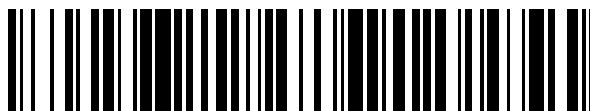


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 381**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/36 (2006.01)

C12P 33/00 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C13K 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/EP2013/052313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13117584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13703568 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2812439**

54 Título: **Procedimiento para la regeneración enzimática de cofactores redox**

30 Prioridad:

07.02.2012 EP 12450007

12.09.2012 WO PCT/EP2012/067781

10.12.2012 AT 12842012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2020

73 Titular/es:

ANNIKKI GMBH (100.0%)

Dr. Auner Strasse 20/1

8074 Raaba-Grambach, AT

72 Inventor/es:

ERTL, ORTWIN;

STAUNIG, NICOLE;

SUT-VEJDA, MARTA y

MAYER, BERND

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 742 381 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

Procedimiento para la regeneración enzimática de cofactores redox

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la regeneración enzimática de los cofactores redox NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en una reacción en un solo recipiente, produciéndose como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente que transcurren en la misma mezcla de reacción adicionales (= reacciones de formación de producto) uno de los dos cofactores redox en su forma reducida y el en cada caso otro en su forma oxidada.

Estado de la técnica

Las reacciones redox catalizadas enzimáticamente se usan en procesos industriales, por ejemplo, en la producción de alcoholes quirales, α -aminoácidos y α -hidroxiácidos. La mayoría de las enzimas que se utilizan en reacciones redox industriales, usan cofactores tales como NADH o NADPH . Entre las reacciones redox enzimáticas son especialmente interesantes aquellas en las que los cofactores redox se reconstituyen mediante sistemas de regeneración de cofactores *in situ*. El motivo de ello radica en que es posible el uso de cantidades solo catalíticas de los caros cofactores ($\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$). La capacidad de obtención de deshidrogenasas adecuadas y otras enzimas ha conducido al desarrollo de diversos sistemas de regeneración de cofactores.

Los sistemas de regeneración descritos hasta la fecha pueden clasificarse como: acoplados a enzimas, acoplados a sustratos, *in vivo* (sistemas de regeneración de cofactores naturales en organismos vivos), fotoquímicos, químicos o electroenzimáticos. El procedimiento descrito en este caso se refiere a un sistema de regeneración acoplado a enzimas. Las ventajas de los sistemas acoplados a enzimas son la alta selectividad, la capacidad de empleo para la producción de diferentes productos y la alta tasa de reutilización del cofactor (*total turnover number*, TTN).

A mediados de los años 90 se empleó un primer proceso industrial usando un sistema de regeneración de cofactores acoplado a enzimas a escala de toneladas. En este proceso se utilizó formiato deshidrogenasa de *Candida boidinii*. Los procesos industriales conocidos hasta la fecha usan por regla general una enzima redox para la síntesis de productos, así como una enzima adicional para la regeneración de cofactores.

De estos deben diferenciarse procedimientos en los que transcurren dos o más reacciones redox enzimáticas implicadas en la formación de productos y dos sistemas enzimáticos para la regeneración de cofactores (al mismo tiempo o secuencialmente) en una mezcla de reacción, sin que se aísle un producto intermedio. En los últimos tiempos tales reacciones en cascada enzimáticas – en este caso denominadas reacciones en un solo recipiente – han despertado una atención significativa dado que reducen eficazmente los costes de funcionamiento, el tiempo de funcionamiento y los efectos medioambientales. Adicionalmente, las cascadas enzimáticas de reacciones redox posibilitan transformaciones, que no son fáciles de implementar mediante procedimientos químicos clásicos.

Sin embargo, es un reto realizar al mismo tiempo varias reacciones (oxidación y reducción) en una reacción en un solo recipiente con regeneración de cofactores paralela, dado que a menudo son necesarias condiciones de reacción muy divergentes para las transformaciones individuales. Hasta el momento se han realizado solo muy pocos ensayos en un solo recipiente que comprenden reacciones de oxidación y de reducción con sistemas de regeneración de cofactores asociados.

En la bibliografía (Advanced Synth. Catal., 2009, volumen 351, número 9, págs. 1303-1311) se ha descrito un ensayo de una reacción en un solo recipiente usando 7α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH), 7β -HSDH y 12α -HSDH. En el procedimiento se ha realizado una oxidación tanto regioselectiva como estereoselectiva en las posiciones 7 y 12 del ácido cólico, seguida de una reducción regio- y estereoselectiva en la posición 7. En el proceso se usó como sistema de regeneración de cofactores tanto una lactato deshidrogenasa (NAD^+ dependiente) como una glucosa deshidrogenasa (NADP^+ dependiente). Como cosustratos se usaron piruvato y glucosa. Aunque este procedimiento tenía originariamente como objetivo un proceso en un solo recipiente verdadero, la reacción de oxidación y de reducción se realizaron finalmente por separado. A este respecto, la división de etapas oxidativas y reductoras tuvo lugar o bien en un denominado reactor “de bolsa de té” o bien en el reactor de membrana. Esta división era necesaria para evitar, debido a la baja selectividad de cofactor de NADPH -glucosa deshidrogenasa, la producción de subproductos. En la reacción en un solo recipiente, la glucosa deshidrogenasa transformaba NADP^+ pero también parcialmente NAD^+ , lo que impedía la oxidación. En el proceso descrito se utilizaron solo 12,5 mM ($\sim 0,5\%$) del sustrato ácido cólico, lo que hace el proceso económicamente poco interesante.

Se ha descrito además un ensayo para realizar la desracemización de racematos de alcoholes secundarios a través de una cetona proquiral como producto intermedio usando un sistema en un solo recipiente (J. Am. Chem. Soc., 2008, volumen 130, págs. 13969-13972). La desracemización de alcoholes secundarios se consiguió a través de dos alcohol deshidrogenasas (S- y R-específicas) con una especificidad de cofactor diferente. En el sistema se regeneró NADP mediante NADPH oxidasa (que produce peróxido de hidrógeno) y NADH mediante formiato

deshidrogenasa. Como cosustratos se usaron formiato y oxígeno. En el sistema se utilizaron 4 enzimas sin división de etapas oxidativas y reductoras. Una desventaja del procedimiento es la concentración muy reducida del sustrato utilizado del 0,2-0,5%, lo que no es adecuado para propósitos industriales.

Se describió un sistema en un solo recipiente adicional en el documento WO 2009/121785 A2. En el procedimiento se oxidó un estereoisómero de un alcohol secundario ópticamente activo para dar cetona y entonces se redujo para dar la antípoda óptica correspondiente, usándose dos alcohol deshidrogenasas con estereoselectividades opuestas y diferentes especificidades de cofactor. Los cofactores se regeneraron por medio de un denominado "sistema de transferencia híbrido" usando solo una enzima adicional. Para regenerar los cofactores se usaron diferentes enzimas como, por ejemplo, formiato deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa. Una desventaja de este procedimiento es la reducida concentración de los sustratos usados.

La desventaja de los procedimientos en un solo recipiente enzimáticos conocidos hasta el momento con sistemas de regeneración de cofactores es en general la concentración de sustrato muy reducida, lo que no es rentable para procesos industriales.

A diferencia de esto, ya se conocen muchas reacciones redox enzimáticas individuales, en las que se usan sistemas de regeneración de cofactores. Los ensayos se han descrito con microorganismos completos, lisados celulares o enzimas aisladas con regeneración de NAD(P)H o NAD(P)⁺ simultánea. Los sistemas de regeneración de cofactores enzimáticos para reacciones redox individuales contienen, por ejemplo, formiato deshidrogenasa para NADH (formiato como cosustrato), alcohol deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.* para NADH (2-propanol como cosustrato), hidrogenasa para NADH y NADPH (H₂ como cosustrato), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *L. mesenteroides* para NADPH (glucosa-6-fosfato como cosustrato), glucosa deshidrogenasa para NADH y NADPH (glucosa como cosustrato), NADH oxidasa para NADH (O₂ como cosustrato) y fosfito deshidrogenasa para NADH (fosfito como cosustrato).

Un ejemplo de aplicación de tales reacciones redox individuales es la producción de hidroxipuestos quirales partiendo de cetocompuestos proquirales correspondientes. En estos procedimientos se regenera el cofactor por medio de una enzima adicional. Estos procedimientos tienen en común que representan una reacción de reducción aislada y regeneran NAD(P)H (véase, por ejemplo, el documento EP 1 152 054).

Se han descrito procedimientos enzimáticos usando hidroxiesteroide deshidrogenasas acoplados con un sistema de regeneración de cofactores, que transcurren a concentraciones de sustrato mayores (aproximadamente >1%) (documentos EP 1 731 618; WO 2007/118644; Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011 volumen 90 págs. 127-135). En los procedimientos se regeneraron los cofactores NAD(P)H o NAD(P)⁺ por medio de diferentes enzimas tales como, por ejemplo, lactato deshidrogenasa (piruvato como cosustrato), alcohol deshidrogenasa de *T. brockii* (isopropanol como cosustrato), alcohol deshidrogenasa de *L. brevis*, *L. minor*, *Leuconostoc carnosum*, *T. ethanolicus*, *Clostridium beijerinckii*. Sin embargo, estos procedimientos conocidos se refieren únicamente a las reacciones individuales aisladas para la oxidación de un hidroxipuesto o para la reducción de un oxocompuesto.

Ya se ha descrito un sistema de regeneración de cofactores para NADH usando malato deshidrogenasa ("enzima malato") (Can. J. Chem. Eng. 1992, volumen 70, págs. 306-312). En la publicación se usó para la aminación reductora de piruvato mediante alanina deshidrogenasa. El piruvato generado en la regeneración de cofactor se utilizó a continuación en la reacción de formación de productos.

En el documento WO 2004/022764 se describe igualmente la regeneración de NADH mediante malato deshidrogenasa. A diferencia de la publicación descrita anteriormente no se reutilizó el piruvato generado en la descarboxilación oxidativa de malato.

Se ha descrito un ejemplo de una reducción enzimática de D-xilosa para dar xilitol con sistema de regeneración de cofactores (FEBS J., 2005, volumen 272, págs. 3816-3827). Como enzima de regeneración de cofactores se usó un mutante NADPH dependiente de fosfito deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.* También a este respecto se trata de una reacción individual para la formación de productos.

Se han descrito ejemplos adicionales de una producción enzimática de compuestos orgánicos enriquecidos en enantiómeros quirales, tales como, por ejemplo, alcoholes o aminoácidos (Organic Letters, 2003, volumen 5, págs. 3649-3650; documento US 7.163.815; Biochem. Eng. J., 2008, volumen 39(2) págs. 319-327; documento EP 1285 962). En los sistemas se usó como enzima de regeneración de cofactores una oxidasa NAD(P)H dependiente de *Lactobacillus brevis* o *Lactobacillus sanfranciscensis*. En el caso de los ensayos se trata también de reacciones individuales para la formación de productos.

En el documento WO 2011/000693 se describe una 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, así como un procedimiento con el que es posible realizar reacciones redox en la posición 17 de 4-androsteno-3,17-diona. A este respecto se trata a su vez de una reacción de reducción aislada. En dichas reacciones de oxidación o de reducción que transcurren individualmente se suprimen las ventajas de una reacción en un solo recipiente, tales como, por ejemplo, la rentabilidad debido a ahorro de tiempo y de material, así como un mejor rendimiento debido a reacciones

en cascada enzimáticas.

Planteamiento y descripción del procedimiento

5 El objetivo de la presente invención era proporcionar un procedimiento para la regeneración de los cofactores redox NAD^+/NADH y/o, por ejemplo y, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, para realizar con ello de manera económica dos o más reacciones redox catalizadas enzimáticamente en una mezcla de reacción.

10 Este objetivo se alcanza según la presente invención en un procedimiento del tipo mencionado al principio porque se proporciona un procedimiento para la regeneración enzimática de los cofactores redox NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en una reacción en un solo recipiente, produciéndose como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente que transcurren en la misma mezcla de reacción adicionales (reacciones de formación de producto) el factor redox NAD^+/NADH en su forma reducida como NADH y el factor redox $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en su forma oxidada como NADP^+ , caracterizado porque

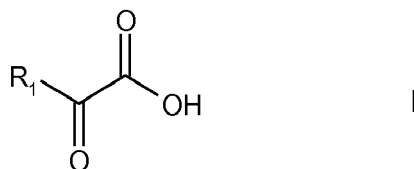
15 a) en la reacción de regeneración que convierte NADH de nuevo en NAD^+ , se reduce oxígeno por medio de una NADH oxidasa o piruvato por medio de una lactato deshidrogenasa, y

20 b) en la reacción de regeneración que convierte NADP^+ de nuevo en NADPH , se oxida 2-propanol por medio de una alcohol deshidrogenasa o malato por medio de una malato deshidrogenasa.

