cambio de la concentración del fármaco en la retina mediante la administración intravítrea de la composición farmacéutica de liberación sostenida se muestra en la Tabla 20.

(Tabla 20)

Tabla 20. Concentración intrarretiniana (nM) del derivado terpenoide (III)

Día	PLA-0020
0,25	1,56
1	9,48
17	0,46
24	0,24
28	0,07

Por lo tanto, la inducción de dos veces o más de Hmox1 se satisfacía en todo momento hasta los 28 días, es decir, aproximadamente 1 mes, después de la administración en este ensayo. En consecuencia, se descubrió que la inducción de Hmox1 necesaria para ejercer la acción farmacológica se obtenía a una concentración igual o mayor que la concentración de fármaco intrarretiniana mínima, es decir, la concentración retiniana en 1 mes después de la administración (0,07 mM a partir de la Tabal 14), en este ensayo.

La dosis necesaria de la inducción de 2 veces del gen Hmox1 durante 1 mes se confirmó a partir de la Tabla 13 que era de 81 mg/cuerpo, que era la cantidad de fármaco en las microesferas administradas en este Ejemplo de Ensayo.

A continuación, se predijo la dosis del fármaco para un ser humano a partir de los resultados de este ensayo. La capacidad dentro del cuerpo vítreo es de 4 ml para un ser humano y 1,5 a 2,5 ml para un conejo (Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 2230-). En consecuencia, la concentración de fármaco en el cuerpo vítreo del conejo se puede extrapolar probablemente a un ser humano mediante la corrección utilizando esta relación de volumen de aproximadamente 2 veces. A partir de la dosis de 81 mg/cuerpo (conejo) del fármaco utilizado para la obtención de los datos de la Tabla 13, se calculó que la dosis necesaria de fármaco eran 162 mg/cuerpo a condición de que la

duración clínicamente deseable de la acción farmacológica sea de 1 mes. Por otra parte, la cantidad del fármaco contenido en Ozudex® lanzado como una composición farmacéutica como un implante con forma de bastoncillo es de 700 mg (Invest Ophthalmol Vis Sci 20011; 52: 80-). A partir de estos, se presumió que una composición farmacéutica que comprenda un derivado terpenoide (III) de la presente invención como principio activo sería capaz de administrar el fármaco en una cantidad que ejerza clínicamente su efecto farmacológico.

Depósito N.º

NITE BP-01914
NITE BP-01915
NITE BP-01916

Texto libre para el listado de secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S de SANK 70214
SEQ ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos parcial del ADNr 16S de SANK 70314
SEQ ID NO: 3: Secuencia de ADN de una proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación
SEQ ID NO: 4: Secuencia de ADN de una proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación
SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de la proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación
SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de la proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Daiichisankyo

<120> Composición farmacéutica para el tratamiento y profilaxis de enfermedades oculares

<130> DSPCT-FP1532

<150> JP2014-183854
<151> 10-09-2014

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1476
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Bacillus sp.*

<400> 1

gcgtgcctaa tacatgcaag tcgagcggac gtttttgaag cttgctttaa aaacgttagc 60

ggcggacggg tgagtaacac gtgggcaacc taccttatcg actgggataa ctccgggaaa 120

ccggggctaa taccggataa catctagcac ctcctggtgc cggattgaaa gagggcttct 180

tgctctcacg atgagatggg cccgcggcgc attagctagt tggagaggta atggctcccc 240

aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc acactgggac tgagacacgg 300

cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg 360

agcaacgccg cgtgagtgat gaagggtttc ggctcgtaaa gctctgttat gagggaagaa 420

cacgtaccgt tcgaataggg cggtaccttg acggtacctc atcagaaagc cacggctaac 480

tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt 540

aaagcgcgcg caggcggcct tttaagtctg atgtgaaatc ttgcggctca accgcaagcg 600

gccattggaa actgggaggc ttgagtacag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg 660

tgaaatgcgt agatatgtgg aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact 720

gacgctgagg cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc 780

gtaaacgatg agtgctaggt gttaggggtt tcgatgcccg tagtgccgaa gttaacacat 840

taagcactcc gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc 900

ccgcacaagc agtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc 960

ttgacatcct ttgaccactc tggagacaga gcttcccctt cgggggcaaa gtgacaggtg 1020

gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca 1080

acccttgacc ttagttgcca gcatttagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa 1140

ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccgct tatgacctgg gctacacacg 1200

tgctacaatg gatggtacaa agggttgcga agccgcgagg tgaagccaat cccataaagc 1260

cattctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctgcatg aagctggaat tgctagtaat 1320

cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac 1380

cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt ttggagccag ccgccgaagg 1440

tgggacagat gattggggtg aagtcgtaac aaggta 1476

<210> 2
<211> 1383
<212> ADN
<213> *Bacillus megaterium*

<400> 2

```
gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc gaactgatta gaagcttgct      60
tctatgacgt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggc aacctgcctg taagactggg     120
ataacttcgg gaaaccgaag ctaataccgg ataggatctt ctccttcatg ggagatgatt     180
gaaagatggt ttcggctatc acttacagat gggcccgcgg tgcattagct agttggtgag     240
gtaacggctc accaaggcaa cgatgcatag ccgacctgag agggtgatcg gccacactgg     300
gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac     360
gaaagtctga cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaaggct ttcgggtcgt aaaactctgt     420
tgttagggaa gaacaagtac aagagtaact gcttgtacct tgacggtacc taaccagaaa     480
gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc gttatccgga     540
attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggt ttcttaagtc tgatgtgaaa gcccacggct     600
caaccgtgga gggtcattgg aaactgggga acttgagtgc agaagagaaa agcggaattc     660
cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac cagtggcgaa ggcggctttt     720
tggtctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt agataccctg     780
gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagagg gtttccgccc tttagtgctg     840
cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga     900
attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa     960
ccttaccagg tcttgacatc ctctgacaac tctagagata gagcgttccc cttcgggggga   1020
cagagtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc   1080
ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccagcattt agttgggcac tctaaggtga   1140
ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac   1200
ctgggctaca cacgtgctac aatggatggt acaaagggct gcaagaccgc gaggtcaagc   1260
caatcccata aaaccattct cagttcggat tgtaggctgc aactcgccta catgaagctg   1320

gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac   1380
acc                                                                 1383
```

<210> 3
<211> 1254
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> *Bacillus sp.*

