

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 389**

51 Int. Cl.:

**C12P 33/00** (2006.01)

**C12P 33/02** (2006.01)

**C12N 9/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12717864 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2691516**

54 Título: **Nuevo proceso para la oxidación selectiva de ácidos biliares, sus sales o derivados**

30 Prioridad:

**31.03.2011 IT MI20110534**

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

**14.10.2016**

73 Titular/es:

**PRODOTTI CHIMICI E ALIMENTARI SPA (100.0%)  
Via Novi 78  
15060 Basaluzzo (Alessandria), IT**

72 Inventor/es:

**MONTI, DANIELA;  
FERRANDI, ERICA ELISA;  
RIVA, SERGIO y  
POLENTINI, FAUSTO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

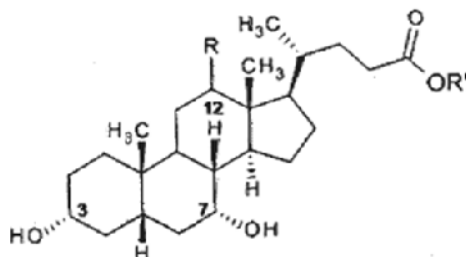
**ES 2 586 389 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevo proceso para la oxidación selectiva de ácidos biliares, sus sales o derivados

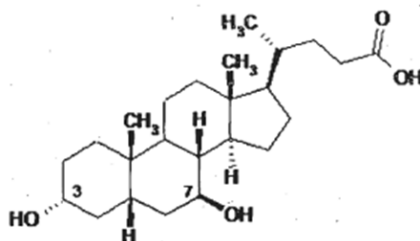
La presente invención se refiere a un nuevo proceso para la producción industrial de ácido ursodesoxicólico, a partir de diferentes ácidos biliares, ilustrados por la fórmula general incluida en el Esquema 1, sales o derivados de los mismos, fácilmente disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, el ácido cólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colanoico, (I)), éster de metilo de ácido cólico (II) y el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico, (III)).



(I)	Ácido cólico	R = OH; R' = H
(II)	Éster metílico del ácido cólico	R = OH; R' = CH <sub>3</sub>
(III)	Ácido quenodesoxicólico	R = H; R' = H

Esquema 1

El ácido ursodesoxicólico, que es un ácido 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico (UDCA), cuya fórmula se notifica en la siguiente fórmula (IV) (Esquema 2),



(IV) Ácido ursodesoxicólico (UDCA)

Esquema 2

es un compuesto generalmente presente en pequeñas cantidades en la bilis humana, que aumenta la capacidad de solubilizar el colesterol de la bilis. UDCA se conoce por sus propiedades terapéuticas: de hecho, se utiliza en el tratamiento de anomalías en el funcionamiento hepático, tales como la disolución de piedras biliares de colesterol, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante.

Es por tanto de gran interés disponer de un método para la producción industrial de UDCA.

La producción de UDCA actualmente se lleva a cabo mediante síntesis química a partir de ácido cólico ácido extraído de bilis bovina, mediante la formación del compuesto intermedio ácido 12-ceto-quenodesoxicólico (Hoffmann A.F., *Acta Chem. Scand.*, 1963, 17, 173-186; Sammuelson B., *Acta Chem. Scand.*, 1960, 14, 17-20).

Se han sugerido varias estrategias sintéticas, en lugar de la síntesis química tradicional del ácido ursodesoxicólico, tales como, por ejemplo, la descrita en Bovara R., Carrea G., Riva S. y Secundo F. *Biotechnology letters* 1996, 18, 305-308. Estas estrategias utilizan diferentes derivados oxidados del ácido cólico o del ácido quenodesoxicólico (tales como, por ejemplo, el ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico, ácido 12-ceto-quenodesoxicólico y ácido 7-ceto-litocólico) para la síntesis de UDCA.

Los derivados oxidados del ácido cólico y del ácido quenodesoxicólico se pueden sintetizar tanto mediante síntesis química, y procesos enzimáticos.

Los procesos químicos incluyen por lo general la esterificación del ácido biliar, la acetilación selectiva de los grupos hidroxilo que no requieren oxidación, y la oxidación del hidroxilo seleccionado a cetona. Sin embargo, los rendimientos y conversiones que se pueden obtener mediante los procesos sintéticos no son plenamente satisfactorios desde el punto de vista industrial.

- 5 Como alternativa a la síntesis química, la oxidación del ácido cólico se puede llevar a cabo mediante la ruta enzimática que utiliza actividades enzimáticas del hidroxisteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H (HSDH) acoplado con sistemas adecuados para regenerar el cofactor, que a continuación se puede hacer reaccionar en cantidades catalíticas, en lugar de usar cantidades estequiométricas.

- 10 Las actividades HSDH muestran una regioselectividad y estereoselectividad prácticamente absolutas y, por tanto, a diferencia de las oxidaciones químicas, las reacciones que catalizan se pueden realizar sin la protección preventiva de los grupos hidroxilo que no requieren oxidación.

- 15 Puesto que las reacciones de oxidorreducción catalizadas por los HSDH son reversibles, el sistema de regeneración del cofactor acoplado con la reacción de la oxidación se puede aprovechar no solamente para reducir las cantidades de NAD(P)<sup>+</sup> a utilizar, sino también para desplazar el equilibrio de la reacción hacia porcentajes de conversión más altos (Kroutil W., Mang H., Edegger K., Faber K. *Adv. Synth. Catal.*, 2004, 346, 125-142).