Un procedimiento, que se proporciona según la presente invención, se denomina en el presente documento también "procedimiento según la presente invención".

25 La solicitud da a conocer también en general un procedimiento para la regeneración enzimática de los cofactores redox NAD^+/NADH y/o, por ejemplo y, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en una reacción en un solo recipiente, produciéndose como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente que transcurren en la misma mezcla de reacción adicionales (reacciones de formación de producto) uno de los dos cofactores redox en su forma reducida y el en cada caso otro en su forma oxidada, en el que

30 a) en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor reducido de nuevo en su forma oxidada original, se reduce oxígeno o un compuesto de fórmula general



35 en la que R_1 representa un grupo alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) de cadena lineal o cadena ramificada o un grupo carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), y

40 b) en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, se oxida un cicloalcanol ($\text{C}_4\text{-C}_8$) o un compuesto de fórmula general



45 en la que R_2 y R_3 se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificado, alquenilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificado y contiene de uno a tres dobles enlaces, arilo, en particular arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$, carboxilo, o carboxialquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), en particular también cicloalquilo, por ejemplo cicloalquilo $\text{C}_3\text{-C}_8$.

A este respecto, R_2 y R_3 pueden elegirse independientemente entre sí del grupo que consiste en

50 1) -H,

2) -alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificado,

55 3) -alquenilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), en el que el alquenilo es de cadena lineal o ramificado y dado el caso contiene hasta tres dobles enlaces,

4) -cicloalquilo, en particular cicloalquilo C₃-C₈,

5) -arilo, en particular arilo C₆-C₁₂,

6) -carboxialquilo (C₁-C₄), si en el caso del compuesto I se trata de piruvato, dado el caso también carboxilo.

En el procedimiento dado a conocer R₂ y R₃ también pueden elegirse independientemente entre sí del grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₆), en el que el alquilo es de cadena lineal o ramificado, alqueno (C₁-C₆), en el que el alqueno es de cadena lineal o ramificado y contiene de uno a tres dobles enlaces, arilo, en particular arilo C₆-C₁₂, carboxilo, o carboxialquilo (C₁-C₄).

Con respecto al estado de la técnica, un procedimiento según la presente invención representa una mejora esencial de procedimientos en los que tanto se oxidan enzimáticamente como se reducen compuestos, dado que con ello se posibilita que transcurran las reacciones de oxidación y de reducción necesarias así como las reacciones asociadas para la regeneración de cofactores en una mezcla de reacción y al mismo tiempo se utilicen concentraciones de sustrato esencialmente mayores que en el caso del estado de la técnica.

En un procedimiento según la presente invención se utilizan los cofactores NADH y NADPH. A este respecto, NAD⁺ designa la forma oxidada y NADH la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido, mientras que NADP⁺ designa la forma oxidada y NADPH la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Como "reacción/reacciones de oxidación" y "reacción/reacciones de reducción" se denominan en este caso aquellas reacciones redox catalizadas enzimáticamente que no forman parte de la regeneración de cofactores y en un procedimiento según la presente invención están implicadas en la formación del producto. La(s) "reacción/reacciones de oxidación" y "reacción/reacciones de reducción" se agrupan bajo el término "reacciones de formación de producto". Las reacciones de formación de producto en un procedimiento según la presente invención incluyen en cada caso al menos una reacción de oxidación, así como al menos una reacción de reducción.

En el procedimiento según la invención se usa NAD⁺ como cofactor para la(s) reacción/reacciones de oxidación y NADPH como cofactor para la(s) reacción/reacciones de reducción. En este caso se da a conocer también un procedimiento en el que se usa NADP⁺ como cofactor para la(s) reacción/reacciones de oxidación y NADH como cofactor para las reacciones de reducción. En un procedimiento según la presente invención, la(s) reacción/reacciones de oxidación y la(s) reacción/reacciones de reducción pueden realizarse o bien en paralelo en el tiempo o sucesivamente en el tiempo, preferiblemente en paralelo en el tiempo en la misma mezcla de reacción.

Se denominan sustratos en este caso aquellos compuestos que se utilizan con el objetivo de la formación de productos. Se denominan cosustratos en este caso aquellos compuestos que se transforman en la regeneración de cofactores.

En un procedimiento según la presente invención pueden utilizarse tanto un sustrato como varios sustratos. A este respecto, la(s) reacción/reacciones de reducción y/o de oxidación pueden tener lugar tanto en el mismo sustrato (estructura básica molecular), como en diferentes sustratos, preferiblemente en el mismo sustrato. Además, en un procedimiento según la presente invención, la reacción de reducción y/o de oxidación puede tener lugar en el mismo o en diferentes grupos funcionales.

Un procedimiento según la presente invención es adecuado para un gran número de reacciones, por ejemplo, para la inversión de la configuración de hidroxidocompuestos estereoisoméricos por medio de oxidación para dar la cetona correspondiente y la reducción posterior para dar el hidroxidocompuesto estereoespecífico opuesto.

Se denomina "reacción en un solo recipiente" en este caso un procedimiento en el que dos o más reacciones redox enzimáticas implicadas en la formación de productos y dos sistemas enzimáticos para la regeneración de cofactores transcurren en una mezcla de reacción, sin que se aísle un producto intermedio.

La mención de un ácido o de la sal de un ácido incluye en este caso el término no mencionado en cada caso. Igualmente, la mención de ácidos, en particular ácidos biliares, incluye también en este caso todos los ésteres derivados de los mismos. Además, en este caso están incluidos también los compuestos dotados (parcialmente) de grupos protectores en la mención de las sustancias de base.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque la reacción de oxidación y la reacción de reducción transcurren en paralelo en el tiempo.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque tanto la reacción de oxidación como la reacción de reducción tienen lugar en la misma estructura básica molecular.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se

caracteriza porque en a) se utiliza piruvato (cosustrato), que se reduce por medio de una lactato deshidrogenasa para dar lactato, es decir, que en la reacción de regeneración que convierte el cofactor reducido de nuevo en su forma oxidada original, se reduce por medio de una lactato deshidrogenasa piruvato para dar lactato.

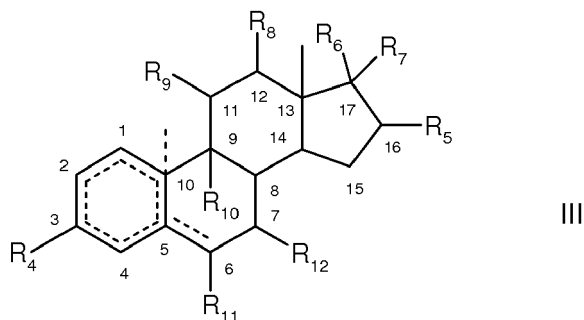
En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque en b) se utiliza 2-propanol (alcohol isopropílico, IPA) (cosustrato), que se oxida por medio de una alcohol deshidrogenasa para dar acetona, es decir, que en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, se oxida por medio de una alcohol deshidrogenasa 2-propanol para dar acetona.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque se utiliza oxígeno que se reduce por medio de una NADH oxidasa.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque en b) se utiliza malato (cosustrato), que se oxida por medio de una malato deshidrogenasa que descarboxila oxalacetato ("enzima malato") para dar piruvato y CO₂, por ejemplo, que en la reacción de regeneración, que convierte el cofactor oxidado de nuevo en su forma reducida original, se oxida por medio de una malato deshidrogenasa malato para dar piruvato y CO₂.

El piruvato generado se transforma en esta forma de realización en una reacción redox adicional, que no sirve para la formación de productos, sino que representa la segunda reacción de regeneración de cofactores.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque se utiliza para la realización de en cada caso al menos una reacción de oxidación y al menos una reacción de reducción en la misma mezcla de reacción en compuestos de fórmula general



en la que

R₄ significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R₅ significa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,

R₆ significa hidrógeno o un grupo hidroxilo,

R₇ significa hidrógeno, -COR₁₃, en la que R₁₃ es un grupo alquilo C₁-C₄ no sustituido o sustituido con un grupo hidroxilo, o un grupo carboxialquilo C₁-C₄ sustituido, en particular con un grupo hidroxilo, o no sustituido,

o R₆ y R₇ significa junto un grupo oxo,

R₈ significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R₉ significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R₁₀ significa hidrógeno, un grupo metilo o un halógeno,

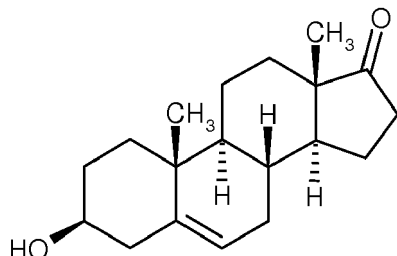
R₁₁ significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o halógeno, y

R₁₂ significa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo, significando el elemento estructural



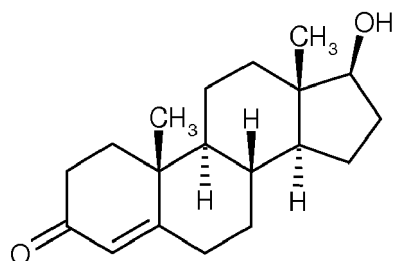
un anillo de benceno o un anillo con 6 átomos de carbono y 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C; encontrándose preferiblemente el sustrato/los sustratos para la(s) reacción/reacciones de reducción implicada(s) en la formación de productos en una concentración del <5% (p/v) en la mezcla de reacción.

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque tiene lugar una transformación enzimática de deshidroepiandrosterona (DHEA)



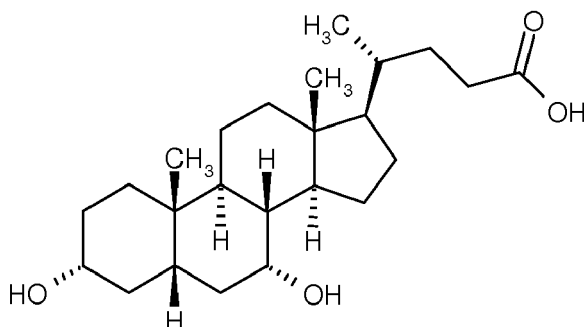
VII

en testosterona de fórmula



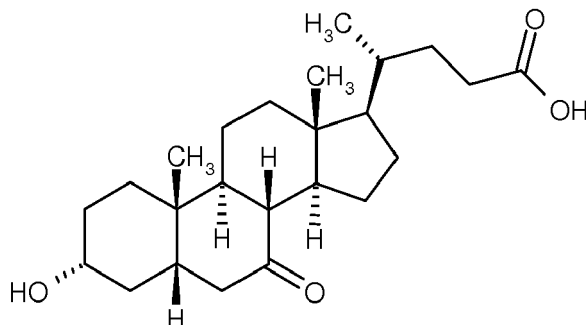
VIII

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque para la epimerización enzimática del compuesto hidroxiesteroideo ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colánico (ácido quenodesoxicólico, CDC) de fórmula



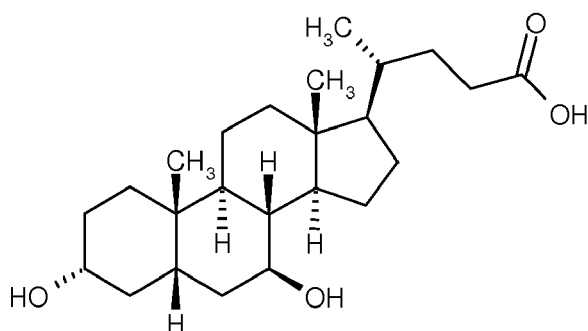
IV

tiene lugar mediante oxidación para dar ácido cetolitocólico (KLC) de fórmula



V

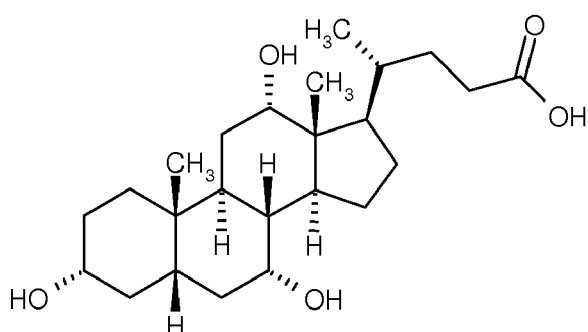
y la reducción posterior para dar el hidroxicompuento estereoisomérico ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colánico (ácido ursodesoxicólico) de fórmula



VI

por medio de dos hidroxisteroide deshidrogenasas estereoespecíficas de manera opuesta.