<400> 3

atgagtcatg ctgcgaacgt aaaagagaaa gtgttaggct ttttaagtgg aaaaagtgga 60

gaaaacccgt ttcatttatt tgctgaactc cgagatttgg gatcggtcgt ctcaatccct 120

aacccaatgg gtgatccaaa caaaaatgct tggatgatca ctaagatgga tacagcaaca 180

aaggttctaa aggattcaaa acggttcacg gttgatccgg catcgattga aaaggaaagt 240

ggatttagag cggaaatggt ttcagatcca gatgattctc ccgatacctt ttttacaggt 300

aagtctatgg tttttattga cggtattgat cataagcgat tgcgaatgct cgtatcgaaa 360

gcattcactc cgaaatatat ggaagggtta cgtcctcgta tacaggaaat agcagacggt 420

ttacttgatc aagttgaatc aaaaggtgag atggatcttg taaaagatta cgcctatcct 480

ctaccgatta ttgtgatatc agaaatgtta ggagtaccta aagaagatca tgaaaatcta 540

caaatatggt catcggctat agctaaaggc ttaggctggg ggaaacaaga tccagccgtg 600

cagcagcatc taaaagattt tggagattac acaaagaagc ttgtagaaaa gaaaagagct 660

catttagagg atgatctcat cagccagctg atccaaattg aagaagaggg agaacgtcta 720

agtgaagaag agctgatctc gatgattaca cttcttatct ttgcagggca tgaaacaacg 780

tctaacctga tcgctacagg tagtatgatg ttatttgacc acccggagca attaaataaa 840

ttaaaatcaa acctagatct ggtaccaact gctgttgaag aacttctgcg ttttaacggt 900

ccttctacaa ctgtaggccc acgtttcgca aaggaagatg tgaatataga tggacaagag 960

atcaaaaaag gagatatgct ccttatcctt gttaagtcag cgaaccgaga tgaagaagtg 1020

ttctctgatt ccgaagaatt ggatgtcagt cgttcaattc accgacattt agcctttggt 1080

tttggtatgc atatgtgcct tggagctcct ttagctcgag tggaaggaga cgtcgctttt 1140

acaacgctct taaaaaggct accgaacata gagcttagta ttccgcctga ggaagtaaag 1200

tggcaattca cgctctcaac gcaaggcctt tcatcattgc ccgtttcatt ctaa 1254

<210> 4
<211> 1215
<212> ADN
<213> *Bacillus megaterium*

<400> 4

```
atgaaaaccg aaagagaaaa cggaatcgtc cgtcaagtga atacgattca aacaaaagaa       60
gagcgcttta atccttttttc atggtatgaa gagatgagaa acagcgcgcc tgtgcgatgg      120
gatgaagaaa ggcaggtatg ggatgttttt cactatgatg gggtcaaaga agtgctggaa      180
caaaaaaata ttttttcttc tgatcgaaga cctccacaaa accaaagaca aactgctcta      240
ggaacgagcc taattaatat tgatccgcct aagcatgctg aaatgagagc gcttgttaat      300
aaagctttta cgcctaaagc aatgaaagca tgggagccta aaattgcgcg cattaccgct      360
gaattattac aagaagttga gcatcttgaa gatattgata tagtcgagca tctttcctat      420
ccgcttccgg ttatggtaat tgccgatatt ttaggcgtcc cgatagaaga tcagcgtcag      480
tttaaagatt ggtcggatat tatcgtagcg ggtccatcga ataatgaacg tgaaacgctc      540
gaaaaattgc agcaagagaa aatgaaagca aacgatgagt tagaaactta cttttatcga      600
atcattgaag aaaagcgcac gcagccagga gatgatatta tttccgtgct tcttcaagca      660
aaagaagaag ggaagcagct aacggatgaa gaaatcgtcg ggttttccat tttgctgctg      720
attgcaggca acgaaacaac cacgaactta atttcaaata cgatttattg tttaatggaa      780
gataaagctt cttttgaacg actcaaacga gaaaaagaac ttttaccttc tgcgattgaa      840
gaagttcttc gctatcgttc acccgttcag gctcttcacc gaatcgtaaa aaaagatgtg      900
gttcttgcag ggaagaaatt aaaagcgggc gaacacgtcg ttccatggat gggatccgcg      960
caccgagatg cgcagtattt tgaagacccg gatgtatttc aaatcgatcg aaagccaaat     1020
atccatatgg catttggaag agggattcat ttttgcttag gagcaccgct tgctcgaata     1080
gaagcaaaag ttatgctggc tgaactgatt gaccgctatc cgcatatgga ctggagcccg     1140
gcatttgagt taaagccgat tgaaagcacg tttgtgtacg ggttagaaga attattgatt     1200
cgtaaacatg tataa                                                      1215
```

<210> 5
<211> 417
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> *Bacillus sp.*

<400> 5

```
Met Ser His Ala Ala Asn Val Lys Glu Lys Val Leu Gly Phe Leu Ser
1               5                  10                  15

Gly Lys Ser Gly Glu Asn Pro Phe His Leu Phe Ala Glu Leu Arg Asp
            20                  25                  30

Leu Gly Ser Val Val Ser Ile Pro Asn Pro Met Gly Asp Pro Asn Lys
        35                  40                  45
```

```
Asn Ala Trp Met Ile Thr Lys Met Asp Thr Ala Thr Lys Val Leu Lys
    50                  55                  60

Asp Ser Lys Arg Phe Thr Val Asp Pro Ala Ser Ile Glu Lys Glu Ser
65                  70                  75                  80

Gly Phe Arg Ala Glu Met Val Ser Asp Pro Asp Asp Ser Pro Asp Thr
                85                  90                  95

Phe Phe Thr Gly Lys Ser Met Val Phe Ile Asp Gly Ile Asp His Lys
            100                 105                 110

Arg Leu Arg Met Leu Val Ser Lys Ala Phe Thr Pro Lys Tyr Met Glu
        115                 120                 125

Gly Leu Arg Pro Arg Ile Gln Glu Ile Ala Asp Gly Leu Leu Asp Gln
    130                 135                 140

Val Glu Ser Lys Gly Glu Met Asp Leu Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Leu Pro Ile Ile Val Ile Ser Glu Met Leu Gly Val Pro Lys Glu Asp
                165                 170                 175

His Glu Asn Leu Gln Ile Trp Ser Ser Ala Ile Ala Lys Gly Leu Gly
            180                 185                 190

Trp Gly Lys Gln Asp Pro Ala Val Gln Gln His Leu Lys Asp Phe Gly
        195                 200                 205

Asp Tyr Thr Lys Lys Leu Val Glu Lys Lys Arg Ala His Leu Glu Asp
    210                 215                 220

Asp Leu Ile Ser Gln Leu Ile Gln Ile Glu Glu Glu Gly Glu Arg Leu
225                 230                 235                 240

Ser Glu Glu Glu Leu Ile Ser Met Ile Thr Leu Leu Ile Phe Ala Gly
                245                 250                 255

His Glu Thr Thr Ser Asn Leu Ile Ala Thr Gly Ser Met Met Leu Phe
            260                 265                 270

Asp His Pro Glu Gln Leu Asn Lys Leu Lys Ser Asn Leu Asp Leu Val
        275                 280                 285

Pro Thr Ala Val Glu Glu Leu Leu Arg Phe Asn Gly Pro Ser Thr Thr
```

290 295 300

Val Gly Pro Arg Phe Ala Lys Glu Asp Val Asn Ile Asp Gly Gln Glu
305 310 315 320

Ile Lys Lys Gly Asp Met Leu Leu Ile Leu Val Lys Ser Ala Asn Arg
325 330 335

Asp Glu Glu Val Phe Ser Asp Ser Glu Glu Leu Asp Val Ser Arg Ser
340 345 350

Ile His Arg His Leu Ala Phe Gly Phe Gly Met His Met Cys Leu Gly
355 360 365

Ala Pro Leu Ala Arg Val Glu Gly Asp Val Ala Phe Thr Thr Leu Leu
370 375 380

Lys Arg Leu Pro Asn Ile Glu Leu Ser Ile Pro Pro Glu Glu Val Lys
385 390 395 400

Trp Gln Phe Thr Leu Ser Thr Gln Gly Leu Ser Ser Leu Pro Val Ser
405 410 415

Phe

<210> 6
<211> 404
<212> PRT
<213> *Bacillus megaterium*

<400> 6

Met Lys Thr Glu Arg Glu Asn Gly Ile Val Arg Gln Val Asn Thr Ile
1 5 10 15

Gln Thr Lys Glu Glu Arg Phe Asn Pro Phe Ser Trp Tyr Glu Glu Met
20 25 30

Arg Asn Ser Ala Pro Val Arg Trp Asp Glu Glu Arg Gln Val Trp Asp
35 40 45

Val Phe His Tyr Asp Gly Val Lys Glu Val Leu Glu Gln Lys Asn Ile
50 55 60

Phe Ser Ser Asp Arg Arg Pro Pro Gln Asn Gln Arg Gln Thr Ala Leu
65 70 75 80

Gly Thr Ser Leu Ile Asn Ile Asp Pro Pro Lys His Ala Glu Met Arg

85 90 95

Ala Leu Val Asn Lys Ala Phe Thr Pro Lys Ala Met Lys Ala Trp Glu
100 105 110

Pro Lys Ile Ala Arg Ile Thr Ala Glu Leu Leu Gln Glu Val Glu His
115 120 125

Leu Glu Asp Ile Asp Ile Val Glu His Leu Ser Tyr Pro Leu Pro Val
130 135 140

Met Val Ile Ala Asp Ile Leu Gly Val Pro Ile Glu Asp Gln Arg Gln
145 150 155 160

Phe Lys Asp Trp Ser Asp Ile Ile Val Ala Gly Pro Ser Asn Asn Glu
165 170 175

Arg Glu Thr Leu Glu Lys Leu Gln Gln Glu Lys Met Lys Ala Asn Asp
180 185 190

Glu Leu Glu Thr Tyr Phe Tyr Arg Ile Ile Glu Glu Lys Arg Thr Gln
195 200 205

Pro Gly Asp Asp Ile Ile Ser Val Leu Leu Gln Ala Lys Glu Glu Gly
210 215 220

Lys Gln Leu Thr Asp Glu Glu Ile Val Gly Phe Ser Ile Leu Leu Leu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Asn Glu Thr Thr Thr Asn Leu Ile Ser Asn Thr Ile Tyr
245 250 255

