

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 992**

51 Int. Cl.:

C07H 19/04 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

C07D 498/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10727887 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2432791**

54 Título: **Un enfoque quimio-enzimático para la síntesis de pimecrolimus**

30 Prioridad:

22.05.2009 IT MI20090908

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

22.10.2015

73 Titular/es:

**EUTICALS S.P.A. (100.0%)
Viale Bianca Maria, 25
20122 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**GRISENTI, PARIDE;
REZA ELAHI, SHAHRZAD y
VERZA, ELISA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 548 992 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

Un enfoque quimio-enzimático para la síntesis de pimecrolimus

La presente invención considera un método de síntesis quimioenzimática para preparar pimecrolimus.

- 5 El pimecrolimus (*número de registro* 137071-32-0; Figura 1) es un macrólido que tiene propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas e inmunosupresoras. Esta sustancia está presente como principio activo en el fármaco Elidel® recientemente aprobado en Europa y en los EE.UU. para el tratamiento tópico de afecciones inflamatorias de la piel tales como dermatitis atópica.

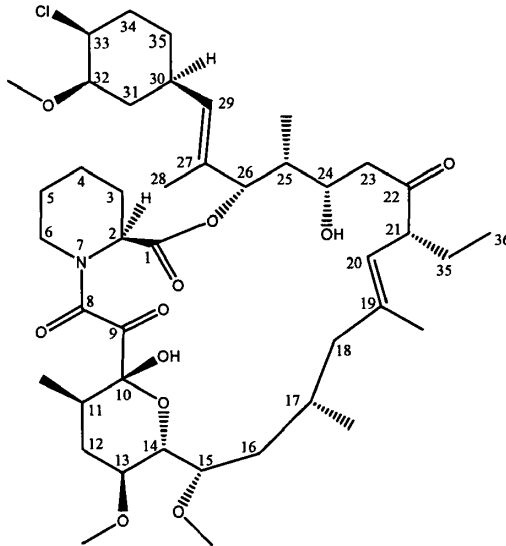
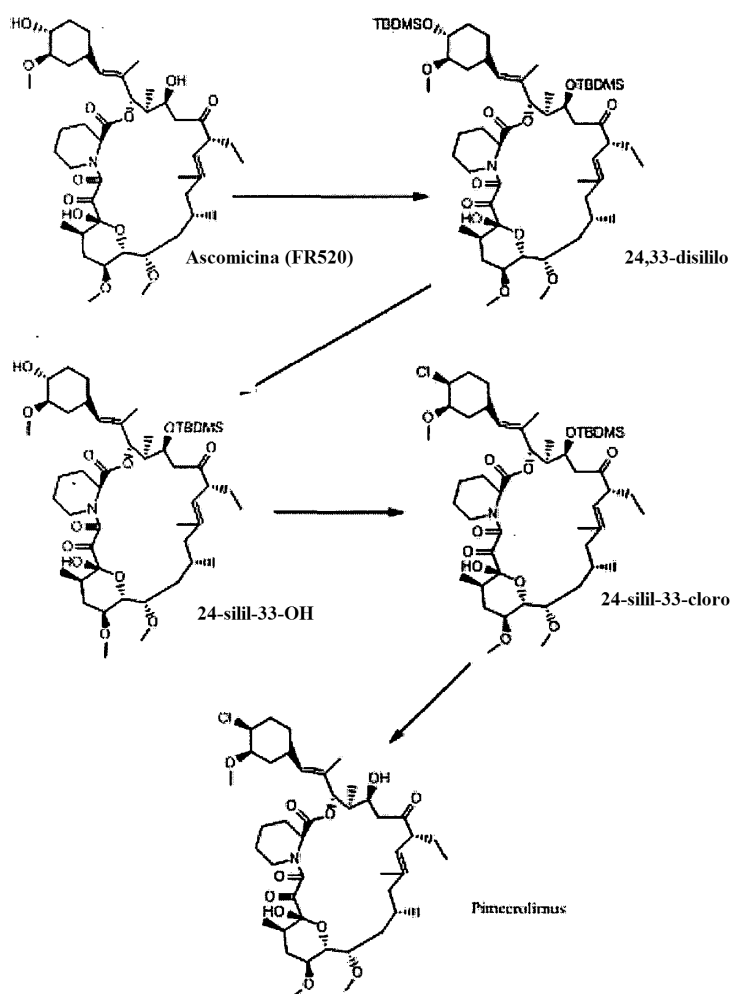


Figura 1: Fórmula estructural de pimecrolimus

ESTADO DE LA MATERIA

- 10 La preparación de pimecrolimus se describió por primera vez en la solicitud de patente EP427680 en nombre de Sandoz. En tal documento se usa como material de partida ascomicina (compuesto identificado por el *número de registro* 11011-38-4), un producto natural obtenido mediante la fermentación de cepas de *Streptomyces* (tales como, por ejemplo, *Streptomyces hygroscopicus var ascomyceticus*, o *Streptomyces hygroscopicus tsukubaensis* N° 9993). Pimecrolimus se obtiene a partir de la ascomicina mediante una secuencia de cuatro etapas de síntesis (esquema 1)



Esquema 1: Proceso de síntesis descrito en EP427680

Desde un punto de vista estructural, el pimecrolimus es el derivado de 33-epi-cloro de ascomicina. Como se describe en el documento EP427680, la presencia simultánea, en la estructura de ascomicina, de dos grupos secundarios hidroxilo en la posición 24 y en la posición 33 requiere la protección del hidroxilo en la posición 24 antes de sustituir el segundo hidroxilo en la posición 33 con un átomo de cloro.

5

Con el fin de obtener la monoprotección del hidroxilo en la posición 24 de ascomicina, tal proceso de síntesis proporciona la preparación del derivado de 24,33-disililo y la posterior eliminación selectiva del éster de sililo en la posición 33.

La alta relación entre el agente sililante y el sustrato y la selectividad no completa de la posterior etapa de desprotección requiere llevar a cabo dos purificaciones cromatográficas sobre la columna de gel de sílice (Baumann K., Bacher M., Damont A., Hogenauer K., Steck A. Tetrahedron, (2003), 59, 10075-10087).

10

Los rendimientos generales de tal proceso de síntesis no se indican en la bibliografía; un experimento por el solicitante reveló que tales rendimientos ascienden a aproximadamente el 16 % molar a partir de ascomicina.

Recientemente se propusieron otros procesos de síntesis como alternativas a la síntesis del documento EP427680.