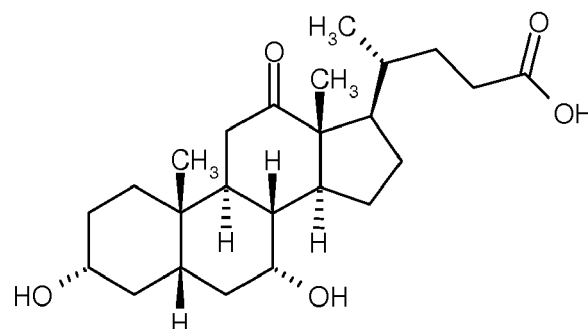
- 5 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque una epimerización enzimática de ácido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colánico (ácido cólico) de fórmula



IX

10 o bien

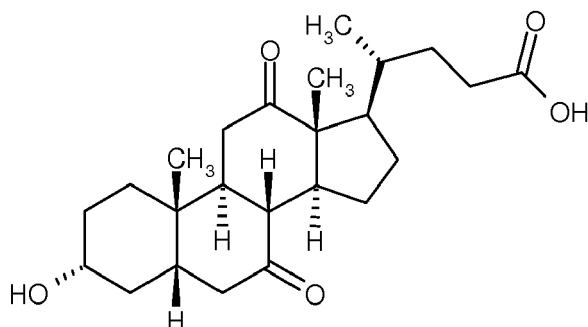
A) mediante oxidación para dar ácido $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-12-oxo- 5β -colánico (12-oxo-CDC) de fórmula



X

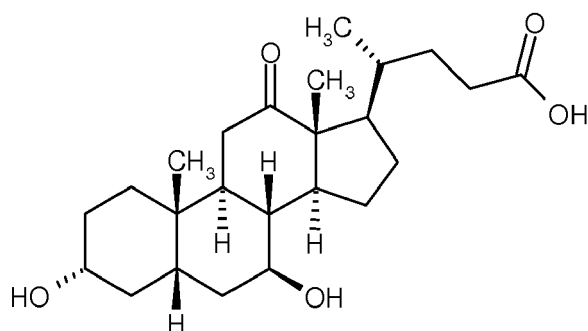
15

que se hace reaccionar adicionalmente para dar ácido 3α -hidroxi-7,12-dioxi- 5β -colánico (12oxo-KLC) de fórmula



XI

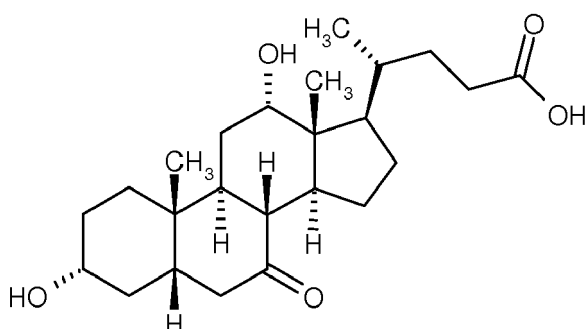
- 20 y la reducción posterior para dar el hidroxicompuento estereoisomérico ácido $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi-12-oxo- 5β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula



XII

o bien

- 5 B) mediante oxidación para dar ácido $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-7-oxo-5 β -colánico de fórmula

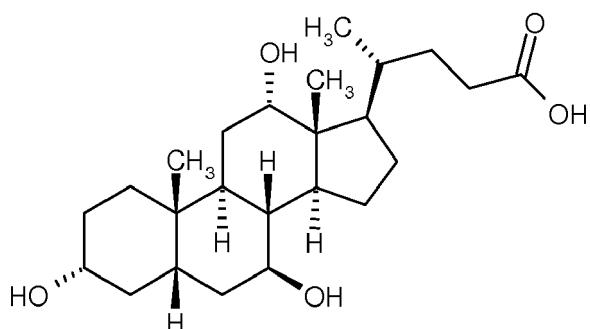


XIII

- 10 seguida de oxidación enzimática para dar ácido 3α -hidroxi-7,12-dioxi-5 β -colánico (12oxo-KLC) de fórmula XI, y la reducción posterior para dar el hidroxicompuento estereoisomérico ácido $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula XII,

o bien

- 15 C) mediante oxidación para dar ácido $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-7-oxo-5 β -colánico de fórmula XIII, seguida de reducción enzimática para dar ácido $3\alpha,7\beta,12\alpha$ -trihidroxi-5 β -colánico de fórmula



XIV

- 20 y la oxidación posterior para dar el hidroxicompuento estereoisomérico ácido $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula XII;

o bien

- 25 en cualquier combinación de A), B) y/o C;

por ejemplo, por medio de tres hidroxisteroide deshidrogenasas estereoespecíficas; siendo 2 de las tres hidroxisteroide hidrogenasas estereoespecíficas específicas de manera opuesta.

- 30 En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque se utiliza un azúcar C_5 o C_6 como sustrato, por ejemplo, que el procedimiento se utiliza para la isomerización de azúcares C_5 o C_6 .

En una forma de realización preferida de la presente invención, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque tiene lugar una isomerización de glucosa mediante reducción para dar sorbitol y oxidación para dar fructosa, por ejemplo, que el procedimiento se utiliza para la isomerización de glucosa mediante reducción para dar sorbitol y oxidación posterior para dar fructosa.

5 Un procedimiento según la presente invención se realiza preferiblemente en un sistema acuoso, siendo posible que el sustrato para la reacción de oxidación y de reducción se encuentre en parte sin disolver en forma de una suspensión y/o como segunda fase líquida.

10 En una forma de realización especial, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque el sustrato/los sustratos para la(s) reacción/reacciones de oxidación implicada(s) en la formación de productos se encuentra(n) en una concentración del al menos el 5% (p/v) y más, preferiblemente el 7% (p/v) y más, particularmente preferible el 9% (p/v) y más en la mezcla de reacción, por ejemplo del 5% (p/v) al 20% (p/v), tal como del 5% (p/v) al 15% (p/v), por ejemplo del 5% (p/v) al 12% (p/v), tal como del 5% (p/v) al 10% (p/v).

15 En una forma de realización especial, un procedimiento según la presente invención se caracteriza porque en las reacciones de formación de producto se alcanza en total una conversión de $\geq 70\%$, en particular $\geq 90\%$.

20 En un procedimiento según la presente invención, al sistema acuoso se le puede añadir un tampón. Tampones adecuados son, por ejemplo, fosfato de potasio, Tris-HCl y glicina con un valor de pH de desde 5 hasta 10, preferiblemente desde 6 hasta 9. Además o alternativamente, al sistema se le pueden añadir iones para la estabilización de las enzimas, tal como, por ejemplo, Mg^{2+} u otros aditivos, tal como, por ejemplo, glicerina. La concentración de los cofactores añadidos $NAD(P)^+$ y $NAD(P)H$ asciende en un procedimiento según la presente invención habitualmente a entre 0,001 mM y 10 mM, preferiblemente entre 0,01 mM y 1 mM.

25 En función de las enzimas usadas, el procedimiento según la presente invención puede realizarse a una temperatura de desde 10°C hasta 70°C, preferiblemente desde 20°C hasta 45°C.

30 Por hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSDH) se entienden aquellas enzimas que catalizan la oxidación de grupos hidroxilo para dar los grupos ceto correspondientes o a la inversa la reducción de grupos ceto para dar los grupos hidroxilo correspondientes en la estructura básica esteroidea.

35 Hidroxiesteroide deshidrogenasas adecuadas, que pueden utilizarse para reacciones redox en hidroxiesteroideos, son, por ejemplo, 3α -HSDH, 3β -HSDH, 7α -HSDH, 7β -HSDH o 17β -HSDH.

Enzimas adecuadas con actividad 7α -HSDH pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de clostridios (*Clostridium absonum*, *Clostridium sordelii*), *Escherichia coli* o *Bacteroides fragilis*.

40 Enzimas adecuadas con actividad 7β -HSDH pueden obtenerse, por ejemplo, de *Ruminococcus sp.* o *Clostridium absonum*.

Lactato deshidrogenasas adecuadas pueden obtenerse, por ejemplo, de *Oryctolagus cuniculus*.

45 Alcohol deshidrogenasas adecuadas pueden obtenerse, por ejemplo, de *Lactobacillus kefir*.

Una xilosa reductasa adecuada puede obtenerse, por ejemplo, de *Candida tropicalis*.

50 Sorbitol deshidrogenasas adecuadas pueden obtenerse, por ejemplo, de hígado de oveja, *Bacillus subtilis* o *Malus domestica*.

NADH oxidasas adecuadas pueden obtenerse, por ejemplo, de *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium aminovalericum*.

55 Las enzimas se usan en un procedimiento según la presente invención preferiblemente como proteínas sobreexpresadas de manera recombinante en *E. coli*, utilizándose además preferiblemente los lisados celulares correspondientes sin purificación adicional. A este respecto, la unidad enzimática 1 U corresponde a aquella cantidad de enzima que se necesita para transformar 1 μ mol de sustrato por min.

Descripción de las figuras

60 La figura 1 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico a través del producto intermedio ácido 3α -hidroxil-7-oxo- 5β -colánico con regeneración de cofactores usando 2-propanol y piruvato.

65 La figura 2 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido

ursodesoxicólico a través del producto intermedio ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colánico con regeneración de cofactores usando malato y piruvato.

La figura 3 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico a través del producto intermedio ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colánico con regeneración de cofactores usando 2-propanol y oxígeno.

La figura 4 muestra el esquema de reacción de la isomerización de glucosa para dar fructosa con regeneración de cofactores usando 2-propanol y piruvato.

La figura 5 muestra el esquema de reacción de la isomerización de glucosa para dar fructosa con regeneración de cofactores usando 2-propanol y oxígeno.

La figura 6 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido cólico para dar ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico a través de los productos intermedios ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico y ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxo-5 β -colánico con regeneración de cofactores usando 2-propanol y piruvato.

La figura 7 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido cólico para dar ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico a través de los productos intermedios ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico y ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxo-5 β -colánico con regeneración de cofactores usando 2-propanol y oxígeno.

La figura 8 y la figura 9 muestran esquemas de reacción de la epimerización de ácido cólico para dar ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico a través de los productos intermedios ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico y ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxo-5 β -colánico con regeneración de cofactores usando 2-propanol, piruvato y oxígeno.

La figura 10 muestra las posibles rutas de reacción de la epimerización de ácido cólico para dar ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico a través de diferentes productos intermedios con sistemas de regeneración de cofactores. Para reconstituir NAD⁺ se utilizaron de manera alternante lactato deshidrogenasa (piruvato como sustrato) y NADH oxidasa (oxígeno como sustrato). Para regenerar NADPH se utilizó alcohol deshidrogenasa (isopropanol como sustrato).

La figura 11 muestra el esquema de reacción de la epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico a través del producto intermedio ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colánico (ácido 7-cetolitocólico = 7K-LCA = KLC) con regeneración de cofactores usando 2-propanol y 2-pentanol (en cada caso alcohol deshidrogenasa) así como piruvato (lactato deshidrogenasa) y oxígeno (NADH oxidasa).

