

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 628**

51 Int. Cl.:

**C12P 33/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2013 E 13737399 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2855693**

54 Título: **Proceso para la reducción selectiva de ácidos biliares, sus sales o derivados, en un sistema bifásico**

30 Prioridad:

**28.05.2012 IT MI20120918**

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

**17.10.2016**

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**

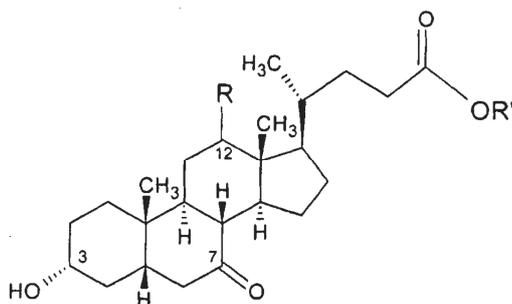
**ES 2 586 628 T3**

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

Proceso para la reducción selectiva de ácidos biliares, sus sales o derivados, en un sistema bifásico

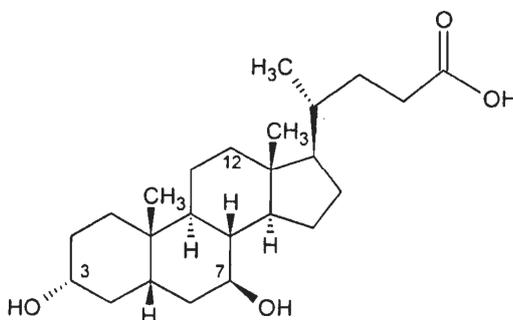
La presente invención se refiere a un proceso nuevo para la producción industrial de ácido ursodesoxicólico a partir de diferentes ácidos biliares (mostrados a modo de ejemplo en el Esquema 1), sus sales o derivados, que son fácilmente obtenibles comercialmente, tales como, por ejemplo, ácido 7-cetolítico (ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico, (I)), éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (éster metílico de ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-7-ceto-5 $\beta$ -colanoico, (II)) y éster metílico de ácido 7,12-diceto-lítico (éster metílico de ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-7,12-diceto-5 $\beta$ -colanoico, (III)).



10	(I), ácido 7-ceto-lítico	R = H; R' = H
	(II), éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico	R = OH; R' = CH <sub>3</sub>
	(III), éster metílico de ácido 7,12-diceto-lítico	R = = O; R' = CH <sub>3</sub>

Esquema 1

El ácido ursodesoxicólico, es decir, ácido 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico (UDCA), el cual se presenta en la fórmula (IV) siguiente (Esquema 2),



(IV), ácido ursodesoxicólico (UDCA)

Esquema 2

es un compuesto presente normalmente en cantidades pequeñas en la bilis humana, en la que incrementa la capacidad solubilizante de la bilis con respecto al colesterol. UDCA es conocido por sus propiedades terapéuticas: de hecho, se usa para el tratamiento de alteraciones de la región hepática, que incluyen la disolución de cálculos biliares de colesterol, cirrosis biliar primitiva y colangitis esclerosante.

Por lo tanto, es de gran interés proporcionar un proceso para la producción industrial de UDCA.

Actualmente, UDCA se produce por medio de síntesis química a partir de ácido cólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -colanoico (CA)), extraído de bilis bovina, por medio de la formación del 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 propuesto diversas estrategias sintéticas en vez de las síntesis químicas tradicionales de ácido ursodesoxicólico, por ejemplo como se describió en Bovara R., Carrea G., Riva S. y Secundo F. *Biotechnology Letters* 1996, 18, 305-308.

Estas estrategias usan diferentes derivados oxidados de ácido cólico o de ácido quenodesoxicólico (ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico (CDCA)), tales como, por ejemplo, ácido 7-ceto-lítico, ácido 7-ceto-desoxicólico, y ácido

7,12-diceto-litocólico, que se reducen químicamente o enzimáticamente en la posición 7.