Cys Leu Met Glu Asp Lys Ala Ser Phe Glu Arg Leu Lys Arg Glu Lys
260 265 270

Glu Leu Leu Pro Ser Ala Ile Glu Glu Val Leu Arg Tyr Arg Ser Pro
275 280 285

Val Gln Ala Leu His Arg Ile Val Lys Lys Asp Val Val Leu Ala Gly
290 295 300

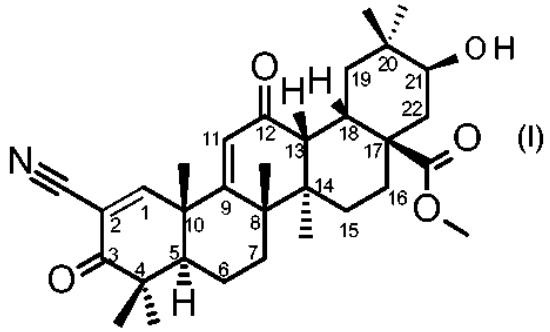
Lys Lys Leu Lys Ala Gly Glu His Val Val Pro Trp Met Gly Ser Ala
305 310 315 320

His Arg Asp Ala Gln Tyr Phe Glu Asp Pro Asp Val Phe Gln Ile Asp
325 330 335

```
Arg Lys Pro Asn Ile His Met Ala Phe Gly Arg Gly Ile His Phe Cys
            340                 345                 350

Leu Gly Ala Pro Leu Ala Arg Ile Glu Ala Lys Val Met Leu Ala Glu
        355                 360                 365

Leu Ile Asp Arg Tyr Pro His Met Asp Trp Ser Pro Ala Phe Glu Leu
    370                 375                 380

Lys Pro Ile Glu Ser Thr Phe Val Tyr Gly Leu Glu Glu Leu Leu Ile
385                 390                 395                 400

Arg Lys His Val
```

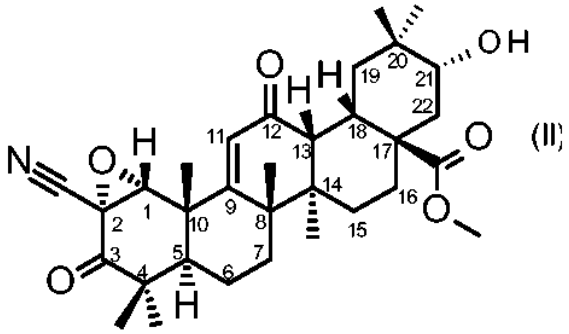
REIVINDICACIONES

1. Un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (I):



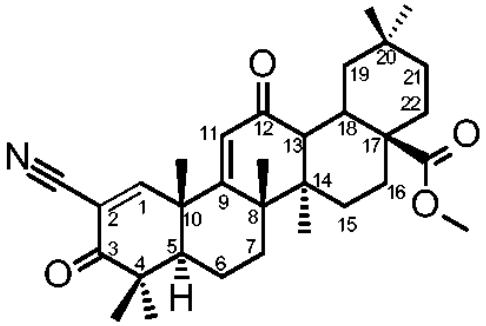
(I)

2. Un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (II):



(II)

3. Un procedimiento de producción de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la utilización de un compuesto representado por la siguiente fórmula (1):



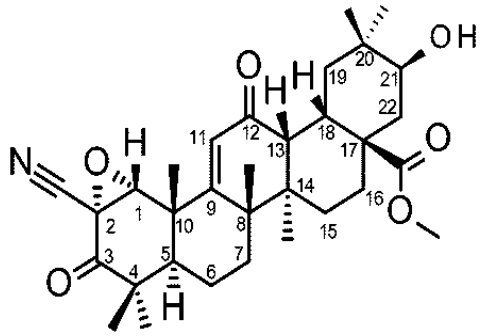
(1)

como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de una cepa de biotransformación del género *Chaetomium* capaz de la transformación del compuesto en el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, y la recolección del compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 a partir del cultivo.

4. El procedimiento de producción de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la cepa de biotransformación es *Chaetomium globosum* SANK 10312 (N.º de depósito NITE BP-1486) que pertenece al género *Chaetomium*.

5. El procedimiento de producción de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la cepa de biotransformación es *Chaetomium sp.* SANK 11867 (N.º de depósito NITE BP-01916) que pertenece al género *Chaetomium*.

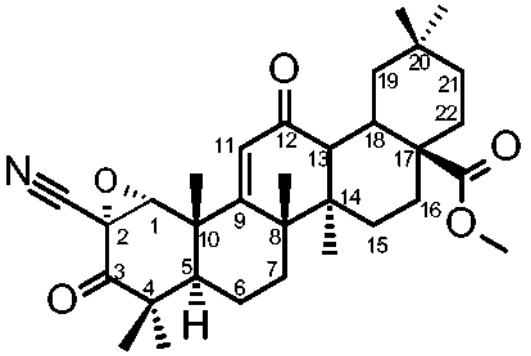
6. Un procedimiento de producción de un derivado terpenoide representado por la siguiente fórmula (III):



(III)

que comprende la utilización de un compuesto representado por la fórmula (1) como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de *Chaetomium sp.* SANK 11867 (N.º de depósito NITE BP-01916) que pertenece al género *Chaetomium* capaz de la transformación del compuesto en el derivado terpenoide representado por la fórmula (III), y la recolección del derivado terpenoide representado por la fórmula (III) a partir del cultivo.

7. Un procedimiento de producción de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) que comprende la producción de un compuesto representado por la siguiente fórmula (2):



(2)

de un compuesto de fórmula (1) mediante una reacción de epoxidación utilizando un peróxido orgánico, utilizando posteriormente el compuesto representado por la fórmula (2) como sustrato, el cultivo junto con este compuesto en un medio de una cepa de biotransformación capaz de transformar el compuesto en el compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o el derivado terpenoide representado por la fórmula (III), y la recolección del compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o el derivado terpenoide representado por la fórmula (III) del cultivo.

8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cepa de biotransformación es *Bacillus sp.* SANK 70214 (N.º de depósito NITE BP-01914) que pertenece al género *Bacillus*.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cepa de biotransformación es *Bacillus megaterium* SANK 70314 (N.º de depósito NITE BP-01915) que pertenece al género *Bacillus*.

10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cepa de biotransformación es un transformante obtenido por transformación de un huésped con un gen que codifica la siguiente proteína (a), (b), (c) o (d):

(a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,
(b) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6,
(c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína (a) o (b) mediante eliminaicón, sustitución, inserción o adición de un aminoácido,
(d) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteína (a) o (b), y
(e) una proteína codificada por un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína (a) o (b).

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el huésped es *Escherichia coli* o una bacteria.

