

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 750**

51 Int. Cl.:
C12P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03729607 .6**
96 Fecha de presentación: **09.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1470220**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54 Título: **ESTERIFICACIÓN Y SOLVÓLISIS ENZIMÁTICAS SELECTIVAS DE UN ANÁLOGO DE LA VITAMINA D EPIMÉRICO Y SEPARACIÓN DE LOS EPÍMEROS.**

30 Prioridad:
10.01.2002 US 348082 P
18.01.2002 US 349977 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.01.2012

73 Titular/es:
TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
5 BASEL STREET, P.O. BOX 3190
49131 PETAH TIQVA, IL

72 Inventor/es:
SHAPIRO, Evgeny;
FISHMAN, Ayelet;
EFFENBERGER, Reinhard;
MAYMON, Asher y
SCHWARTZ, Anchel

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 371 750 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

Esterificación y solvolisis enzimáticas selectivas de un análogo de la vitamina D epimérico y separación de los epímeros.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a unos procedimientos para esterificar enzimáticamente de manera selectiva y para solvolizar enzimáticamente de manera selectiva en C-24 análogos de la vitamina D y sus ésteres. Asimismo, la presente invención se refiere a unos procedimientos para separar epímeros mixtos de análogos de la vitamina D, incluyendo una etapa de esterificación enzimática selectiva o una etapa de solvolisis enzimática selectiva.

10

Antecedentes de la invención

Desde el descubrimiento de la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), la forma metabolito hormonalmente activa de la vitamina D₃, se han preparado muchos análogos con el fin de obtener compuestos activos que presenten un efecto calcémico reducido. Se han dedicado muchos esfuerzos para modificar la cadena lateral de la vitamina D. Aunque el grupo 1 α -hidroxilo resulta esencial para la actividad hormonal, el grupo hidroxilo en C-25 puede sustituirse por el grupo hidroxilo en C-24; ver, por ejemplo, MC 903 (Estructura I) ó 1,24-(OH)₂D₃ (Estructura II).

15

Durante la preparación de análogos de la vitamina D, resulta necesaria una estereoquímica específica para el grupo hidroxilo en C-24 para conseguir la expresión total de la actividad biológica. Utilizando la metodología actual, se introduce la estereoquímica necesaria mediante tres procedimientos: (i) la separación de la mezcla diastereoisomérica de los epímeros del hidroxilo en C-24 mediante cromatografía (ver, por ejemplo, Calverley, *Tetrahedron* 4609-4619, 1987), (ii) la reducción estereoselectiva de la cetona en C-24 correspondiente (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.262.283), o (iii) la unión de una cadena lateral portadora de hidroxilo enantiopura al esqueleto de la vitamina D (ver, por ejemplo, Calverley, *Synlett* 157-159, 1990).

20

La síntesis estereoselectiva todavía es un procedimiento difícil de escalar debido a su naturaleza multietapa y coste. La separación cromatográfica de la mezcla epimérica es muy utilizada. La dificultad de la separación cromatográfica se basa en que los dos epímeros de hidroxilo en C-24 no difieren mucho en su afinidad para el adsorbente, y de esta manera sus tiempos de retención son excesivamente similares para permitir la separación eficiente en una etapa cromatográfica. La presente invención proporciona un procedimiento para mejorar en gran medida la eficacia de la separación cromatográfica.

25

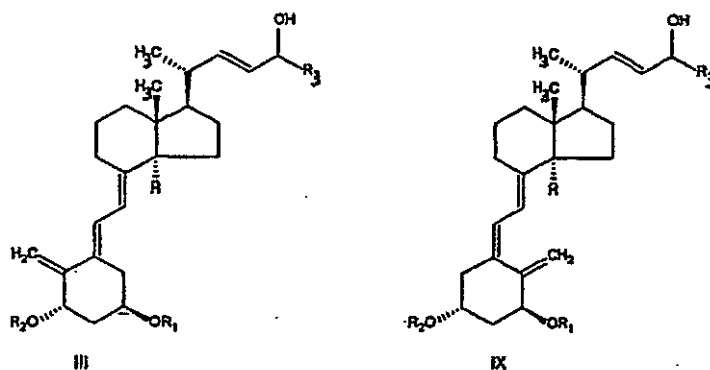
30

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para esterificar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero en una mezcla de epímeros de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición estereogénica C-24 del mismo, especialmente en el caso de que las mezclas de epímeros sean mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX:

35

40



en las que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R₃ es un grupo C₁₋₁₀ lineal o ramificado, cicloalquilo o arilo, incluyendo el procedimiento las etapas que consisten en: proporcionar una solución de epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y un agente esterificante, especialmente acetato de vinilo o butirato de vinilo, en un solvente orgánico, especialmente hexano o éter diisopropílico, y poner en contacto la solución con una lipasa, especialmente lipasa de *Alcaligenes* sp. o *Pseudomonas* sp. La lipasa puede ser, aunque no necesariamente, una lipasa fijada.

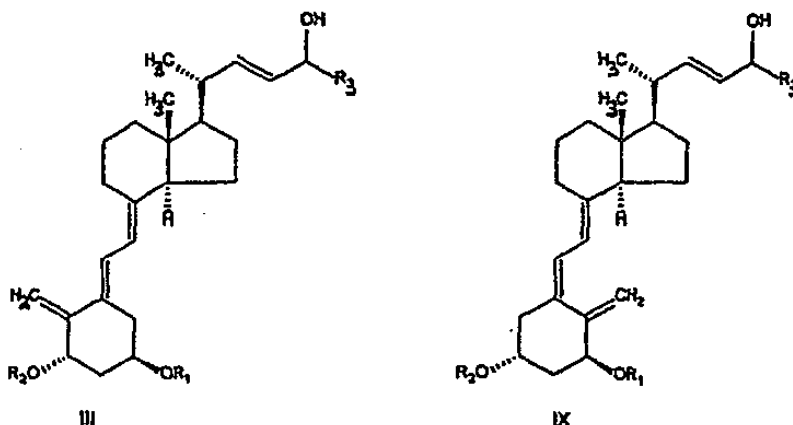
45

50

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para esterificar enzimáticamente de manera selectiva una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno, especialmente en el caso de que el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente sea [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno, incluyendo las etapas que consisten en proporcionar una solución de los epímeros mixtos en C-24 y un agente esterificante, por ejemplo acetato de vinilo, en un solvente orgánico, por ejemplo hexano, y poner en contacto la solución con una lipasa, especialmente lipasa de *Alcaligenes* sp. o de *Pseudomonas* sp.

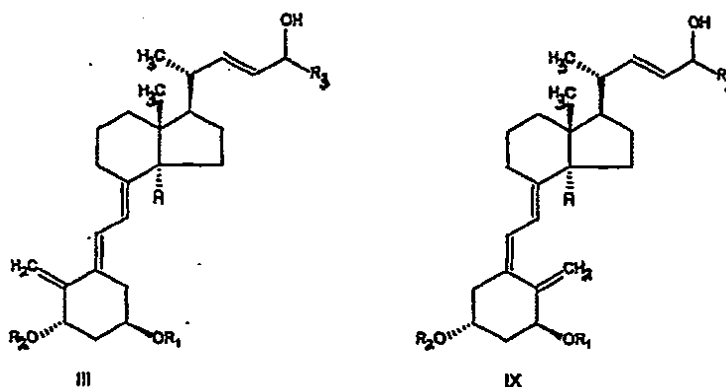
En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para esterificar enzimáticamente de manera selectiva una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno, especialmente en el que el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente es [1 α ,3 β ,5E,7,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7Z,10(19)-trieno, incluyendo las etapas que consisten en proporcionar una solución de los epímeros en C-24 mixtos y un agente esterificante, por ejemplo acetato de vinilo, en un solvente orgánico, por ejemplo hexano, y poner en contacto la solución con una lipasa, especialmente lipasa de *Alcaligenes* sp. o de *Pseudomonas* sp.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para esterificar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero en una mezcla de epímeros de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición estereogénica C-24 del mismo, incluyendo las etapas que consisten en proporcionar una solución de epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y un agente esterificante seleccionado de entre acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilfenilo, butirato de 2,2,2-trifluoroetilo, propionato de vinilo, acetato de vinilo y butirato de vinilo en un solvente orgánico seleccionado de entre hexano y éter diisopropílico, y poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre lipasa de *Alcaligenes* sp. y lipasa de *Pseudomonas* sp., en donde los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre compuestos de fórmula general III o IX:



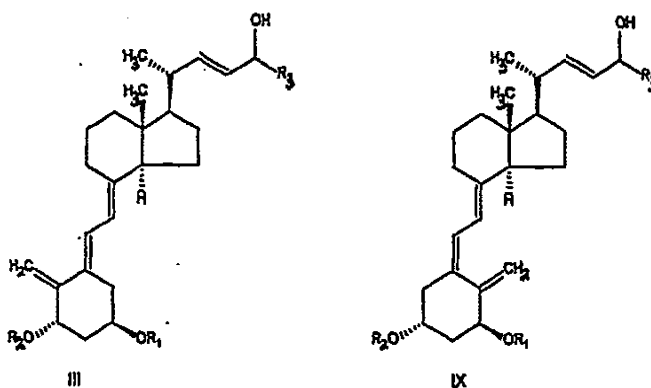
en las que R₁ y R₂ son hidrógenos o *tert*-butildimetilsiloxi y R₃ es un grupo ciclopropilo o isopropilo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para esterificar enzimáticamente el grupo hidroxilo en C-24 de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y seleccionado de entre los compuestos de fórmula general III o IX:



en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo alquilo C_1 - C_{10} lineal o ramificado, cicloalquilo o arilo, que comprende las etapas que consisten en: proporcionar una solución del análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en su posición C-24 y un agente esterificante seleccionado de entre el grupo constituido por acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilfenilo, butirato de 2,2,2-trifluoroetilo, y los ésteres vinílicos de ácidos alquil-carboxílicos inferiores que presentan de 2 a 6 átomos de carbono en un solvente orgánico que es un alcano lineal o ramificado que presenta hasta 12 carbonos o un éter dialquílico, y poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre *Alcaligenes sp.* y lipasa de *Pseudomonas sp.* La lipasa puede ser libre o fija.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para solvolizar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 esterificado de un epímero en una mezcla de epímeros en C-24 esterificados de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo esterificado en su posición estereogénica C-24, en el que especialmente los epímeros mixtos son mezclas de epímeros en C-24 esterificados de los compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX.



en los que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo alquilo C_1 - C_{10} lineal o ramificado, cicloalquilo o arilo, que comprende las etapas que consisten en: proporcionar una solución de los epímeros en C-24 esterificados mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en C-24 y un agente de solvólisis, especialmente agua o un alcohol alquílico C_{1-10} lineal o ramificado, en un solvente orgánico, especialmente hexano o éter diisopropílico, y poner en contacto la solución con una lipasa, especialmente lipasa de *Alcaligenes sp.* o lipasa de *Pseudomonas sp.* La lipasa puede, aunque no necesariamente, ser una lipasa fijada.

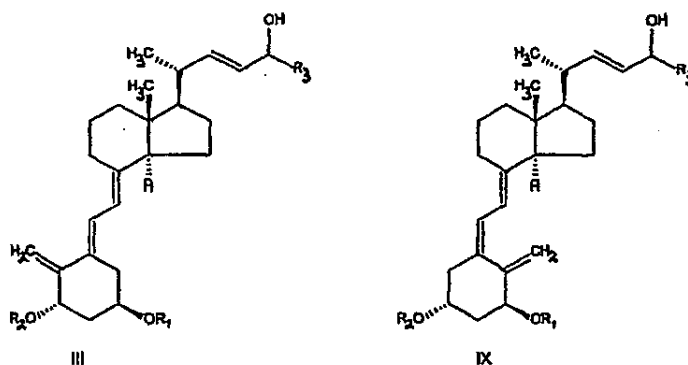
En todavía otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para solvolizar enzimáticamente de manera selectiva, especialmente con agua o con un alcohol alquílico C_{1-10} lineal o ramificado, los epímeros en C-24 mixtos de una mezcla epimérica de ésteres en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno, especialmente en los que el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente solvolizado es el éster de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.

En todavía otra forma de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para solvolizar enzimáticamente de manera selectiva, especialmente con agua o con alcohol alquílico C_{1-10} lineal o ramificado, los epímeros en C-24 mixtos de una mezcla epimérica de ésteres en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno, especialmente en los que el epímero de OH en C-24 esterificado solvolizado selectivamente es el éster de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.

En todavía un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar calcipotrieno, (5Z,7E,22E,24S)-24-ciclopropil-9,10-secocola-5,7,10(19),22-tetraeno-1 α ,3 β -24-triol, mediante la separación cromatográfica de epímeros mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo OH en un centro estereogénico C-24 mediante un procedimiento que incluye una etapa seleccionada de entre la esterificación enzimática selectiva y la solvólisis enzimática selectiva, en las que, en el caso de que se seleccione la solvólisis enzimática selectiva, en primer lugar se esterifica el grupo OH en C-24 de ambos epímeros, y en el caso de que se seleccione la esterificación selectiva, el agente de esterificación es el acetato de vinilo, y en el que la esterificación selectiva o la solvólisis selectiva se llevan a cabo con lipasa fijada o libre de *Alcaligenes sp.* o de *Pseudomonas sp.*

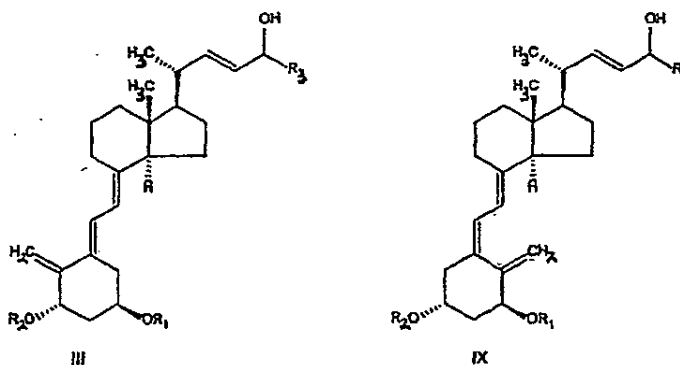
En todavía un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para separar epímeros mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición 24, en el que C-24 es el centro

epimérico, especialmente en el que los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre compuestos de fórmula general III o IX:



- 5 en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C_{1-10} , incluyendo las etapas que consisten en esterificar enzimáticamente de manera selectiva utilizando una lipasa el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero, tal como se ha comentado anteriormente, y separar cromatográficamente epímeros esterificados de epímeros no esterificados. Este procedimiento resulta especialmente adecuado en el caso de que los epímeros en C-24 sean una mezcla epimérica en C-24 de $[1\alpha,3\beta,5E,7E,20R]$ -1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno o una mezcla epimérica en C-24 de $[1\alpha,3\beta,5Z,7E,20R]$ -1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.

15 En todavía un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para separar epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24, en los que C-24 es el centro epimérico, incluyendo las etapas que consisten en: esterificar el grupo hidroxilo en C-24 de ambos epímeros, solvolizar enzimáticamente de manera selectiva utilizando una lipasa el éster en C-24 formado de esta manera de uno de los epímeros, y separar cromatográficamente el epímero solvolizado selectivamente del epímero no solvolizado. Este procedimiento resulta particularmente aplicable en el caso de que los epímeros en C-24 mixtos sean mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX:

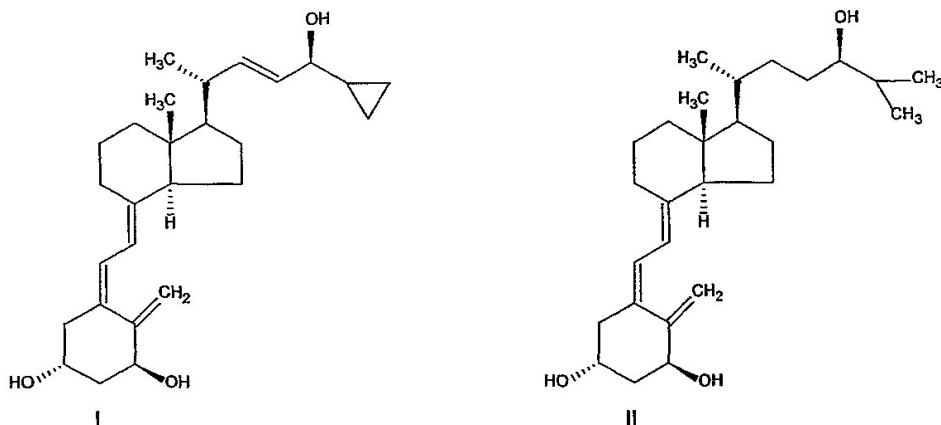


- 25 en la que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C_{1-10} .