- 20 Se pueden obtener conversiones cuantitativas mediante el acoplamiento de la reacción de oxidación con la reacción de reducción irreversible de un cosustrato catalizada por una segunda deshidrogenasa, como en el caso de la aminación reductora del ácido  $\alpha$ -cetoglutárico catalizada por la glutamato deshidrogenasa en presencia de amoníaco. Los ejemplos de oxidación de ácidos biliares acopladas a la glutamato deshidrogenasa para la regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup> se describen, por ejemplo, en Riva S., Bovara R., Pasta P., Carrea G. *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 2902-2906; Bovara R., Carrea G., Riva S., Secundo F. *Biotechnology letters*, 1996, 18, 305-308. Dichas reacciones se consiguen solamente con bajas concentraciones del sustrato ácido cólico (12,5 mM) y no se pueden aplicar a gran escala, debido al elevado coste del cosustrato ácido  $\alpha$ -cetoglutárico y la no disponibilidad comercial de la glutamato deshidrogenasa para aplicaciones industriales.

- 25 En los casos en donde la reacción de oxidación está acoplada a reacciones de reducción reversibles catalizadas por otras deshidrogenasas, en su lugar, se requiere el uso de un exceso de cosustrato capaz de favorecer el desplazamiento de la reacción de equilibrio hacia el producto deseado.

- 30 Por ejemplo, en la reacción de oxidación del ácido cólico realizada por un 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH acoplado con la reducción de ácido pirúvico a ácido láctico catalizada por una lactato deshidrogenasa (LDH) dependiente de NADH (Fossati E., Carrea G., Riva S., Polentini F., patente europea EP 1 731 618), se utilizó un 100 % de exceso de cosustrato para obtener conversiones cuantitativas. También en este caso, el elevado coste del cosustrato ácido pirúvico utilizado para reciclar la enzima hace que un proceso de ese tipo no sea satisfactorio para su aplicación a escala industrial. Además, como no están disponibles las LDH dependientes de NADPH, dicho sistema de regeneración del cofactor solamente se puede acoplar con oxidaciones catalizadas por HSDH dependientes de NADH.

- 40 El acoplamiento de la oxidación del ácido cólico catalizada por un 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH con la reducción de acetona mediante una alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de NADPH se describe en Fossati E., Polentini F., Carrea G., Riva S., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 93, 1216-1220. Este sistema es económicamente ventajoso debido a la elevada disponibilidad de ambas enzimas acopladas, tales como la alcohol deshidrogenasa, y el cosustrato acetona. Sin embargo, el equilibrio termodinámico del proceso acoplado no permite la conversión cuantitativa del ácido cólico, ni siquiera en presencia de un importante exceso de acetona, ya que ambas reacciones enzimáticas son totalmente reversibles. En condiciones optimizadas, solamente se obtiene un 92 % de conversión del ácido cólico en ácido 12-ceto-quetodesoxicólico en una mezcla de reacción que contiene un 25 % (volumen/volumen) de acetona.

- 45 Recientemente, la reducción biocatalizada quasi-irreversible de cetonas que tienen grupos electroatrayentes, tales como las  $\alpha$ -halo-cetonas o las 1,3-dicetonas, por alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H se ha descrito en Bisogno F. R., Lavandera I., Kroutil W., Gotor V. *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 1730-1732; Lavandera I., Kern A., Resch V., Ferreira-Silva B., Glieder A., Fabian W.M.F., de Wildeman F., Kroutil W., *Organic Letters*, 2008, 10, 2155-2158). En estos trabajos, se sugiere que estas reacciones de reducción se pueden acoplar con la resolución enzimática de alcoholes racémicos secundarios, tales como, por ejemplo 2-octanol, para tener un sistema de regeneración del cofactor eficaz, usado con cantidades de cosustrato cercanos al valor estequiométrico (aproximadamente 1,5 equivalentes).

- 55 Un nuevo proceso para la oxidación enzimática regioselectiva de ácidos biliares, sales o derivados de los mismos, tal como el ácido cólico, el ácido quetodesoxicólico o el éster metílico del ácido cólico, mediante hidroxisteroide deshidrogenasas (HSDH) dependientes de NAD(P)<sup>+</sup> en la presencia de una alcohol deshidrogenasa (ADH) y acetoacetato de metilo como cosustrato para la regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup> se ha descubierto sorprendentemente ahora.

A diferencia de los trabajos anteriormente descritos, donde una única ADH reacciona tanto en la oxidación del

sustrato de interés, por ejemplo 2-octanol, y en la reducción del cosustrato de sacrificio, por ejemplo, cloroacetona, en este nuevo proceso, se consiguió el acoplamiento de dos actividades enzimáticas diferentes, HSDH y ADH.

