

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 383**

51 Int. Cl.:

C12P 33/02 (2006.01)

C12P 33/16 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07724138 .8**

96 Fecha de presentación: **11.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2004838**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de derivados de esteroides mediante la reducción de compuestos oxoesteroides o mediante la oxidación de compuestos hidroxiesteroides usando una hidroxiesteroide deshidrogenasa**

30 Prioridad:
11.04.2006 AT 6272006

45 Fecha de publicación de la mención BOP:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
**IEP GMBH (100.0%)
RHEINGAUSTRASSE 190-196
65203 WIESBADEN, DE**

72 Inventor/es:
**GUPTA, ANTJE;
TSCHENTSCHER, ANKE y
BOBKOVA, MARIA**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

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).

ES 2 389 383 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de derivados de esteroides mediante la reducción de compuestos oxoesteroides o mediante la oxidación de compuestos hidroxiesteroides usando una hidroxiesteroide deshidrogenasa

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos oxoesteroides, reduciéndose el compuesto oxoesteroide con una hidroxiesteroide deshidrogenasa en presencia de un cofactor NADH o NADPH.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la oxidación enzimática de compuestos hidroxiesteroides, oxidándose el compuesto hidroxiesteroide con una hidroxiesteroide deshidrogenasa en presencia de un cofactor NAD o NADP.

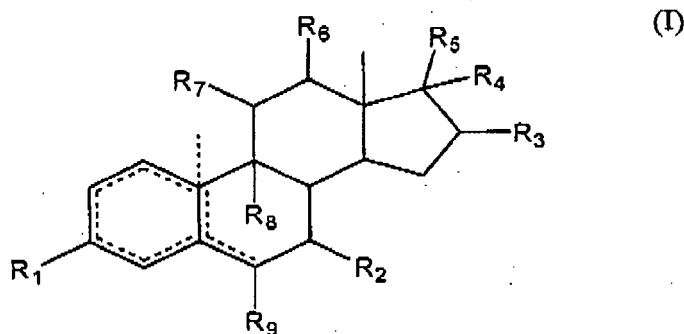
- 10 Los esteroides son compuestos que poseen el sistema anular de la colesteroína y que se diferencian en el número de enlaces dobles, el tipo, número y posición de grupos funcionales, número de grupos metilo, las cadenas de alquilo laterales y la configuración de los enlaces.

- 15 Los compuestos esteroides están presentes tanto en organismos animales como también en hongos y en plantas y presentan una variada actividad biológica, por ejemplo como hormonas sexuales masculinas y femeninas, como hormonas de las glándulas suprarrenales, como vitaminas, como ácidos biliares, como esteroide sapogeninas, como sustancias cardioactivas y como venenos de sapos.

Por compuestos oxoesteroides se entiende en adelante esteroides del tipo definido al principio, es decir, los que presentan al menos una función cetona, pudiendo ésta estar presente en el sistema anular o también en una cadena lateral situada en el esqueleto del esteroide.

- 20 Por compuestos hidroxiesteroides se entiende en adelante esteroides del tipo definido al principio, es decir, los que presentan al menos una función hidroxilo, pudiendo ésta estar presente en el sistema anular o también en una cadena lateral situada en el esqueleto del esteroide.

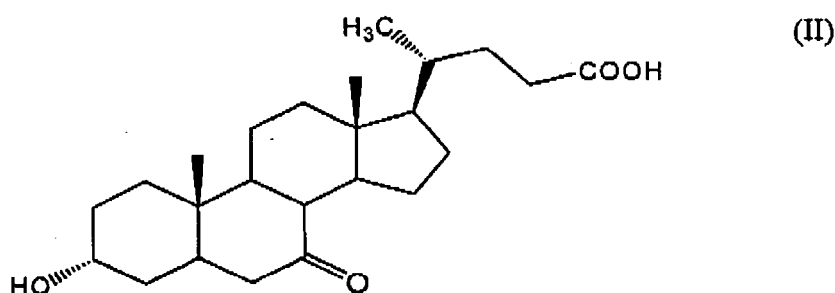
La presente invención se refiere a un procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos oxoesteroides de la fórmula general I



- 25 en la que
- R₁ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
- R₂ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
- R₃ representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,
- 30 R₄ representa hidrógeno o un grupo hidroxilo,
- R₅ representa hidrógeno, un resto -COR₁₀, en el que R₁₀ es un grupo alquilo C1-C4 no sustituido o sustituido con un grupo hidroxilo, o un grupo carboxialquilo C1-C4 sustituido o no sustituido,
- o R₄ y R₅ representan conjuntamente un grupo oxo,
- R₆ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
- 35 R₇ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
- R₈ representa hidrógeno, un grupo metilo o un haluro, y
- R₉ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un haluro,
- siendo al menos uno de R₁, R₂, R₄ + R₅, R₆, R₈ o R₉ un grupo oxo o R₅ un resto -COR₁₀ y el elemento estructural



representa un anillo de benceno o un anillo C6 con 0, 1 o 2 enlaces dobles C-C,
o la fórmula II (ácido cetolítico)



5

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la oxidación enzimática de compuestos hidroxisteroides de la fórmula general I o de los que son derivados de los ácidos biliares tales como ácido cólico, ácido quenodeoxicólico, ácido 12-oxocólico, ácido 3-hidroxi-12-oxocólico, ácido cetolítico o ácido litocólico, oxidándose el compuesto hidroxisteroide con una hidroxisteroide deshidrogenasa en presencia de un cofactor NAD o NADP.

10

Debido a las variadas actividades fisiológicas de los esteroides es evidente que los compuestos y derivados esteroides se usan también en medicina en un gran número como sustancias terapéuticamente activas y medicamentos.

15

De este modo, por ejemplo, se usan ampliamente a escala mundial derivados de gestágeno y de estrógeno como anticonceptivos; los andrógenos (testosterona) se usan como anabólicos y antiandrógenos, por ejemplo en la terapia de carcinoma de próstata. Los glucocorticoides (cortisona, cortisol, prednisolona y prednisona) y sus derivados, debido a su actividad antiflogística, antialérgica e inmunosupresora, se usan ampliamente en el tratamiento terapéutico de enfermedades de la piel, enfermedades reumáticas, reacciones alérgicas, enfermedades renales, enfermedades gastrointestinales y muchos otros trastornos.

20

El mercado mundial de compuestos esteroides biológicamente activos es inmenso. En la producción de distintos derivados esteroides con diferentes actividades, las biotransformaciones tienen un papel grande. A este respecto son de importancia las reacciones particulares que están catalizadas por hidroxilasas y por deshidrogenasas. Tienen un papel particular, a este respecto, la deshidrogenación 1-delta, la reducción 11-beta, la reducción 20-beta, la reducción 17-beta, las reducciones estereoselectivas en la posición 3 y 7, pero también las oxidaciones de grupos hidroxilo, en particular en las posiciones 3, 7, 12 y 17.