Los procedimientos químicos en general dan como resultado la reducción de la cetona de la posición 7 del ácido biliar preseleccionado por medio de sodio metálico/alcohol (por ejemplo metanol, isopropanol) (Sammuelson B., ya citado), sin embargo los rendimientos y las conversiones obtenidas por medio de tal método no son completamente satisfactorias en cuanto a la estereoselectividad, lo que conduce a la formación de mezclas de UDCA y CDA (normalmente en una proporción de alrededor de 85:15).

Los métodos sintéticos alternativos propuestos incluyen la reducción de la cetona de la posición 7 del ácido 7-ceto-litocólico por medio de potasio/alcohol terc-amílico (Batta A.K. *et al.*, *J. Lipid Res.*, 1991, 32, 977-983) o por medio de reducción electroquímica (Zhao H. Tian H. *et al.*, *J. Appl. Electrochem.*, 2010, 40, 1307-1316), sin embargo ninguno de estos métodos se usa actualmente a escala industrial.

Como alternativa a la síntesis química, la reducción de la cetona de la posición 7 del ácido biliar se puede conseguir enzimáticamente mediante el uso de actividades de hidroxisteroide deshidrogenasa (HSDH) dependiente de NAD(P)H acoplada a sistemas de regeneración adecuados del cofactor, que por lo tanto se puede hacer reaccionar en cantidades catalíticas y no estequiométricas.

Las actividades de HSDH demuestran una regioselectividad y estereoselectividad casi absolutas, y se pueden usar, por lo tanto, para catalizar las reacciones sin dar como resultado la protección preventiva de los grupos hidroxilo que no requieren oxidación/reducción, a la inversa de lo que ocurre en las oxidaciones/reducciones químicas.

Debido a que las reacciones catalizadas de oxidación-reducción de HSDHs son reversibles, el sistema de regeneración del cofactor acoplado a la reacción de reducción se puede utilizar no solamente con el fin de reducir la cantidad de NAD(P)H a usar, sino también para favorecer el equilibrio de la reacción hacia porcentajes incrementados de conversión (Kroutil W. *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, 2004, 346, 125-142).

Se pueden conseguir conversiones cuantitativas acoplando la reacción de reducción a una reacción de oxidación irreversible de un co-sustrato catalizada por una segunda deshidrogenasa. Los métodos de regeneración usados más habitualmente incluyen la oxidación de formiato de amonio para proporcionar anhídrido carbónico catalizada por la formiato deshidrogenasa (FDH) o la oxidación de glucosa para proporcionar glucono- $\delta$ -lactona, que se hidroliza espontáneamente para proporcionar ácido glucónico, catalizada por la glucosa deshidrogenasa (GDH). El segundo método en general se usa más a menudo que el primero debido a que las GDHs se pueden obtener con rendimientos óptimos en cuanto a actividad e incluso son estables en condiciones de uso industrial, mientras las FDHs disponibles actualmente se caracterizan por una estabilidad y actividad específica limitadas (van der Donk W., Zhao H. *Curr. Opin. Biotech.*, 2003, 14, 421-426). La bibliografía informa de numerosos ejemplos de reacciones de reducción de cetonas acopladas con el sistema de regeneración de glucosa/GDH, como se describe en Kosjek B, *et al.*, *Org. Process Res. Dev.*, 2008, 12, 584-588; Eguchi T. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56, 701-703; y Nidetzky B. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 52, 387-396.

El sistema de glucosa/GDH se ha usado, por lo tanto, en la producción industrial de productos farmacéuticos, por ejemplo testosterona y L-carnitina, como se informó en las patentes MI2009A001168 y en el documento US4542098, respectivamente.

Con respecto a las reacciones de reducción de los ácidos biliares, se describen algunos ejemplos acoplados con el sistema de glucosa/GDH para la regeneración del cofactor NAD(P)H en Riva S. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 2902-2906; Bovara R. *et al.*, *Biotechnology Letters*, ya citado; Carrea G. *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 1992, 12, 1131-1135; Bovara R. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 499-501.

Tales reacciones, sin embargo, se llevaron a cabo a escala de laboratorio, y solamente a concentraciones bajas del sustrato de ácido biliar (normalmente 12,5 mM, igual a 5 g/l).