Descripción detallada de la invención

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, un análogo de la vitamina D se refiere a cualquier compuesto que presenta la estructura básica del colecalciferol o del ergocalciferol y modificaciones del mismo, incluyendo aquéllas en las que se encuentra un doble enlace exocíclico del anillo A en diferentes posiciones y/o en las que varía la estructura de la cadena lateral unida al anillo D en el carbono 17, particularmente las modificaciones (análogos) en las que la cadena lateral presenta un grupo ciclopropilo o isopropilo en C-24.

35 Debido a que la vitamina D es un esteroide, se retiene, en la medida de lo posible, la denominación del anillo y el sistema de numeración del compuesto parental, el colesterol. Se ilustran a continuación (Estructuras I y II) derivados representativos de la vitamina D que son objeto de la presente invención.

Estructuras I y II

Los epímeros se conocen como diastereómeros que presentan una configuración opuesta (R o S) en únicamente uno de múltiples centros estereogénicos tetrahédricos en las moléculas, tal como los análogos de la vitamina D a los que se refiere la presente invención, que presentan múltiples centros estereogénicos. Los epímeros de los análogos de la vitamina D que resultan útiles en la práctica de la presente invención son diastereómeros con respecto a la configuración en C-24.

La denominación de, por ejemplo, C-24 como el centro epimérico de una pareja de enantiómeros implica, por lo tanto, que la configuración en los otros centros estereogénicos de la pareja es la misma.

A menos que el contexto indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria en relación a los epímeros y mezclas de epímeros de los análogos de la vitamina D que presentan un grupo hidroxilo en la posición C-24, las expresiones "esterificación enzimática selectiva" y "enzimáticamente esterificado de manera selectiva" se refieren a que el grupo hidroxilo en la posición 24 de un epímero se esterifica con un agente de esterificación con ayuda de un enzima de manera que se excluye sustancialmente la esterificación del grupo hidroxilo en la posición 24 del otro epímero. Una exclusión sustancial implica que, de todas las moléculas esterificadas, por lo menos aproximadamente 80% molar de un epímero, y no más de aproximadamente 20% del otro epímero, se esterifica (proporción de diastereómeros de 80:20). Preferentemente, la proporción de diastereómeros es de por lo menos 90:10, más preferentemente es de por lo menos 95:5. El experto en la materia conocerá cómo optimizar las variables del procedimiento expuestas a continuación en la presente memoria con el fin de alcanzar la proporción de diastereómeros deseada.

A menos que el contexto indique lo contrario, tal como se utiliza en la presente memoria en relación a epímeros y mezclas de epímeros de análogos de la vitamina D que presentan un grupo éster (por ejemplo acetato) en la posición 24, la solvólisis enzimática selectiva y enzimáticamente solvolizado de manera selectiva se refieren a que el grupo éster en la posición 24 de un epímero resulta solvolizado hasta la exclusión sustancial de la solvólisis del grupo éster en la posición 24 del otro epímero. La expresión "exclusión sustancial" implica que, de todas las moléculas solvolizadas, por lo menos aproximadamente 80% molar de un epímero y no más de aproximadamente 20% del otro epímero resultan solvolizados (proporción de diastereómeros de 80:20). Preferentemente la proporción es de por lo menos 90:10, más preferentemente es de por lo menos 95:5. El experto en la materia conocerá cómo optimizar las variables del procedimiento expuestas a continuación en la presente memoria con el fin de alcanzar la proporción de diastereómeros deseada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, alquilo inferior se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado, que puede ser cíclico o acíclico, que presenta entre uno y diez átomos de carbono. El grupo isopropilo y el grupo ciclopropilo son ejemplos de grupos de alquilo inferior.

Tal como se utiliza en la presente memoria, arilo es un grupo aromático sustituido o no sustituido que presenta entre seis y doce átomos de carbono. El grupo fenilo es un ejemplo de un grupo arilo.

En la presente invención, la solvólisis se lleva a cabo con un agente de solvólisis, preferentemente un solvente prótico polar. Los solventes próticos polares preferidos son el agua y los alcoholes alifáticos inferiores.

Los términos "enzimático" y "enzimáticamente" se refieren a que el procedimiento respectivo se lleva a cabo con un enzima. Los enzimas preferidos son las lipasas. La lipasa de *Alcaligenes* sp. y la lipasa de *Pseudomonas* sp. son lipasas preferidas para la utilización en la práctica de la presente invención. El enzima puede encontrarse fijado (inmovilizado) o libre. Los procedimientos para inmovilizar enzimas son bien conocidos en la técnica.

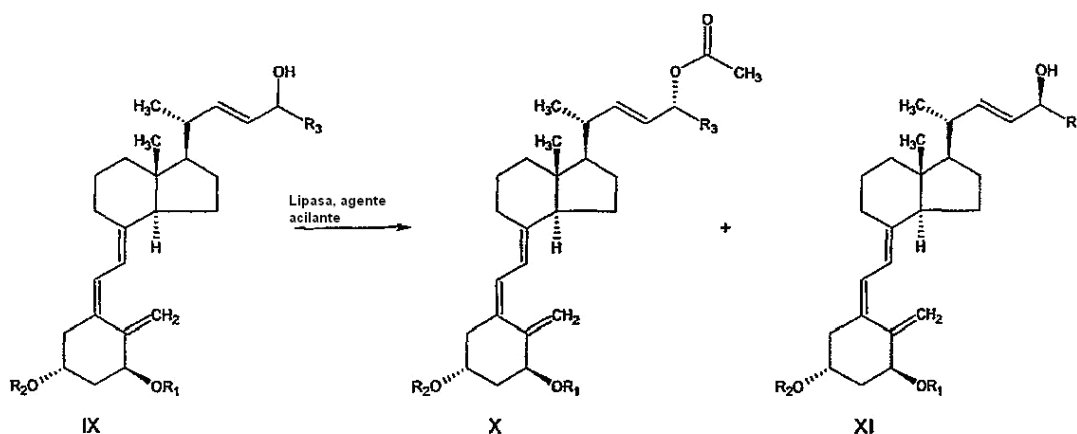
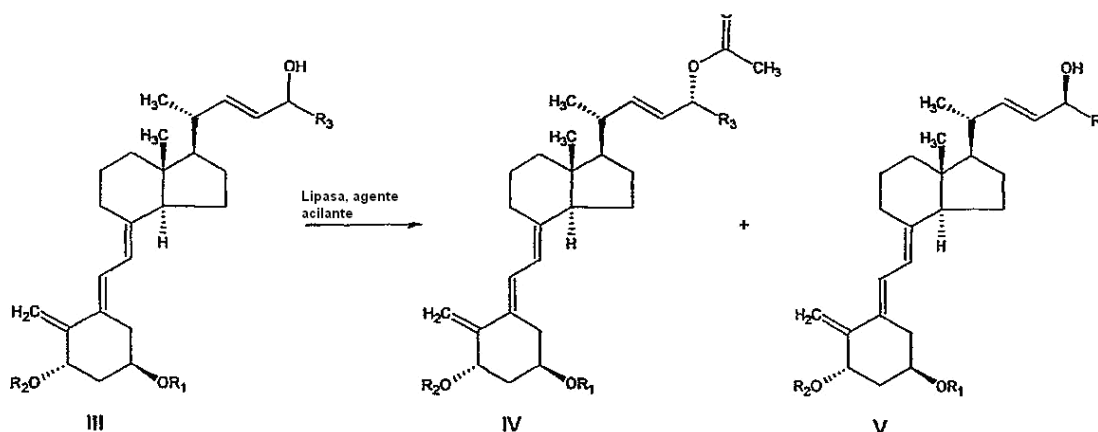
Tal como se utiliza en la presente memoria, la esterificación de un grupo hidroxilo es sinónima de la acilación y se refiere a cualquiera de las reacciones conocidas de la técnica que sustituyen el hidrógeno de un grupo hidroxilo alcohólico por un grupo acilo (por ejemplo RC(O)).