25

Industrialmente se han realizado hasta la fecha biorreducciones de esteroides exclusivamente con células completas intactas y en concentraciones de sustrato muy inferiores a 10 g/l. Esto es debido, por una parte, a que las enzimas responsables de las biotransformaciones, hasta la fecha, ni se han caracterizado ni son expresables y, por otra parte, también a que no se ha propuesto ninguna solución tecnológica satisfactoria que solucione, por una parte, el problema de la reducida solubilidad de los esteroides en medio acuoso y, por otra parte, el problema de la regeneración de los cofactores NADH y NADPH en una medida suficiente.

30

Hasta la fecha se han realizado oxidaciones de esteroides a escala industrial químicamente.

De 1975 a 1988 se han descrito enayos de reducción enantioselectiva de esteroides con enzimas aisladas, esencialmente por G. Carrea (Eur. J. Biochemistry 44, 1974 p. 401-405; Biotechnology and Bioengineering, Vol 17, 1975, p. 1101-1108; Enzyme Microb. Technol. Vol 6, julio, 1984, p. 307-311; Biotechnology and Bioengineering, Vol 26, 1984, p. 560-563; J. Org. Chem. 51, 1986, p. 2902-2906; J. Org. Chem. 58, 1993, p. 499-501; J. Org. Chem., 53, 1988, p. 88-92; Enzyme Microb. Technol., Vol 10, junio, p. 333-339; Archives of Biochemistry and Biophysics, 159, 1973, p. 7-10).

35

A este respecto se usaron distintas hidroxisteroide deshidrogenasas (HSHD), lográndose la regeneración del cofactor NADH esencialmente mediante el acoplamiento con las enzimas lactato deshidrogenasa, formiato deshidrogenasa o también alcohol deshidrogenasa de levadura. La regeneración de NADP se realizó usando

40

glucosa deshidrogenasa. Para superar los problemas de solubilidad se llevaron a cabo ensayos en un sistema bifásico con acetato de etilo y acetato de butilo como fase orgánica. También con enzimas aisladas en el sistema bifásico se trabajó, a este respecto, en intervalos de concentraciones que eran muy inferiores a 10 g/l, siendo los "números de recambio totales" (NRT = moles de compuesto oxoesteroide reducido / moles de cofactor usado) también muy inferiores a 1000, por lo que estos procesos no representan ninguna ventaja económica en comparación con procedimientos de célula completa.

Además existen trabajos en los que se lleva a cabo la conversión de grupos hidroxilo de 7 alfa a 7 beta mediante acoplamiento de oxidación y reducción. Esto se logró mediante acoplamiento de 7 α HSDH y 7 β HSDH (Pedrini y col., Steroids 71 (2006) p 189-198). También en estos procedimientos se trabajó en intervalos de concentraciones muy inferiores a 10 g/l y los "números de recambio totales" (NRT = moles de compuesto oxoesteroide reducido / moles de cofactor usado) logrados fueron inferiores a 100, por lo que estos procesos tampoco son económicamente relevantes.

La invención tiene por objeto evitar estas desventajas y dificultades y tiene el objetivo de proporcionar un procedimiento que posibilite la reducción enantioselectiva o la oxidación de compuestos oxoesteroides o compuestos hidroxiesteroides con conversiones más elevadas, en intervalos de concentraciones más altos y con NRT de cofactores más altos y, con ello, de modo más económico.

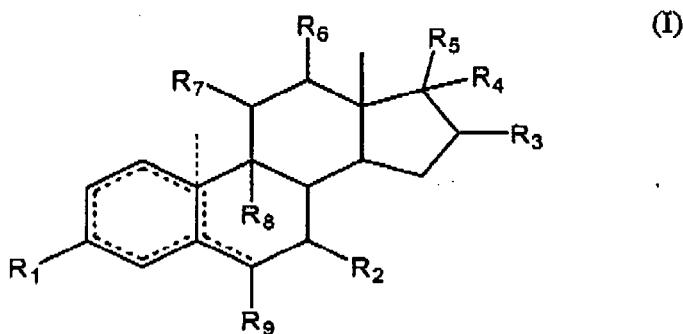
Este objetivo se logra mediante un procedimiento del tipo mencionado al principio en el que

a) el compuesto oxoesteroide está presente en la preparación de reacción en una concentración ≥ 50 g/l,

b) el cofactor NAD o NADP oxidado formado mediante la hidroxiesteroide deshidrogenasa se regenera continuamente mediante la oxidación de un alcohol secundario de la fórmula general $R_X R_Y \text{CHOH}$, en la que R_X , R_Y independientemente uno de otro representan alquilo C1-C8 ramificado o no ramificado y $C_{\text{total}} \geq 3$, o mediante la oxidación de un cicloalcanol C4-C6, y

c) para la oxidación del alcohol secundario de la fórmula general $R_X R_Y \text{CHOH}$ o del cicloalcanol se usa una oxidorreductasa/alcohol deshidrogenasa adicional,

usándose como compuesto oxoesteroide un compuesto de la fórmula general I



en la que

R_1 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R_2 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R_3 representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,

R_4 representa hidrógeno o un grupo hidroxilo,

R_5 representa hidrógeno, un resto $-\text{COR}_{10}$, en el que R_{10} es un grupo alquilo C1-C4 sustituido con un grupo hidroxilo o no sustituido, o un grupo carboxialquilo C1-C4 sustituido o no sustituido,

o R_4 y R_5 representan conjuntamente un grupo oxo,

R_6 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R_7 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

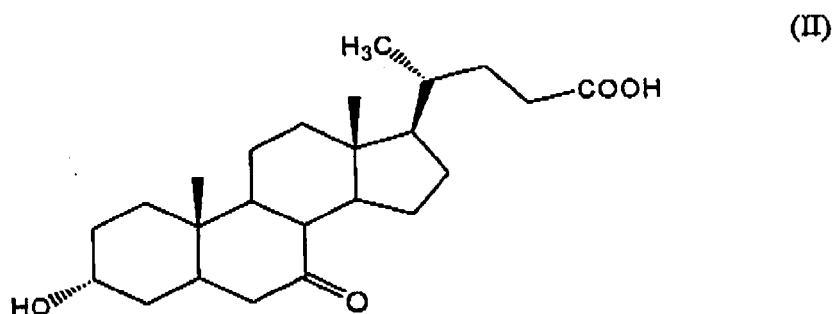
R_8 representa hidrógeno, un grupo metilo o un haluro, y