En particular, la solicitud de patente internacional WO2006040111 a nombre de Novartis proporciona la sustitución directa del hidroxilo en la posición 33 de ascomicina con un átomo de cloro y una segunda alternativa, descrita en la solicitud de patente internacional WO2006060614 en nombre de Teva, usa, como producto intermedio sintético, un derivado de sulfonato en la posición 33 de ascomicina.

15

Ninguna de las alternativas sintéticas propuestas es completamente satisfactoria porque en el documento WO2006040111 los agentes de halogenación propuestos (clorofosforano y N-clorosuccinimida) no son capaces, según los mismos autores, de sustituir regioselectivamente la función hidroxilo en la posición 33, mientras que en el documento WO2006060614 las características de calidad del producto obtenido son, incluso después de la purificación cromatográfica y/o cristalización, bajas para un producto que va a usarse para fines farmacéuticos (es decir, pureza del 96

20

% como se describe en la parte experimental).

Generalmente, pueden usarse sistemas enzimáticos purificados para la síntesis orgánica de moléculas polifuncionales (Wang Y-F, Wong C-H. J Org Chem (1988) 53, 3127-3129; Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A. Chem. Rev. (1992), 92(5), 1071-140; Ferraboschi P., Casati S., De Grandi S., Grisenti P., Santaniello E. Biocatalysis (1994), 10(1-4), 279-88); documento WO2006024582).

Los documentos WO2007103348 y WO2005105811 describen la acilación de rapamicina en la posición 42 en presencia de lipasa de *Candida antarctica*.

En particular, el documento WO2007103348 desvela procesos para preparar conjugados de polietilenglicol solubles en agua de macrólidos, que comprenden una acilación catalizada por lipasa con un éster activado y la posterior pegilación.

10 El documento WO2005105811 desvela un proceso para preparar derivados de éster de rapamicina en la posición 42, que comprende hacer reaccionar rapamicina con un donante de acilo en presencia de una lipasa.

RESUMEN DE LA INVENCION

Así, un objetivo de la presente invención son procesos alternativos para preparar pimecrolimus a partir de ascomicina explotando las características de selectividad de los sistemas enzimáticos purificados, particularmente con respecto a la posibilidad de funcionalización selectiva de los grupos hidroxilo presentes en la posición 24 y 33 de ascomicina. Tal método representa el primer ejemplo de la síntesis quimioenzimática para preparar pimecrolimus.

En particular, el proceso según la presente invención permite obtener pimecrolimus a partir de ascomicina con un rendimiento de aproximadamente el 30 % molar, es decir, con un rendimiento superior a aproximadamente el 87,5 % con respecto al rendimiento obtenible según el proceso brevemente expuesto en el documento EP427680.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objetivo de la presente invención son métodos para la síntesis alternativa de pimecrolimus, que comprenden la funcionalización enzimática selectiva del hidroxilo en la posición 33 o en la posición 24 de ascomicina.

Enzimas disponibles en el mercado, tales como, por ejemplo, lipasa de *Candida antarctica* (CAL B; E.C.3.1.1.3), de *Candida cylindracea* (CCL, E.C.3.1.1.3), de páncreas porcino (PPL; E.C.3.1.13) y de *Pseudomonas cepacia* (PFL, E.C.3.1.13) se evaluaron mediante cribado llevado a cabo tanto bajo condiciones de hidrólisis y de alcoholólisis usando, como sustrato, 24,33-diacetato de ascomicina (compuesto V del esquema 3), como bajo condiciones de transesterificación usando, como sustrato, ascomicina.

Así, se descubrió sorprendentemente que solo la lipasa de *Candida antarctica* (en las formas de enzimas libres disponibles en el mercado o como enzimas inmovilizadas sobre una resina polimérica; denominándose también la última forma CAL B) bajo condiciones de transesterificación irreversibles (condiciones que proporcionan el uso de acetato de vinilo como agente acilante y *tert*-butil dimetil éter como disolvente) es capaz de acilar selectivamente la posición 33 de ascomicina de una manera cuantitativa en el plazo de 80 horas, igual que solo la lipasa de *Candida antarctica*, y en particular CAL B, operando en condiciones de alcoholólisis sobre el 24,33-diacetato de ascomicina, demostró sorprendentemente que puede conducir quimioselectivamente al 24-monoacetato de ascomicina correspondiente (compuesto VI del esquema 3).

Así, un objetivo de la presente invención son procesos para preparar pimecrolimus, caracterizados porque comprenden una etapa de acilación y/o alcoholólisis enzimática con lipasa de *Candida antarctica*, en los que preferentemente dicha lipasa de *Candida antarctica* es CAL B (E.C.3.1.1.3).

Además, son un objetivo de la presente invención métodos de síntesis de pimecrolimus, que comprenden una etapa de alcoholólisis enzimática selectiva de ésteres en la posición 33 de ascomicina (preferentemente de ésteres C₁-C₄) o de derivados siliados de tales ésteres, y más en detalle de los derivados de los mismos tales como 33-acil-24-silil-ascomicina y la ascomicina diacetilada en las posiciones 24 y 33, por una lipasa de *Candida antarctica*, preferentemente la lipasa CAL B (E.C.3.1.1.3).

Tal método representa el primer ejemplo de síntesis quimioenzimática para preparar pimecrolimus. Con respecto a la síntesis química previamente descrita en la bibliografía, este método tiene la ventaja de usar, en una macromolécula polifuncional tal como ascomicina o derivados de la misma, condiciones de reacción no extremas (por ejemplo, pH y temperatura), minimizando así la degradación del propio producto.

El uso de la lipasa de *Candida antarctica* unida a una matriz polimérica (CAL B), para obtener protección/desprotección de las funciones hidroxilo presentes en la posición 33 y 24 de ascomicina, representa otra ventaja de esta síntesis, en la que el uso de una enzima soportada no solo simplifica considerablemente el procesamiento de la reacción, sino que también

permite el uso de la misma en varios ciclos de uso. En realidad, se sabe que, a diferencia de la lipasa no soportada, CAL B no solo es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y en agua, permitiendo así la fácil recuperación de los mismos del medio de reacción a través de filtración simple, sino que tal tipo de lipasa soportada también es más estable desde un punto de vista de la actividad enzimática (Ferraboschi P., Grisenti P., Pengo D., Prestileo P., *Biocatalysis and Biotransformation* (2006), 24(3), 209-213; Heldt-Hansen, Hans Peter; Ishii, Michiyo; Patkar, Shamkant A.; Hansen, Tomas T.; Eigtved, Peter. *Novo Ind. A/S, Bagsvaerd, Den. ACS Symposium Series* (1989), 389 (*Biocatal. Agric. Biotechnol.*), 158-72).