En las figuras se usan las siguientes abreviaturas:

BsSDH	=	sorbitol deshidrogenasa de <i>Bacillus subtilis</i>
CA	=	ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colánico
7 β -CA	=	ácido 3 α ,7 β ,12 α -trihidroxi-5 β -colánico
Caoxo	=	NADH oxidasa de <i>Clostridium aminovalericum</i>
CDC	=	ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colánico
CDCA	=	ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colánico
CtXR	=	xilosa reductasa de <i>Candida tropicalis</i>
7 α -HSDH	=	7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
7 β -HSDH	=	7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
12 α -HSDH	=	12 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa
KLC	=	ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colánico
7K-LCA	=	ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-5 β -colánico
LacDH	=	lactato deshidrogenasa NAD(H) dependiente

	LkADH	=	alcohol deshidrogenasa NADP(H) dependiente de <i>Lactobacillus kefir</i>
	Lmoxid	=	NADH oxidasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
5	MalDH	=	malato deshidrogenasa NADP(H) dependiente de <i>E. coli</i>
	7-oxo-CA	=	ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-7-oxo-5 β -colánico
10	12oxo-CDC	=	ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico
	12oxo-KLC	=	ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxo-5 β -colánico
	12oxo-UDC	=	ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico
15	SISDH	=	sorbitol deshidrogenasa de hígado de oveja
	SmOxo	=	NADH oxidasa de <i>Streptococcus mutans</i>
20	UDC	=	ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colánico
	UDCA	=	ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colánico

En los siguientes ejemplos, todos los datos de temperatura son en grados Celsius (°C). Se usan las siguientes abreviaturas:

25	EtOAc	acetato de etilo
	H	hora(s)
30	IPA	alcohol isopropílico (2-propanol)
	MeOH	metanol
35	TA	temperatura ambiente

Ejemplo 1

Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg de ácido quenodesoxicólico, 12 U de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 6 U de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques* así como NAD⁺ 0,5 mM y NADPH 0,3 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 6 U de lactato deshidrogenasa recombinante y piruvato de sodio 350 mM. Para la regeneración de NADPH se utilizan 6 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2,4% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH = 7,8) a 25°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido ursodesoxicólico. Se dosifican posteriormente IPA al 1,6% (p/v) tras 6 h, IPA al 2,4% (p/v) tras 16 h, IPA al 3,9% (p/v) tras 24 h e IPA al 0,8% (p/v) tras 40 h. Además, se añaden tras 24 h 20 μ l de 4-metil-2-pentanol. Tras 46 h se añaden 200 μ l de 2-pentanol, así como IPA al 1,6% (p/v). Tras 48 h el porcentaje de ácido ursodesoxicólico en todos los ácidos biliares en la mezcla de reacción asciende a >97%.

Ejemplo 2

Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y dependiente de malato deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg de ácido quenodesoxicólico, 20 U de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 20 U de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 1 mM y NADPH 1 mM.

Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 10 U de la lactato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich) y al inicio de la reacción piruvato de sodio 16,5 mM. Para la regeneración de NADPH se utilizan 20 U de la malato deshidrogenasa

recombinante de *Escherichia coli* y malato de sodio 320 mM. La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH = 7,8) a 25°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar un escape el CO₂ generado. Se dosificaron posteriormente 20 U de 7 α -HSDH, así como 10 U de lactato deshidrogenasa tras 16 h y 40 h. Se dosificaron posteriormente 10 U de 7 β -HSDH tras 20 h, 24 h, 44 h y 48 h. Además, se dosificaron posteriormente 10 U malato deshidrogenasa tras 40 h. Tras 72 h el porcentaje de ácido ursodesoxicólico en todos los ácidos biliares en la mezcla de reacción asciende a aproximadamente el 90%.

Ejemplo 3

Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de NADH oxidasa y de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg de ácido quenodesoxicólico, 12 U de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 7,5 U de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 1 mM y NADPH 1 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 20 U de la NADH oxidasa recombinante de *Clostridium aminovalericum*. Para la regeneración de NADPH se utilizan 5 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH 6) a 25°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido ursodesoxicólico. Se dosifican posteriormente IPA al 2% tras 18 h, 22 h, 26 h y 41 h así como IPA al 5% tras 41 h y 48 h. Tras 24 h se dosifican posteriormente 20 U de NADH oxidasa y tras 41 h 7,5 U de 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa así como 5 U de alcohol deshidrogenasa. Tras 48 h el porcentaje de ácido ursodesoxicólico en todos los ácidos biliares en la mezcla de reacción asciende a aproximadamente el 95-98%.

Ejemplo 4

Procesamiento y análisis de los ácidos biliares

Tras la finalización de las reacciones, tal como se describen en los ejemplos 1 a 3, se extrae la mezcla de reacción con EtOAc. El disolvente se elimina a continuación por medio de evaporación. El residuo de evaporación se disuelve en una mezcla de MeOH:acetonitrilo:tampón fosfato de sodio pH = 3, 0,78 g/l (40:30:37) y se sigue la transformación del ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico por medio de HPLC. A este respecto, se utiliza una columna de separación de fase invertida (ZORBAX®Eclipse® XDB C18, flujo 0,8 ml/min) y un detector de refracción de luz (RID), Agilent 1260 Infinity®, ambos de Agilent Technologies Inc.

Ejemplo 5

Transformación de glucosa para dar fructosa mediante una xilosa reductasa y una sorbitol hidrogenasa usando una alcohol deshidrogenasa para reciclar el NADPH y una lactato deshidrogenasa para reciclar el NAD⁺

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de glucosa y 6 U/ml de la xilosa reductasa recombinante de *Candida tropicalis* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3)) y NADP⁺ 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor se añaden IPA al 7% (v/v) y 6 U/ml de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3)). Las enzimas se utilizan en forma de lisado celular. La reacción tiene lugar durante 24 h a 40°C y pH = 9 (tampón Tris HCl 50 mM) con agitación continua (900 rpm) en un sistema abierto. El sistema abierto conduce a la eliminación de la acetona, lo que desplaza la reacción en el sentido de la formación de sorbitol. En el sistema abierto se evaporan agua e IPA igualmente, de modo que estos se dosifican posteriormente tras 6 h y 21 h. A este respecto, en cada caso se ajusta de nuevo un volumen total de 0,5 ml, así como una concentración de IPA del 7% (v/v). Tras 24 h se incuba el recipiente de reacción a 60°C a vacío para desactivar las enzimas y evaporar los disolventes orgánicos. Tras el enfriamiento hasta TA se añaden la sorbitol hidrogenasa recombinante de *Bacillus subtilis* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3)) en una concentración final de 5 U/ml, ZnCl₂ en una concentración final de 1 mM y NAD⁺ en una concentración final de 0,1 mM. Para la regeneración de cofactores se utilizan 5 U/ml (concentración final) de lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (Sigma Aldrich) y piruvato 300 mM. La mezcla básica se repone hasta 0,5 ml con agua. La reacción tiene lugar durante 24 h más a 40°C con agitación continua (900 rpm) en el sistema cerrado. Se alcanza una conversión de la D-glucosa para dar D-fructosa de >90%.

Ejemplo 6

Conversión de la glucosa para dar fructosa mediante una xilosa reductasa y una sorbitol hidrogenasa usando una alcohol deshidrogenasa para reciclar el NADPH y una oxidasa para reciclar el NAD⁺

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg/ml de glucosa, 6 U/ml de la xilosa reductasa recombinante de *Candida tropicalis* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3)) y NADP⁺ 0,1 mM. Para la regeneración del cofactor se utilizan IPA al 7% (v/v) y la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3)).

Las enzimas se utilizan en forma de lisado celular. La reacción tiene lugar durante 24 h a 40°C y pH = 8 (tampón Tris-HCl 50 mM) con agitación continua (900 rpm) en un sistema abierto. El sistema abierto conduce a la eliminación de la acetona, lo que desplaza la reacción en el sentido de la formación de sorbitol. En el sistema abierto se evaporan agua e IPA igualmente, de modo que estos se dosifican posteriormente tras 6 h y 21 h. A este respecto, se ajusta en cada caso de nuevo un volumen total de 0,5 ml y una concentración de IPA del 7% (v/v).

Tras 24 h se incuba el recipiente de reacción a 60°C a vacío, para desactivar las enzimas así como para evaporar tanto la acetona generada como IPA. Tras el enfriamiento hasta temperatura ambiente se añaden la sorbitol hidrogenasa recombinante de *Bacillus subtilis* (sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3) en una concentración final de 5 U/ml, CaCl₂ en una concentración final de 1 mM y una mezcla de NAD⁺ y NADH en una concentración final de 0,1 mM. Para la regeneración de cofactores se utilizan 10 U/ml (concentración final) de la NADH oxidasa de *Leuconostoc mesenteroides* sobreexpresada en *E.coli* BL21 (DE3). Las enzimas se utilizan en forma de lisado celular. La mezcla básica se repone hasta 0,5 ml con agua. La reacción tiene lugar durante 24 h a 40°C con agitación continua (900 rpm) en el sistema abierto, para garantizar un abastecimiento de oxígeno suficiente para la NADH oxidasa desde el aire. En el sistema abierto a 40°C se evapora el agua. Por tanto, tras 6 h y 21 h se repone con agua hasta 0,5 ml. Se alcanza una conversión de la D-glucosa para dar D-fructosa de aproximadamente el 98%.

Ejemplo 7

Procesamiento y análisis de los azúcares

La mezcla básica se incuba durante 10 min a 65°C para desactivar las enzimas y a continuación se centrifuga. El sobrenadante se filtra entonces a través de un filtro de PVDF 0,2 µm y se analiza por medio de HPLC de intercambio de ligandos (Agilent Technologies Inc.). A este respecto se separan azúcares y polioles a través de una columna de plomo de Showa Denko K.K. (Shodex® Sugar SP0810) con un flujo de 0,5 ml/min de agua (VWR International GmbH, calidad para HPLC) a 80°C. La detección tiene lugar por medio de un detector de refracción de luz (RID, Agilent 1260 Infinity®, Agilent Technologies Inc.). Se usa un filtro en línea de Agilent Technologies Inc., así como, como columnas previas, una columna de intercambio aniónico (Shodex® Axpak-WAG), una columna de fase invertida (Shodex® Asahipak® ODP-50 6E) y una columna previa de azúcar (SUGAR SP-G) de Showa Denko K.K.

Ejemplo 8

Bioconversión de ácido cólico para dar ácido 3α,7β-dihidroxi-12-oxo-5β-colánico mediante 12α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y dependiente de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 25 mg de ácido cólico, 12,5 U de la 12α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Eggertella lenta* o *Lysinibacillus sphaericus*, 16 U de la 7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 6 U de la 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 1 mM y NADPH 1 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 12,5 U de la lactato deshidrogenasa recombinante de *Oryctolagus cuniculus* (isoforma de músculo) y piruvato de sodio 200 mM. Para la regeneración de NADPH se utilizan 5 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH 7,8) a 25°C con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido 3α,7β-dihidroxi-12-oxo-5β-colánico. Se dosifica posteriormente IPA al 2% tras 18 h y 24 h. Tras 48 h se ha convertido el 61% del ácido cólico utilizado para dar ácido 3α,7α-dihidroxi-β-oxo-5β-colánico.

Ejemplo 9

Bioconversión de ácido cólico para dar ácido 3α,7β-dihidroxi-12-oxo-5β-colánico mediante 12α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa, dependiente de NADH oxidasa y dependiente de alcohol deshidrogenasa

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 25 mg de ácido cólico, 12,5 U de la 12α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Eggertella lenta* o *Lysinibacillus sphaericus*, 16 U de la 7α-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 6 U de la 7β-hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 1 mM y NADPH 1 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 5 U de la NADH oxidasa recombinante de *Leuconostoc mesenteroides* y 12,5 U de la lactato deshidrogenasa recombinante de *Oryctolagus cuniculus* (isoforma de músculo) y piruvato de sodio 200 mM. Para la regeneración de NADPH se utilizan 5 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH 7,8) a 25°C con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido 3α,7β-dihidroxi-12-oxo-5β-colánico. Se dosifica posteriormente IPA al 2% (p/v) tras 18 h y 24 h. Tras 48 h se ha convertido

el 70% del ácido cólico utilizado para dar ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico.

Ejemplo 10

5 Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y dependiente de alcohol deshidrogenasa. Ventaja de la adición de cloruro de manganeso (MnCl₂)

10 Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg de ácido quenodesoxicólico, 12 U de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 6 U de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 0,5 mM y NADPH 0,3 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 6 U de lactato deshidrogenasa recombinante y piruvato de sodio 350 mM. Para la regeneración de NADPH se utilizan 6 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2,4% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH = 7,8) con MnCl₂ 5 mM a 25°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido ursodesoxicólico. Se dosifican posteriormente IPA al 1,6% (p/v) tras 6 h, IPA al 2,4% (p/v) tras 16 h e IPA al 3,9% (p/v) tras 24 h. Tras 36 h se añaden 200 μ l de 2-pentanol, así como IPA al 3% (p/v) y tras 48 h se dosifican posteriormente 100 μ l de 2-pentanol e IPA al 4% (p/v). Tras 64 h el porcentaje de ácido ursodesoxicólico en todos los ácidos biliares en la mezcla de reacción asciende a >99%. En particular, el porcentaje de ácido quenodesoxicólico asciende a aproximadamente el 0,3%. En una mezcla básica de control sin adición de MnCl₂ el porcentaje de ácido quenodesoxicólico se encuentra a aproximadamente el 2% y el porcentaje de ácido ursodesoxicólico a aproximadamente el 97,5% (en cada caso valores medios de 5 experimentos).