R_9 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un haluro,

siendo al menos uno de R_1 , R_2 , R_4+R_5 , R_6 , R_8 o R_9 un grupo oxo o R_5 es $-\text{COR}_{10}$ y el elemento estructural



representa un anillo de benceno o un anillo C6 con 0, 1 o 2 enlaces dobles C-C,
o de la fórmula II (ácido cetolítico)



- 5 El objetivo mencionado anteriormente se logra también mediante un procedimiento del tipo mencionado al principio, en el que
- a) el compuesto hidroxiesteroide está presente en la preparación de reacción en una concentración ≥ 50 g/l,
- b) el cofactor NADH o NADPH reducido formado usando la hidroxiesteroide deshidrogenasa se regenera continuamente mediante la reducción de un compuesto cetona de la fórmula general $R_X R_Y CO$, en la que R_X , R_Y independientemente uno de otro representan alquilo C1-C8 ramificado o no ramificado y $C_{total} \geq 3$, o mediante la reducción de una cicloalcanona C4-C6, y
- 10 c) para la oxidación del compuesto cetona de la fórmula general $R_X R_Y CO$ o de la cicloalcanona se usa una oxidorreductasa/alcohol deshidrogenasa adicional, usándose como compuesto hidroxiesteroide los derivados de ácido biliar, ácido cólico, ácido quenodeoxicólico, ácido 12-oxocólico, ácido 3-hidroxi-12-oxocólico, ácido cetolítico o ácido litocólico o un compuesto de la fórmula general I en la que
- 15 R_1 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
 R_2 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,
 R_3 representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,
 R_4 representa hidrógeno o un grupo hidroxilo,
- 20 R_5 representa hidrógeno, un resto $-COR_{10}$, en el que R_{10} es un grupo alquilo C1-C4 sustituido con un grupo hidroxilo o no sustituido, o un grupo carboxialquilo C1-C4 sustituido o no sustituido,
o R_4 y R_5 representan conjuntamente un grupo oxo,
 R_6 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,
 R_7 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,
- 25 R_8 representa hidrógeno, un grupo metilo o un haluro, y
 R_9 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un haluro,
siendo al menos uno de R_1 , R_2 , R_4 , R_6 , R_7 , R_8 o R_9 un grupo hidroxilo y el elemento estructural



representa un anillo de benceno o un anillo C6 con 0, 1 o 2 enlaces dobles C-C.

- 30 La presente invención representa una mejora esencial de la reacción de reducción y oxidación enzimática enantioselectiva en el esqueleto esteroide frente al estado de la técnica. La presente invención posibilita la reducción u oxidación de compuestos oxoesteroides para dar los hidroxi- u oxoesteroides correspondientes con enzimas libres en intervalos de concentraciones que exceden ampliamente los descritos en el estado de la técnica.

En el procedimiento según la invención se usa como cofactor NADH o NADPH. Por la abreviatura "NADP" se entiende nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, por "NADPH" se entiende nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida. La abreviatura "NAD" significa nicotinamida adenina dinucleótido, la abreviatura "NADH" significa nicotinamida adenina dinucleótido reducida.

- 5 Preferentemente, como alcohol secundario de la fórmula general R_xR_yCHOH se usa 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 5-metil-2-hexanol o 2-octanol y como cicloalcohol se usa ciclohexanol.

- 10 Preferentemente, como cetona de la fórmula general R_xR_yCO se usa acetona, 2-butanona, 2-pentanona, 4-metil-2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 5-metil-2-hexanona o 2-octanona y como cicloalcanona se usa ciclohexanona.

La cetona de la fórmula general R_xR_yCO o la cicloalcanona C4-C6 y el alcohol secundario de la fórmula general R_xR_yCHOH o el cicloalcohol C4-C6 se indican en delante de forma resumida con el término general cosustrato.

- 15 Preferentemente, el procedimiento según la invención se lleva a cabo en un sistema bifásico orgánico acuoso. A este respecto, el cosustrato usado para la regeneración de coenzimas no se puede mezclar con agua adecuadamente y forma por lo tanto la fase orgánica del sistema bifásico orgánico acuoso.

Según otra forma de realización, en el procedimiento se usa adicionalmente un disolvente orgánico que no participa en la regeneración del cofactor, tal como, por ejemplo, dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.

Preferentemente, el NRT del procedimiento según la invención es $\geq 10^3$.

- 20 Además, se reduce o se oxida respectivamente preferentemente al menos el 50 % de los compuestos oxoesteroides o hidroxiesteroides respectivamente dentro de un periodo de 2 a 96 h dando los compuestos hidroxiesteroides o los compuestos oxoesteroides respectivamente.

- 25 Se caracterizan formas de realización preferentes del procedimiento según la invención porque como compuesto oxoesteroide se usan, por ejemplo, ácido cetolítico (fórmula II), dexametasona (fórmula III), 4-androsten-3,17-diona (fórmula IV), 1,4-androstadien-3,17-diona (fórmula V), estrona (fórmula VI), pregnenolona (fórmula VII) y cortisona (fórmula VIII).

- 30 Además, se caracterizan formas de realización preferentes del procedimiento según la invención porque como compuestos hidroxiesteroides se usan por ejemplo distintos derivados de ácidos biliares tales como ácido cólico, ácido quenodeoxicólico, ácido 12-oxocólico, ácido 3-hidroxi-12-oxocólico, ácido cetolítico, ácido litocólico o también hidro cortisona.

- 35 Por hidroxiesteroide deshidrogenasas se entiende en general las enzimas que son capaces de catalizar la reducción de grupos cetona dando grupos hidroxilo o la oxidación de grupos hidroxilo dando los grupos cetona correspondientes en el esqueleto del esteroide. La oxidación o la reducción puede realizarse a este respecto en el sistema anular del esteroide mismo (por ejemplo 7- α hidroxiesteroide deshidrogenasas) o también en restos carbohidrato del esqueleto principal del esteroide (por ejemplo 20- β hidroxiesteroide deshidrogenasas).

Hidroxiesteroide deshidrogenasas adecuadas para la reducción de compuestos oxoesteroides son, por ejemplo, 3- α hidroxiesteroide deshidrogenada (HSDH), 3 β HSDH, 12 α HSDH, 20 β HSDH, 7 α HSDH, 7 β HSDH, 17 β HSDH y 11 β HSDH.

- 40 Una 3- α hidroxiesteroide deshidrogenasa adecuada se puede obtener, por ejemplo, de *Pseudomonas testosteroni* (J. Biol. Chem. 276 (13), 9961-9970 (2001)) y puede usarse para la oxidación de 3- α -hidroxiesteroides o para la reducción de 3-cetoesteroides, tales como, por ejemplo, ácido 3-cetobiliar, progesterona, 4-androsten-3-17-diona, 5- α -androstan-3,17-diona, etc.