5 Los procedimientos de separación de la presente invención utilizan una etapa de esterificación enzimática selectiva o una etapa de solvolisis enzimática selectiva y, en formas de realización preferidas, una etapa cromatográfica. La etapa de esterificación enzimática selectiva resulta preferida en el caso de que los compuestos que presentan un grupo isopropilo (II) o un grupo ciclopropilo (I) en C-24 son el objetivo del procedimiento.

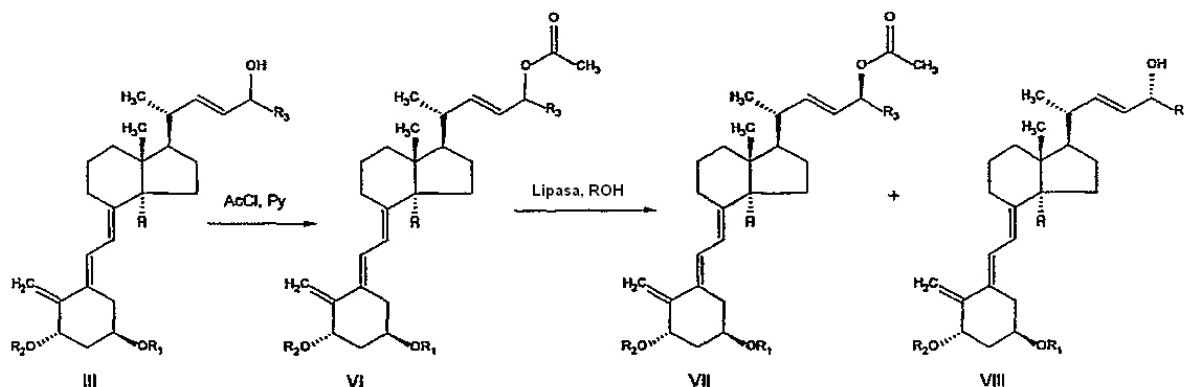
10 Se ha descubierto en el contexto de la presente invención que una mezcla de epímeros en C-24 de análogos de la vitamina D que presentan un grupo hidroxilo en un centro epimérico en C-24 pueden esterificarse selectivamente en la posición 24 en presencia de un enzima, preferentemente una lipasa, produciendo una mezcla del éster en C-24 de un epímero y el alcohol en C-24 preferente del epímero no esterificado. Se ilustra a continuación, en el Esquema I. No resulta importante para la presente invención qué epímero se esterifica selectivamente.

15 Se ha descubierto asimismo que una mezcla epimérica de ésteres en C-24 de análogos de la vitamina D puede solvolizarse selectivamente en presencia de un enzima, preferentemente una lipasa, proporcionando una mezcla del éster en C-24 de un epímero y el alcohol en C-24 del otro epímero. Se ilustra a continuación, en el Esquema II. El Esquema II se ilustra con el cloruro de acetilo, aunque otros agentes de esterificación resultan igualmente útiles. No resulta importante para la práctica de la presente invención qué epímero se solvoliza selectivamente. Se ha descubierto que puede formarse un éster en la posición C-24 de análogos de la vitamina D, sin esterificación simultánea de grupos hidroxilo en el anillo A del análogo de la vitamina D. De esta manera, el presente procedimiento puede ponerse en práctica sin necesidad de proteger los grupos OH en, por ejemplo, el anillo A del derivado de la vitamina D.

Esquema I



Esquema II



Aunque no resulta necesario en la práctica de la invención, puede resultar conveniente proteger los grupos hidroxilo en el anillo A de los análogos de la vitamina D. Puede utilizarse cualquiera de los procedimientos de protección de grupos hidroxilo conocidos de la técnica, si se desea. El grupo *tert*-butildimetilsililo es únicamente un ejemplo de grupo protector de hidroxilo que puede utilizarse en la práctica de la presente invención.

En una forma de realización, la presente invención proporciona la esterificación enzimática selectiva de un análogo de la vitamina D. En la esterificación enzimática selectiva, el análogo de la vitamina D (por ejemplo de estructura general III o IX), que consiste en una mezcla de epímeros de OH en C-24, y un agente de esterificación (acilación) (A), se disuelven en un solvente orgánico (S1), proporcionando una solución que seguidamente se pone en contacto con un enzima (E), preferentemente una lipasa. Los solventes adecuados (S1) comprenden los alcanos lineales y ramificados que presentan como máximo aproximadamente 12 carbonos, por ejemplo hexano, y los éteres dialquílicos, por ejemplo el éter diisopropílico. Los ésteres de alquilo y de alqueniolo son ejemplos de agentes de esterificación adecuados. El acetato de vinilo es un agente de esterificación preferido. La solución se pone en contacto (por ejemplo se agita) con el enzima (E) a una temperatura especificada (T) durante un periodo de tiempo (t). Puede utilizarse cualquier temperatura que no destruya la actividad del enzima. Resultan preferidas las temperaturas de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 40°C. El experto en la materia conocerá cómo ajustar el tiempo de reacción según el avance de la reacción. El avance de la reacción de esterificación puede seguirse mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Un aparato Merck-Hitachi modelo 6200 A utilizando alcohol amílico al 0,5% en hexano como la fase móvil resulta adecuado para la utilización. El experto en la materia también conocerá cómo adaptar un procedimiento analítico adecuado a partir del procedimiento cromatográfico preparativo indicado posteriormente. Puede utilizarse el mismo procedimiento analítico en todas las formas de realización de la presente invención. Se detiene la esterificación tras esterificarse una cantidad suficiente del epímero no deseado para garantizar un exceso diastereomérico del alcohol C-24 de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%.

En este momento, se separa (elimina) el enzima por medios adecuados, tal como conocerá el experto en la materia, por ejemplo la filtración o centrifugación, entre otros, y se concentra el filtrado.

En otra forma de realización, el presente procedimiento proporciona la solvólisis enzimática selectiva de un análogo esterificado de la vitamina D. La solvólisis enzimática selectiva puede ilustrarse con la alcoholisis enzimática selectiva, en cuyo caso la etapa también puede denominarse transesterificación enzimática selectiva. El análogo de la vitamina D (por ejemplo de estructura general III), que consiste en una mezcla de epímeros de OH en C-24, se esterifica con una mezcla de ésteres epiméricos en C-24 mediante procedimientos estándares bien conocidos por el experto en la materia, tal como utilizando un haluro de acilo, un anhídrido de ácido o un éster activo, tal como alcanatoato de vinilo. A continuación, esta mezcla de ésteres epiméricos se disuelve en un solvente orgánico (S1), especialmente un alcano inferior o éter dialquílico tal como se ha indicado anteriormente, que contiene un agente de solvólisis, especialmente un alcohol alquílico inferior (R-OH) o agua, proporcionando una solución que se pone en contacto con un enzima (E), preferentemente una lipasa. La puesta en contacto (por ejemplo la mezcla) se realiza a una temperatura especificada (T) durante un periodo de tiempo (t) y se sigue el avance de la reacción de solvólisis mediante HPLC. Los solventes, agentes de solvólisis, temperaturas y tiempos útiles para la esterificación enzimática selectiva también resultan útiles en la presente forma de realización. La reacción se detiene en el caso de que se haya formado selectivamente suficiente del epímero de alcohol en C-24 en el exceso diastereomérico necesario de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente superior a 95%. En la presente forma de realización, resulta preferente que el epímero de OH en C-24 formado mediante transesterificación no sea el epímero deseado (buscado).

En este momento se elimina el enzima mediante filtración (u otros medios adecuados, tal como la centrifugación) y se concentra el filtrado.

5 En todavía otra forma de realización, se lleva a cabo la solvólisis enzimática selectiva con agua. En este caso, la etapa puede denominarse hidrólisis enzimática selectiva. El análogo de la vitamina D (por ejemplo de estructura general III), que consiste en una mezcla de epímeros de OH en C-24, se esterifica con una mezcla de ésteres epiméricos en C-24 mediante procedimientos estándares (tales como la utilización de un haluro de acilo, un anhídrido de ácido o un éster activo, tal como alcanato de vinilo, etc.). Esta mezcla de ésteres epiméricos se disuelve a continuación en un solvente orgánico (S1) que contiene agua y un enzima (E), tal como una lipasa. 10 La mezcla se agita a una temperatura especificada (T) durante un periodo de tiempo (t) y se sigue el avance de la reacción de hidrólisis mediante HPLC. La reacción se detiene tras formarse selectivamente una cantidad suficiente del epímero del alcohol en C-24 en el exceso diastereomérico deseado, de por lo menos aproximadamente 80%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%. En la presente forma de realización, resulta preferido que el alcohol en C-24 formado sea el alcohol en C-24 del epímero no deseado y que el éster no hidrolizado sea el éster del epímero de OH en C-24 deseado. 15

En este momento se elimina el enzima por medios apropiados, tal como resultará evidente para el experto en la materia, por ejemplo mediante filtración o centrifugación, entre otros. Se concentra el filtrado.