Además, una desventaja observada al usar ácido 7-ceto-litocólico como sustrato en la reacción de reducción estereoselectiva y regioselectiva catalizada por una 7 $\beta$ -HSDH para proporcionar el producto de interés, UDCA, es el hecho de que, incluso a concentraciones de sustrato iguales a 50 mM (20 g/l), la mezcla de reacción se someterá a una gelificación completa, por lo que se impide la progresión de la propia reacción hasta la finalización.

La formación del gel parece estar provocada tanto por una tendencia natural de los ácidos biliares, y en particular de UDCA, a formar estructuras supramoleculares, como por la presencia en el medio de reacción de co-sustratos/co-productos de glucosa/ácido glucónico, que, debido a su marcada hidrofiliidad, tienden a retirar moléculas de agua de los otros solutos presentes (en este caso los ácidos biliares), y por lo tanto tienden a favorecer la agregación estructural.

Sin embargo, con las condiciones de reacción conocidas, no es posible implementar la producción industrial de UDCA, que, para ser considerada aceptable desde un punto de vista económico, se tiene que llevar a cabo a concentraciones del sustrato de partida al menos iguales a 50 - 100 mM (20-40 g/l).

El documento ya citado anteriormente de Bovara R. *et al.*, *J. Org. Chem.* describe la reacción de reducción de éster

metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (25 mM en fase orgánica, 10 g/l) catalizada por una 7 $\beta$ -HSDH en un sistema bifásico de tampón fosfato: acetato de etilo = 1,5 : 1 acoplado con el sistema de glucosa/GDH para la regeneración del cofactor NAD(P)H, pero las conversiones obtenidas en este caso son menores del 20% y, por lo tanto, no son aplicables a nivel industrial, probablemente debido a la inactivación enzimática.

5 Además, es interesante indicar que los ácidos biliares son solubles en agua solamente en forma de las sales sódicas o potásicas correspondientes a un pH mayor de 7,5-8,0, mientras, en un disolvente orgánico, pueden ser solubles en forma de ácidos (por ejemplo ácido 7-ceto-litocólico) o en forma de ésteres de metilo (por ejemplo éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico). Por esta razón, en un sistema bifásico, la cantidad de ácido biliar o de un derivado del mismo presente en la fase acuosa es muy baja. Por lo tanto, las reacciones catalizadas por HSDH en un sistema  
10 bifásico pueden ser más rápidas y más cuantitativas que aquellas en fase acuosa homogénea, debido a que se ha observado que las HSDHs se inhiben a concentraciones elevadas (> 50 mM) de ácidos biliares (Ferrandi E.E., Bertolesi G.M., Polentini F., Negri A., Riva S., Monti D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, en prensa, DOI: 10.1007/s00253-011-3798-x).

15 Ahora, se ha descubierto un nuevo proceso para la reducción enzimática regioselectiva de ácidos biliares, sus sales o derivados, tales como ácido 7-ceto-litocólico, éster metílico de ácido 7-ceto-desoxilitocólico y éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico, en el que dicho proceso usa 7 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (7 $\beta$ -HSDH) dependiente de NAD(P)H en presencia de una glucosa deshidrogenasa (GDH) en sistemas bifásicos, por lo que se hace posible disolver los sustratos de partida en cantidades elevadas, evitar la formación de geles, evitar la inactivación enzimática, y obtener conversiones cuantitativas.

20 El proceso de la invención se descubrió confirmando experimentalmente la influencia de diversos parámetros, tales como la cantidad de enzimas HSDH y GDH, la concentración de los sustratos de ácidos biliares y del co-sustrato de glucosa, la temperatura y el pH, sobre el grado de conversión de la reacción de reducción en presencia de diversos disolventes orgánicos.

25 El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, un proceso para la reducción enzimática regioselectiva en la posición 7 de ácidos biliares, sus sales o derivados, tales como ácido 7-ceto-litocólico, éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico y éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico en un sistema bifásico, que comprende hacer reaccionar dichos compuestos en presencia de una 7 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (7 $\beta$ -HSDH) dependiente de NAD(P)H, de un sistema de regeneración del cofactor NAD(P)H que comprende glucosa como co-sustrato, de una glucosa deshidrogenasa (GDH) y un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes de alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>  
30 lineales o ramificados, cetonas C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> lineales o ramificadas y ésteres C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> lineales o ramificados de ácido acético.