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la bacteria es el *Bacillus subtilis*.

13. Una secuencia de nucleótidos que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos (f) a (j) y que codifica una proteína que tiene una actividad hidroxilasa contra un compuesto de sustrato representado por la fórmula (2):

(f) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 3,
(g) la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO: 4,
(h) la secuencia de nucleótidos de un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende una secuencia complementaria de cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f),
(i) una secuencia de nucleótidos que tiene un 90 % o más de identidad con cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f), y
(j) una secuencia de nucleótidos que no se hibrida en condiciones rigurosas con un ADN que comprende una secuencia complementaria de cualquier secuencia de nucleótidos definida en la secuencia de nucleótidos (f) debido a la degeneración del código genético, pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de (f) a (h).

14. Una proteína que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos (k) a (n) y que tiene una actividad hidroxilasa contra un compuesto de sustrato representado por la fórmula (2):

(k) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 5,
(l) la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 6,
(m) una secuencia de aminoácidos derivada de cualquier secuencia de aminoácidos definida en la secuencia de aminoácidos (k) mediante eliminación, sustitución, y/o adición de un aminoácido, y
(n) una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % o más identidad con cualquier secuencia de aminoácidos definida en la secuencia de aminoácidos (k).

15. Un plásmido recombinante de replicación autónoma o replicación de manera integrada que lleva una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 13.

16. Un transformante obtenido mediante la transformación de un huésped no humano con un plásmido recombinante de acuerdo con la reivindicación 15.

17. Un *Bacillus subtilis* SANK 70214T transformante obtenido mediante la transformación de un *Bacillus subtilis* con un plásmido recombinante de acuerdo con la reivindicación 15.

18. Un *Bacillus subtilis* SANK 70314T transformante obtenido mediante la transformación de un *Bacillus subtilis* con un plásmido recombinante de acuerdo con la reivindicación 15.

19. Un *Bacillus sp.* SANK 70214 (N.º de depósito NITE BP-01914) que pertenece al género *Bacillus*.

20. Un *Bacillus sp.* SANK 70314 (N.º de depósito NITE BP-01915) que pertenece al género *Bacillus*.

21. Un fármaco farmacéutico para el tratamiento o prevención de
una enfermedad ocular, la enfermedad ocular es una enfermedad alérgica conjuntival, conjuntivitis vírica, pterigión, infección corneal, ojo seco, trastorno corneal, que es un trastorno corneal epitelial y/o un trastorno corneal endotelial, uveítis, enfermedad de Behcet, retinopatía diabética, desprendimiento de retina, oclusión de la vena retiniana, coriorretinopatía serosa central, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, enfermedad macular, retinitis pigmentaria, glaucoma o cataratas,
una enfermedad renal, la enfermedad renal es una nefritis aguda, nefritis crónica, fallo renal agudo, fallo renal crónico, síndrome nefrótico, nefropatía por IgA, nefropatía diabética, riñón gotoso, nefroesclerosis, hidronefrosis, nefritis tubulointersticial, disminución de la función renal después de una revascularización quirúrgica de arteria coronaria, o una infección del tracto urinario,
una enfermedad respiratoria. la enfermedad respiratoria es bronquitis, neumonía, pleuritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión pulmonar aguda (ALI), panbronquiolitis difusa, enfisema pulmonar, o asma,
una enfermedad hepática, la enfermedad hepática es hígado graso alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, o disfunción hepática asociada con el trasplante de hígado,
una enfermedad cerebral, la enfermedad cerebral es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), infarto cerebral, o esclerosis múltiple, o
una enfermedad cardíaca, la enfermedad cardíaca es el infarto de miocardio,
que comprende un derivado terpenoide de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 como principio activo.

22. Una composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular, que comprende un derivado terpenoide de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) como principio activo, en el que la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica del mismo durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del derivado terpenoide en condiciones fisiológicas y tiene un material básico que se puede administrar en el cuerpo vítreo y una forma que se puede administrar en el cuerpo vítreo, y
en la que la forma es de microesferas, o
en la que el contenido de principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso, la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica del mismo durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del principio activo en condiciones fisiológicas, el material básico es ácido poliláctico o ácido láctico ácido glicólico, y la forma es una microesfera.

23. Una composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con la reivindicación 22 que comprende un derivado terpenoide representado por la fórmula (III) como principio activo.

24. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con la reivindicación 22 o 23 en la que el material básico es un polímero biodegradable.

25. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en la que el material básico es ácido poliláctico o ácido poli(láctico-co-glicólico).

26. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en la que la forma es de microesferas.

27. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en la que el contenido del principio activo es del 5 % en peso al 80 % en peso.

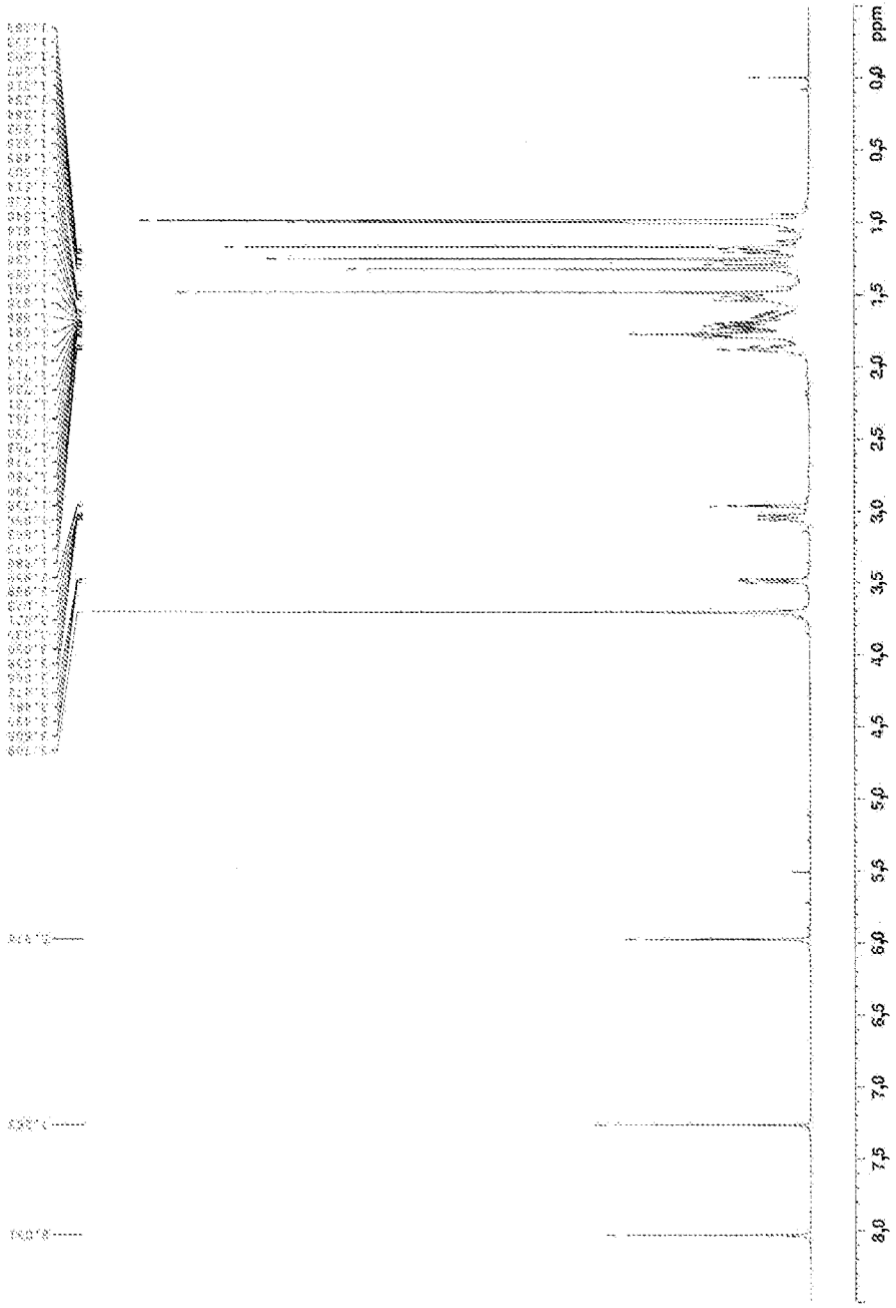
28. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en la que el contenido del principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso.

29. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en la que el contenido de principio activo es del 20 % en peso al 60 % en peso, la composición farmacéutica de liberación sostenida mantiene una acción farmacológica del mismo durante 1 semana o más mediante la liberación sostenida del principio activo en condiciones fisiológicas, el material básico es ácido poliláctico o ácido láctico ácido glicólico, y la forma es una microesfera.

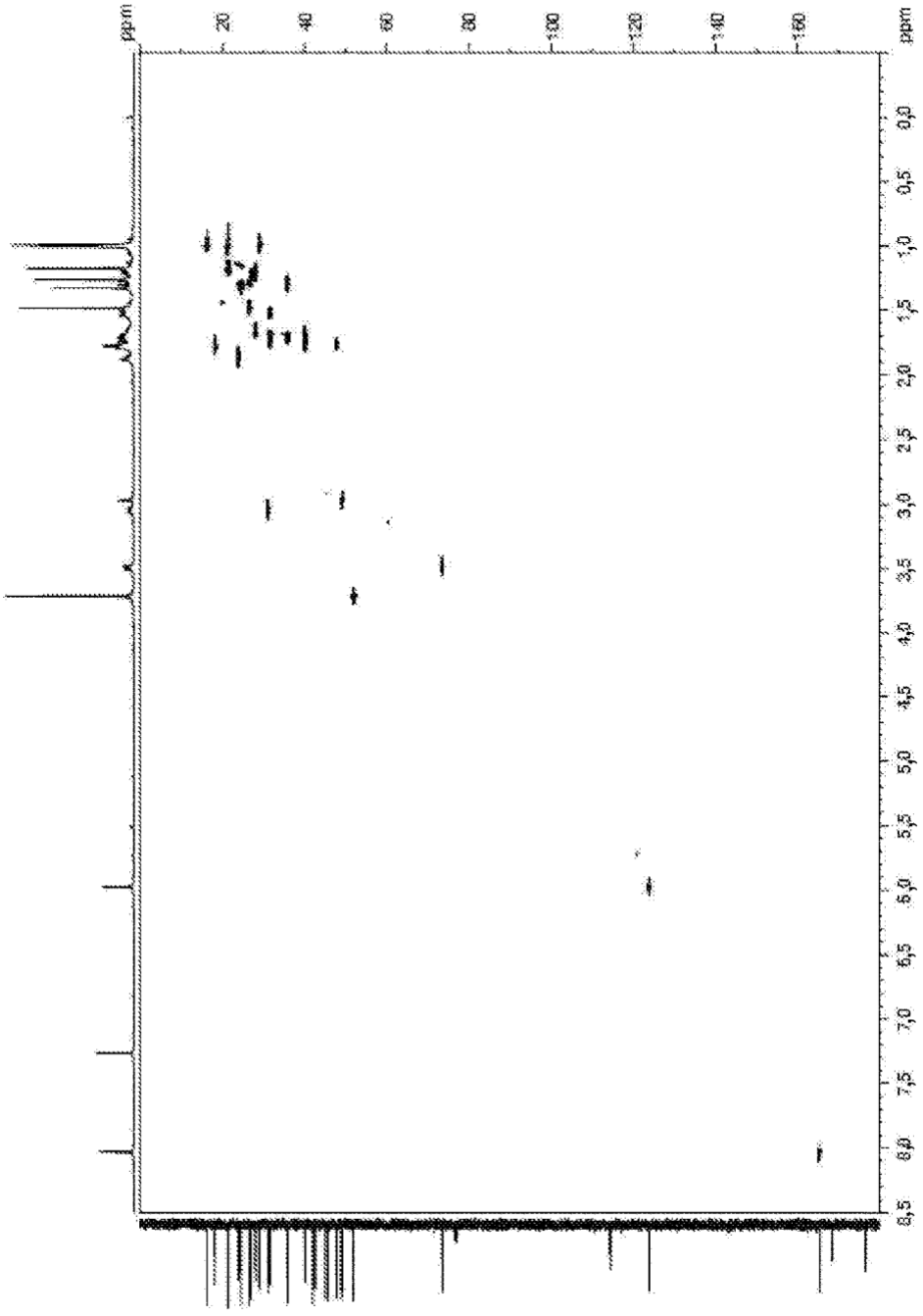
30. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en la que la enfermedad de la parte posterior del ojo es la degeneración macular relacionada con la edad.

31. La composición farmacéutica de liberación sostenida para el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en la que la enfermedad de la parte posterior del ojo es el edema macular diabético y/o la oclusión de la vena retiniana.

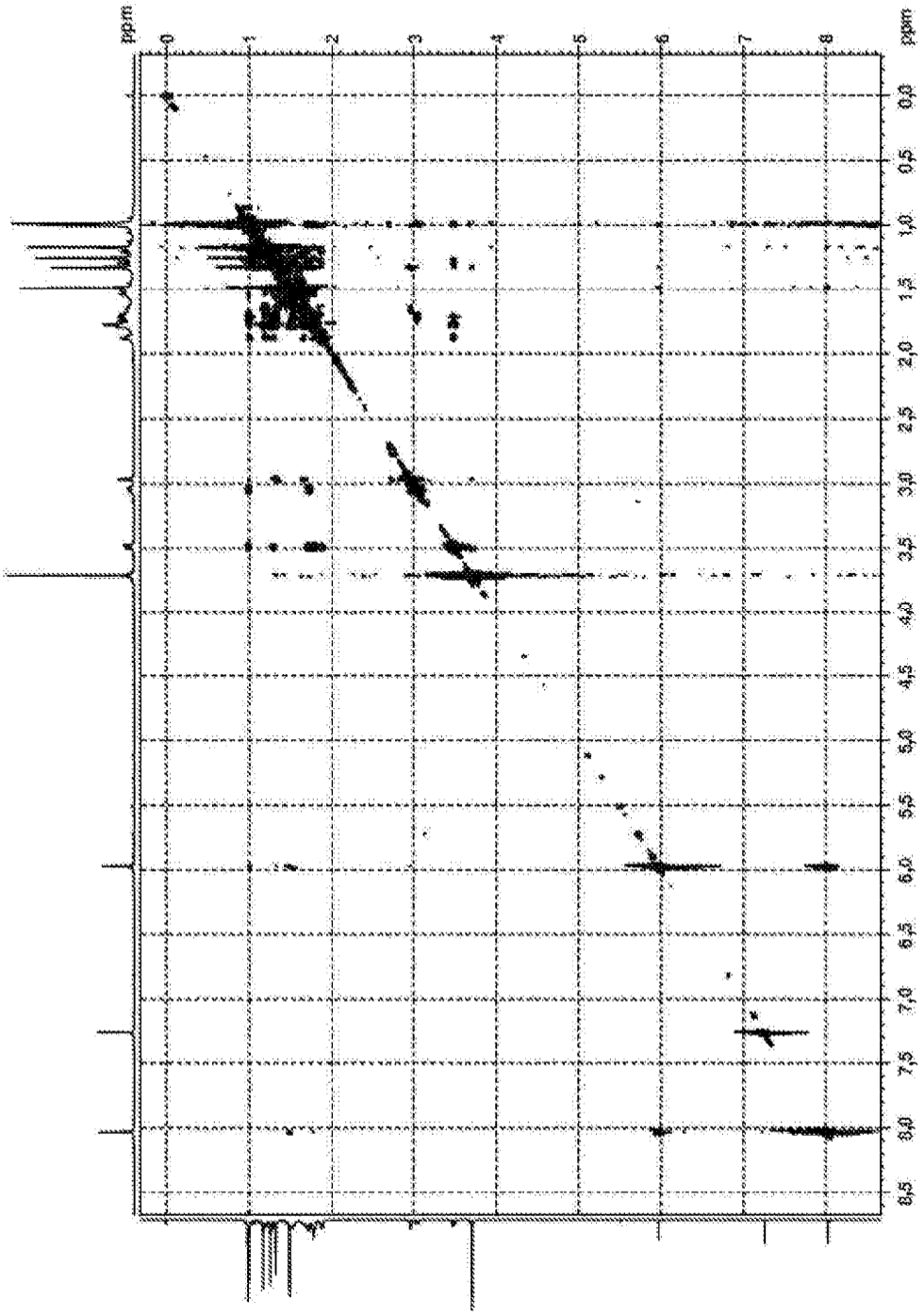
[Figura 1]