El objetivo de la presente invención es un método para la síntesis de pimecrolimus, que comprende las siguientes etapas: a) acilación enzimática selectiva del hidroxilo en la posición 33 de ascomicina; b) conversión del derivado acilado en 33 así obtenido en el 24-*terc*-butil dimetilsilil éter correspondiente; c) eliminación enzimática (alcoholólisis) del acilo en la posición 33 del compuesto preparado en la etapa b) para obtener el 24-*terc*-butil dimetilsilil éter de ascomicina; d) sustitución del hidroxilo en 33 de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter de ascomicina, con un átomo de cloro para obtener el derivado 24-*terc*-butildimetilsilil-33-epi-cloro ascomicina; y finalmente e) la eliminación del *terc*-butil dimetilsilil éter en la posición 24.

En particular, las etapas indicadas anteriormente se llevan a cabo del siguiente modo:

a) la reacción de esterificación quimioselectiva de ascomicina sobre el hidroxilo en la posición 33 se lleva a cabo característicamente usando, como enzima, la lipasa de *Candida antarctica* (CAL B, E.C.3.1.1.3) en disolvente orgánico adecuado, seleccionado de entre disolventes orgánicos apróticos con un coeficiente de reparto (logP) que supera 0,5, tal como, por ejemplo, tolueno, n-hexano, n-heptano, diclorometano, cloroformo y *terc*-butil dimetil éter, en presencia de un agente acilante tal como un éster activado del éster vinílico o tipo éster de trifluoroetilo C₁-C₈, preferentemente acetato de trifluoroetilo o acetato de vinilo. Tal reacción de esterificación se lleva a cabo usando una relación relativa entre mg de ascomicina y unidades de CAL B comprendidas entre 0,1 y 1, preferentemente 0,4, con agitación a una temperatura comprendida entre 15 y 50 °C, preferentemente 30 °C. La relación molar relativa entre ascomicina y éster activado comprende entre 1 y 6, preferentemente 4,5. La concentración del sustrato sobre el que se lleva a cabo tal reacción de transesterificación comprende entre 0,01 y 0,1 molar.

b) La reacción de preparación del derivado de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-acil-ascomicina se obtiene en presencia de un agente sililante, tal como cloruro de *terc*-butildimetilsililo o triflato de *terc*-butildimetilsililo, usados en una relación molar relativa comprendida entre 1/2 y 1/7, preferentemente 1/5, en presencia de una base orgánica, tal como, por ejemplo, imidazol, piridina o 2,6-lutidina, preferentemente 2,6-lutidina. La relación molar relativa entre agente sililante y base orgánica comprende entre 1/1 y 1/4 preferentemente 1/3. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico aprótico, tal como, por ejemplo, diclorometano o tetrahidrofurano, operando en el intervalo de concentración de 0,02-0,15 molar, preferentemente 0,04 molar, a una temperatura comprendida entre 0 °C y 40 °C, preferentemente 25 °C.

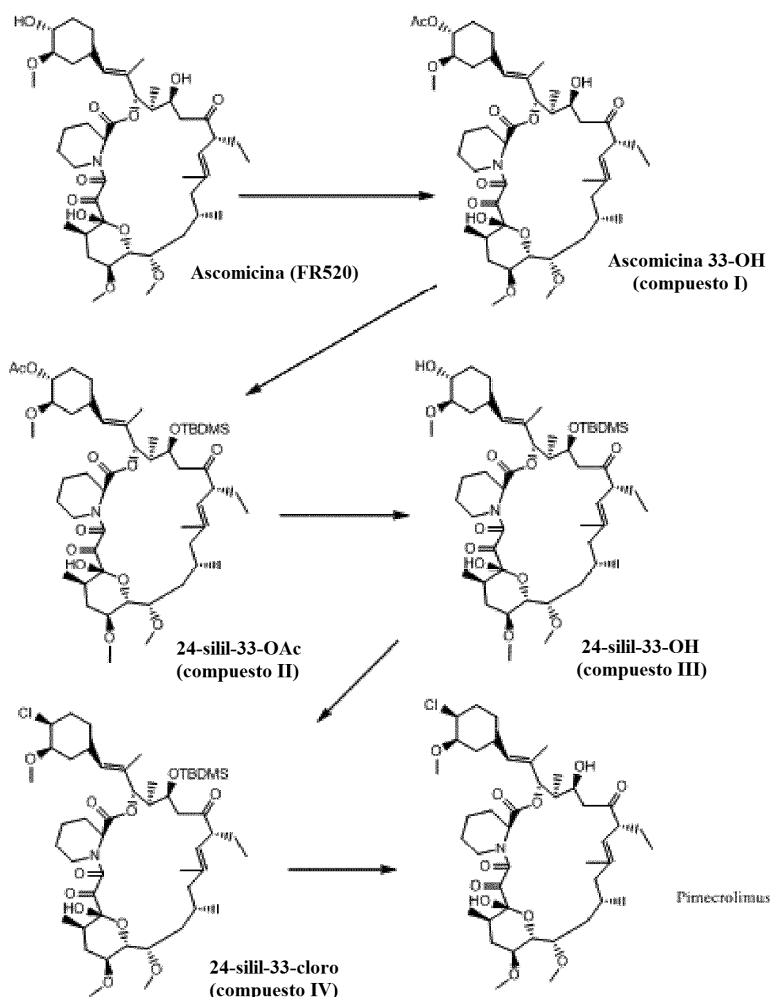
c) La reacción enzimática para preparar 24-*terc*-butil dimetilsilil éter de ascomicina (producto intermedio 24-silil-33-OH; compuesto III del esquema 2), es decir, la reacción de alcoholólisis en la posición 33, se lleva a cabo característicamente usando, como enzima, la lipasa de *Candida antarctica* (CAL B, E.C.3.1.1.3). El disolvente orgánico usado está seleccionado de entre disolventes apróticos con un log P que supera 0,5 tal como, por ejemplo, *terc*-butil metil éter, diclorometano o tolueno, preferentemente *terc*-butil metil éter, en presencia de un alcohol alifático primario C₁-C₈, preferentemente n-octan-1-ol. Tal reacción de alcoholólisis se lleva a cabo usando una relación relativa entre mg de derivado de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-acetil-ascomicina y unidades de CAL B comprendidas entre 0,1 y 0,5, preferentemente 0,25, operando con agitación a una temperatura comprendida entre 15 °C y 60 °C, preferentemente 40 °C. La relación molar relativa entre el sustrato y el alcohol alifático primario comprende entre 0,1 y 0,4, preferentemente 0,2. La reacción se lleva a cabo a la concentración del sustrato comprendida entre 0,01 y 0,1 molar, preferentemente 0,02 molar.