25 Ejemplo 11

Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de alcohol deshidrogenasa, así como un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y dependiente de NADH oxidasa combinado

Una mezcla básica de 0,5 ml contiene 50 mg de ácido quenodesoxicólico, 12 U de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 6 U de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 0,5 mM y NADPH 0,3 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 6 U de lactato deshidrogenasa recombinante y piruvato de sodio 350 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan adicionalmente 9 U de la NADH oxidasa recombinante de *Leuconostoc mesenteroides*, así como 6 U de la NADH oxidasa recombinante de *Clostridium aminovalericum*. Para la regeneración de NADPH se utilizan 6 U de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 2,4% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH = 7,8) a 25°C y con agitación continua (850 rpm). Se usa además un sistema abierto para posibilitar la evaporación de acetona y desplazar la reacción en el sentido del ácido ursodesoxicólico. Se dosifican posteriormente IPA al 1,6% (p/v) tras 6 h, IPA al 2,4% (p/v) tras 16 h e IPA al 3,9% (p/v) tras 24 h. Tras 36 h se añaden 200 μ l de 2-pentanol, así como IPA al 3% (p/v) y tras 48 h se dosifican posteriormente 100 μ l de 2-pentanol e IPA al 4% (p/v). Tras 64 h el porcentaje de ácido ursodesoxicólico en todos los ácidos biliares en la mezcla de reacción asciende a >99%. En particular, el porcentaje de ácido quenodesoxicólico asciende a aproximadamente el 0,2%. En una mezcla básica de control sin adición de NADH oxidasa el porcentaje de ácido quenodesoxicólico se encuentra a aproximadamente el 2% y el porcentaje de ácido ursodesoxicólico a aproximadamente el 97,5% (misma mezcla básica de control que para el ejemplo 11; en cada caso valores medios de 5 experimentos).

50 Ejemplo 12

Epimerización de ácido quenodesoxicólico para dar ácido ursodesoxicólico mediante 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa usando un sistema de regeneración de cofactores dependiente de alcohol deshidrogenasa, así como un sistema de regeneración de cofactores dependiente de lactato deshidrogenasa y dependiente de NADH oxidasa combinado. Efecto aditivo de 2-pentanol y 2-propanol

Una mezcla básica de 50 ml contiene 5 g de ácido quenodesoxicólico, 24 U/ml de la 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Escherichia coli*, 12 U/ml de la 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa recombinante de *Ruminococcus torques*, así como NAD⁺ 0,5 mM y NADPH 0,3 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan 12 U/ml de lactato deshidrogenasa recombinante y piruvato de sodio 350 mM. Para la regeneración de NAD⁺ se utilizan adicionalmente 18 U/ml de la NADH oxidasa recombinante de *Leuconostoc mesenteroides* así como 12 U/ml de la NADH oxidasa recombinante de *Clostridium aminovalericum*. Para la regeneración de NADPH se utilizan 12 U/ml de la alcohol deshidrogenasa recombinante de *Lactobacillus kefir* e inicialmente IPA al 1,5% (p/v). La reacción se realiza en un tampón fosfato de potasio acuoso (100 mM, pH = 7,8) con MnCl₂ 5 mM a 25°C. En un matraz de 3 bocas se agita con un agitador KPG a aproximadamente 100 rpm. Se garantiza una eliminación de la

acetona generada durante la reacción mediante una corriente de aire de aproximadamente 400-600 ml/min a través del recipiente de reacción. Dado que se evapora igualmente 2-propanol, son necesarias dosificaciones posteriores. Estas ascienden en el ejemplo a 0,75 ml (1,5 h), 0,75 ml (3 h), 0,5 ml (4 h), 0,75 ml (6 h), 0,75 ml (8 h), 0,5 ml (11 h), 0,5 ml (14 h), 0,5 ml (17 h), 0,5 ml (21 h), 1 ml (23 h), 2,5 ml (25 h), 4 ml (29 h). Tras aproximadamente 30 h se añaden 20 ml de 2-pentanol, así como 2 ml de 2-propanol. Tras 46 h de tiempo de reacción total el porcentaje de ácido 7-cetolitolcóico asciende a aproximadamente el 1% (con respecto a la suma de ácido quenodesoxicóico, ácido ursodesoxicóico y ácido 7-cetolitolcóico). Se añade ahora adicionalmente 2-propanol: 3 ml (46 h), 4 ml (52 h), 4 ml (54 h) así como adicionalmente 10 ml de 2-pentanol. Tras 72 h de tiempo de reacción total el porcentaje de ácido 7-cetolitolcóico puede reducirse hasta menos del 0,2%. El porcentaje de ácido ursodesoxicóico asciende a >99%.

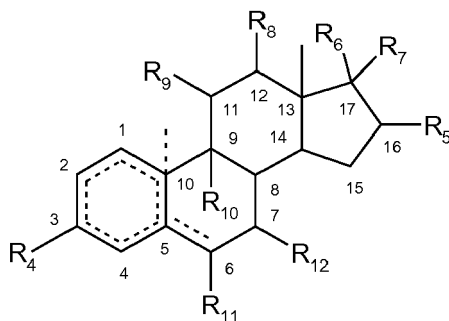
Ejemplo 13

Procesamiento y análisis de los ácidos biliares

Tras la finalización de las reacciones, tal como se describen en los ejemplos 8 a 12, los ácidos biliares contenidos en las muestras pueden analizarse por medio de un método tal como se describe en el ejemplo 4.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la regeneración enzimática de los cofactores redox NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en una reacción en un solo recipiente, acumulándose como resultado de al menos dos reacciones redox catalizadas enzimáticamente que transcurren en la misma mezcla de reacción adicionales (reacciones de formación de producto) el factor redox NAD^+/NADH en su forma reducida como NADH y el factor redox $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en su forma oxidada como NADP^+ , caracterizado porque
 - a) en la reacción de regeneración, que convierte NADH de nuevo en NAD^+ , se reduce oxígeno por medio de una NADH oxidasa o piruvato por medio de una lactato deshidrogenasa, y
 - b) en la reacción de regeneración, que convierte NADP^+ de nuevo en NADPH , se oxida 2-propanol por medio de una alcohol deshidrogenasa o malato por medio de una malato deshidrogenasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la(s) reacción/reacciones de oxidación y la(s) reacción/reacciones de reducción tienen lugar en el mismo sustrato (estructura básica molecular).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la(s) reacción/reacciones de oxidación y la(s) reacción/reacciones de reducción transcurren en paralelo en el tiempo.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en la reacción de regeneración, que convierte NADP^+ en NADPH , se oxida por medio de una alcohol deshidrogenasa 2-propanol para dar acetona.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque en la reacción de regeneración, que convierte NADH en NAD^+ , se reduce por medio de una lactato deshidrogenasa piruvato para dar lactato.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque en la reacción de regeneración, que convierte NADP^+ en NADPH , se oxida por medio de una malato deshidrogenasa malato para dar piruvato y CO_2 .
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se utiliza para la realización de en cada caso al menos una reacción de oxidación y al menos una reacción de reducción en la misma mezcla de reacción en compuestos de fórmula general



III

en la que

R_4 significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R_5 significa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,

R_6 significa hidrógeno o un grupo hidroxilo,

R_7 significa hidrógeno, $-\text{COR}_{13}$, en la que R_{13} es un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ no sustituido o sustituido con un grupo hidroxilo, o un grupo carboxialquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ sustituido, en particular con un grupo hidroxilo, o no sustituido,

o R_6 y R_7 significan juntos un grupo oxo,

R_8 significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

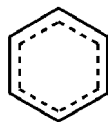
R_9 significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo o un grupo oxo,

R₁₀ significa hidrógeno, un grupo metilo o halógeno,

R₁₁ significa hidrógeno, un grupo metilo, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o halógeno, y

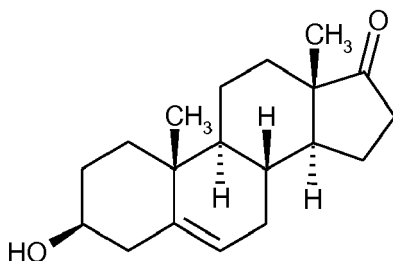
5 R₁₂ significa hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo oxo o un grupo metilo,

Significando el elemento estructural



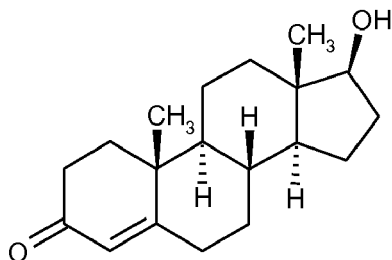
10 un anillo de benceno o un anillo con 6 átomos de carbono y 0, 1 o 2 dobles enlaces C-C; encontrándose en particular el sustrato/los sustratos para la(s) reacción/reacciones de reducción implicada(s) en la formación de productos en una concentración del <5% (p/v) en la mezcla de reacción.

15 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque se utiliza para la transformación de deshidroepiandrosterona (DHEA) de fórmula



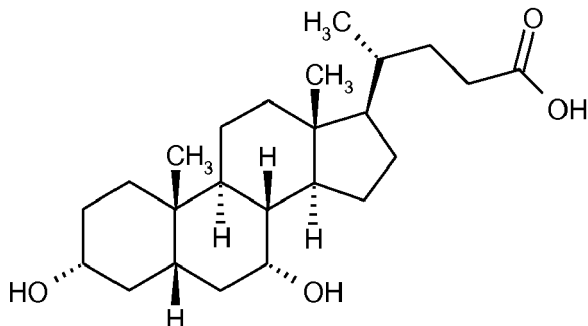
VII

20 en testosterona de fórmula



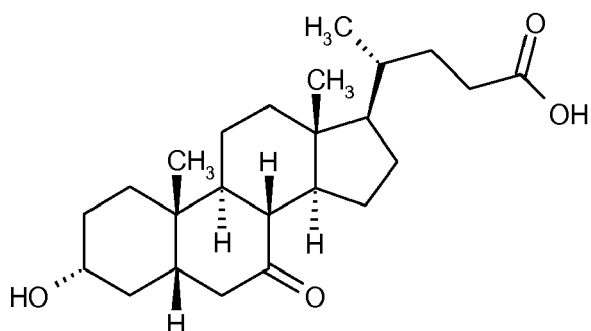
VIII

25 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque se utiliza para la epimerización enzimática de ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colánico (ácido quenodesoxicólico) de fórmula



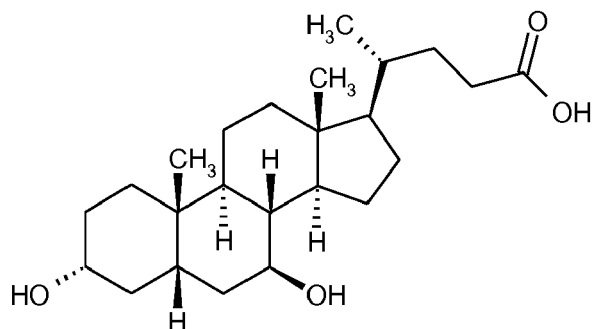
IV

30 mediante oxidación para dar ácido cetolitolcólico de fórmula



V

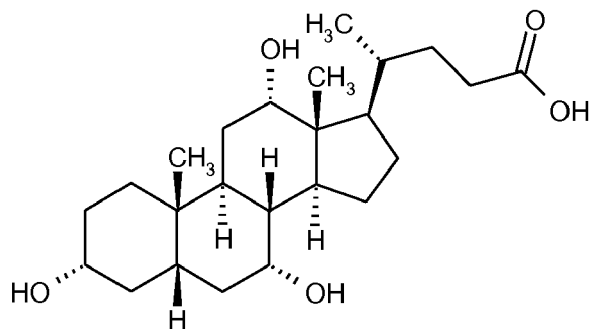
y la reducción posterior para dar el hidroxicompuento estereoisomérico ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-5 β -colánico (ácido ursodesoxicólico) de fórmula



VI

por medio de dos hidroxisteroide deshidrogenasas estereoespecíficas opuestas, catalizándose dado el caso la reacción de oxidación mediante una 7 α -hidroxisteroide deshidrogenasa de *E. coli* y/o la reacción de reducción mediante una 7 β -hidroxisteroide deshidrogenasa de *Ruminococcus torques*.