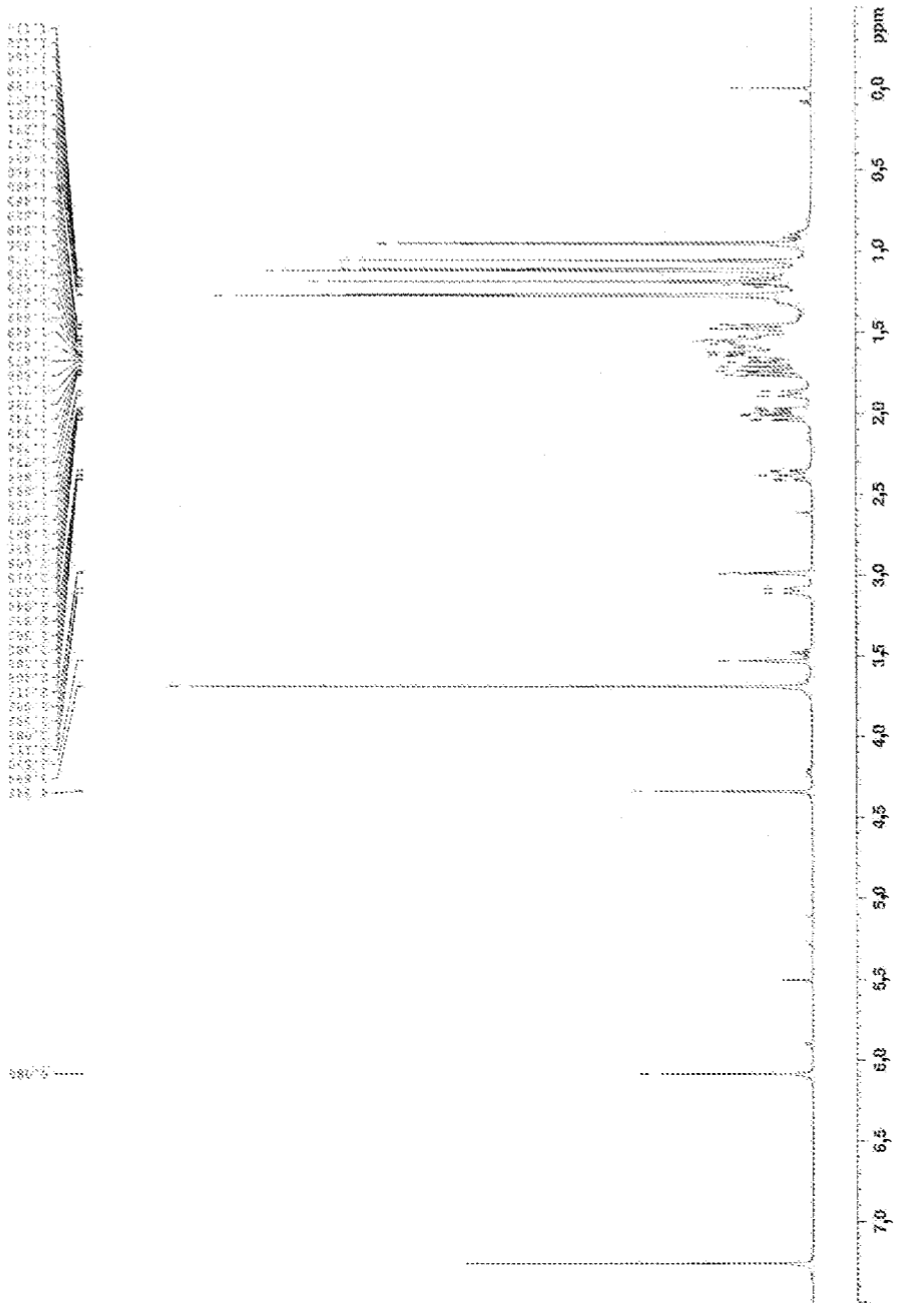
[Figura 2]


ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
ppm
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0
6,5
7,0
7,5
8,0
8,5

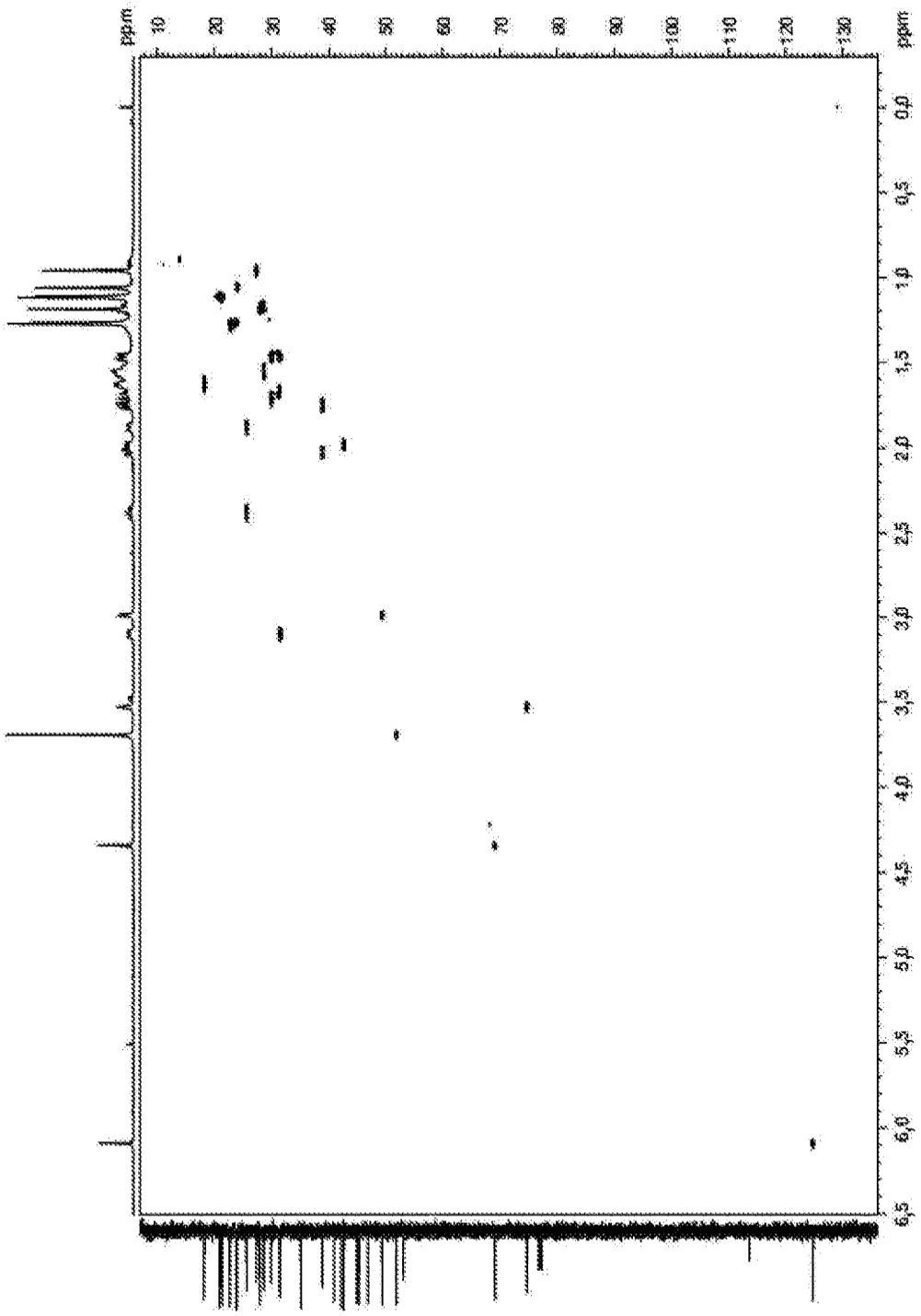
[Figura 3]


ppm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
ppm
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0
6,5
7,0
7,5
8,0
8,5