d) La preparación de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-epi-cloro-ascomicina (producto intermedio 24-silil-33-cloro; compuesto IV del esquema 2) se lleva a cabo característicamente usando, como reactivo, diclorotriphenilfosforano o N-clorosuccinimida; el reactivo se usa a una relación molecular relativa con el sustrato comprendida entre 1,2 y 1,8, preferentemente 1,6, en un disolvente aprótico tal como, por ejemplo, tolueno, n-hexano o diclorometano, preferentemente tolueno. Se lleva a cabo a una concentración del sustrato comprendida entre 0,05 y 0,1 molar, preferentemente 0,07 molar, en el intervalo de temperatura comprendido entre 25 °C y 80 °C, preferentemente a 60 °C.

e) La eliminación del *terc*-butil silil éter en la posición 24 para obtener pimecrolimus se lleva a cabo por medio de catálisis ácida que puede obtenerse usando ácidos inorgánicos monoproticos tales como ácido fluorhídrico o ácido clorhídrico o ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico monohidratado o ácido metanosulfónico, preferentemente ácido p-toluenosulfónico monohidratado, usando una relación molar entre

- 5 sustrato y ácido comprendida entre 1:0,3 y 1:1, preferentemente 1:0,4, operando a un intervalo de temperatura comprendido entre 15 y 40 °C, preferentemente 25 °C, durante un tiempo de reacción comprendido entre 24 y 72 horas. Tal reacción se lleva a cabo operando a una concentración molar del sustrato comprendida entre 0,05 y 0,2 M, preferentemente a la concentración de 0,12 M, usando, como disolvente de reacción, mezclas de disolventes apróticos y próticos usados a una relación volumétrica relativa comprendida entre 2/8 y 8/2. Ejemplos de disolventes apróticos utilizables en tal etapa son diclorometano e hidrocarburos o mezclas de hidrocarburos C₅-C₇ lineales o ramificados, preferentemente diclorometano. Ejemplos de disolventes próticos útiles en esta etapa son alcoholes C₁-C₄ de cadena lineal o ramificada, preferentemente metanol.

Una síntesis preferida según el método descrito anteriormente se esquematiza en el siguiente esquema 2:



Esquema 2: Síntesis de pimecrolimus para la transesterificación enzimática de ascocinina.

- 10 En el producto inicial, es decir, la ascocinina, se lleva a cabo una transesterificación irreversible catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* (CAL B) usando acetato de vinilo como agente acilante y *tert*-butil dimetil éter (TBDME) como disolvente. Esto permite obtener la acetilación selectiva de la posición 33 de ascocinina de una manera cuantitativa en 80 horas.
- 15 El producto de reacción obtenido (producto intermedio 33-OAc de ascocinina; compuesto I del esquema 2), sin ninguna purificación, se convirtió en el 24-*tert*-butil-dimetil-silil éter correspondiente (producto intermedio 24-silil-33-OAc; compuesto II del esquema 2) con triflato de *tert*-butil dimetilsililo en diclorometano y 2,6-lutidina en 0,5 horas, con un rendimiento del 75 %.
- 20 Después de la purificación cromatográfica sobre gel de sílice, el acetato en la posición 33 del producto intermedio 24-silil-33-OAc se eliminó, todavía usando CAL B en condiciones de alcoholólisis, es decir, usando octan-1-ol en *tert*-butil dimetil éter que proporciona el derivado de 24-silil éter de ascocinina (compuesto III del esquema 2) con rendimientos

comprendidos entre el 80 y el 100%.

Este producto intermedio se convirtió en el producto final sustituyendo el hidroxilo en 33 con un átomo de cloro, mediante la reacción con diclorotrietilfosforano. El producto intermedio 24-silil-33-cloro (compuesto IV del esquema 2) se obtuvo después de la purificación cromatográfica.

- 5 Finalmente, la eliminación del silil éter en la posición 24 usando ácido p-toluenosulfónico monohidratado en diclorometano/metanol permite obtener pimecrolimus a partir de ascomicina con rendimientos globales de aproximadamente el 30 % molar.

Así, hay un mayor rendimiento con respecto a la síntesis de pimecrolimus descrita previamente y, en particular, un rendimiento superior al 87,5 % con respecto al rendimiento obtenible según el proceso descrito en el documento EP427680. En realidad, la prueba experimental llevaba a cabo por el solicitante, con respecto a la descripción brevemente explicada en el documento EP427680, confirmó los rendimientos de conversión globales del 16 %, como se indica en el Ejemplo comparativo 4. En particular, particularmente penalizante para los rendimientos globales del proceso fueron la parada de la desprotección de grupos *terc*-butil dimetilsilil éter en la posición 24 y 33 llevada a cabo en las condiciones descritas en el Ejemplo 1b y 47 (rendimiento del 45-50 %) de la patente anteriormente mencionada y las halogenaciones como se describen en el Ejemplo 1 (rendimiento del 50-60 %). El compuesto 24-silil-33-OAc (compuesto II del esquema 2), es decir, el compuesto 24-*terc*-butildimetilsilil-33-acetil-ascomicina es un compuesto que nunca se ha descrito en la bibliografía y se sintetizó y caracterizó por primera vez en la presente invención.

Así, otro aspecto de la presente invención se representa por el compuesto 24-*terc*-butildimetilsilil-33-acetil-ascomicina, obtenido como producto intermedio en el proceso de síntesis enzimática de pimecrolimus.

- 20 Otro objeto de la presente invención se basa en el uso, como producto intermedio en la síntesis de pimecrolimus, del compuesto 24-*terc*-butildimetilsilil-33-acetil-ascomicina.

También se describe un método para la síntesis de pimecrolimus, que comprende las siguientes etapas: a') preparar ascomicina acetilada en las posiciones 24 y 33; b') eliminación enzimática (alcoholólisis) del acilo en la posición 33 para obtener ascomicina monoacetilada en la posición 24; c') sustitución del hidroxilo en 33 de ascomicina con un átomo de cloro para obtener el compuesto 24-acetato-33-epi-cloro ascomicina; d') la eliminación del acetato en la posición 24.

En particular, las etapas indicadas anteriormente se realizan del siguiente modo:

a') la preparación de 24,33-diacetato de ascomicina (producto intermedio 24,33-diacetato; compuesto V del esquema 3) se lleva a cabo característicamente usando, como agentes acilantes, cloruro de acetilo o anhídrido acético, a una relación molar relativa con el sustrato comprendida entre 3 y 6, preferentemente 4,5, en presencia de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), que se usa en una relación relativa con el agente acilante comprendida entre 1,0 y 1,2, preferentemente 1,0. La reacción se lleva a cabo usando, como disolvente, una base orgánica tal como piridina o trietilamina, preferentemente piridina, operando a la concentración del sustrato comprendida entre 0,08-0,5 molar, preferentemente 0,1 molar. La temperatura de esta reacción puede estar comprendida entre -5 °C y 25 °C, preferentemente a la temperatura de 0 °C.