20 Debido a que la diferencia entonces de polaridad entre el alcohol en C-24 y el éster en C-24 es mucho mayor, los epímeros selectivamente esterificados o selectivamente solvólizados presentan tiempos de elución bien resueltos, permitiendo de esta manera la separación completa de las mezclas, con independencia de cómo se han preparado, en un único pase mediante, por ejemplo, cromatografía de columna, tal como se indica a continuación. Por lo tanto, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para separar los epímeros en C-24 de análogos de la vitamina D que presentan un grupo hidroxilo en el centro estereogénico C-24, que incluye una etapa seleccionada de entre la esterificación enzimática selectiva y la solvólisis enzimática selectiva. 25

Con el fin de obtener epímeros separados, el concentrado procedente de la esterificación enzimática selectiva o de la solvólisis enzimática selectiva seguidamente se cargaron en una columna cromatográfica, que se indica 30 posteriormente, y se eluyeron con un solvente o mezcla de solventes adecuado (S2), de manera que se separase el alcohol en C-24 (V) del éster en C-24 (IV) y, de manera similar, para separar XI de X, tal como se describe en el Esquema I. En el Esquema I, el éster formado en C-24 es un acetato, aunque otros ésteres, por ejemplo el butirato, resultan igualmente útiles. En otra forma de realización se separa el alcohol en C-24 del éster en C-24, preferentemente el éster del epímero deseado (Esquema II). En el Esquema II, el agente esterificante es un cloruro de acilo, aunque otros agentes de esterificación, por ejemplo anhídridos de ácidos, resultan igualmente útiles. 35

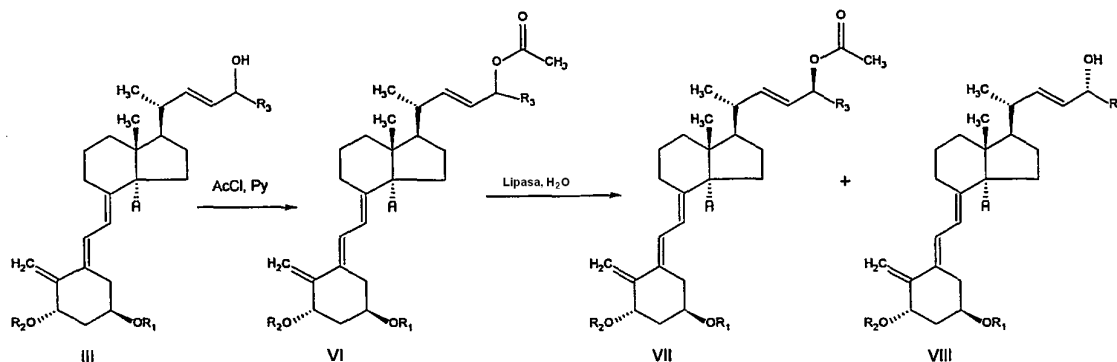
El éster separado puede convertirse en el alcohol deseado mediante procedimientos bien conocidos de la técnica, en los que se obtienen epímeros de hidroxilo en C-24 estereoquímicamente esencialmente puros a partir de una mezcla de epímeros. De esta manera, no importa qué epímero se desea ya que los procedimientos descritos en la presente memoria pueden producir cualquiera de ellos. 40

Se recogen a continuación unos ejemplos de valores que pueden seleccionarse para varios parámetros de reacción en la práctica de varias formas de realización de la presente invención.

Parámetro	Tipo o condición adecuada	Comentario
Sustrato	Mezcla 65:35 de compuesto III (mezcla de los compuestos VIII y V)	Cualquier cantidad de compuesto VIII en la mezcla
Concentración de sustrato	25% a 50% (p/v)	1% a 80%
Otros sustratos	Compuesto de estructura IX	
Enzima	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp. o de <i>Alcaligenes</i> sp.	Lipasas de origen microbiano, de mamífero o vegetal
Forma del enzima	Crudo o inmovilizado	
Agente acilante	Acetato de vinilo/butirato de vinilo/propionato de vinilo	Acetato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilfenilo, butirato de 222-trifluoroetilo
Cantidad de agente acilante	Acetato de vinilo A/III proporción molar de 2 a 3	Puede utilizarse como solvente
Solvente	Hexano	Hexano, éter diisopropílico, tolueno, diclorometano, tetraclorometano, acetona, metil-isobutil cetona
Mezcla de solvente para cromatografía	Acetato de etilo al 3% en hexano	Acetato de etilo al 3%-10% en hexano
Tiempo de reacción	2 a 3 horas	1 a 24 horas
Temperatura de reacción	25°C a 35°C	10°C a 60°C

45

Esquema III



Para la etapa cromatográfica, puede utilizarse cualquier combinación de fase estacionaria (empaquetamiento) y eluyente que pueda resolver la mezcla de alcohol en C-24 y éster en C-24. Estas combinaciones pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia mediante experimentación rutinaria. Un ejemplo de una fase estacionaria preferida es la sílice tratada.

La cromatografía de columna, que resulta útil para la separación de análogos de vitamina D selectivamente esterificados o selectivamente solvolizados de la presente invención, es bien conocida por el experto en química farmacéutica. La técnica utiliza una columna empaquetada con una fase estacionaria, por ejemplo sílice tratada, en la que se carga una muestra que debe separarse. A continuación, la muestra se eluye con un eluyente adecuado. La elución puede ser isocrática o con la denominada programación de solventes, en la que la composición del eluyente se modifica regularmente (por ejemplo linealmente) o irregularmente (por ejemplo escalonadamente) durante el tiempo. El gel de sílice pretratado, bien conocido de la técnica cromatográfica, es una fase estacionaria adecuada. La elución con acetato de etilo al 5% (v/v) en hexano seguido de acetato de etilo puro es meramente un ejemplo de un programa de elución que produce la separación deseada. Otros eluyentes adecuados podrán ser deducidos por el experto en la materia mediante el desarrollo de procedimientos rutinarios.

Ejemplos

La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1 - Esterificación enzimática selectiva

A una solución bajo agitación de mezcla de alcohol epimérico en C-24 de estructura III, $R_1=R_2=tert$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (20 g, 31,2 mmoles) y acetato de vinilo (5,8 ml, 62,4 mmoles) en hexano (60 ml) se le añadieron 0,56 gramos de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó durante 3 horas a $25\pm 3^\circ C$, mostrando a continuación el análisis de HPLC una conversión esencialmente completa del epímero en C-24 (R) en acetato. El alcohol en C-24 (S) no esterificado restante se encontraba en un exceso diastereomérico $>99\%$ (según HPLC). Se filtró la solución y se concentró a sequedad. Se cromatografió el residuo en gel de sílice pretratado con acetato de etilo al 5% en hexano, después con acetato de etilo, proporcionando el compuesto acetato en C-24 IV (11 g) y el compuesto alcohol en C-24 V (7,4 g).

El perfil de pureza del producto era el siguiente.

Compuesto	Perfil de pureza			Instrumento y procedimiento
	IV	V	VIII	
IV	93,1	0,2	-	Merck-Hitachi Modelo: bomba inteligente L-6200A. Fase móvil: alcohol amílico al 0,5% en hexano
V	0,5	89,0	1,6	

Ejemplo 2 - Esterificación enzimática selectiva

Se inmovilizaron 0,5 gramos de lipasa de *Alcaligenes* sp. en 4 gramos de Eupergit C (Rohm, Alemania) según un procedimiento conocido recomendado por el proveedor. A un matraz de fondo redondo que contenía 0,3 gramos (0,47 mmoles) de mezcla de alcohol epimérico en C-24 III, $R_1=R_2=tert$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros 65:35), 0,43 ml (4,7 mmoles) de acetato de vinilo y 3,57 ml de hexano, se le añadieron 400 mg de enzima inmovilizado. La mezcla se agitó a $35^\circ C$ durante 4 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC

mostró la presencia de 30% de compuesto **IV**, 35% de compuesto **VIII** y 35% de compuesto no reaccionado de estructura **V**.