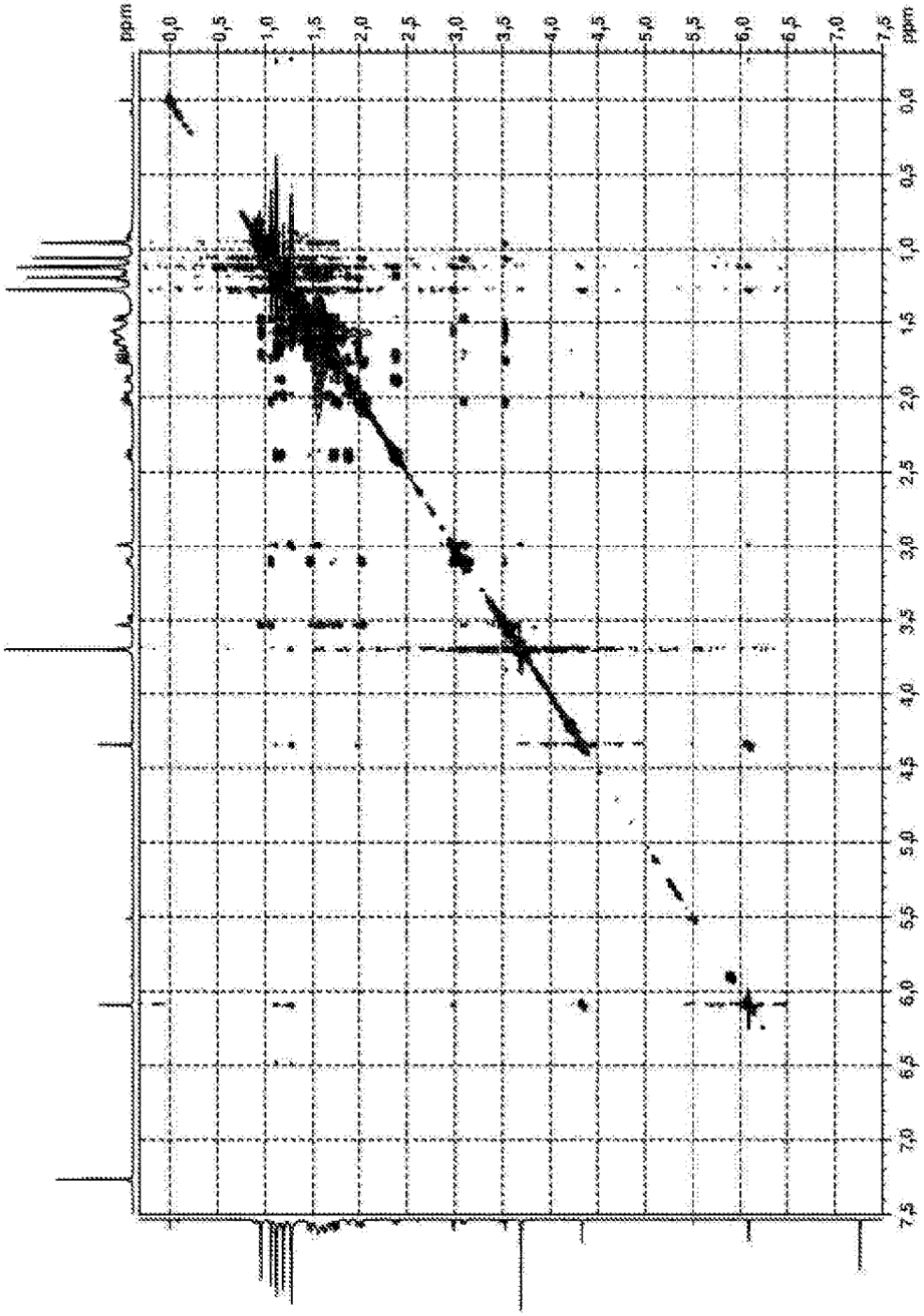
[Figura 4]



[Figura 5]


ppm
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
ppm
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0
6,5

[Figura 6]



[Figura 7]

SEQ ID NO: 1: Secuencia parcial de nucleótidos del ADNr 16S de SANK 70214

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACGTTTTTGAAGCTTGCTTTAAAAACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGCAACCTACCTTATCGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATCTAGCACCTCCTGGTGC
CGGATTGAAAGAGGGCTTCTTGCTCTCACGATGAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGAGAGGTAATGGCTCCCC
AAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA
GCTCTGTTATGAGGGAAGAACACGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTCATCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCT
TTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAGCGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTACAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGT
GTTAGGGGTTTCGATGCCCGTAGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTA
AGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTTGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCCAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTA
GGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGG
TGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

[Figura 8]

SEQ ID NO: 2: Secuencia parcial de nucleótidos del ADNr 16S de SANK 70314

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTT
CTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCT
TTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGC
AGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTT
TGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTT
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCT
CAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACC

[Figura 9]

SEQ ID NO: 3: Secuencia de ADN de la proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación

ATGAGTCATGCTGCGAACGTAAAAGAGAAAGTGTTAGGCTTTTTAAGTGGAAAAAGTGGAGAAAACCCGTTTCATTTATT
TGCTGAACTCCGAGATTTGGGATCGGTCGTCTCAATCCCTAACCCAATGGGTGATCCAAACAAAAATGCTTGGATGATCA
CTAAGATGGATACAGCAACAAAGGTTCTAAAGGATTCAAAACGGTTCACGGTTGATCCGGCATCGATTGAAAAGGAAAGT
GGATTTAGAGCGGAAATGGTTTCAGATCCAGATGATTCTCCCGATACCTTTTTTACAGGTAAGTCTATGGTTTTTATTGA
CGGTATTGATCATAAGCGATTGCGAATGCTCGTATCGAAAGCATTCACTCCGAAATATATGGAAGGGTTACGTCCTCGTA
TACAGGAAATAGCAGACGGTTTACTTGATCAAGTTGAATCAAAAGGTGAGATGGATCTTGTAAAAGATTACGCCTATCCT
CTACCGATTATTGTGATATCAGAAATGTTAGGAGTACCTAAAGAAGATCATGAAAATCTACAAATATGGTCATCGGCTAT
AGCTAAAGGCTTAGGCTGGGGGAAACAAGATCCAGCCGTGCAGCAGCATCTAAAAGATTTTGGAGATTACACAAAGAAGC
TTGTAGAAAAGAAAAGAGCTCATTTAGAGGATGATCTCATCAGCCAGCTGATCCAAATTGAAGAAGAGGGAGAACGTCTA
AGTGAAGAAGAGCTGATCTCGATGATTACACTTCTTATCTTTGCAGGGCATGAAACAACGTCTAACCTGATCGCTACAGG
TAGTATGATGTTATTTGACCACCCGGAGCAATTAAATAAATTAAAATCAAACCTAGATCTGGTACCAACTGCTGTTGAAG
AACTTCTGCGTTTTAACGGTCCTTCTACAACTGTAGGCCCACGTTTCGCAAAGGAAGATGTGAATATAGATGGACAAGAG
ATCAAAAAAGGAGATATGCTCCTTATCCTTGTTAAGTCAGCGAACCGAGATGAAGAAGTGTTCTCTGATTCCGAAGAATT
GGATGTCAGTCGTTCAATTCACCGACATTTAGCCTTTGGTTTTGGTATGCATATGTGCCTTGGAGCTCCTTTAGCTCGAG
TGGAAGGAGACGTCGCTTTTACAACGCTCTTAAAAAGGCTACCGAACATAGAGCTTAGTATTCCGCCTGAGGAAGTAAAG
TGGCAATTCACGCTCTCAACGCAAGGCCTTTCATCATTGCCCGTTTCATTCTAA