- 45 Se pueden obtener enzimas adecuadas con actividad de 3- β hidroxiesteroide deshidrogenasa, por ejemplo, de *Clostridium innocuum* (Applied and Environmental Microbiology, June 1989, p. 1656-1659) o de *Pseudomonas testosteroni* y pueden usarse para la oxidación de 3- β -hidroxiesteroides o para la reducción de 3-cetoesteroides, tales como, por ejemplo, ácido 3-cetobiliar, progesterona, 4-androsten-3-17-diona, 5- α -androstan-3,17-diona, etc.

- 50 Se puede obtener una 12 α HSDH, por ejemplo, de clostridios (Eur. J. Biochem. 196 (1991) 439-450) y puede usarse para la oxidación de 12 α -hidroxiesteroides (por ejemplo, ácido cólico) o para la reducción de 12-cetoesteroides, como por ejemplo de ácido 12-ceto-biliar (ácido 12-cetokenodeoxicólico, ácido dehidrocólico). También se describen enzimas con actividad de 12- β hidroxiesteroide deshidrogenasa de clostridios (Biochim. Biophys. Acta 1988 Oct. 14; 962(3): 362-370).

- 55 Se pueden obtener enzimas con actividad de 20- β hidroxiesteroide deshidrogenasa, por ejemplo, de organismos del grupo de los *estreptomicas* (The Journal of Biological Chemistry, 1977, Vol 252 N° 1, enero 10, 205-211) y pueden usarse para la reducción de cortisona y derivados de cortisona (cortisona, cortisol, cortexolona, progesterona) para dar los 20- β hidroxiesteroides correspondientes (por ejemplo, 20- β hidroxiprogesterona).

Se pueden obtener enzimas correspondientes con actividad de 20- α hidroxisteroide deshidrogenasa, por ejemplo, de clostridios, en particular de *Clostridium scindens* (Journal of Bacteriology, junio 1989, p. 2925-2932) y de *Tetrahymena pyriformis* (Biochem.J. (1994) 297, 195-200).

5 Se pueden obtener 7- α hidroxisteroide deshidrogenasas, entre otros, de organismos de la flora intestinal, como por ejemplo de clostridios (*Clostridium absonum*, *Clostridium sordellii*) (Journal of Bacteriology, agosto 1994, p. 4865-4874), de *Escherichia coli* (Journal of Bacteriology, abril, 1991, p. 2173-2179), de *Bacteroides fragilis* (Current Microbiology, Vol 47 (2003) 475-484), *Brucella*, *Eubacterium* y pueden usarse para la oxidación de 7- α hidroxisteroides (ácido quenolítico) o para la reducción de 7-cetosteroides, tales como, por ejemplo, ácidos 7-cetobiliares (ácido cetolítico).

10 También se han descrito enzimas correspondientes con actividad de 7- β hidroxisteroide deshidrogenasa de clostridios, de microorganismos de la familia de los ruminococos (J. Biochemistry 102, 1987, p. 613-619) o de los peptostreptococos (Biochimica and Biophysica Acta 1004, 1989, p. 230-238), de *Eubacterium aerofaciens* (Applied and Environmental Microbiology, mayo 1982, p. 1057-1063) y de *Xanthomonas maltophilia* (Pedrini y col, Steroids 71(2006) p 189-198). Por medio de una 7- β HSDH puede prepararse, por ejemplo, ácido ursodesoxicólico a partir de
15 ácido cetolítico.

Las 17- β hidroxisteroide deshidrogenasas son conocidas de hongos tales como *Cylindrocarpon radicola* (J. Biochemistry 103, 1988, 1039-1044) y *Cochliobolus lunatus* (J. Steroid Biochem. Molec. Biol. Vol 59, 1996, N° 2, p. 205-214), de bacterias de la familia de los estreptococos (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, vol. 356, 1975, 1843-1852), pseudomonas (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252 N° 11, junio 10, 1977, p. 3775-3783) y
20 alcaligenes (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 260, N° 25, noviembre 5, 1985, p. 13648-13655).

Las 17- β hidroxisteroide deshidrogenasas pueden usarse, por ejemplo, para la oxidación de 17- β -hidroxisteroides o para la reducción de 17-cetosteroides, como por ejemplo de 4-androsten-3,17-diona, androsterona, estrona.

Se ha descrito una enzima correspondiente con actividad de 17- α hidroxisteroide deshidrogenasa de *Eubacterium* sp. (Journal of Lipid Research, Vol. 35, 1994, p. 922-929).

25 Se conocen 11- β hidroxisteroide deshidrogenasas de mamíferos superiores y pueden usarse, por ejemplo, para oxidar cortisol dando cortisona.

No obstante, también puede usarse otra oxidorreductasa como hidroxisteroide deshidrogenasa que catalice oxidaciones o reducciones en el esqueleto del esteroide.

30 Alcohol deshidrogenasas secundarias adecuadas para la regeneración del NADH o NAD, por ejemplo usando las 17- β hidroxisteroide deshidrogenasas de *Pseudomonas testosteroni*, las 3- β hidroxisteroide deshidrogenasas de *Clostridium innocuum* o las 7- α hidroxisteroide deshidrogenasas de *Bacteroides fragilis*, son las que se han descrito anteriormente y se aíslan de levaduras de los géneros Candida y Pichia, tales como, por ejemplo: carbonil reductasa de *Candida parapsilosis* (CPCR) (documentos US 5.523.223 y US 5.763.236; Enzyme Microb. Technol. 1993 noviembre; 15(11):950-8), *Pichia capsulata* (documento DE 10327454.4), *Pichia farinosa* (documento A 1261/2005, KI. C12N), *Pichia finlandica* (documento EP 1179595 A1), *Candida nemodendra* (documento A 1261/2005, KI. C12N), *Pichia trehalophila* (documento A 1261/2005, KI. C12N), *Rhodotorula mucilaginosa* (documento A 1261/2005, KI. C12N), *Lodderomyces elongisporus* (documento A 1261/2005, KI. C12N) y *Pichia stipidis* (documento A 261/2005, KI. C12N)

40 Además, también puede realizarse la regeneración del NADH con alcohol deshidrogenasas / oxidorreductasas secundarias, tal como se ha descrito, y se aíslan de bacterias de la clase de las actinobacterias, por ejemplo de *Rhodococcus eiythropolis* (documento US 5.523.223), *Norcardia fusca* (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), páginas 1721-1729; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003 septiembre; 62(4):380-6, Epub 2003 abril 26), *Rhodococcus ruber* (J. Org. Chem. 2003 enero 24; 68(2):402-6.) o *Microbacterium spec.* (documento A 1261/2005, KI. C12N).