5 Esto implica la necesidad de identificar las condiciones de reacción óptimas para la actividad y la estabilidad de ambas enzimas implicadas en el proceso, así como las condiciones más adecuadas para garantizar simultáneamente la solubilidad y la estabilidad química de los ácidos biliares sustratos y del acetoacetato de metilo. En este sentido, es importante subrayar, por tanto, que los ácidos biliares son solubles en la forma de sales de sodio o potasio a pH mayor de 7,5-8,0, mientras que el acetoacetato de metilo es poco soluble a pH alcalino, especialmente a temperaturas superiores a 25-30°C. A continuación, el proceso presentado en la presente memoria se consiguió mediante la verificación experimental de la influencia de diferentes parámetros, tales como la cantidad de enzimas HSDH y ADH, concentración de los ácidos biliares sustratos y del cosustrato acetoacetato de metilo, temperatura, y pH, sobre el grado de conversión de la reacción de oxidación.

10 En particular, los HSDH dependientes de  $\text{NAD(P)}^+$  usados en el proceso de la presente invención tienen preferiblemente una actividad enzimática comprendida entre 0,25 y 12 U, donde la actividad enzimática (U) significa la cantidad de enzima 7 $\alpha$ -HSDH o 12 $\alpha$ -HSDH capaz de transformar en un minuto un micromol del sustrato de ácido cólico al producto correspondiente, oxidado en las posiciones 7 o 12, respectivamente, en una solución de ensayo que contiene 12,5 mM de ácido cólico, 0,2 mM de  $\text{NAD(P)}^+$  y 100 mM de tampón fosfato de potasio, pH 9,0.

15 Los compuestos (I), (II) y (III), sales o derivados de los mismos preferiblemente se utilizan a una concentración comprendida entre 0,5 % y 4 % (peso/volumen), eso es, a una concentración comprendida entre 12,5 mM y 100 mM.

20 El cofactor  $\text{NAD(P)}^+$  se utiliza preferiblemente en cantidades catalíticas, a una concentración comprendida entre 0,2 y 0,8 mM.

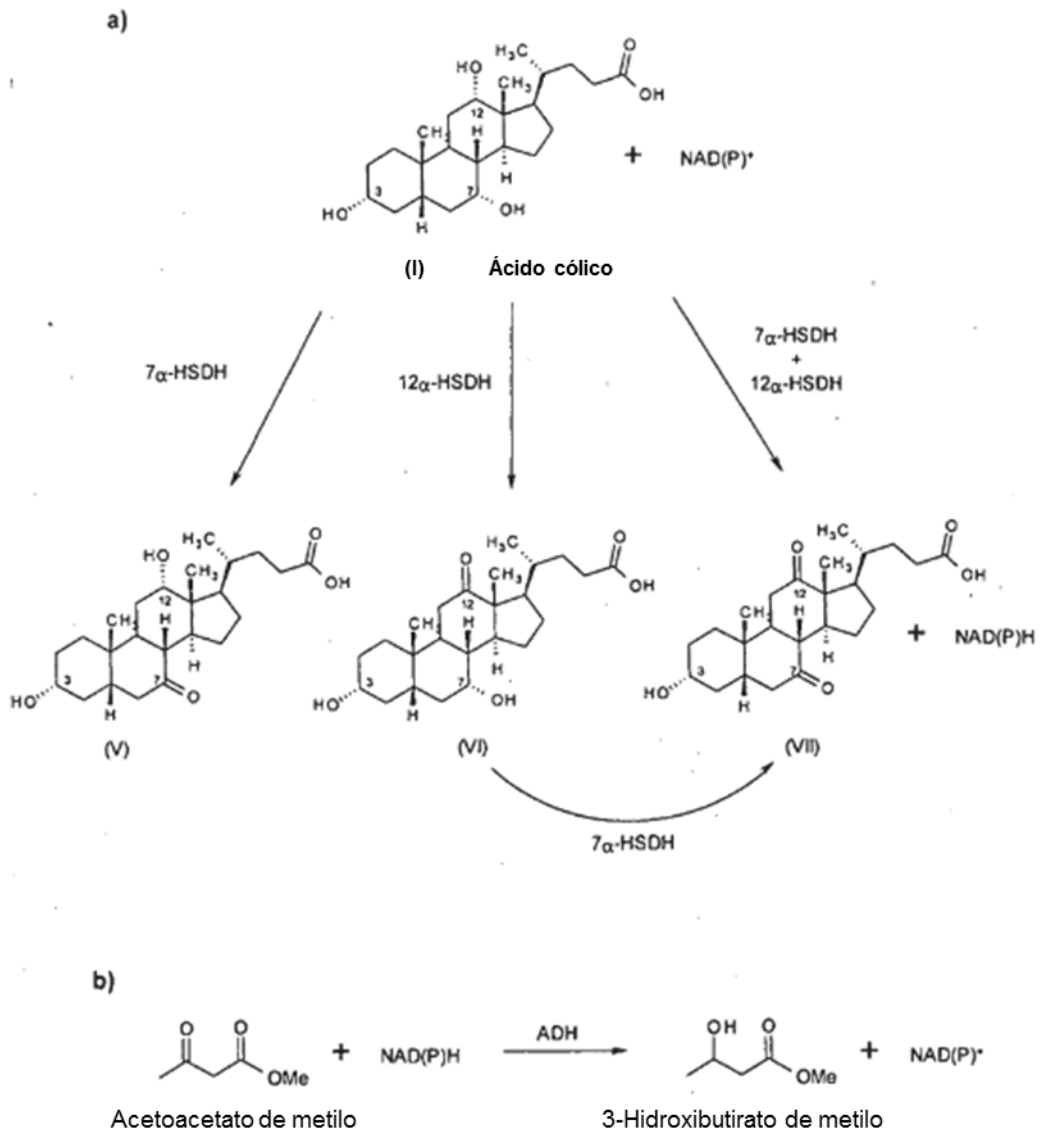
El cosustrato acetoacetato de metilo se utiliza en una cantidad igual a 2 equivalentes en referencia a cada uno de los compuestos (I), (II) o (III). En particular, el cosustrato acetoacetato de metilo se utiliza en cantidades comprendidas entre 0,3 % y 2,4 % (volumen/volumen).