Se prefieren en particular los alcoholes 2-hexanol, 3-octanol y 4-metil-2-pentanol, el disolvente de cetona 2-pentanona y el éster acetato de i-propilo.

35 Las 7 $\beta$ -HSDHs dependientes de NAD(P)H usadas en el proceso de la presente invención tienen preferiblemente una actividad enzimática que oscila de 30 a 50 U/ml, en la que la actividad enzimática (U) significa la cantidad de enzima 7 $\beta$ -HSDH capaz de transformar, en un minuto, un micromol del sustrato de ácido 7-ceto-litocólico en el producto correspondiente reducido en la posición 7 en una disolución de ensayo que contiene 12,5 mM de ácido 7-ceto-litocólico.

40 Las GDHs dependientes de NAD(P)H usadas en el proceso de la presente invención tienen preferiblemente una actividad enzimática que oscila de 20 a 30 U/ml, en la que la actividad enzimática (U) significa la cantidad de enzima GDH capaz de transformar, en un minuto, un micromol del sustrato de glucosa en el producto oxidado correspondiente de glucono- $\delta$ -lactona en una disolución de ensayo que contiene 50 mM de glucosa.

Los compuestos de partida, es decir, los sustratos de fórmula (I), (II) o (III), se usan preferiblemente a una concentración que oscila del 1% al 12% (peso/volumen) en una fase orgánica (25-300 mM), y más preferiblemente se usan a una concentración que oscila del 5% al 10% (peso/volumen) (125-250 mM).

45 El proceso de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente a temperatura ambiente, es decir, a alrededor de 20 °C-25 °C, y se lleva a cabo preferiblemente a un pH de 7-7,5.

El tampón usado es preferiblemente el tampón de fosfato potásico.

La duración del proceso descrito en la presente memoria es preferiblemente de entre 4 horas y 24 horas, y más preferiblemente entre 5 y 10 horas.

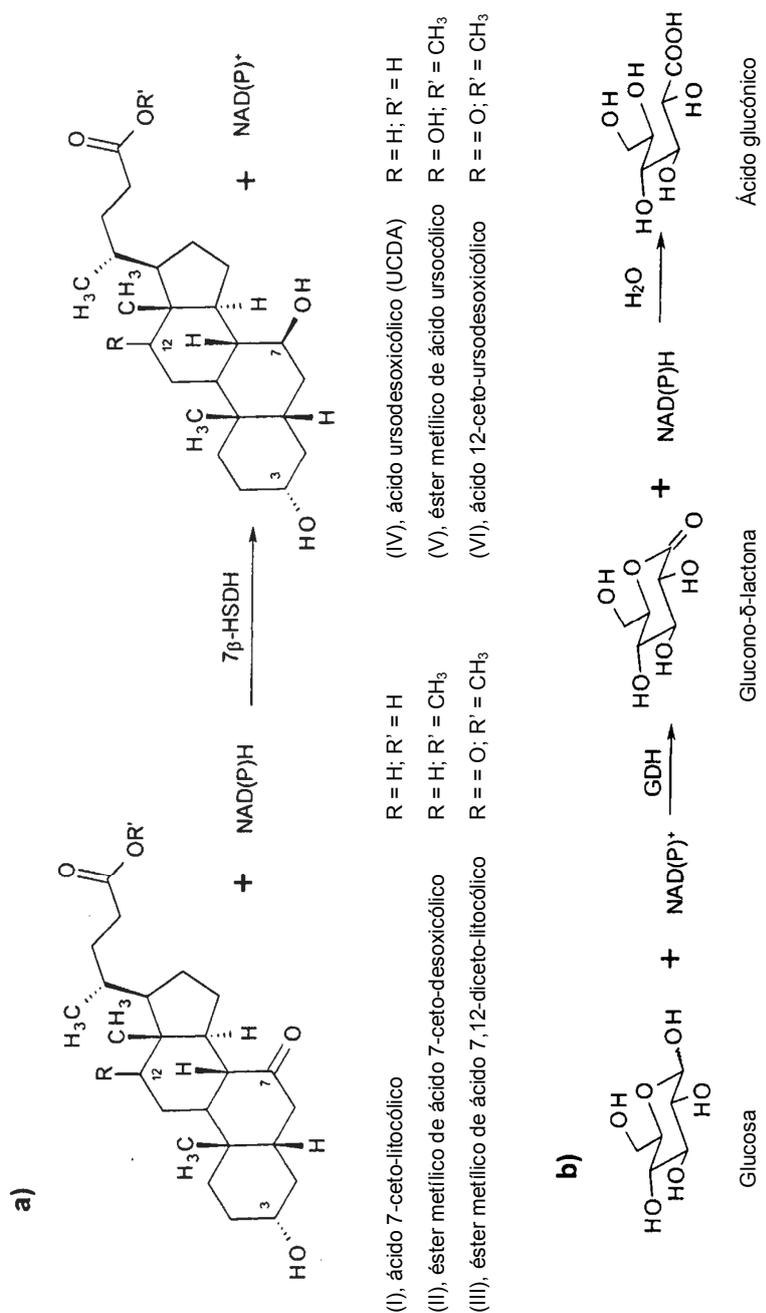
50 El cofactor NAD(P)<sup>+</sup> se usa preferiblemente en cantidades catalíticas a concentraciones que oscilan entre 100 y 1000  $\mu$ M, preferiblemente entre 300 y 500  $\mu$ M.