45 Alcohol deshidrogenasas / oxidorreductasas secundarias adecuadas para la regeneración del NADPH o del NADP, por ejemplo en el uso de 12- α hidroxisteroide deshidrogenasas de *Clostridium paraputrificum*, de 17- α hidroxisteroide deshidrogenasas de *Eubacterium* sp. o de 7- α hidroxisteroide deshidrogenasas de *Clostridium sordelli*, son tan como se ha descrito, y se aíslan de organismos del orden de los lactobacilares (*Lactobacillus kefir* (documento US 5.200.335), *Lactobacillus brevis* (documento DE 19610984 A1; Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2000 diciembre; 56 Pt 12:1696-8), *Lactobacillus minor* (documento DE 10119274), *Leuconostoc carnosum* (documento A 1261/2005, KI. C12N) o los de, tal como se describe, *Thermoanaerobium brockii*, *Thermoanaerobium ethanolicus* o *Clostridium beijerinckii*.

55 Tanto las enzimas, hidroxisteroide deshidrogenasas como las oxidorreductasa / alcohol deshidrogenasas usadas se sobreexpresan de forma recombinante preferentemente en *Escherichia coli*. En el procedimiento según la invención pueden usarse tanto las enzimas, hidroxisteroide deshidrogenasas como las oxidorreductasa / alcohol deshidrogenasas bien totalmente purificadas, bien parcialmente purificadas o bien contenidas en células. A este respecto, las células usadas pueden estar presentes en forma nativa, permeabilizadas o lisadas.

Por cada kg de compuesto oxoesteroide o compuesto hidroxisteroide que se desea transformar se usan de 50.000 a 10 millones de unidades de hidroxisteroide deshidrogenasas y de 50.000 a 10 millones de unidades de alcohol deshidrogenasas (abierto por arriba).

La unidad de enzima 1 U corresponde, a este respecto, a la cantidad de enzima de hidroxisteroide deshidrogenada necesaria para transformar 1 μmol de compuesto oxosteroide por minuto (min) o a la cantidad de enzima de alcohol deshidrogenasa necesaria para oxidar 1 μmol de 2-alcohol por minuto (min).

- 5 De forma análoga, por cada kg de compuesto oxosteroide o de compuesto hidroxisteroide se usan aproximadamente de 10 g a 500 g de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la hidroxisteroide deshidrogenada y de 10 g a 500 g de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la alcohol deshidrogenasa / oxidoreductasa (abierto por arriba).

La regeneración de NAD(P)H se realiza en los ejemplos descritos de forma acoplada a enzima.

- 10 La reacción del compuesto oxosteroide o del compuesto hidroxisteroide se realiza en el procedimiento según la invención preferentemente en el sistema bifásico que contiene un compuesto 2-alcohol o un compuesto cetona para la regeneración del cofactor, una hidroxisteroide deshidrogenasa, una alcohol deshidrogenasa, agua, cofactor y el compuesto oxosteroide o compuesto hidroxisteroide. Además, pueden estar presentes también disolventes orgánicos adicionales que no participan en la regeneración del cofactor, es decir, que no contienen ningún grupo hidroxilo oxidable o ningún grupo cetona reducible por la alcohol deshidrogenasa usada.

- 15 La proporción de componentes orgánicos no miscibles con agua del sistema bifásico puede ser a este respecto de entre el 10 % y el 90 %, preferentemente del 20 % al 80 %, con relación al volumen total de la preparación de reacción. La proporción acuosa puede ser del 90 % al 10 %, preferentemente del 80 % al 20 %, con relación al volumen total de la preparación de reacción.

- 20 Se puede añadir un tampón al agua, por ejemplo, un tampón de fosfato de potasio, de Tris/HCl, de glicina o de trietanolamina con un valor del pH de 5 a 10, preferentemente de 6 a 9. El tampón puede contener adicionalmente además iones para estabilizar o activar las enzimas, por ejemplo iones de magnesio o iones de cinc.

Además, en el procedimiento según la invención pueden usarse también otros aditivos para estabilizar la enzima hidroxisteroide deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, tales como, por ejemplo, glicerina, sorbitol, 1-4-DL-ditiotreitol (DTT) o dimetilsulfóxido (DMSO).

- 25 La concentración del cofactor NAD(P)H, con respecto a la fase acuosa, es de 0,001 mM a 10 mM, en particular de 0,01 mM a 1,0 mM. La temperatura puede ser, en función de las propiedades especiales de la enzima usada, de 10 °C a 70 °C, preferentemente de 20 °C a 35 °C.

- 30 El NRT (número de recambio total = moles de compuesto oxosteroide reducidos / moles de cofactor usados) logrado en el procedimiento según la invención puede encontrarse, a este respecto, en el intervalo de 10^2 a 10^5 , generalmente es preferente un NRT $\geq 10^3$.

- 35 Los compuestos oxosteroides que se desean reducir o compuestos hidroxisteroides son generalmente poco solubles en agua. El sustrato puede estar presente durante la reacción totalmente o también no totalmente disuelto. Si el sustrato no está totalmente disuelto en la mezcla de reacción, una parte del sustrato está presente en forma sólida y puede formar una tercera fase sólida. La mezcla de reacción puede formar durante la reacción también temporalmente una emulsión.

El compuesto oxosteroide que se desea reducir o el compuesto hidroxisteroide que se desea oxidar se usa en el procedimiento según la invención en cantidades ≥ 50 g/l, con respecto al volumen total de la preparación de reacción. Preferentemente se usan entre 50 g/l y 400g/l de compuesto oxosteroide / compuesto de hidroxisteroide, de modo particularmente preferente de entre 50 g/l y 200 g/l.

- 40 Los disolventes orgánicos adicionales preferentes que no participan en la regeneración del cofactor son, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de butilo, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, heptano, hexano, tolueno, diclorometano o ciclohexano o sus mezclas de distintas composiciones.

- 45 La regeneración del NAD(P)H se logra mediante la oxidación de alcoholes secundarios de la fórmula general $R_XR_Y\text{CHOH}$ o cicloalcanoles C4-C6. A este respecto, como productos de reacción se producen cetonas de la fórmula general $R_XR_Y\text{C=O}$ o cicloalcanonas C4-C6. Alcoholes secundarios preferentes son, a este respecto, 2-alcoholes alifáticos tales como, por ejemplo, isopropanol, 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol, 4-metil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol y alcoholes secundarios cíclicos tales como ciclohexanol, ciclopentanol.

- 50 La regeneración del NAD(P) se logra mediante la reducción de compuestos cetona de la fórmula general $R_XR_Y\text{CO}$ o de cicloalcanonas C4-C6. A este respecto, como productos de reacción se producen alcoholes secundarios de la fórmula general $R_XR_Y\text{CHOH}$ o cicloalcanoles C4-C6. A este respecto, compuestos cetona preferentes son cetonas tales como, por ejemplo, acetona, 2-butanona, 2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-octanona, 4-metil-2-pentanona, 5-metil-2-hexanona y cetonas cíclicas tales como ciclohexanona, ciclopentanona.