[Figura 10]

SEQ ID NO: 4: Secuencia de ADN de la proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación

ATGAAAACCGAAAGAGAAAACGGAATCGTCCGTCAAGTGAATACGATTCAAACAAAAGAAGAGCGCTTTAATCCTTTTTC
ATGGTATGAAGAGATGAGAAACAGCGCGCCTGTGCGATGGGATGAAGAAAGGCAGGTATGGGATGTTTTTCACTATGATG
GGGTCAAAGAAGTGCTGGAACAAAAAAATATTTTTTCTTCTGATCGAAGACCTCCACAAAACCAAAGACAAACTGCTCTA
GGAACGAGCCTAATTAATATTGATCCGCCTAAGCATGCTGAAATGAGAGCGCTTGTTAATAAAGCTTTTACGCCTAAAGC
AATGAAAGCATGGGAGCCTAAAATTGCGCGCATTACCGCTGAATTATTACAAGAAGTTGAGCATCTTGAAGATATTGATA
TAGTCGAGCATCTTTCCTATCCGCTTCCGGTTATGGTAATTGCCGATATTTTAGGCGTCCCGATAGAAGATCAGCGTCAG
TTTAAAGATTGGTCGGATATTATCGTAGCGGGTCCATCGAATAATGAACGTGAAACGCTCGAAAAATTGCAGCAAGAGAA
AATGAAAGCAAACGATGAGTTAGAAACTTACTTTTATCGAATCATTGAAGAAAAGCGCACGCAGCCAGGAGATGATATTA
TTTCCGTGCTTCTTCAAGCAAAAGAAGAAGGGAAGCAGCTAACGGATGAAGAAATCGTCGGGTTTTCCATTTTGCTGCTG
ATTGCAGGCAACGAAACAACCACGAACTTAATTTCAAATACGATTTATTGTTTAATGGAAGATAAAGCTTCTTTTGAACG
ACTCAAACGAGAAAAAGAACTTTTACCTTCTGCGATTGAAGAAGTTCTTCGCTATCGTTCACCCGTTCAGGCTCTTCACC
GAATCGTAAAAAAAGATGTGGTTCTTGCAGGGAAGAAATTAAAAGCGGGCGAACACGTCGTTCCATGGATGGGATCCGCG
CACCGAGATGCGCAGTATTTTGAAGACCCGGATGTATTTCAAATCGATCGAAAGCCAAATATCCATATGGCATTTGGAAG
AGGGATTCATTTTTGCTTAGGAGCACCGCTTGCTCGAATAGAAGCAAAAGTTATGCTGGCTGAACTGATTGACCGCTATC
CGCATATGGACTGGAGCCCGGCATTTGAGTTAAAGCCGATTGAAAGCACGTTTGTGTACGGGTTAGAAGAATTATTGATT
CGTAAACATGTATAA

[Figura 11]

SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de la proteína de SANK 70214 que tiene actividad de hidroxilación

MSHAANVKEKVLGFLSGKSGENPFHLFAELRDLGSVVSIPNPMGDPNKNAWMITKMDTATKVLKDSKRFTVDPASIEKES
GFRAEMVSDPDDSPDTFFTGKSMVFIDGIDHKRLRMLVSKAFTPKYMEGLRPRIQEIADGLLDQVESKGEMDLVKDYAYP
LPIIVISEMLGVPKEDHENLQIWSSAIAKGLGWGKQDPAVQQHLKDFGDYTKKLVEKKRAHLEDDLISQLIQIEEEGERL
SEEELISMITLLIFAGHETTSNLIATGSMMLFDHPEQLNKLKSNLDLVPTAVEELLRFNGPSTTVGPRFAKEDVNIDGQE
IKKGDMLLILVKSANRDEEVFSDSEELDVSRSIHRHLAFGFGMHMCLGAPLARVEGDVAFTTLLKRLPNIELSIPPEEVK
WQFTLSTQGLSSLPVSF

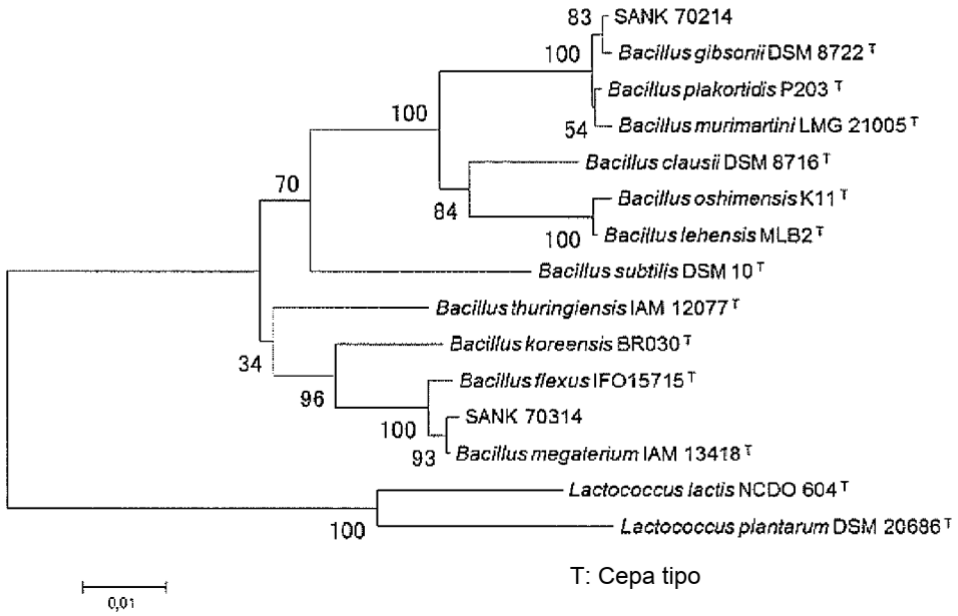
[Figura 12]

SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de la proteína de SANK 70314 que tiene actividad de hidroxilación

MKTERENGIVRQVNTIQTKEERFNPFSWYEEMRNSAPVRWDEERQVWDVFHYDGVKEVLEQKNIFSSDRRPPQNQRQTAL
GTSLINIDPPKHAEMRALVNKAFTPKAMKAWEPKIARITAELLQEVEHLEDIDIVEHLSYPLPVMVIADILGVPIEDQRQ
FKDWSDIIVAGPSNNERETLEKLQQEKMKANDELETYFYRIIEEKRTQPGDDIISVLLQAKEEGKQLTDEEIVGFSILLL
IAGNETTTNLISNTIYCLMEDKASFERLKREKELLPSAIEEVLRYRSPVQALHRIVKKDVVLAGKKLKAGEHVVPWMGSA
HRDAQVFEDPDVFQIDRKPNIHMAFGRGIHFCLGAPLARIEAKVMLAELIDRYPHMDWSPAFELKPIESTFVYGLEELLI
RKHV

[Figura 13]

Diagrama del análisis filogenético de SANK 70214 y SANK 70314



T: Cepa tipo