Ejemplo 3 - Esterificación enzimática selectiva

5 A un vial que contenía 100 mg (0,16 mmoles) de epímeros en C-24 mixtos de alcohol en C-24 de estructura **III**, con $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), 0,044 ml (0,47 mmoles) de acetato de vinilo y 1,5 ml de éter diisopropílico, se le añadieron 10 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 65% de compuesto **IV** y 35% de compuesto de estructura **V**.

Ejemplo 4 - Esterificación enzimática selectiva

15 A un vial que contenía 100 mg (0,16 mmoles) de epímeros en C-24 mixtos de alcohol en C-24 **III**, $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), 0,044 ml (0,47 mmoles) de acetato de vinilo y 1,5 ml de tetracloruro de carbono, se le añadieron 10 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 65% de compuesto **IV** y 35% de compuesto **V**.

Ejemplo 5 - Esterificación enzimática selectiva

20 A un vial que contenía 100 mg (0,16 mmoles) de epímeros en C-24 mixtos de alcohol en C-24 de estructura **III**, con $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), 0,140 ml (1,6 mmoles) de acetato de vinilo y 0,36 ml de hexano, se le añadieron 50 mg de lipasa de *Pseudomonas* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, mostrando a continuación el análisis de HPLC mostró la presencia de 65% de compuesto **IV** y 35% de compuesto de estructura **V**.

Ejemplo 6 - Esterificación enzimática selectiva

30 A un matraz de fondo redondo que contenía 5 gramos (7,8 mmoles) de epímeros en C-24 mixtos de alcohol en C-24 de estructura **III**, $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), 1,26 ml (15,6 mmoles) de butirato de vinilo y 8,7 ml de hexano, se le añadieron 250 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 65% de butanoato en C-24 (por ejemplo el análogo butanoato de estructura **IV**) y 35% de compuesto **V**. Se separó el alcohol del éster butílico mediante cromatografía en gel de sílice pretratado.

Ejemplo 7 - Esterificación enzimática selectiva

40 A un matraz de fondo redondo que contenía 300 mg (0,468 mmoles) de epímeros en C-24 mixtos de alcohol en C-24 de estructura **III**, con $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), y 4 ml de acetato de etilo, se le añadieron 50 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a 35°C durante 24 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 45% de compuesto **IV**, 20% de compuesto de estructura **VIII** y 35% de compuesto de estructura **V**.

Ejemplo 8 - Esterificación enzimática selectiva

50 A un matraz de fondo redondo que contenía 10 g (15,6 mmoles) de compuesto **VIII**, con $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$, se le añadieron 2,9 ml (31,3 mmoles) de acetato de vinilo, 17,1 ml de hexano y 800 mg de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 99% de compuesto **IV**.

Ejemplo 9 - Esterificación enzimática selectiva

55 A un vial que contenía 1 g (1,56 mmoles) de mezcla de alcoholes epiméricos en C-24 **IX**, con $R_1=R_2=terc$ -butildimetilsililo y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 65:35), se le añadieron 0,44 ml (4,68 mmoles) de acetato de vinilo y 2,9 ml de hexano y 250 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 65% de compuesto **X** y 35% de compuesto de estructura **XI**.

Ejemplo 10 - Esterificación enzimática selectiva

65 A un vial que contenía 25 mg (0,06 mmoles) de mezcla de alcoholes epiméricos en C-24 **IX**, con $R_1=R_2=H$ y $R_3=ciclopropilo$ (proporción de isómeros de 50:50), se le añadieron 0,044 ml (0,48 mmoles) de acetato de vinilo, 0,5 ml de acetona, 2 ml de éter diisopropílico y 50 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 50% de compuesto **X** y

50% de compuesto **XI**. La acetilación tuvo lugar únicamente en el hidroxilo en posición C-24, lo que se confirmó mediante RMN-H.

Ejemplo 11 - Solvólisis selectiva

5 A un matraz de fondo redondo que contenía 2 gramos (3,2 mmoles) de mezcla de alcoholes epiméricos en C-24 **III**, con R₁=R₂=*tert*-butildimetilsililo y R₃=ciclopropilo (proporción de isómeros de 65:35) disuelta en 8 ml de piridina, se le añadió anhídrido acético (0,4 ml, 4,2 mmoles) gota a gota, manteniendo una temperatura de 5°C. Se elevó la temperatura a 45°C y se dejó reposar la reacción durante 24 horas. La mezcla se extrajo con 10 ml de hexano y se evaporó la fase orgánica. Se obtuvieron 1,7 gramos de acetatos de mezcla **VI**. A un vial que contenía 100 mg (0,15 mmoles) de mezcla **VI** (proporción de isómeros de 65:35), 0,041 ml (0,45 mmoles) de etanol y 2 ml de hexano, se añadieron 200 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 65% de compuesto **VIII** y 35% de compuesto **VII**.

Ejemplo 12 - Solvólisis selectiva

15 A un vial que contenía 100 mg (0,15 mmoles) de mezcla de acetatos epiméricos en C-24 **VI**, con R₁=R₂=*tert*-butildimetilsililo y R₃=ciclopropilo (proporción de isómeros de 65:35), se le añadieron 5 ml de H₂O, 1,5 ml de hexano y 250 mg de lipasa de *Alcaligenes* sp. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 260 horas, mostrando a continuación el análisis de HPLC la presencia de 32% de compuesto **VII** y 62% de compuesto **VIII**.

Ejemplo 13 - Preparación de calcipotrieno (MC 903)

25 Una solución de alcohol de estructura V con R₁=R₂=*tert*-butildimetilsililo y R₃=ciclopropilo (15,3 g, 24 mmoles), 9-acetilantraceno (1,6 g, 7,2 mmoles) y trietilamina en tolueno (350 µl en 1.200 ml) contenido en un reactor fotoquímico y enfriado a una temperatura de entre 5°C y 8°C, se irradió con luz de una lámpara de ultravioletas de alta presión hasta completar la reacción (~45 minutos). Se transfirió la mezcla a un evaporador. Se enjuagó el reactor con 2x100 ml de tolueno y los enjuagues se añadieron al evaporador. La mezcla se evaporó a sequedad bajo vacío, proporcionando alcohol crudo de estructura XI (15,3 g).

30 El alcohol XI se disolvió en THF (450 ml) y se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (45 ml, 45 mmoles) a la solución. La mezcla resultante se calentó a 40°C durante 2 horas bajo una atmósfera de nitrógeno y se evaporó a sequedad. Se disolvió el residuo en acetato de etilo (1.200 ml) y la solución se lavó con solución de bicarbonato sódico al 2% (2x150 ml), seguido de solución hipersalina (1x250 ml). La solución se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. 35 El residuo se cromatografió en gel de sílice (1.200 g) eluido con una mezcla de acetato de etilo en hexano. La recolección de las fracciones apropiadas (comprobadas mediante TLC) y la evaporación proporcionaron 7 gramos de un material espumoso.

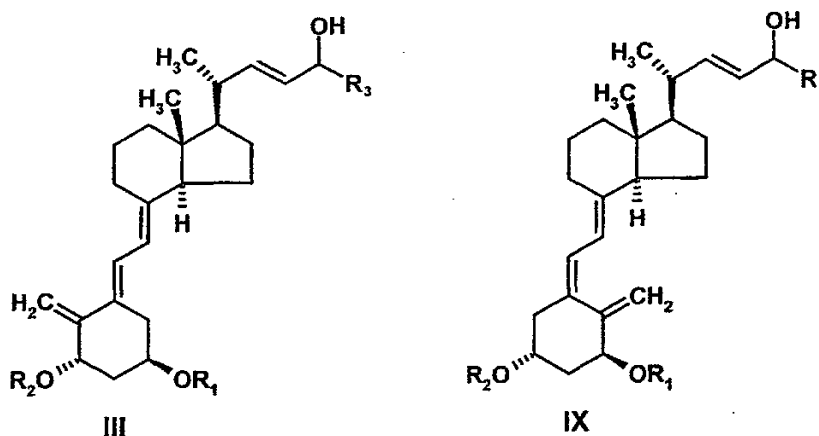
40 Se cristalizaron 3 gramos del producto a partir de acetona, y después a partir de formato de metilo, proporcionando 1,3 gramos de calcipotrieno.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para esterificar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero en una mezcla de epímeros de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición estereogénica C-24 del mismo, que comprende las etapas que consisten en:

a) proporcionar una solución de epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y un agente esterificante en un solvente orgánico, y

b) poner en contacto la solución con una lipasa, en el que los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX



en las que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R₃ es un grupo arilo, cicloalquilo o alquilo lineal o ramificado C₁₋₁₀.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los epímeros en C-24 mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente es el [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los epímeros mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente es el [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno.