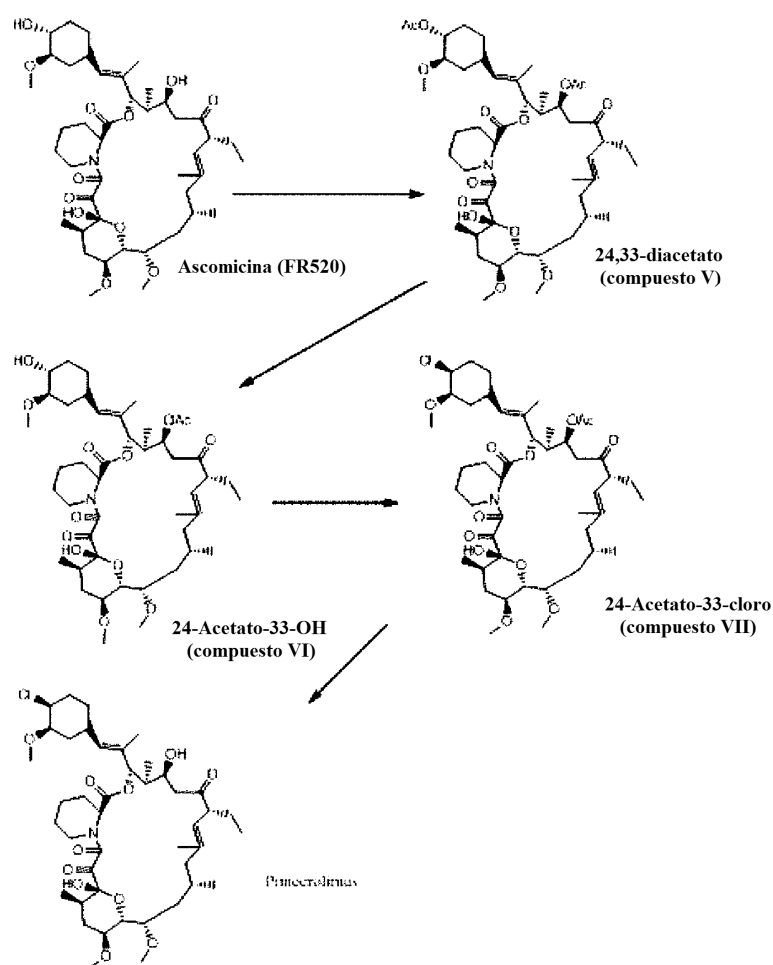
b') la reacción enzimática (alcoholólisis) para preparar 24-acetil-ascomicina (producto intermedio 24-acetato-33-OH; compuesto VI del esquema 3) a partir de 24,33-diacetato de ascomicina (producto intermedio 24,33-diacetato) se lleva a cabo característicamente usando, como enzima, lipasa de *Candida antarctica* (CAL B, (E.C.3.1.1.3.)) en un disolvente orgánico adecuado seleccionado de entre disolventes apróticos con un log P que supera 0,5 tal como, por ejemplo, *terc*-butil metil éter, diclorometano o tolueno, preferentemente *terc*-butil metil éter, en presencia del alcohol alifático primario C₁-C₈, preferentemente n-octan-1-ol. Tal reacción se lleva a cabo usando una relación relativa entre mg de 24,33-diacetato de ascomicina y unidades de CAL B comprendida entre 0,1 y 0,5, preferentemente 0,23, operando con agitación a una temperatura comprendida entre 15 °C y 60 °C, preferentemente 30 °C. La relación molar relativa entre el alcohol alifático primario y el sustrato comprende entre 0,2 y 0,8, preferentemente 0,5. La reacción se lleva a cabo a la concentración del sustrato comprendida entre 0,01 y 0,1 molar, preferentemente 0,02 molar.

c') la preparación de 24-acetil-33-epi-cloro-ascomicina (producto intermedio 24-acetato-33-cloro; compuesto VII del esquema 3) a partir de 24-acetil-ascomicina se lleva a cabo característicamente usando trifetilfosfina poliméricamente soportada, disponible en el mercado (a un título de aproximadamente 3 mmoles de trifetilfosfina por gramo de copolímero de estireno y divinilbenceno), en una relación molar (calculada basándose en el contenido de trifetilfosfina) comprendida entre 2,0 y 3,0 con respecto al sustrato, preferentemente 2,3. La reacción se lleva a cabo en un disolvente clorado C₁-C₂ tal como tetracloruro de carbono solo, o hexacloroetano en presencia de otro disolvente orgánico aprótico no polar tal como, por ejemplo, hidrocarburos alifáticos C₅-C₈ lineales o ramificados o hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno o xileno, preferentemente tetracloruro de carbono, operando a una temperatura comprendida entre 60 °C y 85 °C, preferentemente 77 °C a la concentración del sustrato comprendida entre 0,05 y 0,20 molar, preferentemente 0,1 molar.

d') la eliminación del acetato en la posición 24 para obtener pimecrolimus se lleva a cabo usando una catálisis ácida operando a un intervalo de temperatura comprendido entre 5 y 40 °C en un disolvente prótico polar tal como, por ejemplo, alcoholes C₁-C₈ lineales o ramificados, preferentemente metanol, a la concentración del sustrato comprendida entre 0,05 y 0,2 M. El catalizador ácido utilizable en esta etapa puede ser un ácido monoprótico inorgánico tal como ácido fluorhídrico o ácido clorhídrico o un ácido orgánico tal como, por ejemplo, el ácido p-toluenosulfónico monohidratado o ácido metanosulfónico, preferentemente ácido clorhídrico. La relación molar entre el sustrato y el ácido óptimo en esta etapa comprende entre 1:5 y 1:20, preferentemente 1:13.

Ventajosamente, el uso de trifetilfosfina soportada, en la reacción de sustitución de hidroxilo en la posición 33 con un átomo de cloro de la etapa c'), permite una simplificación considerable del procesamiento de tal etapa de síntesis que en realidad se reduce a simple filtración. Otra ventaja de tal modificación sintética se basa en el hecho de que la trifetilfosfina oxidada soportada recuperada al final de la reacción puede reutilizarse, después de la regeneración usando triclorosilano (*número de registro* 10025-778-2; Regent S.L., Lee D.P. Journal of Organic Chemistry, (1975), 40, 1669-1670), en el mismo proceso.