25 El proceso de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente a temperatura ambiente, esto es, a aproximadamente 20°C, y se lleva a cabo preferiblemente a pH 8.

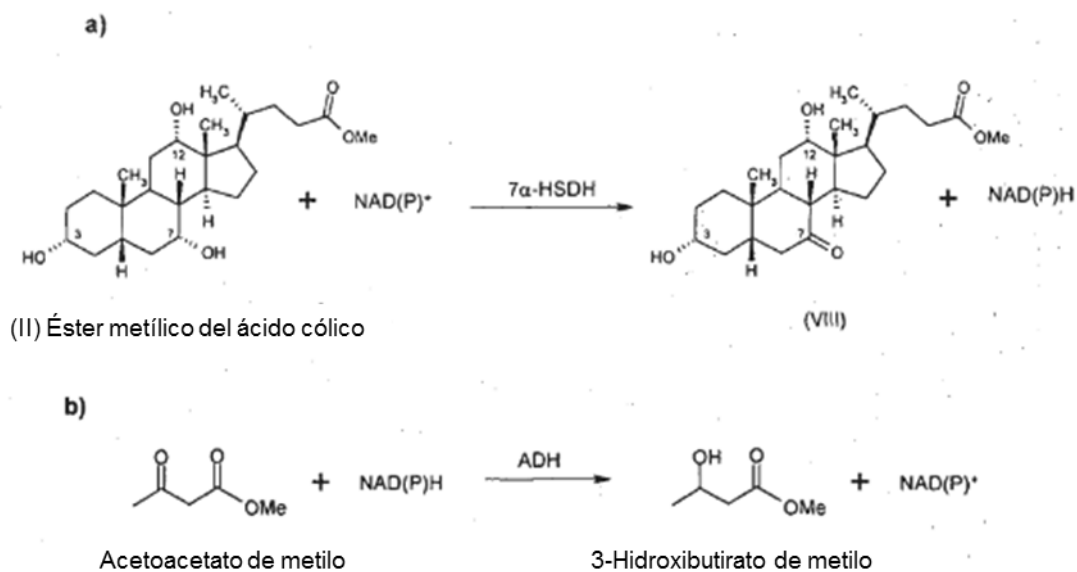
Además, aunque los ejemplos de la bibliografía describen reacciones exclusivamente en medio acuoso, este nuevo proceso se aplica también a los sistemas de reacción bifásicos de tampón/disolvente orgánico, que también permiten el uso de ésteres de ácidos biliares como sustratos, tales como el éster metílico del ácido cólico.

30 El sistema de regeneración del cofactor utilizado en el proceso de la presente invención es considerablemente más barato y eficaz que los anteriores, ya que utiliza una enzima y un cosustrato, que es alcohol deshidrogenasa y acetoacetato de metilo, respectivamente, que no son muy caros y permiten la conversión cuantitativa, es decir, igual o superior al 99,5 %, de ácidos biliares, sales o derivados de los mismos tales como el ácido cólico ((I), Esquema 3), éster metílico del ácido cólico ((II), Esquema 4) y ácido quenodesoxicólico ((III), Esquema 5) a sus correspondientes derivados oxidados selectivamente, dependiendo de la HSDH específica seleccionada, esto es 7 $\alpha$ -HSDH, 12 $\alpha$ -HSDH o combinaciones de las mismas, a escala preparativa.