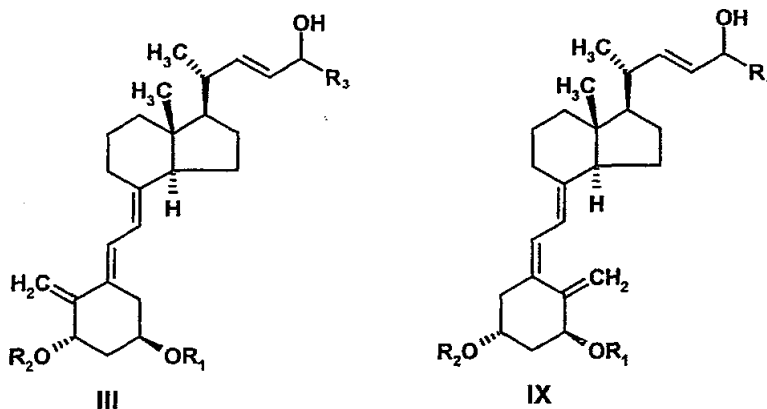
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente esterificante se selecciona de entre el grupo constituido por acetato de etilo, acetato de butilo, fenil-acetato de etilo, butirato de 2,2,2-trifluoroetilo, y los ésteres vinílicos de los ácidos alquil-carboxílicos inferiores que presentan de 2 a 6 átomos de carbono.

7. Procedimiento para esterificar selectivamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero en una mezcla de epímeros de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición estereogénica C-24 del mismo según la reivindicación 1, que comprende las etapas que consisten en:

a) proporcionar una solución de epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y un agente esterificante seleccionado de entre acetato de etilo, acetato de butilo, fenil-acetato de etilo, butirato de 2,2,2-trifluoroetilo, propionato de vinilo, acetato de vinilo y butirato de vinilo en un solvente orgánico seleccionado de entre hexano, acetato de etilo y éter diisopropílico, y

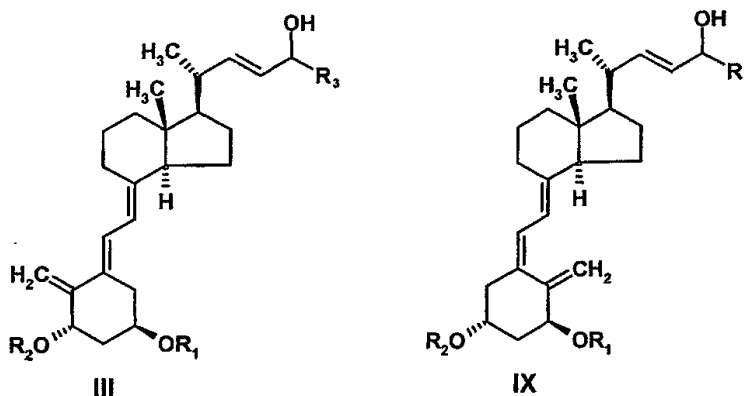
b) poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre lipasa de *Alcaligenes sp.* y lipasa de *Pseudomonas sp.*,

en el que los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX:



en las que R_1 y R_2 son hidrógeno o *tert*-butildimetilsililo, y R_3 es un grupo ciclopropilo o isopropilo.

- 5 8. Procedimiento para esterificar enzimáticamente el grupo hidroxilo en C-24 de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y seleccionado de entre los compuestos de fórmula general III o IX:



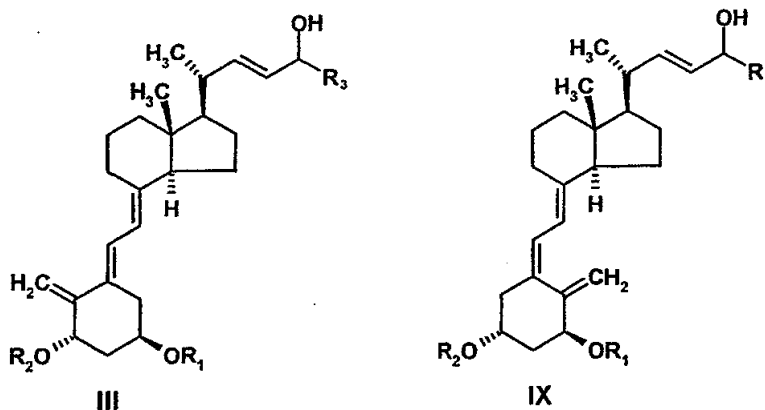
10 en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C_{1-10} , que comprende las etapas que consisten en:

- 15 a) proporcionar una solución del análogo de vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24 del mismo y un agente esterificante seleccionado de entre el grupo constituido por acetato de etilo, acetato de butilo, fenil-acetato de etilo, butirato de 2,2,2-trifluoroetilo, y los ésteres vinílicos de ácidos alquil-carboxílicos inferiores que presentan de 2 a 6 átomos de carbono en un solvente orgánico que es un alcano lineal o ramificado que presentan hasta 12 carbonos, un éster alquílico de un ácido alquil-carboxílico, o un éter dialquílico, y
- 20 b) poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre lipasa de *Alcaligenes sp.* y lipasa de *Pseudomonas sp.*

9. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 8, en el que el agente esterificante se selecciona de entre acetato de etilo, acetato de vinilo, y butirato de vinilo.

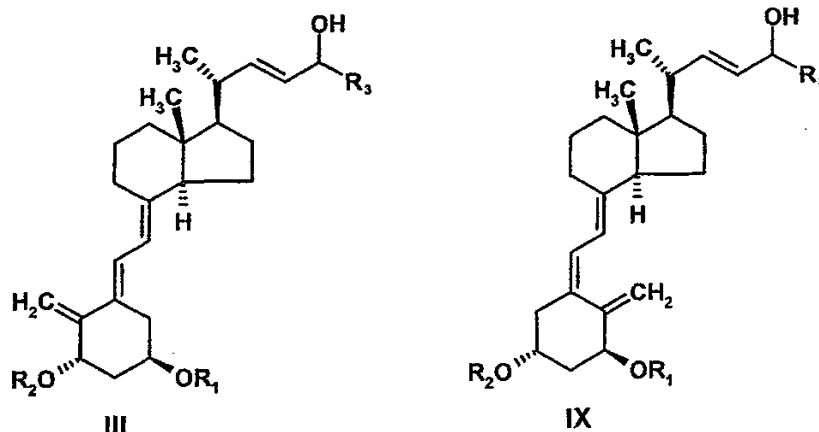
25 10. Procedimiento para solvolizar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 esterificado de un epímero en una mezcla de epímeros en C-24 esterificados de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo esterificado en la posición estereogénica C-24 del mismo, que comprende las etapas que consisten en:

- 30 a) proporcionar una solución de los epímeros en C-24 esterificados mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en C-24 y un agente de solvolisis en un solvente orgánico, y
- b) poner en contacto la solución con una lipasa, en el que los epímeros en C-24 esterificados mixtos son ésteres de epímeros mixtos de compuestos de fórmula general III o IX,



en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno o grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C_{1-10} .