El co-sustrato de glucosa se usa a concentraciones equimolares con respecto al sustrato de partida, pero preferiblemente en ligero exceso (preferiblemente entre 20% y 50%).

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la reacción de reducción se lleva a cabo en un sistema bifásico

por medio de la adición de una fase acuosa que contiene una 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (7β-HSDH) dependiente de NAD(P)H, tal como la 7β-HSDH que cataliza la reacción de reducción del ácido biliar, indicada en el Esquema 3, una glucosa deshidrogenasa que regenera el cofactor NAD(P)H, glucosa como co-sustrato de la reacción de regeneración, y el cofactor NAD(P)<sup>+</sup> en cantidades catalíticas a una fase orgánica seleccionada de las descritas anteriormente, en la que se disuelve el ácido biliar de interés, tal como el compuesto (I), (II) o (III) tal como se indica en el Esquema 3.

En el Esquema 3, el compuesto (IV) es UDCA, formado en el proceso de reducción ilustrado a modo de ejemplo en el punto a) partiendo del compuesto de partida de fórmula (I), mientras el punto b) describe la reacción de oxidación de la glucosa acoplada con la reacción de reducción mencionada en el punto a). Los productos de las reacciones de reducción de los compuestos de fórmulas (II) y (III) son, respectivamente, éster metílico de ácido ursocólico (éster metílico de ácido 3α,12α,7β-trihidroxi-5β-colanoico, (V)) y éster metílico de ácido 12-ceto-ursodesoxicólico (éster metílico de ácido 3α,7β-dihidroxi-12-ceto-5β-colanoico, (VI)).



Esquema 3. a) reacción de reducción catalizada por HSDH; b) sistema de regeneración del cofactor NAD(P)H

La 7 $\beta$ -HSDH usada en el proceso de la invención puede ser la 7 $\beta$ -HSDH dependiente de NADPH de *Clostridium absonum* descrita en Ferrandi E.E. *et al.*, ya citado anteriormente, la 7 $\beta$ -HSDH dependiente de NADPH de *Collinsella aerofaciens* descrita en Liu L. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90, 127-35, o la 7 $\beta$ -HSDH dependiente de NADPH de *Xanthomonas maltophilia* descrita en Pedrini P. *et al.*, *Steroids*, 2006, 71, 189-198.

- 5 La glucosa deshidrogenasa usada en el proceso de la invención puede ser la de *Bacillus megaterium* (Heilmann H. J. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1988, 174, 485-490; Ebeling W *et al.*, documento US5250415), de *Bacillus subtilis* (Fujita Y. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1977, 132, 282-293), de *Gluconobacter suboxydans* (Adachi O. *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 1980, 44, 301-308), de *Thermoplasma acidophilum* (Smith L. D. *et al.*, *Biochem. J.*, 1989, 261, 973-977; Bright J. R. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 211, 549-554), de *Sulfolobus solfataricus* (Giardina P. *et al.*, *Biochem. J.*, 1986, 239, 517-522), de *Pseudomonas* (Sogabe A. *et al.*, documento US5298411), o de *Aspergillus oryzae* (Tsuji Y. *et al.*, documento US7655130).