- 55 El procedimiento según la invención se lleva a cabo, por ejemplo, en un recipiente de reacción de vidrio o metal. Para ello se transfieren los componentes individualmente al recipiente de reacción y se agita en una atmósfera de, por ejemplo, nitrógeno o aire. Según el compuesto oxosteroide usado el tiempo de reacción es de 1 hora a 96 horas, en particular de 2 horas a 48 horas. En este tiempo, el compuestos oxosteroide se reduce al menos en un 50 % dando el hidroxisteroide correspondiente o el hidroxisteroide se oxida dando el compuesto oxosteroide.

A continuación se explicará la invención con más detalle por medio de los ejemplos.

Ejemplos:

1. Reducción de androsten-3,17-diona para dar 17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona)

A) Sistema bifásico con 4-metil-2-pentanol para la regeneración de coenzima

- 5 Para la síntesis de 17 β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona) se añaden a 0,5 ml de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contienen 0,1 mg de NAD, 30 unidades de 17-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Pseudomonas testosteroni* (J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44 (2), 133-139 (1993), Pubmed P19871) y 50 unidades de alcohol deshidrogenada recombinante de *Pichia capsulata* (documento DE-A 103 27 454), 100 mg de androsten-3,17-diona disueltos en 0,4 ml de 4-metil-2-pentanol. La mezcla se incubaba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de androsten-3,17-diona en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Al finalizar la reacción la mezcla de reacción se puede procesar, por ejemplo, extrayendo la mezcla de reacción con un disolvente orgánico y eliminando a continuación el disolvente mediante destilación.

- 15 Después de 24 h ha reaccionado aproximadamente el 94 % de la androsten-3,17-diona dando 17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona).

El seguimiento de la reacción de androsten-3,17-diona para dar 17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona) se realiza mediante cromatografía de gases. Para ello se usó un cromatógrafo de gases GC-17A de Shimadzu con una columna de separación quiral de Lipodex E, 12m (Machery-Nagel, Düren, Alemania), detector de ionización de llama y helio como gas portador.

20 B) Sistema bifásico con acetato de butilo y 2-propanol para la regeneración de coenzimas

- Para la síntesis de 17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona) se añaden a 0,5 ml de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contienen 0,1 mg de NAD, 30 unidades de 17-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Pseudomonas testosteroni* (J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44 (2), 133-139 (1993), Pubmed P19871) y 50 unidades de alcohol deshidrogenada recombinante de *Pichia cupsulata* (documento DE-A 103 27 454), 100 mg de androsten-3,17-diona disueltos en 0,3 ml de acetato de butilo y 0,1 ml de 2-propanol. La mezcla se incubaba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de androsten-3,17-diona en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Al finalizar la reacción la mezcla de reacción se puede procesar, por ejemplo, extrayendo la mezcla de reacción con un disolvente orgánico y eliminando a continuación el disolvente mediante destilación.

- 30 Después de 24 h ha reaccionado aproximadamente el 90-95 % de la androsten-3,17-diona usada dando 17-β-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona).

2. Reducción de ácido cetolítico para dar ácido quenolítico

A) Regeneración de coenzima con ADH de *Thermoanaerobium brockii* / sistema bifásico

- 35 Para la síntesis de ácido 3α-7α-dihidroxi-5-β-cólico (ácido quenodeoxicólico) se añaden a 0,2 ml de tampón (tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH = 8,5, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contiene 0,1 mg de NADP, 10 unidades de 7-α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Clostridium scindens* (Pubmed AAB61151) y 10 unidades de alcohol deshidrogenada recombinante de *Thermoanaerobium brockii*, 100 mg de ácido 3α-hidroxi-7-oxo-5-β-cólico (ácido cetolítico) en 0,5 ml de metilpentanol. La mezcla se incubaba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de ácido cetolítico en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Después de 24 h ha reaccionado el 90-98 % del ácido cetolítico dando ácido quenodeoxicólico.

El seguimiento de la reacción de ácido cetolítico para dar ácido quenodeoxicólico se realizó mediante HPLC. Para ello se usó una columna de separación EC125/4 Nucleodur 100-5 C18ec (Machery-Nagel, Düren, Alemania) de forma isocrática con una mezcla de MeOH/agua (80:20).

45 B) Regeneración de coenzima con ADH de *Lactobacillus* (documento DE 10119274) / sistema bifásico

- Para la síntesis de ácido 3α-7α-dihidroxi-5-β-cólico (ácido quenodeoxicólico) se añaden, por ejemplo, a 0,3 ml de tampón (tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contiene 0,1 mg de NADP, 10 unidades de 7-α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Clostridium scindens* (Pubmed AAB61151) y 10 unidades de alcohol deshidrogenada recombinante de *Lactobacillus*, 100 mg de ácido 3α-hidroxi-7-oxo-5-β-cólico (ácido cetolítico) en 0,5 ml de octanol. La mezcla se incubaba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de ácido cetolítico en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Después de 24 h ha reaccionado el 70-80 % del ácido cetolítico dando ácido quenodeoxicólico.

3. Reducción de 1,4-androstadien-3,17-diona para dar 17-β-hidroxi-1,4-androstadien-3-ona

Para la síntesis de 17- β -hidroxi-1,4-androstadien-3-ona se añaden a 0,5 ml de tampón (trietanolamina 100 mM, pH = 7, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contienen 0,1 mg de NAD, 30 unidades de 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Pseudomonas testosteroni* (J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44 (2), 133-139 (1993), Pubmed P19871) y 5 unidades de alcohol deshidrogenasa recombinante de *Pichia cupsulata* (documento DE-A 103 27454), 100 mg de 1,4-androstadien-3,17-diona disueltos en 0,4 ml de 4-metil-2-pentanol. La mezcla se incuba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de 1,4-androstadien-3,17-diona fue en el volumen total de reacción de aproximadamente 100 g/l.

Después de finalizar la reacción la mezcla de reacción puede procesarse, por ejemplo, separando la fase orgánica y eliminando la fase orgánica a continuación por medio de destilación.

Después de 24 h ha reaccionado aproximadamente el 90-98 % de la androsten-3,17-diona usada dando 17- β -hidroxi-1,4-androstadien-3-ona.

El seguimiento de la reacción de 1,4-androstadien-3,17-diona para dar 17- β -hidroxi-1,4-androstadien-3-ona se realizó mediante cromatografía de gases. Para ello se usó un cromatógrafo de gases Autosystem XL de Perkin Elmer equipado con espectrómetro de masas con una columna capilar FS Optima-5-MS (Machery-Nagel, Düren, Alemania) y helio como gas portador.