- 5
11. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que R_1 y R_2 son ambos H.
12. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que la lipasa es la lipasa de *Alcaligenes sp.*
- 10 13. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que la lipasa es la lipasa de *Pseudomonas sp.*
14. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que la lipasa es fija.
15. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que la lipasa es libre.
- 15 16. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que los epímeros en C-24 mixtos esterificados son una mezcla epimérica en C-24 de ésteres en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 20 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el epímero de OH en C-24 esterificado solvolidado selectivamente es el éster de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 25 18. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que los epímeros mixtos esterificados son una mezcla epimérica en C-24 de ésteres en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 30 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el epímero de OH en C-24 esterificado solvolidado selectivamente es el [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*tert*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxil-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
20. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el agente de solvólisis es el agua.
- 35 21. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el agente de solvólisis es un alcohol.
22. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, en el que el solvente es un alcano lineal o ramificado que presenta hasta 12 carbonos, un éster alquílico de un ácido alquil-carboxílico o un éter dialquílico.
- 40 23. Procedimiento para solvolidar enzimáticamente de manera selectiva el grupo hidroxilo en C-24 esterificado de un epímero en una mezcla de epímeros en C-24 esterificados de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo esterificado en la posición estereogénica C-24 del mismo según la reivindicación 10, que comprende las etapas que consisten en:
- 45 a) proporcionar una solución del epímero en C-24 esterificado mixto de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en C-24 y un agente de solvólisis que es agua o un alcohol alquílico en un solvente orgánico seleccionado de entre hexano, éter diisopropílico y acetato de etilo; y
- b) poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre lipasa de *Alcaligenes sp.* y lipasa de *Pseudomonas sp.*, en el que
- 50 los epímeros en C-24 esterificados mixtos son ésteres de epímeros mixtos de compuestos de fórmula III o IX,



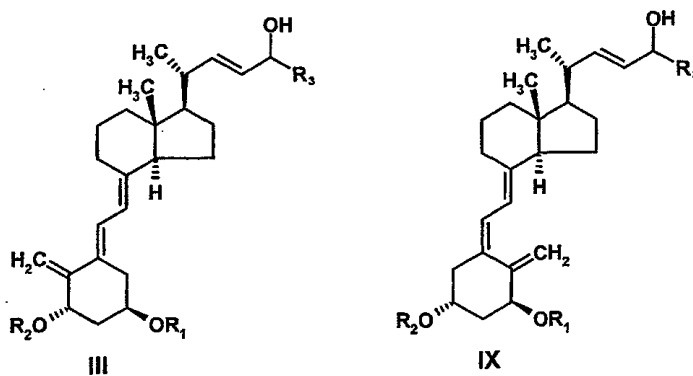
5 en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno o *tert*-butilsililo, y R_3 es ciclopropilo o isopropilo.

10 24. Procedimiento para solvolizar enzimáticamente el grupo hidroxilo en C-24 esterificado de un epímero de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo esterificado en la posición estereogénica C-24 del mismo, que comprende las etapas que consisten en:

10 a) proporcionar una solución del epímero en C-24 esterificado de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en C-24 y un agente de solvólisis; y

15 b) poner en contacto la solución con una lipasa seleccionada de entre lipasa de *Alcaligenes sp.* y lipasa de *Pseudomonas sp.*; en el que

el epímero en C-24 esterificado es un éster en C-24 de un compuesto de fórmula general III o IX:



20 en las que R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, y R_3 es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C_{1-10} .

25 25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que el agente de solvólisis es agua o un alcohol alquílico C_{1-10} lineal o ramificado.

26. Procedimiento según la reivindicación 9, 21, 22 ó 24, en el que el solvente es hexano, éter diisopropílico o acetato de etilo.

30 27. Procedimiento para preparar calcipotrieno, (5Z, 7E, 22E, 24S)-24-ciclopropilo-9,10-secocola-5,7,10(19),22-tetraen-1 α ,3 β -24-triol, que comprende separar cromatográficamente los epímeros mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo OH en un centro estereogénico C-24 mediante un procedimiento que incluye una etapa seleccionada de entre la esterificación enzimática selectiva y la solvólisis enzimática selectiva, en el que

35 cuando se selecciona la solvólisis enzimática selectiva, el grupo OH en C-24 de ambos epímeros se esterifica en primer lugar, y

cuando se selecciona la esterificación selectiva, el agente de esterificación es el acetato de vinilo, y en el que

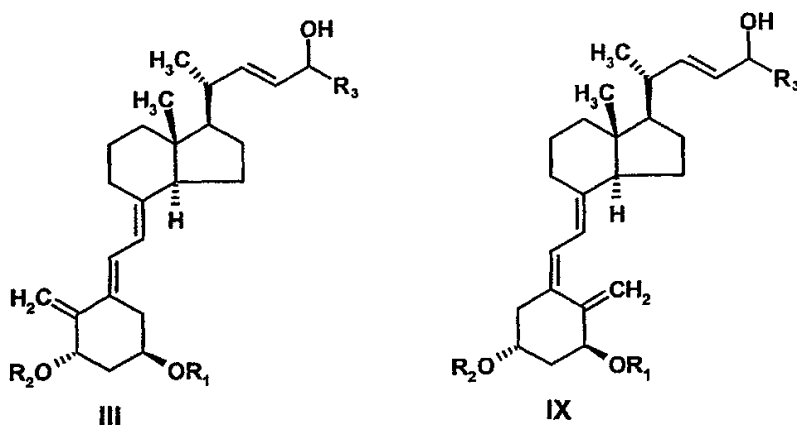
la esterificación selectiva o la solvolisis selectiva se lleva a cabo con lipasa de *Alcaligenes sp.* o con lipasa de *Pseudomonas sp.*

5 28. Procedimiento para separar epímeros mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición 24, en el que C-24 es el centro epimérico, que comprende las etapas que consisten en:

a) esterificar enzimáticamente de manera selectiva utilizando una lipasa el grupo hidroxilo en C-24 de un epímero, y

10 b) separar cromatográficamente el epímero esterificado del epímero no esterificado,

en el que los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de compuestos seleccionados de entre compuestos de fórmula general III o IX



15 en las que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R₃ es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C₁₋₁₀.

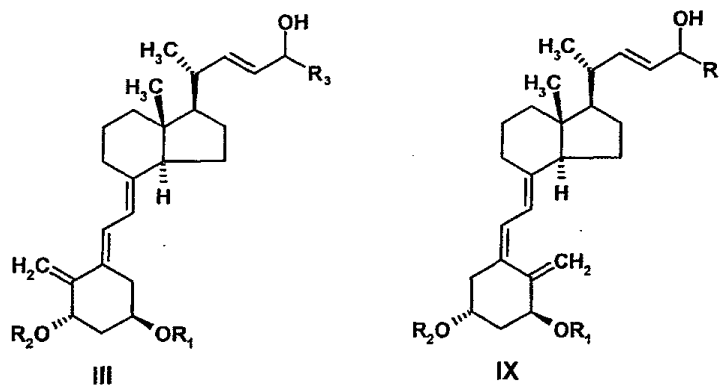
20 29. Procedimiento para separar los epímeros en C-24 mixtos de un análogo de la vitamina D que presenta un grupo hidroxilo en la posición C-24, en el que C-24 es el centro epimérico, que comprende las etapas que consisten en:

a) esterificar el grupo hidroxilo en C-24 de ambos epímeros,

25 b) solvolizar enzimáticamente de manera selectiva utilizando una lipasa el éster en C-24 así formado de uno de los epímeros, y

c) separar cromatográficamente el epímero solvolizado de manera selectiva del epímero no solvolizado,

30 en el que los epímeros en C-24 mixtos son mezclas de epímeros en C-24 de los compuestos seleccionados de entre los compuestos de fórmula general III o IX:



35 en las que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes y representan hidrógeno, o grupo protector de hidroxilo, y R₃ es un grupo arilo, cicloalquilo o arilo lineal o ramificado C₁₋₁₀.

30. Procedimiento según la reivindicación 28 ó 29, en el que los epímeros en C-24 mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 5 31. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que los epímeros en C-24 mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno y el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente es el [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 10 32. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que los epímeros en C-24 mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno y el epímero de OH en C-24 solvolizado selectivamente es un éster de [1 α ,3 β ,5E,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 15 33. Procedimiento según la reivindicación 28 ó 29, en el que los epímeros mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno.
- 20 34. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que los epímeros mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno y el epímero de OH en C-24 esterificado selectivamente es el [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.
- 25 35. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que los epímeros mixtos son una mezcla epimérica en C-24 de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R,S)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10 (19)-trieno y el epímero de OH en C-24 esterificado solvolizado selectivamente es un éster de [1 α ,3 β ,5Z,7E,20R]-1,3-bis(*terc*-butildimetilsiloxi)-20-(3'-ciclopropil-3'(R)-hidroxi-1'-propenil)-9,10-secopregna-5,7,10(19)-trieno.