10 Los derivados de fórmulas (V) y (VI) obtenidos con el proceso de la presente invención cuando los sustratos de partida son éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (II) o éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico (III) se pueden usar en la síntesis química de UDCA, como se describió en la patente EP0072293 y en Hoffmann A. F., o Sammuelson B. (ya citado).

Los ejemplos siguientes se deben considerar ilustraciones no limitantes de la invención.

### Ejemplos

#### *Ejemplo 1 - Reducción enzimática en un sistema bifásico de ácido 7-ceto-litocólico (I)*

20 Se disolvieron 4 g (10 mmol) de ácido 7-ceto-litocólico (I) en 40 ml de 4-metil-2-pentanol (10% peso/volumen, 250 mM) en presencia de 4 ml de agua desionizada calentando a una temperatura de 90 °C durante unos cuantos minutos. La disolución se dejó enfriar a alrededor de 23 °C, y se añadieron 8 ml de tampón fosfato 100 mM de pH 9,2, y 2,2 g (12,2 mmol) de glucosa. El sistema se mantuvo con agitación para mezclar las dos fases, y después se añadieron 15 mg (0,023 mmol) de NAD<sup>+</sup>, 130 U de 7 $\beta$ -HSDH (3,2 ml de una disolución que contenía 40 U/ml de 7 $\beta$ -HSDH) y 80 U de GDH (3,2 ml de una disolución que contenía 25 U/ml de GDH). La temperatura y el pH se mantuvieron constantes durante el transcurso de la reacción. La conversión completa (> 99,5%) del ácido 7-ceto-litocólico (I) hasta ácido ursodesoxicólico (IV) se consiguió en un tiempo de 5 h. El grado de conversión se determinó por medio de análisis de HPLC.

A modo de comparación, se informarán a continuación las mejores condiciones para la reacción de reducción del sustrato (I) al producto (IV) en fase acuosa homogénea (monofásica).

30 La reacción se llevó a cabo a 20 °C y a un pH de 8,0 en un volumen total de 100 ml, que contenía: 4 g (10 mmol) de la sal sódica de ácido 7-ceto-litocólico (I) a pH 8,0 (4% peso/volumen, 100 mM, obtenido diluyendo una disolución acuosa de 0,2 M de la sal sódica del ácido 7-ceto-litocólico a pH 8,0), 2,2 g (12,2 mmol) de glucosa, 240 U de 7 $\beta$ -HSDH (6 ml de una disolución que contenía 40 U/ml de 7 $\beta$ -HSDH) y 150 U de GDH (6 ml de una disolución que contenía 25 U/ml de GDH), 40 mg (0,06 mmol) de NAD<sup>+</sup>, 50 mM de tampón de fosfato potásico, pH 8,0.

35 En un tiempo de alrededor de 16 h, se observó una conversión > 99% del ácido 7-ceto-litocólico (I) hasta ácido ursodesoxicólico (UDCA (IV)), sin embargo, incluso con agitación, la disolución gelifica, lo que impide la finalización de la reacción.

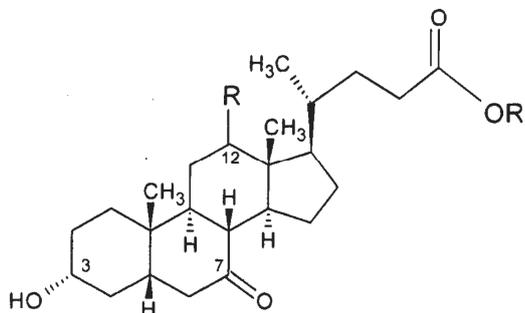
#### *Ejemplo 2 - Reducción enzimática en un sistema bifásico de éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (II) o de éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico (III)*