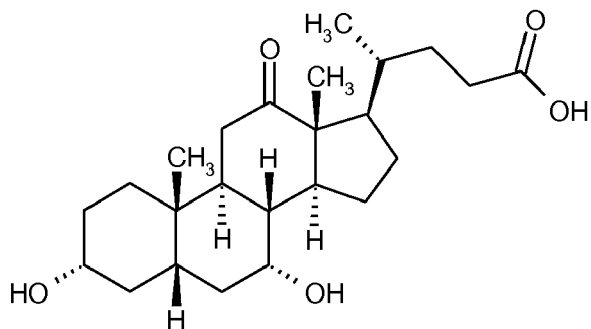
10. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque se utiliza para la epimerización enzimática de ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colánico (ácido cólico) de fórmula



IX

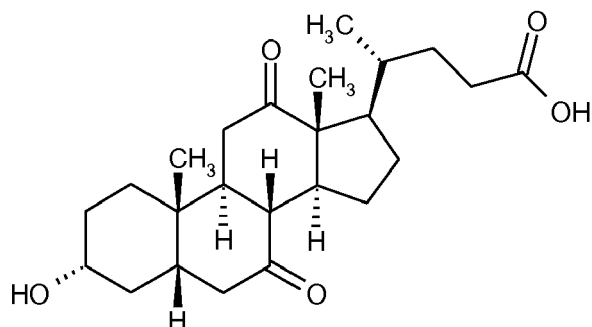
o bien

- A) mediante oxidación para dar ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico (12-oxo-CDC) de fórmula



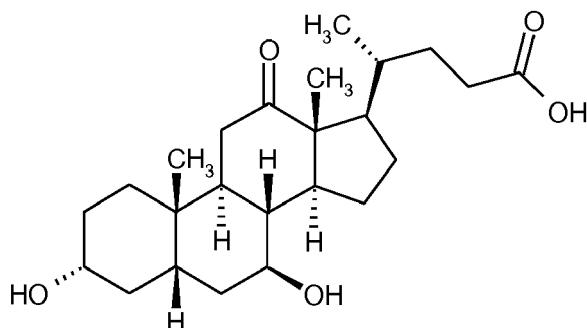
X

que se transforma adicionalmente en ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxi-5 β -colánico (12oxo-KLC) de fórmula



XI

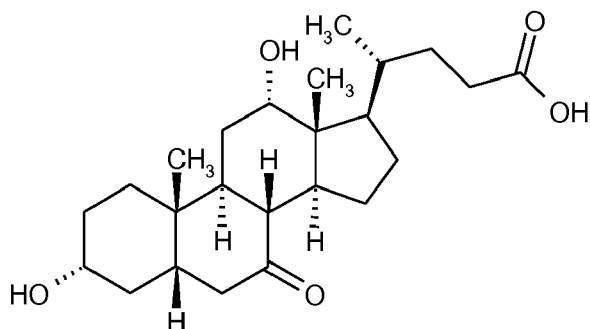
5 y la reducción posterior para dar el hidrox compuesto estereoisomérico ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula



XII

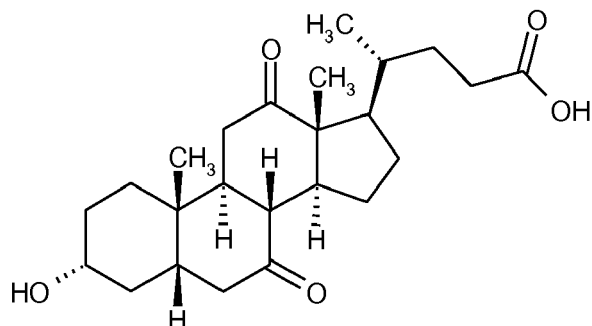
10 o bien

B) mediante oxidación para dar ácido 3 α ,12 α -dihidroxi-7-oxo-5 β -colánico de fórmula



XIII

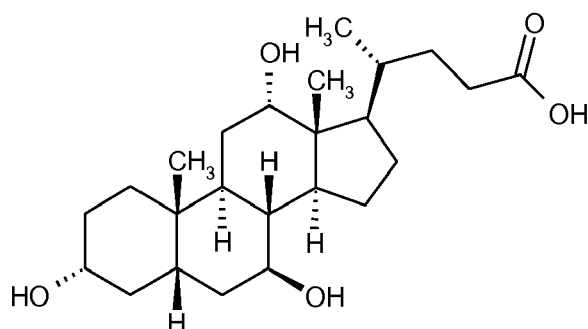
15 seguida de oxidación enzimática para dar ácido 3 α -hidroxi-7,12-dioxi-5 β -colánico (12oxo-KLC) de fórmula



XI

20 y la reducción posterior para dar el hidrox compuesto estereoisomérico ácido 3 α ,7 β -dihidroxi-12-oxo-5 β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula XII, o

C) mediante oxidación para dar ácido $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-7-oxo- 5β -colánico de fórmula XIII, seguida de reducción enzimática para dar ácido $3\alpha,7\beta,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colánico de fórmula



XIV

y la oxidación posterior para dar el hidrox compuesto estereoisomérico ácido $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi-12-oxo- 5β -colánico (ácido 12-cetoursodesoxicólico) de fórmula XII; por medio de tres hidroxisteroide deshidrogenasas estereoespecíficas; siendo 2 de las tres hidroxisteroide deshidrogenasas estereoespecíficas específicas de manera opuesta.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se utiliza para la isomerización de azúcares C_5 o C_6 , en particular para la isomerización de glucosa mediante reducción para dar sorbitol y la oxidación posterior para dar fructosa.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el sustrato/los sustratos para la(s) reacción/reacciones de oxidación implicada(s) en la formación de productos se encuentra(n) en una concentración del 5% (p/v) y más, en particular del 7% (p/v) y más, en particular del 9% (p/v) y más en la mezcla de reacción.