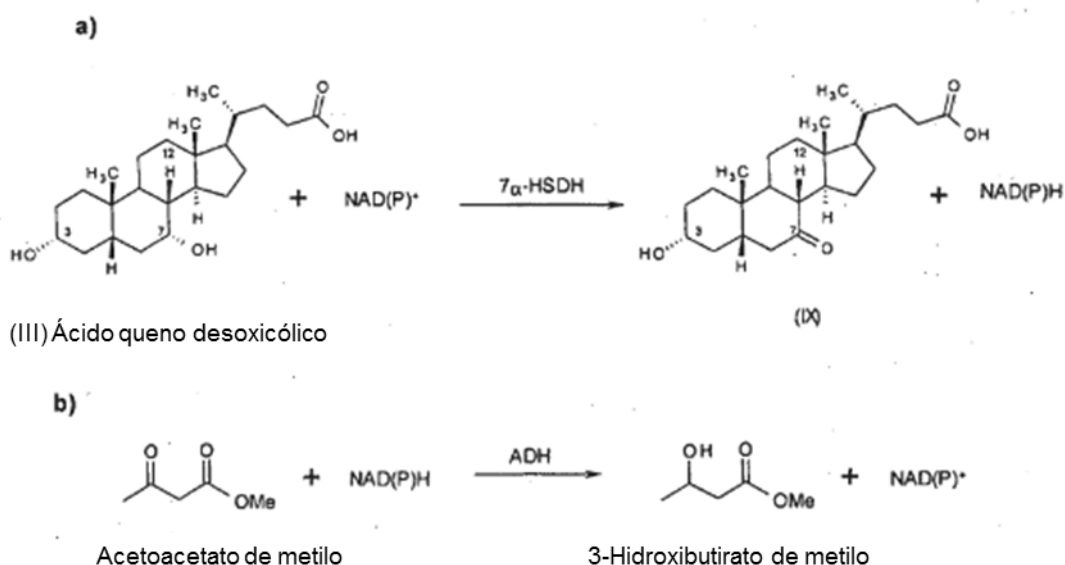
35 En los esquemas 3 a 5, el compuesto mostrado como (V) es el ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico, el compuesto mostrado como (VI) es el ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12-ceto-5 $\beta$ -colanoico, el compuesto mostrado como (VII) es el ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-7,12-ceto-5 $\beta$ -colanoico, el compuesto mostrado como (VIII) es el éster metílico del ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico y el compuesto mostrado como (IX) es el ácido 7-ceto-litocólico. Los puntos b) de estos esquemas describen la reacción de reducción del acetoacetato de metilo mediante una alcohol deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD(P)H}$ , acoplada con las reacciones de oxidación de los correspondientes puntos a).



Esquema 3. a) Reacción de oxidación catalizada por HSDH; b) sistema de regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup>



**Esquema 4. a) Reacción de oxidación catalizada por HSDH; b) sistema de regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup>**



**Esquema 5. a) Reacción de oxidación catalizada por HSDH; b) sistema de regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup>**

Según un aspecto del proceso de la invención, la reacción de oxidación se lleva a cabo en un sistema monofásico añadiendo una hidroesteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> (HSDH), tal como, por ejemplo, las 12α-HSDH y 7α-HSDH descritas en el Esquema 3 o la 7α-HSDH descrita en el Esquema 5, a una solución acuosa que contiene sales sódicas del ácido cólico (I) o ácido quenodesoxicólico (III), con cantidades catalíticas de NAD(P)<sup>+</sup>, cuya regeneración a partir de NAD(P)H a NAD(P)<sup>+</sup> se lleva a cabo mediante la conversión de acetoacetato de metilo a 3-hidroxibutirato de metilo usando una alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H (ADH).

Dependiendo del sustrato y de las actividades enzimáticas utilizadas, las reacciones (oxidaciones de (I) a los derivados (V), (VI) y (VII) y de (VI) al derivado (VII) (Esquema 3), y la oxidación de (III) al derivado (IX) (Esquema 5)) se llevan a cabo durante un período de tiempo comprendido entre 4 y 16 h, la sal sódica del ácido biliar sustrato se utiliza normalmente a una concentración comprendida entre 0,5 % y 4 % (peso/volumen) (eso es, entre 12,5 y 100 mM), a pH 8,0 y 20°C, NAD(P)<sup>+</sup> se utiliza en cantidades catalíticas, a una concentración comprendida entre 0,2 y 0,8 mM, el acetoacetato de metilo normalmente se usa en una cantidad igual a 2 equivalentes con respecto a la sal del ácido biliar, por consiguiente, en cantidades comprendidas entre 0,3 y 2,4 % (volumen/volumen). La reacción de

oxidación del hidroxilo en la posición 7 del éster metílico del ácido cólico (II) catalizada por una 7 $\alpha$ -HSDH (Esquema 4) se lleva a cabo en un sistema bifásico de tampón fosfato de potasio a pH 8,0 con acetato de *i*-propilo a 20°C, usando el mismo sistema de regeneración del cofactor. El sustrato (II) se disuelve a una concentración igual al 4 % (peso/volumen) (esto es, 100 mM) en acetato de *i*-propilo y se añadió un volumen equivalente de tampón fosfato potásico a pH 8,0, que contiene NAD(P)<sup>+</sup> a una concentración igual a 0,8 mM y acetoacetato de metilo en una cantidad igual a 2 equivalentes con respecto a (II), por consiguiente, en una cantidad igual a un 2,4 % (volumen/volumen).

El nuevo proceso descrito en la presente memoria es ventajoso en comparación con los anteriormente descritos por diferentes motivos.

10 Comparado con los procesos químicos, el nuevo proceso es más sencillo y económicamente ventajoso, ya que no es necesario proteger los grupos hidroxilo que no requieren oxidación, gracias a la regioselectividad casi absoluta de las HSDH. Además, el proceso se puede llevar a cabo en condiciones de reacción suaves (por ejemplo, a una temperatura de 20°C, a presión atmosférica y a un pH igual a 8,0), lo que conlleva ventajas tanto económicas como ambientales.