4. Oxidación de ácido quenolitocólico para dar ácido cetolitocólico

A) Regeneración de coenzima con ADH de *Thermoanaerobium brockii* / sistema bifásico

Para la síntesis de ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5- β -cólico (ácido cetolitocólico) se añaden a 0,4 ml de tampón (tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH = 8,5, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contiene 0,1 mg de NADP, 10 mg de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la 7- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa sobreexpresada de *Clostridium scindens* (Pubmed AVAB61151), y 5 mg de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la alcohol deshidrogenasa sobreexpresada de *Thermoanaerobium brockii*, 100 mg de ácido 3 α -7 α -dihidroxi-5- β -cólico (ácido quenodeoxicólico) en 0,5 ml de metilisobutilcetona. La mezcla se incuba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de ácido cetolitocólico en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Después de 24 h ha reaccionado más del 80 % del ácido quenodeoxicólico dando ácido cetolitocólico.

El seguimiento de la reacción de ácido cetolitocólico para dar ácido quenodeoxicólico se realizó mediante cromatografía de capa fina.

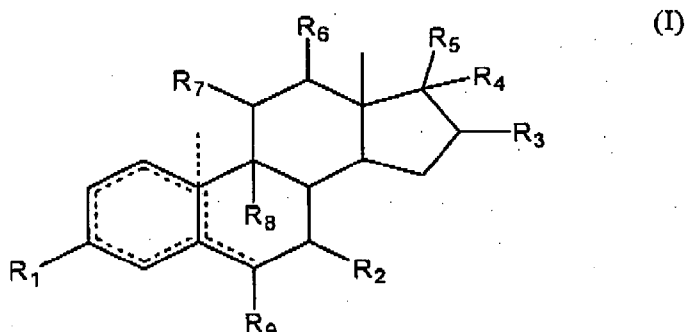
B) Regeneración de coenzima con ADH de *Lactobacillus* (documento DE 10119274) / sistema bifásico

Para la síntesis de ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5- β -cólico (ácido cetolitocólico) se añaden a 0,15 ml de tampón (tampón de fosfato de potasio 100 mM, pH = 7,5, MgCl₂ 1 mM, glicerina al 10 %) que contiene 0,1 mg de NADP, 10 mg de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la 7- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa sobreexpresada de *Clostridium scindens* (Pubmed AAB61151) y 5 mg de biomasa húmeda de *E. coli* que contienen la alcohol deshidrogenasa sobreexpresada de *Lactobacillus* (documento DE 10119274), 100 mg de ácido 3 α -7 α -dihidroxi-5- β -cólico (ácido quenodeoxicólico) en 0,7 ml de metilisobutilcetona. La mezcla se incuba durante 24 h a temperatura ambiente y con mezclado continuo. La concentración de ácido cetolitocólico en el volumen total de reacción es de aproximadamente 100 g/l.

Después de 24 h ha reaccionado más del 90 % del ácido quenodeoxicólico dando ácido cetolitocólico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción enzimática enantioselectiva de compuestos oxoesteroides de la fórmula general I

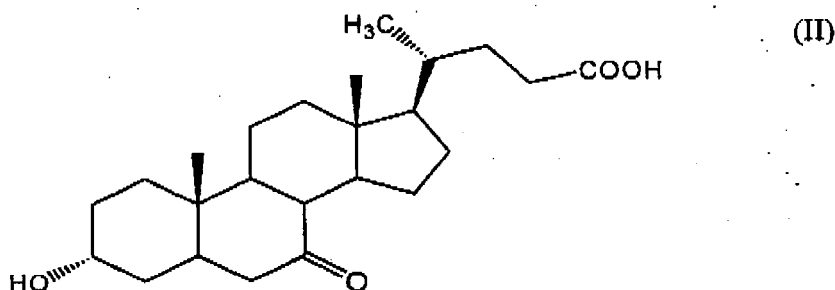


en la que

- 5 R_1 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
 R_2 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
 R_3 representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,
 R_4 representa hidrógeno o un grupo hidroxilo,
 R_5 representa hidrógeno, un resto $-COR_{10}$, en el que R_{10} es un grupo alquilo C1-C4 sustituido con un grupo hidroxilo o no sustituido, o un grupo carboxialquilo C1-C4 sustituido o no sustituido,
10 o R_4 y R_5 representan conjuntamente un grupo oxo,
 R_6 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
 R_7 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,
 R_8 representa hidrógeno, un grupo metilo o un haluro, y
15 R_9 representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un haluro,
siendo al menos uno de R_1 , R_2 , $R_4 + R_5$, R_6 , R_8 o R_9 un grupo oxo o R_5 es un resto $-COR_{10}$ y el elemento estructural



representa un anillo de benceno o un anillo C6 con 0, 1 o 2 enlaces dobles C-C,
o la fórmula II (ácido cetolítico)



en el que el compuesto oxoesteroide se reduce con una hidroxisteroide deshidrogenasa en presencia de un cofactor NADH o NADPH, caracterizado porque

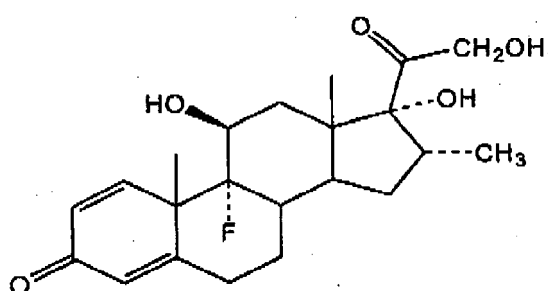
a) el compuesto oxoesteroide está presente en la preparación de reacción en una concentración ≥ 50 g/l,

b) el cofactor NAD o NADP oxidado formado mediante la hidroxisteroide deshidrogenasa se regenera continuamente mediante la oxidación de un alcohol secundario de la fórmula general $R_X R_Y \text{CHOH}$, en la que R_X , R_Y

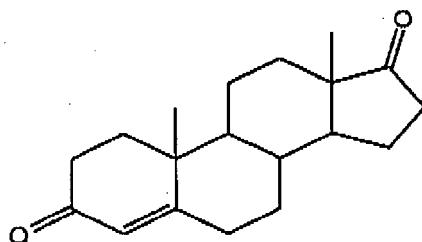
independientemente uno de otro representan alquilo C1-C8 ramificado o no ramificado y $C_{total} \geq 3$, o mediante la oxidación de un cicloalcanol C4-C6, y

c) para la oxidación del alcohol secundario de la fórmula general R_xR_yCHOH o del cicloalcanol se usa una oxidorreductasa / alcohol deshidrogenasa adicional.