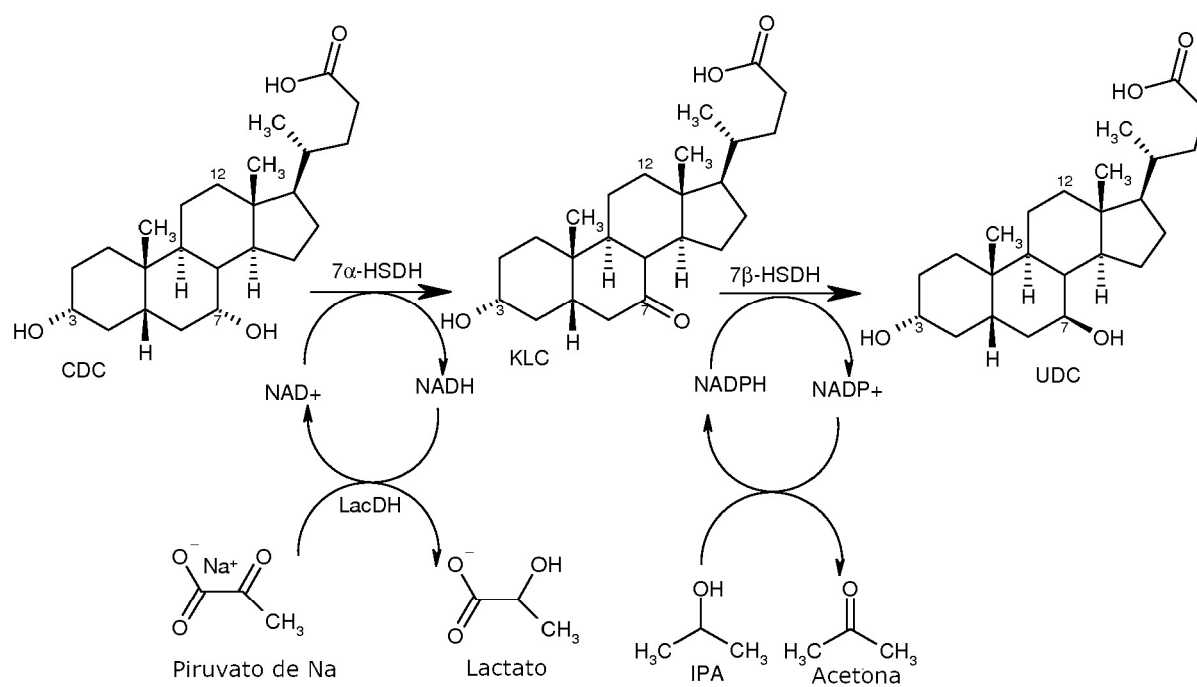


Fig. 1

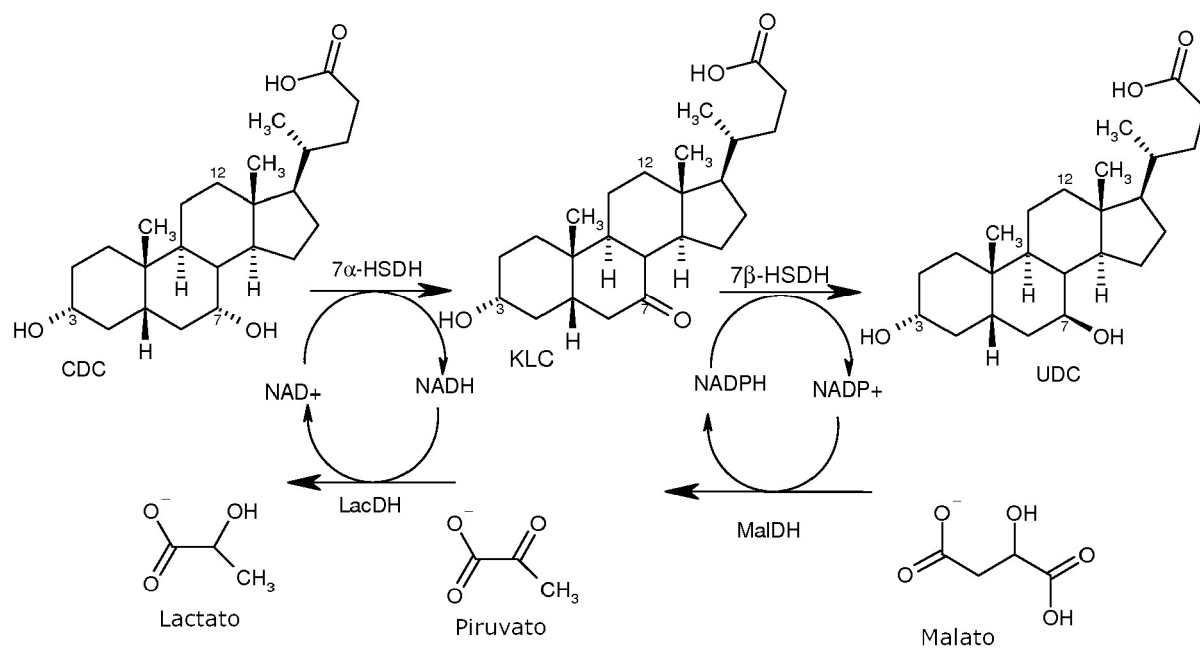


Fig. 2

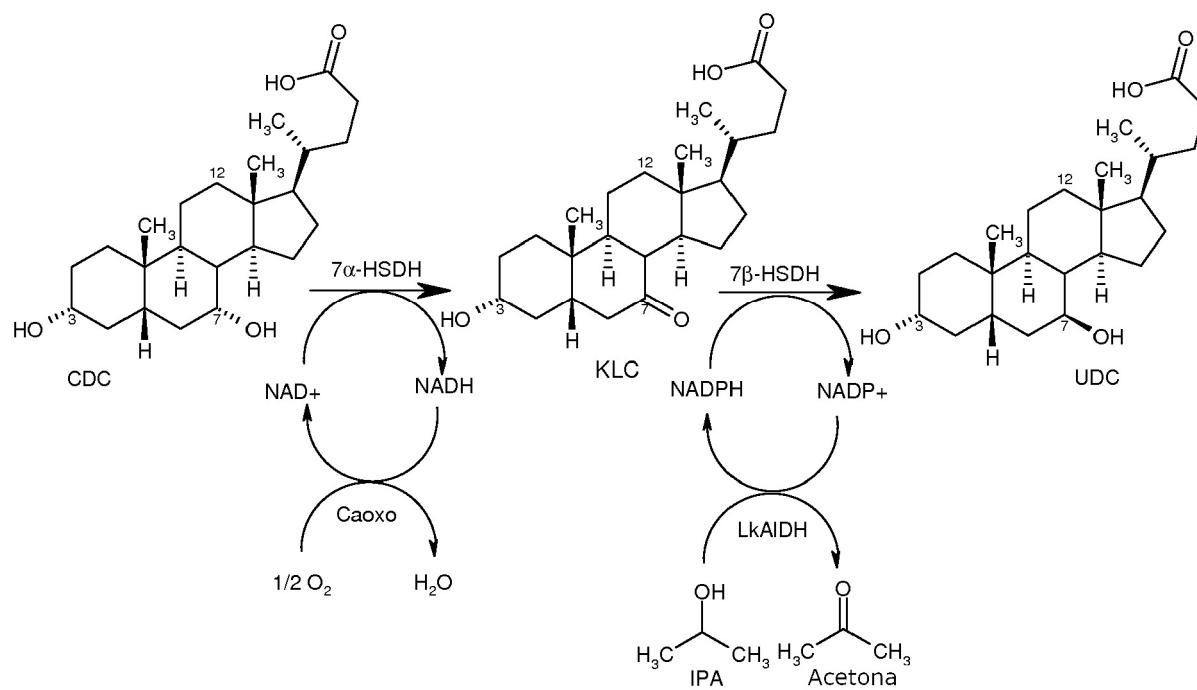


Fig. 3

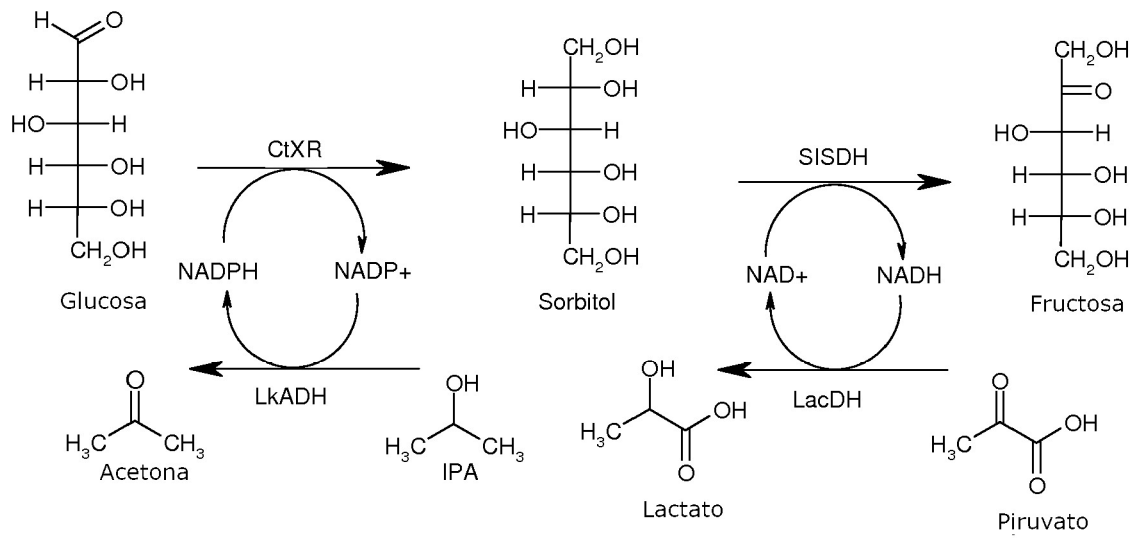


Fig. 4

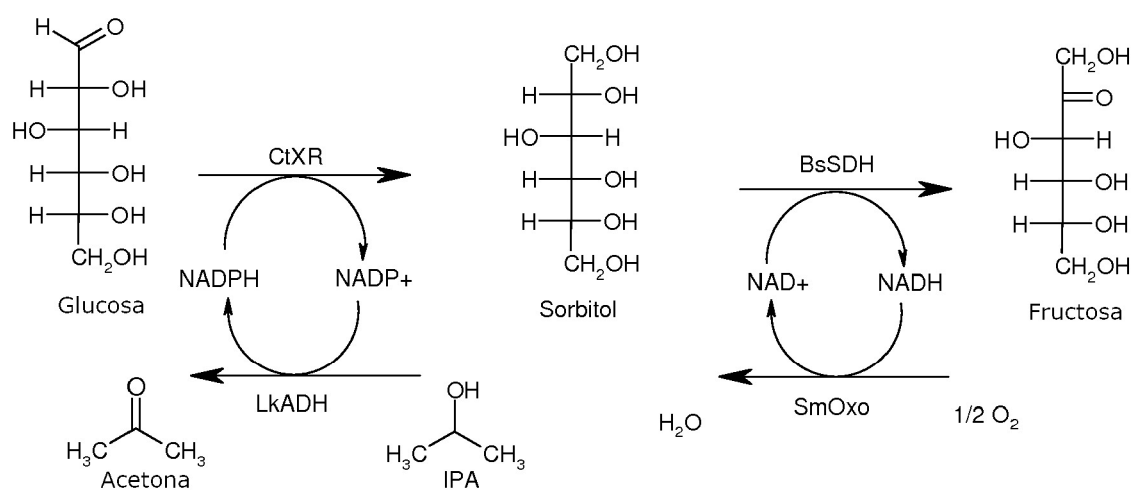


Fig. 5

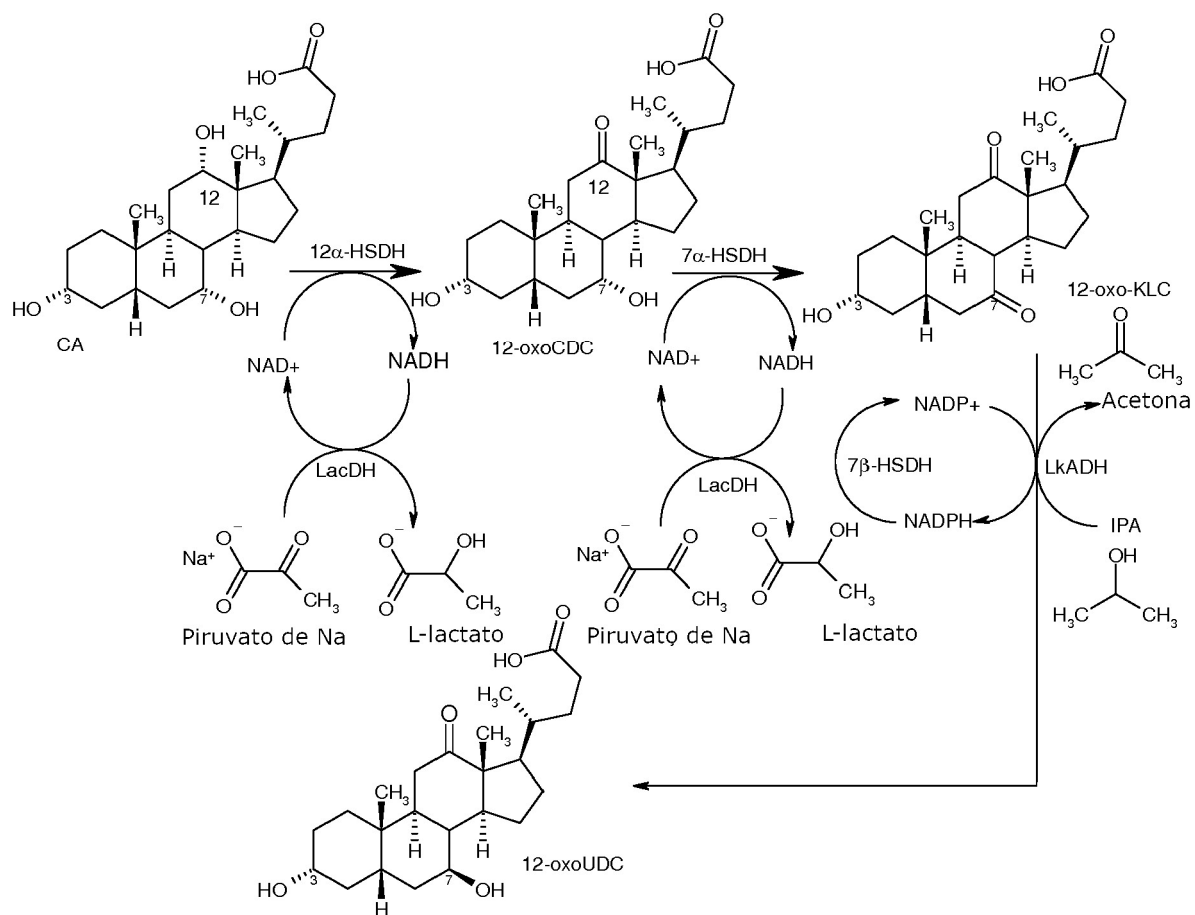


Fig. 6

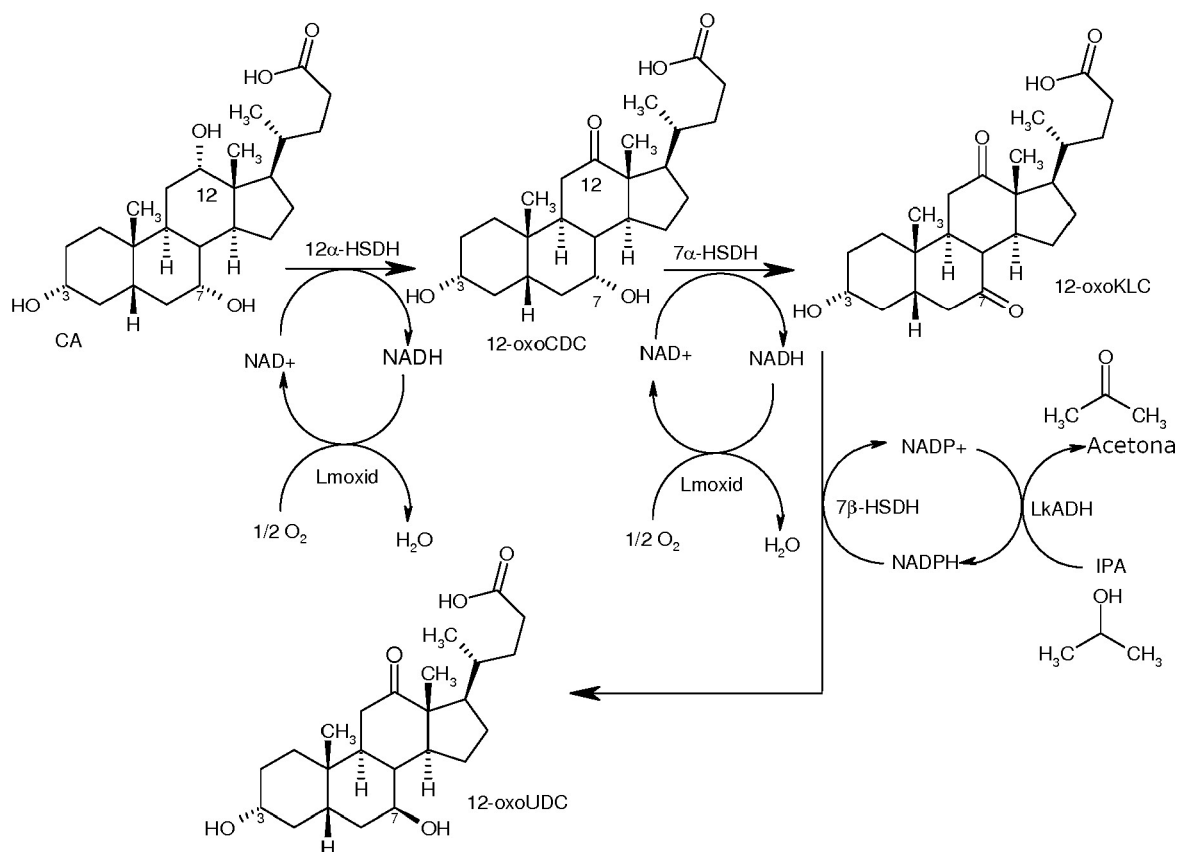


Fig. 7