15 Comparado con los procesos enzimáticos anteriormente descritos, es más ventajoso económicamente debido al uso de un menor exceso de cosustrato, en comparación con el habitualmente utilizado con las ADH (por ejemplo, un 2,4 % en lugar del 25 % (volumen/volumen) de cosustrato para la oxidación de una solución de ácido cólico al 4 % (peso/volumen) tal como se describe en Fossati E., Polentini F., Carrea G., Riva S., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 93, 1216-1220). De manera simultánea, el nuevo proceso es más eficaz, ya que permite conversiones iguales o superiores al 99,5 %, que por motivos termodinámicos no se pueden conseguir usando las cetonas habituales, por ejemplo, acetona, como cosustrato. Además, el sistema de regeneración de la presente invención es más versátil que los anteriores, gracias a la disponibilidad de ADH dependientes tanto de NADH como de NADPH desarrollados para aplicaciones a escala industrial, que a continuación se pueden acoplar de forma adecuada con una HSDH que tenga la misma especificidad.

25 Las enzimas utilizadas en los procesos anteriormente descritos pueden ser de origen microbiano, tales como:

– La enzima 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH puede proceder de *Clostridium absonum*, descrito por ejemplo en McDonald I.A., Hutchinson D.M., Forrest T.P., *J. Lipid Res.*, 1981, 22, 458-466, que se clonó y expresó en exceso en *E. coli* (manuscrito en realización).

30 – La enzima 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH puede ser la de *Bacteroides fragilis*, recombinante de *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS, que se describe por ejemplo en Zhu D., Stearns J.E., Ramirez M., Hua L., *Tetrahedron*, 2006, 62, 4535-4539.

– La enzima 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH puede proceder de *Clostridium* sp. comercializado por ASA Spezialenzyme (Alemania).

35 – La enzima 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH de una fuente microbiana que se puede comercializar por Genzyme Biochemicals Ltd. (Inglaterra).

– La enzima ADH dependiente de NADPH puede proceder de *Thermoanaerobacter brockii*, que se describe en Peretz M., Bogin O., Tel-Or S., Cohen A., Li G., Chen J. -S., Burstein Y., *Anaerobe*, 1997, 3, 259-270, o de una fuente microbiana comercializada por SIGMA-ALDRICH.

40 – La enzima ADH dependiente de NADPH puede ser la de hígado de caballo comercializada por SIGMA-ALDRICH.

Los derivados oxidados obtenidos mediante el proceso de la presente invención se pueden utilizar en la síntesis de UDCA ((IV), Esquema 2) mediante una ruta química, como se describe en Giordano C., Perdoncin G., Castaldi G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1985, 24, 499-500; Magni A., Piccolo O., Ascheri A., documento US 4.834.919; Arosio R., Rossetti V., Beratto S., Talamona A., Crisafulli E., patente europea EP 0 424 232 A2; Hattori M., Mikami K., documento JP 06002184, o alternativamente, mediante una ruta enzimática mediante reducción regioselectiva y estereoselectiva del grupo ceto en 7 catalizada por una 7 $\beta$ -HSDH, por ejemplo, como se describe en Riva S., Bovara R., Pasta P., Carrea G. *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 2902-2906; Bovara R., Canzi E., Carrea G., Pilotti A., Riva S., *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 499-501; Bovara R., Carrea G., Riva S., Secundo F. *Biotechnology letters*, 1996, 18, 305-308; Pedrini P., Andreotti E., Guerrini A., Dean M., Fantin G., Giovannini P. P., *Steroids*, 2006, 71, 189-198; Monti D., Ferrandi E. E., Zanellato I., Hua L., Polentini F., Carrea G., Riva S., *Adv. Synth. Catal.*, 2009, 351, 1303-1311.

Los siguientes ejemplos deberían considerarse como ilustraciones no limitantes de la invención.

## Ejemplos

**Ejemplo 1** - Oxidación del hidroxilo en la posición 7 del ácido cólico (I) catalizada por 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH procedente de *Bacteroides fragilis* en presencia de ADH dependiente de NADH procedente de hígado de caballo (SIGMA-ALDRICH).

5 La reacción se llevó a cabo a 20°C y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 0,5 % (p/v) a pH 8,0 (12,5 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (0,3 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 12 U de 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH procedente de *Bacteroides fragilis*, recombinante de *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS, 0,1 U de ADH dependiente de NADH procedente de hígado de caballo (SIGMA-ALDRICH), NAD<sup>+</sup> 0,8 mM (40  $\mu$ l de una solución acuosa de NAD<sup>+</sup> 10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

La conversión completa ( $\geq 99,5$  %) del ácido cólico (I) a ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico (V) se obtuvo en un periodo de 16 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

15 **Ejemplo 2** - Oxidación del hidroxilo en la posición 12 del ácido cólico (I) catalizado por 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH (Genzyme) en presencia de ADH dependiente de NADH procedente de hígado de caballo (SIGMA-ALDRICH).

20 La reacción se llevó a cabo a 20°C y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 0,5 % (p/v) a pH 8,0 (12,5 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (0,3 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 4 U de 12 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADH procedente de una fuente microbiana (Genzyme), 0,05 U de ADH dependiente de NADH procedente de hígado de caballo (SIGMA-ALDRICH), NAD<sup>+</sup> 0,2 mM (10  $\mu$ l de una solución acuosa de NAD<sup>+</sup> 10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

25 La conversión completa ( $\geq 99,5$  %) del ácido cólico (I) a ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12-ceto-5 $\beta$ -colanoico (VI) se obtuvo en un periodo de 16 horas. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

**Ejemplo 3** - Oxidación del hidroxilo en la posición 12 del ácido cólico (I) catalizada por 12 $\alpha$ -HSDH (ASA) dependiente de NADPH en presencia de ADH dependiente de NADPH procedente de *T. Brockii* (SIGMA-ALDRICH).