La síntesis según el método descrito anteriormente se esquematiza en el siguiente esquema 3:



Esquema 3: Síntesis de pimecrolimus para la alcoholisis catalizada por enzima de 33,24-diacetato de ascomicina

Una síntesis preferida según el método descrito anteriormente proporciona la reacción de ascomicina con anhídrido acético y dimetilaminopiridina (DMAP) en piridina a 0 °C. El derivado de 24,33-diacetato se preparó en 1 hora (compuesto V del esquema 3; rendimiento del 95 %).

Se descubrió sorprendentemente que, también sobre este sustrato, la lipasa de *Candida antarctica* (CAL B; E.C.3.1.1.3), operando en condiciones de alcoholisis, puede conducir quimioselectivamente al 24-monoacetato de ascomicina correspondiente (compuesto VI del esquema 3).

Así, el 24,33-diacetato (compuesto V) de ascomicina se convirtió en 24-monoacetato (24-acetato-33-OH; compuesto VI) durante una transformación catalizada a partir de CAL B con octan-1-ol en *tert*-butil dimetil éter (TBDME) (100 %, en 5 horas)

5 El cloro en la posición 33 se introdujo mediante reacción con trifenílfosfina soportada y tetracloruro de carbono con rendimiento del 40 % para obtener el producto intermedio 24-acetato-33-cloro (compuesto VII del esquema 3).

10 El uso de trifenílfosfina soportada en esta etapa de síntesis como una alternativa al uso de trifenílfosfina, previamente descrita en la bibliografía, para introducir cloro sobre la ascomicina protegida sobre el hidroxilo en la posición 24, permitió, considerando los mismos rendimientos de conversión, simplificar considerablemente el procesamiento de reacción que, en el caso de trifenílfosfina soportada, se lleva a cabo filtrando simplemente la mezcla de reacción y evaporando el filtrado a vacío. Tal reactivo también tiene la ventaja de permitir la reutilización, después de la regeneración con triclorosilano, en el mismo proceso.

15 La eliminación del acetato en la posición 24 con HCl 3 N en metanol a temperatura ambiente (rendimiento del 40 %) obtuvo pimecrolimus con características idénticas a una muestra de referencia y rendimientos globales del 13 % (Esquema 3). Los productos intermedios del proceso 24,33-diacetato de ascomicina (compuesto V), 24-monoacetato de ascomicina (compuesto VI) y 24-acetato-33-epi-cloro de ascomicina (compuesto VII) no se describen en la bibliografía y se sintetizaron y caracterizaron por primera vez en la presente invención.

Así, también se describen los compuestos 24,33-diacetato de ascomicina, 24-monoacetato de ascomicina y 24-acetato-33-cloro de ascomicina, obtenidos como productos intermedios en el proceso de síntesis enzimática de pimecrolimus.

20 También se describen los usos de pimecrolimus, de los compuestos 24,33-diacetato de ascomicina, 24-monoacetato de ascomicina y 24-acetato-33-cloro de ascomicina, como productos intermedios en la síntesis.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin limitarla de ninguna manera en absoluto.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

25 En los siguientes ejemplos, se registraron los análisis de RMN ¹H (500 MHz) en deuterocloroformo en el instrumento Bruker AM500; los valores espectrales indicados son en ppm (δ) y se refieren a los picos de diagnóstico del isómero principal.

30 Se registraron los análisis de IR en instrumentos de FT IR de Perkin Elmer (Mod. Spectrum One) equipados con ATR. Los análisis polarimétricos se llevaron a cabo en instrumentos de Perkin Elmer (Mod. 343). Los espectros de masas se registraron en los instrumentos de espectrómetro Finnigan LCQ Deca Termoquest (trampa de iones; ESI positiva) usando la técnica de infusión directa.

35 Los valores indicados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se registraron en el instrumento de Perkin Elmer (Mod. DSC7) a un valor de calentamiento de 5 °C/min. La lipasa de *Candida antarctica* (CAL B 2 U/mg; E.C.3.1.1.3), de *Candida cylindracea* (CCL 15-25 U/mg; E.C.3.1.1.3), de páncreas porcino (PPL \geq 200 U/mg; E.C.3.1.1.3), de *Pseudomonas cepacia* (PFL 50 U/mg; E.C.3.1.1.3) y la trifenílfosfina soportada (aproximadamente 3,2 mmoles/g de trifenílfosfina) se adquirieron por Fluka. La ascomicina usada como reactivo inicial de la síntesis se preparó por Poli Industria Chimica SpA, Quinto de Stampi, Rozzano (MI), Italia.

Ejemplo 1

Preparación del derivado de 33-acetilo de ascomicina (compuesto I del esquema II)

40 Se añadió lipasa de *Candida antarctica* (CAL B, Novozym 435) [0,140 g (2 U/mg) FLUKA] a una disolución de ascomicina (100 mg; 0,126 mmoles) en tolueno (8 ml) y acetato de vinilo (4,5 eq; 0,473 g). La reacción se mantiene con agitación a la temperatura de 30 °C durante 80 h, a continuación la enzima se saca por filtración y el filtrado se concentra a baja presión para obtener 105 mg de 33-acetil-ascomicina.

Una muestra de tal producto intermedio se purificó para fines analíticos por cristalización en acetona/agua.

45 Se llevaron a cabo los siguientes análisis sobre tal muestra: RMN ¹H (500 MHz) δ : 2,10 (CH₃CO), 3,92 y 4,70 (24CH y 33CH); IR (cm⁻¹): 3484,245, 2935,287, 1735,331, 1649,741, 1450,039, 1372,278; DSC: endoterma a 134,25 °C; $[\alpha]_D^{25} = -74,0^\circ$ (c=0,5 CHCl₃). Espectro de EM (ESI +): m/z: 856,4 (M+23; 100,0 %)

Análisis elemental calculado para C₄₅H₇₁NO₁₃: C 64,80 %; H, 8,58 %; N, 1,68 %; O, 24,94 %

Análisis elemental hallado: C 64,78 %; H, 8,54 %; N, 1,59 %; O, 24,89 %

Preparación del derivado de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-acetilo de ascomicina (producto intermedio 24-silil-33-Oac; compuesto II del esquema 2)

5 Se añaden 2,6-lutidina (0,290 g; 2,7 mmoles) y triflato de *terc*-butildimetilsililo (0,238 g; 0,9 mmoles) a una disolución de derivado de 33-acetilo de ascomicina (150 mg; 0,18 mmoles) en diclorometano (5 ml). La reacción se deja con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de este periodo la mezcla de reacción se lava con una disolución saturada con bicarbonato sódico (5 ml) y la fase orgánica obtenida se lava en secuencia con HCl 0,1 N (5 ml 3 veces) y con una disolución al 30 % de NaCl (5 ml). La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra dando el residuo a vacío para obtener 128 mg de producto.