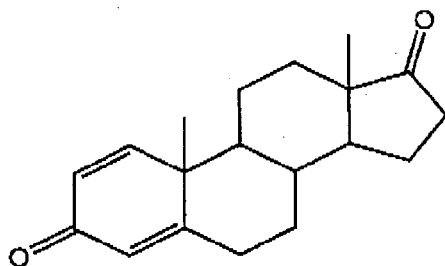
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como alcohol secundario de la fórmula general R_xR_yCHOH se usa 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 4-metil-2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 5-metil-2-hexanol o 2-octanol y como cicloalcohol se usa ciclohexanol.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se lleva a cabo en un sistema bifásico orgánico acuoso.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se usa adicionalmente un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el NRT, es decir número de recambio total = moles de compuesto oxoesteroide reducidos / moles de cofactor usados es $\geq 10^3$.
- 15 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se reduce al menos el 50 % del compuesto oxoesteroide usado dentro de un periodo de 2 a 96 h dando el compuesto hidroxiesteroide.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa dexametasona (fórmula III).



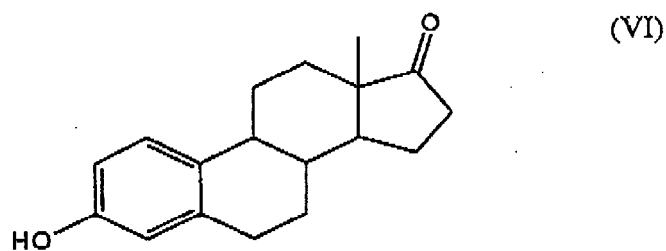
- 20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa 4-androsten-3,17-diona (fórmula IV).



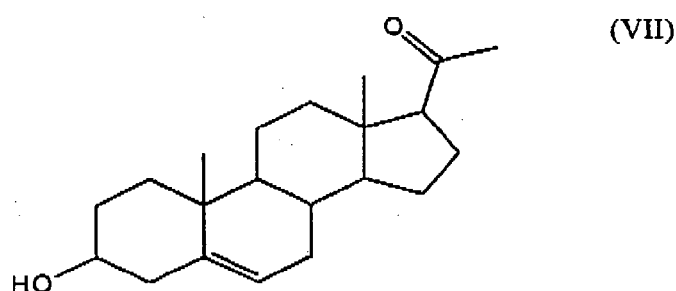
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa 1,4-androstadien-3,17-diona (fórmula V).



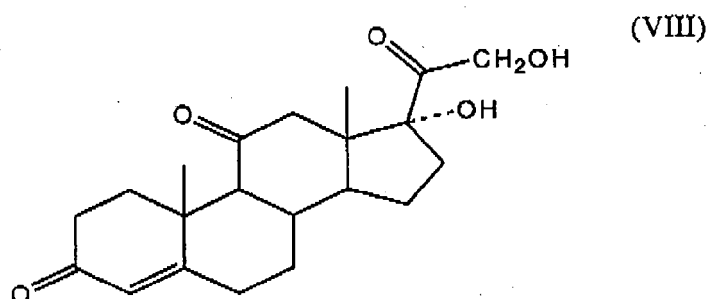
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa estrona (fórmula VI).



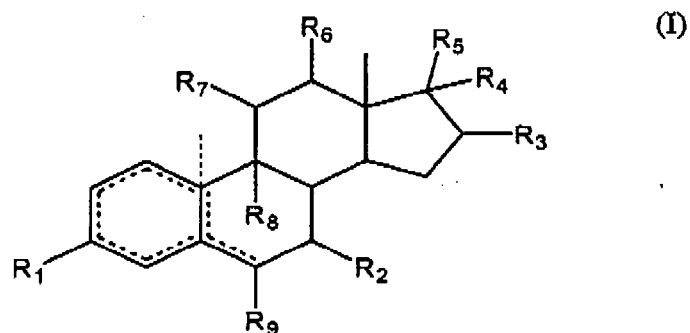
5 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa pregnenolona (fórmula VII).



12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque como compuesto oxoesteroide se usa cortisona (fórmula VIII).



10 13. Procedimiento para la oxidación enzimática de compuestos hidroxiesteroides de la fórmula general I



en la que

R₁ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R₂ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,

R₃ representa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,

R₄ representa hidrógeno o un grupo hidroxilo,

R₅ representa hidrógeno, un resto -COR₁₀, en el que R₁₀ es un grupo alquilo C1-C4 sustituido con un grupo hidroxilo o no sustituido, o un grupo carboxialquilo C1-C4 sustituido o no sustituido,

5 o R₄ y R₅ representan conjuntamente un grupo oxo,

R₆ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,

R₇ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo oxo o un grupo hidroxilo,

R₈ representa hidrógeno, un grupo metilo o un haluro, y

R₉ representa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un haluro,

10 siendo al menos uno de R₁, R₂, R₄, R₆, R₇, R₈ o R₉ un grupo hidroxilo y el elemento estructural



representa un anillo de benceno o un anillo C₆ con 0, 1 o 2 enlaces dobles C-C,

o de los derivados de ácido biliar ácido cólico, ácido quenodeoxicólico, ácido 12-oxocólico, ácido 3-hidroxi-12-oxocólico, ácido cetolítico o ácido litocólico,

15 oxidándose el compuesto hidroxiesteroide con una hidroxiesteroide deshidrogenasa en presencia de un cofactor NAD o NADP, caracterizado porque

a) el compuesto hidroxiesteroide está presente en la preparación de reacción en una concentración ≥ 50 g/l,

b) el cofactor NADH o NADPH reducido formado mediante la hidroxiesteroide deshidrogenasa se regenera continuamente mediante la reducción de un compuesto cetona de la fórmula general R_xR_yCO, en la que R_x, R_y independientemente uno de otro representan alquilo C1-C8 ramificado o no ramificado y C_{total} ≥ 3 , o mediante la reducción de una cicloalcanona C4-C6, y

c) para la reducción del compuesto cetona de la fórmula general R_xR_yCO o de la cicloalcanona se usa una oxidorreductasa / alcohol deshidrogenasa adicional.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque como cetona de la fórmula general R_xR_yCO se usa acetona, 2-butanona, 2-pentanona, 4-metil-2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 5-metil-2-hexanona o 2-octanona y como cicloalcanona se usa ciclohexanona.

15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque se lleva a cabo en un sistema bifásico orgánico acuoso.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque se usa adicionalmente un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dietiléter, terc-butilmetiléter, diisopropiléter, dibutiléter, acetato de etilo, acetato de butilo, heptano, hexano o ciclohexano.

17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado porque el NRT, es decir número de recambio total = moles de compuesto hidroxiesteroide oxidados / moles de cofactor usados es $\geq 10^3$.

18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizado porque se oxida al menos el 50 % del compuesto hidroxiesteroide usado, dentro de un periodo de 2 a 96 h, dando el compuesto oxoesteroide.