30 La reacción se llevó a cabo a 20°C y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 0,5 % (p/v) a pH 8,0 (12,5 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (0,3 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 4 U de 12 $\alpha$ -HSDH(ASA) dependiente de NADPH, 10 U de ADH dependiente de NADPH *T. Brockii* (SIGMA-ALDRICH), NADP<sup>+</sup> 0,2 mM (10  $\mu$ l de una solución acuosa de NADP<sup>+</sup> 10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0. La conversión completa ( $\geq 99,5$  %) del ácido cólico (I) a ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12-ceto-5 $\beta$ -colanoico (VI) se obtuvo en un periodo de 16 horas. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

35 **Ejemplo 4** - Oxidación del hidroxilo en la posición 7 del ácido cólico (I) catalizada por 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* en presencia de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).

40 La reacción se llevó a cabo a 20°C y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 4 % (p/v) a pH 8,0 (100 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (2,4 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 0,25 U de 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum*, recombinante de *E. coli*, 4 U de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH), NADP<sup>+</sup> 0,8 mM (40  $\mu$ l de una solución acuosa de NADP<sup>+</sup> 10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

45 La conversión completa ( $\geq 99,5$  %) del ácido cólico (I) a ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico (V) se obtuvo en un periodo de 16 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

**Ejemplo 5** - Oxidación del hidroxilo en la posición 7 del ácido cólico (I) catalizada por 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* en presencia de ADH dependiente de NADPH procedente de *T. Brockii* (SIGMA-ALDRICH).

50 La reacción se llevó a cabo a 20°C y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 0,5 % (p/v) a pH 8,0 (12,5 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (0,3 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 4 U de 7 $\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum*, recombinante de *E. coli*, 10 U de ADH dependiente de NADPH *T. Brockii* (SIGMA-ALDRICH), NADP<sup>+</sup> 0,2 mM (10  $\mu$ l de una solución acuosa de NADP<sup>+</sup> 10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.



La conversión completa ( $\geq 99,5\%$ ) del ácido cólico (I) a ácido  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-7-ceto- $5\beta$ -colanoico (V) se obtuvo en un periodo de 4 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

5 **Ejemplo 6** - Oxidación del hidroxilo en la posición 7 del ácido 12-ceto-*quenodesoxicólico* (VI) catalizada por  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* en presencia de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).

10 La reacción se llevó a cabo a  $20^\circ\text{C}$  y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido 12-ceto-*quenodesoxicólico* al 4 % (p/v) a pH 8,0 (100 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido 12-ceto-*quenodesoxicólico* 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (2,4 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 4 U de  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum*, recombinante de *E. coli*, 4 U de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH),  $\text{NADP}^+$  0,8 mM (40  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de  $\text{NADP}^+$  10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

15 La conversión completa ( $\geq 99,5\%$ ) del ácido 12-ceto-*quenodesoxicólico* (VI) a  $3\alpha$ -hidroxi-7,12-diceto- $5\beta$ -colanoico (VII) se obtuvo en un periodo de 16 horas. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

**Ejemplo 7** - Oxidación de los hidroxilo en las posiciones 7 y 12 del ácido cólico (I) catalizada por  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* y  $12\alpha$ -HSDH (ASA) dependiente de NADPH en presencia de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).

20 La reacción se llevó a cabo a  $20^\circ\text{C}$  y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido cólico al 0,5 % (p/v) a pH 8,0 (12,5 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido cólico 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (0,6 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 2 U de  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* recombinante de *E. coli*, 4 U de  $12\alpha$ -HSDH (ASA) dependiente de NADPH, 4 U de ADH dependiente de NADPH procedente de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH),  $\text{NADP}^+$  0,8 mM (40  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de  $\text{NADP}^+$  10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

25 La conversión completa ( $\geq 99,5\%$ ) del ácido cólico (I) a ácido  $3\alpha$ -hidroxi-7,12-diceto- $5\beta$ -colanoico (VII) se obtuvo en un periodo de 16 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

30 **Ejemplo 8** - Oxidación del hidroxilo en la posición 7 del ácido *quenodesoxicólico* (III) catalizada por  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* en presencia de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).

35 La reacción se llevó a cabo a  $20^\circ\text{C}$  y pH 8,0 en un volumen total de 0,5 ml que contenía: sal sódica de ácido *quenodesoxicólico* al 2 % (p/v) a pH 8,0 (50 mM, obtenida por dilución una solución acuosa de la sal sódica de ácido *quenodesoxicólico* 0,2 M a pH 8,0), 2 equivalentes (1,2 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 4 U de  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum*, recombinante de *E. coli*, 3 U de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH),  $\text{NADP}^+$  0,6 mM (30  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de  $\text{NADP}^+$  10 mM), tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0.