Espectro de EM (ESI+): m/z: 970,5 (M+23; 100,0 %)

10 RMN ¹H (500 MHz) δ: 0,05 y 0,06 ((CH₃)₂Si), 0,90 ((CH₃)₃C-Si), 2,10 (CH₃CO), 4,70 (33CH)

IR (cm⁻¹): 3462,948, 2934,450, 1739,236, 1649,937

Análisis elemental calculado para C₅₁H₈₅NO₁₃Si: C 64,59 %; H, 9,03 %; N, 1,48 %; O, 21,93 %

Análisis elemental hallado: C 64,50 %; H, 9,05 %; N, 1,41 %; O, 21,88 %

DSC= endoterma a 236,43 °C. [α]_D=-81,4° (c=0,5 CHCl₃).

15 Preparación de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter de ascomicina (producto intermedio 24-silil-33-OH; compuesto III del esquema 2)

20 Se añaden n-octan-1-ol (0,035 g; 0,265 mmoles) y CAL B (Novozym 435) [0,100 g (2 U/mg) FLUKA] a una disolución de derivado de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-acetilo de ascomicina (50 mg; 0,053 mmoles) en *terc*-butil metil éter (4 ml). La reacción se mantiene con agitación a la temperatura de 40 °C durante 120 horas. Después de este periodo la mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora dando residuo a vacío para obtener producto en bruto de reacción que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice: se recuperan 44 mg de producto (0,048 mmoles) mediante elución con éter de petróleo/acetona 7/3.

Las propiedades químicas/físicas del producto obtenido coinciden con aquellas de una muestra de referencia obtenida según la patente EP427680.

25 Preparación de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-epi-cloro-ascomicina (producto intermedio 24-silil-33-cloro; compuesto IV del esquema 2)

Una disolución de 24-sililo FR520, es decir, 24-silil-ascomicina (165 g; 0,18 moles) en tolueno anhidro (1,4 litros) y piridina (50 ml) se añade a una suspensión de diclorotriphenilfosforano (99,95 g) en tolueno anhidro (1,1 litros), con agitación a temperatura ambiente (20-25 °C) en atmósfera inerte.

30 Después de la adición, la mezcla de reacción se calienta a la temperatura de 60 °C durante 1 hora. Después de este periodo, la temperatura de la mezcla de reacción se lleva a 25 °C y así la fase orgánica se lava en secuencia con agua (1 vez con 1 l) y con una disolución acuosa de NaCl al 10 % (4 veces con 1 l cada vez), entonces se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra a vacío para obtener aproximadamente 250 g de un sólido húmedo de tolueno. Tal producto de residuo vuelve a cogerse con n-hexano (500 ml) y a continuación se evapora a sequedad (con el fin de eliminar el tolueno presente). El producto de residuo se diluye en n-hexano (500 ml) con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 minutos y a continuación el sólido sin disolver se saca por filtración sobre Büchner (es el subproducto de diclorofosforano).

El filtrado se concentra a baja presión para obtener 148,6 g de un sólido que posteriormente se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (elución con n-heptano/acetona = 9/1) para obtener 123 g (0,13 moles) de producto.

40 Las propiedades químicas/físicas del producto obtenido coinciden con aquellas descritas en la bibliografía (documento EP427680).

Preparación de pimecrolimus a partir de 24-*terc*-butil dimetilsilil éter-33-epi-cloro-ascomicina

45 El producto intermedio 24-silil-33 cloro (123 g; 0,13 moles; compuesto IV del esquema 2) se disuelve con agitación a temperatura ambiente en una mezcla de diclorometano/metanol = 1/1 = v/v (1,1 litros), luego se añade ácido p-toluenosulfónico monohidratado (10,11 g).

La reacción se mantiene con agitación a la temperatura de 20-25 °C durante 72 horas, así se añade una disolución de agua (600 ml) y bicarbonato sódico (4,46 g) a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, entonces se prepara la fase orgánica y se lava con una disolución acuosa al

10 % de cloruro sódico (600 ml).

La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra a vacío para obtener 119 g de pimecrolimus en bruto. Tal producto en bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (n-hexano/acetona como eluyentes) y así cristaliza en acetato de etilo, ciclohexano/agua para obtener 66 g (81,5 mmoles) de pimecrolimus purificado.

- 5 Los datos químicos/físicos obtenidos coinciden con los datos indicados en la bibliografía.

Ejemplo 2 (comparativo)

Preparación de 24,33-diacetato de ascomicina (producto intermedio 24,33-diacetato; compuesto V del esquema 3)

Se añaden DMAP (4,5 eq; 0,136 g) y anhídrido acético (4,5 eq; 0,114 g) a una disolución de ascomicina (200 mg; 0,25 mmoles) en piridina (2,5 ml), con agitación a la temperatura de 0 °C.

- 10 La reacción se mantiene con agitación durante 1,5 horas a la temperatura de 0 °C, a continuación se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo (3 veces con 5 ml). Los extractos orgánicos se lavan con HCl 0,5 N (5 veces con 10 ml), se secan sobre Na₂SO₄ concentrado a vacío.

El producto de residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (n-hexano/acetona 8/2 v/v como eluyente) para obtener 24,32-diacetato de ascomicina (210 mg; 0,24 mmoles).

- 15 Los presentes inventores llevaron a cabo el siguiente análisis sobre tal muestra purificada:

RMN ¹H (500 MHz) δ: 2,02 y 2,06 (2 CH₃CO), 5,20 y 4,70 (24CH y 33CH);

IR (cm⁻¹): 3462,749, 2935,824, 1734,403, 1650,739, 1449,091, 1371,079.

DSC: pico endotérmico a 234,10 °C ; [α]_D=-100,0° (c=0,5 CHCl₃).