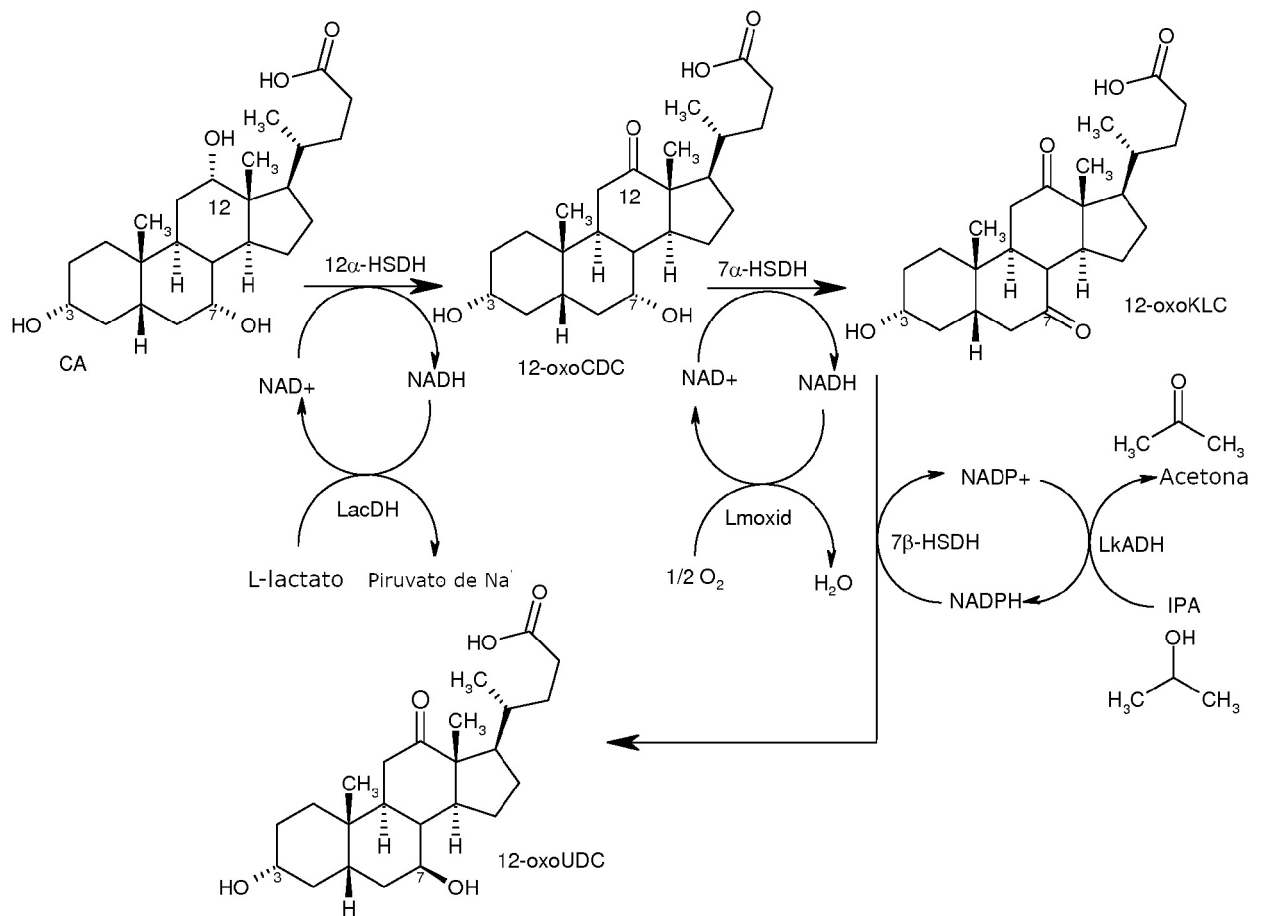


Fig. 8

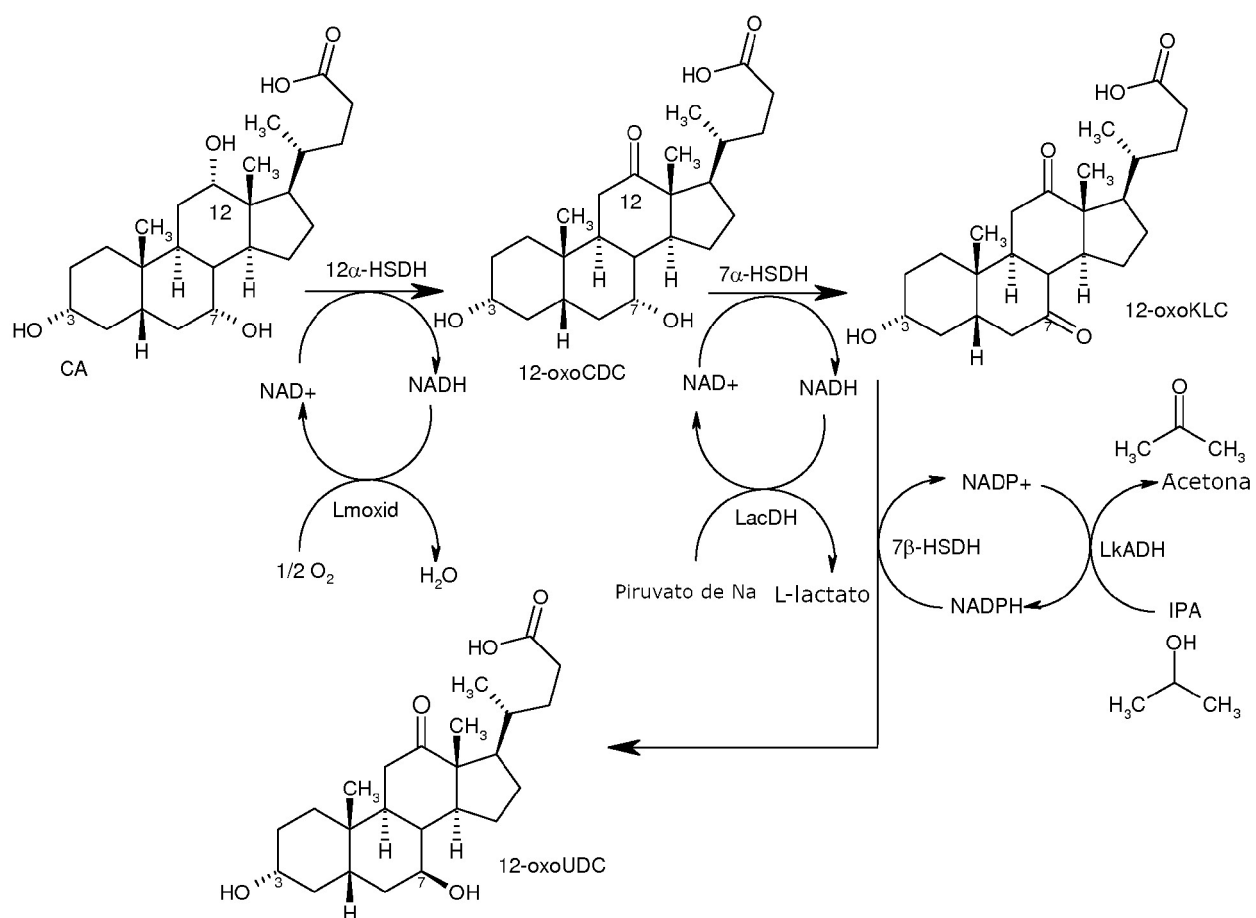
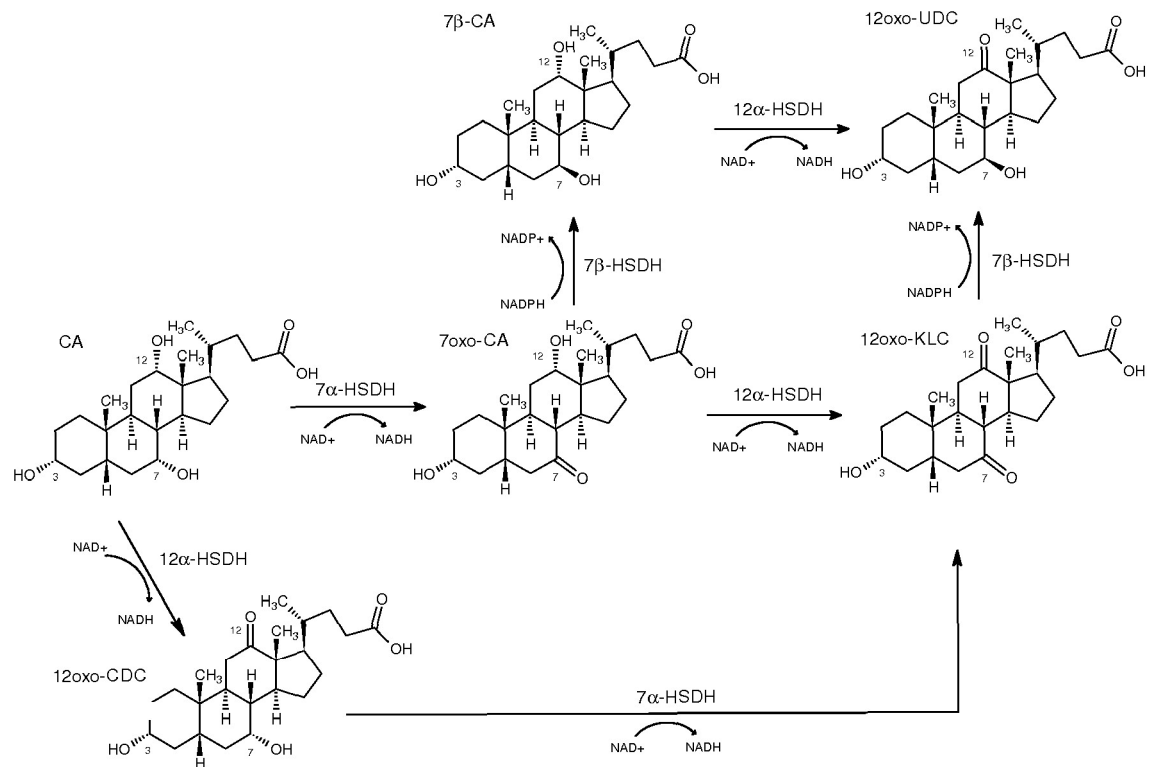


Fig. 9



Sistema de regeneración de cofactores

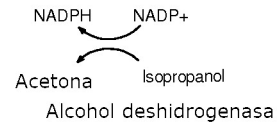
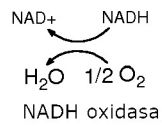
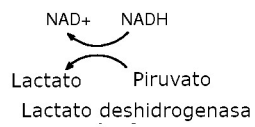


Fig. 10

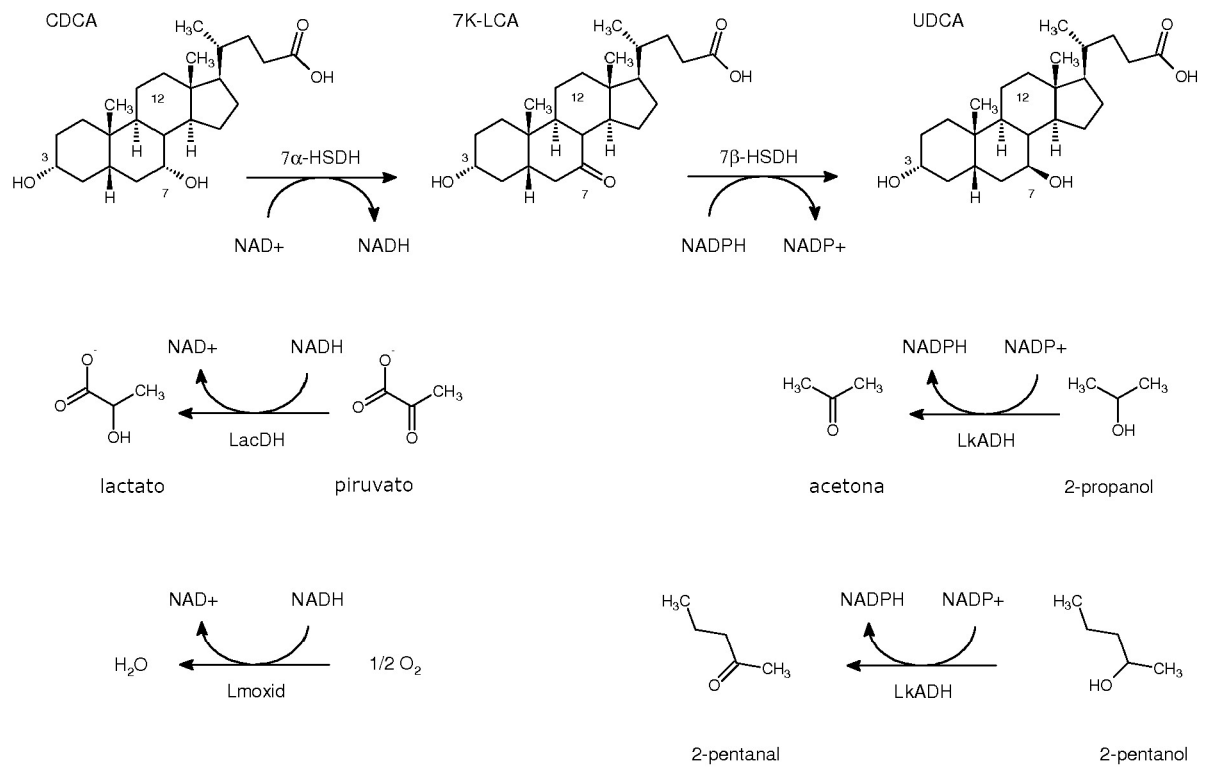


Fig. 11