La conversión completa ( $\geq 99,5\%$ ) de ácido *quenodesoxicólico* (III) a ácido 7-ceto-litocólico (IX) se obtuvo en un periodo de 16 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

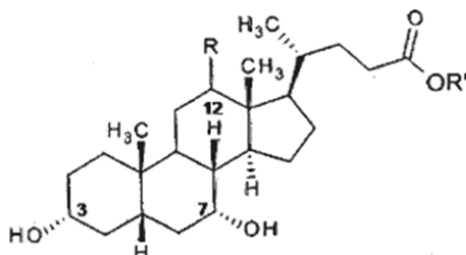
40 **Ejemplo 9** - Oxidación en un sistema bifásico del hidroxilo en la posición 7 del éster metílico del ácido cólico (II) catalizada por  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* en la presencia de ADH dependiente de NADPH, recombinante de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH).

45 La reacción se llevó a cabo a  $20^\circ\text{C}$ , pH 8,0 y 1400 rpm en un volumen total de 1 ml que contenía: a) 0,5 ml de una solución de acetato de *i-propilo* al 4 % (p/v) de éster metílico del ácido cólico (100 mM, obtenida mediante disolución de 20 mg de éster metílico del ácido cólico en 0,5 ml de acetato de *i-propilo*); b) 0,5 ml de un tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 8,0, que contenía a su vez 2 equivalentes (2,4 % (v/v)) de acetoacetato de metilo, 5,5 U de  $7\alpha$ -HSDH dependiente de NADPH procedente de *C. absonum* recombinante de *E. coli*, 4 U de ADH dependiente de NADPH procedente de *E. coli* (SIGMA-ALDRICH),  $\text{NADP}^+$  0,8 mM (40  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa de  $\text{NADP}^+$  10 mM).

50 La conversión completa ( $\geq 99,5\%$ ) del éster metílico del ácido cólico (II) a ácido  $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-7-ceto- $5\beta$ -colanoico (VIII) se obtuvo en un periodo de 16 h. El grado de conversión se evaluó mediante análisis por TLC usando cloroformo/metanol/ácido acético (10:1:0,5) como sistema eluyente.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la oxidación enzimática regioselectiva en las posiciones 7 y/o 12 de los compuestos de fórmula



- |       |                                 |                              |
|-------|---------------------------------|------------------------------|
| (I)   | Ácido cólico                    | R = OH; R' = H               |
| (II)  | Éster metílico del ácido cólico | R = OH; R' = CH <sub>3</sub> |
| (III) | Ácido quenodesoxicólico         | R = H; R' = H                |

- 5 o sales o derivados de los mismos, que comprende hacer reaccionar dichos compuestos con una hidroxisteroide deshidrogenasa dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> (HSDH), en presencia de un sistema de regeneración del cofactor NAD(P)<sup>+</sup> que comprende acetoacetato de metilo y alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> (ADH).
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde la HSDH dependiente de NAD (P)<sup>+</sup> tiene una actividad enzimática que varía de 0,25 a 12 U.
- 10 3. El proceso según la reivindicación 1, en donde los compuestos que tienen la fórmula (I), (II) o (III), sales o derivados de los mismos tienen una concentración que varía de 0,5 % a 4 % (peso/volumen).
4. El proceso según la reivindicación 1, en donde los compuestos que tienen la fórmula (I), (II) o (III), sales o derivados de los mismos tienen una concentración que varía de 12,5 mM a 100 mM.
5. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cofactor NAD(P)<sup>+</sup> se usa en cantidades catalíticas, a una concentración que varía de 0,2 mM a 0,8 mM.
- 15 6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cosustrato acetoacetato de metilo se utiliza en una cantidad igual a 2 equivalentes en referencia a cada uno de los compuestos (I), (II) y (III).
7. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cosustrato acetoacetato de metilo se utiliza en cantidades que varían de 0,3 % a 2,4 % (volumen/volumen).
- 20 8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la oxidación es cuantitativa, es decir, mayor o igual a 99,5 %.
9. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, realizado a temperatura ambiente, es decir, aproximadamente 20°C.
10. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, realizada a un pH igual a 8.
- 25 11. El proceso según la reivindicación 10, que comprende además un sistema tampón, que consiste preferiblemente en un tampón fosfato de potasio.
12. El proceso según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se lleva a cabo en un sistema bifásico acuoso/orgánico, en donde el disolvente orgánico es preferiblemente acetato de *i*-propilo.
13. El proceso según las reivindicaciones 11 y 12, en donde el sistema tampón fosfato es un tampón fosfato de potasio y el disolvente orgánico es acetato de *i*-propilo.
- 30 14. El proceso según la reivindicación 1, en donde la sal del ácido cólico ácido o ácido quenodesoxicólico es la sal sódica.
15. Un proceso para la preparación del ácido ursodesoxicólico (IV), **caracterizado por que** comprende un proceso para la síntesis de ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico (IV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Un proceso para preparar el ácido ursodesoxicólico (IV), **caracterizado por que** comprende un proceso para la síntesis del ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-12-ceto-5 $\beta$ -colanoico (VI) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
17. Un proceso para preparar el ácido ursodesoxicólico (IV), **caracterizado por que** comprende un proceso para la síntesis del ácido 3 $\alpha$ -hidroxí-7,12-ceto-5 $\beta$ -colanoico (VII) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 5 18. Un proceso para preparar el ácido ursodesoxicólico (IV), **caracterizado por que** comprende un proceso para la síntesis del ácido 7-ceto-litocólico (IX) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
19. Un proceso para preparar el ácido ursodesoxicólico (IV), **caracterizado por que** comprende un proceso para la síntesis del éster metílico del ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico (VIII) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.