40 Se disolvieron 0,4 g (1 mmol) de éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (II) en 5 ml de acetato de i-propilo (8% peso/volumen, 200 mM). Después se añadieron 3,5 ml de tampón fosfato 50 mM de pH 8,0 y 220 mg (1,22 mmol) de glucosa. El sistema se mantuvo con agitación para mezclar las dos fases, y después se añadieron 0,2 ml de una disolución de 6 mg/ml de NAD<sup>+</sup> (0,0018 mmol), 20 U de 7 $\beta$ -HSDH (0,5 ml de una disolución que contenía 40 U/ml de 7 $\beta$ -HSDH) y 7,5 U de GDH (0,3 ml de una disolución que contenía 25 U/ml de GDH). La temperatura y el pH se mantuvieron constantes durante el transcurso de la reacción. La conversión completa (> 99,5%) del éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico (II) hasta un éster metílico de ácido ursocólico (V) se consiguió en un tiempo de 5 h. El grado de conversión se determinó por medio de análisis de HPLC.

50 Se aplicaron las mismas condiciones de reacción para la reacción de reducción del éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico (III) para proporcionar el éster metílico de ácido 12-ceto-ursodesoxicólico (VI). La conversión completa (> 99,5%) del sustrato de partida hasta el producto esperado se consiguió en un tiempo de 5 h.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la reducción enzimática regioselectiva en la posición 7 de compuestos que tienen la fórmula



- (I), ácido 7-ceto-litocólico R = H; R' = H
- (II), éster metílico de ácido 7-ceto-desoxicólico R = OH; R' = CH<sub>3</sub>
- (III), éster metílico de ácido 7,12-diceto-litocólico R = = O; R' = CH<sub>3</sub>

- 5
- o sus sales o derivados, que comprende hacer reaccionar dichos compuestos en presencia de una 7 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (7 $\beta$ -HSDH) dependiente de NAD(P)H, de un sistema de regeneración del cofactor NAD(P)H que comprende glucosa como co-sustrato, una glucosa deshidrogenasa (GDH) y un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes de alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> lineales o ramificados, cetonas C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> lineales o ramificadas y ésteres C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> lineales o ramificados de ácido acético.
- 10
2. El proceso según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico es 2-hexanol, 3-octanol, 4-metil-2-pentanol, 2-pentanona o éster de acetato de i-propilo.
- 15
3. El proceso según la reivindicación 1, en el que la 7 $\beta$ -HSDH dependiente de NAD(P)H tiene una actividad enzimática que oscila de 30 a 50 U/ml.
4. El proceso según la reivindicación 1, en el que la GDH dependiente de NAD(P)H tiene una actividad enzimática que oscila de 20 a 30 U/ml.
- 20
5. El proceso según la reivindicación 1, en el que los compuestos que tienen las fórmulas (I), (II) o (III), sus sales o derivados, tienen una concentración que oscila del 1% al 12% (peso/volumen) en una fase orgánica (25-300 mM), y más preferiblemente oscila del 5% al 10% (peso/volumen) (125-250 mM).
6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el cofactor NAD(P)<sup>+</sup> se usa en cantidades catalíticas a concentraciones que oscilan de 100 a 1000  $\mu$ M, preferiblemente de 300 a 500  $\mu$ M.
7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el co-sustrato de glucosa se usa a concentraciones equimolares, o en ligero exceso, preferiblemente que oscilan del 20 al 50%, con respecto a cada uno de los compuestos (I), (II) o (III).
- 25
8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la reducción es cuantitativa, o mayor o igual al 99,5%.
9. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones previas, llevado a cabo a temperatura ambiente, es decir, a alrededor de 20 °C - 25 °C.
- 30
10. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones previas, llevado a cabo a un pH que oscila de 7 a 7,5.
11. El proceso según la reivindicación 10, que también comprende un sistema tampón, que consiste preferiblemente en el tampón de fosfato potásico.
12. Un proceso para la preparación de ácido ursodesoxicólico (IV), caracterizado porque comprende un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 35
13. Un proceso para la preparación del éster metílico de ácido ursocólico (V), caracterizado porque comprende un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. Un proceso para la preparación del éster metílico de ácido 12-ceto-ursodesoxicólico (VI), caracterizado porque comprende un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.