Espectro de EM (ESI+): m/z: 898,4 (100,0 %; m+23)

- 20 Análisis elemental calculado para C₄₇H₇₃NO₁₄: C 64,44 %; H 8,40 %; N 1,60 %; O 25,57 %

Análisis elemental hallado: C 64,55 %; H 8,44 %; N 1,61 %; O 25,40 %

Preparación de 24-acetil-ascomicina (producto intermedio 24-acetato-33-OH; compuesto VI del esquema 3)

- 25 Se añade lipasa de *Candida antarctica* (CAL B Novozym 435) [1,1 g (2 U/mg) FLUKA] a una disolución de 33,24-diacetato de ascomicina (500 mg; 0,57 mmoles) en TBDME (25 ml) y n-octan-1-ol (4,5 eq; 0,371 g). La reacción se mantiene con agitación a 30 °C durante 100 horas, entonces la enzima se saca por filtración y el filtrado obtenido se concentra bajo baja presión para obtener 425 mg (0,51 mmoles) de producto.

Se purificó una muestra para fines analíticos por cromatografía sobre gel de sílice (n-hexano/acetona = 7:3 v/v como eluyentes) y así cristalizó en acetona/agua.

- 30 Los presentes inventores llevaron a cabo los siguientes análisis en tal muestra purificada: RMN ¹H (500 MHz) δ: 2,05 (CH₃CO); IR (cm⁻¹): 3491,528, 2935,860, 1744,728, 1710,227, 1652,310, 1448,662, 1371,335. DSC: pico endotérmico a 134,68 °C; [α]_D=-102,7° (c=0,5 CHCl₃)

Espectro de EM (ESI +): m/z: 856,4 (M+23; 100,0 %)

Análisis elemental calculado para C₄₅H₇₁NO₁₃: C 64,80 %; H, 8,58 %; N, 1,68 %; O, 24,94 %

Análisis elemental hallado: C 64,71 %; H, 8,49 %; N, 1,60 %; O, 24,97 %

- 35 Preparación de 24-acetil-33-epi-cloro-ascomicina (producto intermedio 24-acetato-33-cloro; compuesto VII del esquema 3)

- 40 Se añade trifetilfosfina soportada (0,335 g; 1,1 mmoles) a una disolución de 24-acetil-ascomicina (400 mg; 0,48 mmoles) en tetracloruro de carbono (5 ml). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 3 horas, a continuación se enfría a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se filtra y el filtrado se concentra dando residuo a vacío para obtener 0,45 g de producto en bruto de reacción que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice: se obtienen 163 mg (0,19 mmoles) de producto por elución con éter de petróleo/acetona = 90/10.

RMN ¹H δ: 2,08 (CH₃CO); 4,60 (33CH); IR (cm⁻¹)= 3464,941, 2934,360, 1738,993, 1650,366, 1450,424, 1371,557; DSC: pico endotérmico a 231,67 °C; [α]_D=-75,2° (c=0,5 CHCl₃)

Espectro de EM (ESI +): m/z: 874,3 (M+23; 100,0 %)

Análisis elemental calculado para C₄₅H₇₀ClNO₁₂: C 63,40 %; H, 8,28 %; Cl, 4,16 %; N, 1,64 %; O, 22,52 %

Análisis elemental hallado: C 63,31 %; H, 8,30 %; Cl, 4,05 %; N, 1,58 %; O, 22,42 %.

Preparación de pimecrolimus a partir de 24-acetil-33-epi-cloro-ascomicina

- 5 Se agita una disolución de 24-acetil-33-epi-cloro-ascomicina (200 mg; 0,23 mmoles; compuesto VII) en metanol (2 ml) y HCl 3 N (1 ml) a temperatura ambiente durante 40 horas. Después de este periodo, la reacción se neutraliza con una disolución acuosa de bicarbonato, el metanol se evapora a vacío. La mezcla se extrae con diclorometano (3 veces con 5 ml), se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra dando residuo para obtener un producto de residuo que se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (n-hexano/acetona como eluyentes) y así cristaliza en acetato de etilo, ciclohexano/agua para obtener 78 mg de pimecrolimus purificado (0,096 mmoles).

Las características químicas/ físicas del producto obtenido coinciden con los datos indicados en la bibliografía para pimecrolimus.

Ejemplo 3 (comparativo)

- 15 Cribado de lipasa: transesterificación de ascomicina y alcoholisis de 33,24-diacetato de ascomicina (compuesto V del esquema 3)

La regioselectividad de la reacción enzimática se determinó mediante el uso del análisis de RMN ¹H. El 24,33-diacetato de ascomicina (compuesto V) y los 24- y 33-monoacetatos (respectivamente los compuestos VI del esquema 3 y I del esquema 2) no están caracterizados en la bibliografía. El único éster de ascomicina descrito es 24,33-diformiato: para este compuesto los protones en la posición 24 y 33 dan dos señales de diagnóstico, respectivamente, a 5,22 y 4,71 ppm.

- 20 Presentes en el espectro de 33-monoacetato (compuesto I) están dos picos a 3,92 y 4,70 ppm compatibles con la estructura propuesta.

En el espectro de 24,33-diacetato (compuesto V) de ascomicina tales protones caen a 5,20 y 4,70 ppm.

- 25 En el espectro de 24-acetato (compuesto VI) se observa que la región entre 5,0 y 5,4 ppm se modifica y el pico está ausente a 4,7 ppm. Las Tablas 1 y 2 resumen los datos experimentales referentes a las reacciones enzimáticas llevadas a cabo en ascomicina y 33,24-diacetato de ascomicina (compuesto V) en la esterificación (transesterificación), hidrólisis y alcoholisis.

Tabla 1: Esterificación enzimática de ascomicina

Lipasa	Disolvente	Éster activado	Tiempo (horas)	% de conversión (productos obtenidos)
PFL	Cloroformo	Acetato de vinilo	100	0
PPL	Tolueno	Acetato de vinilo	94	0
CCL	Tolueno	Acetato de vinilo	92	0
CAL B	Acetonitrilo	Acetato de vinilo	53	30 (33-OAc; compuesto I)
CAL B	Tolueno	Acetato de vinilo	80	100 (33-OAc; compuesto I)

PFL: lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PFL, E.C.3.1.13)

PPL: lipasa de páncreas porcino (PPL; E.C.3.1.13)

- 30 CCL: lipasa de *Candida cylindracea* (CCL, E.C.3.1.1.3)

CAL B: lipasa de *Candida antarctica* (CAL B; E.C.3.1.1.3)

Tabla 2: Alcohólisis e hidrólisis de 33,24-diacetato de ascomicina (compuesto V del esquema 3)

Lipasa	Disolvente	Disolvente	Tiempo (horas)	% de conversión (productos obtenidos)
CAL B	Tolueno	Agua	80	0
CAL B	Tolueno	Metanol	48	0
CAL B	Tolueno	n-butanol	100	0
CAL B	Tolueno	n-octan-1-ol	120	30 (24-OAc; compuesto VI)
CAL B	<i>tert</i> -butil metil éter	n-octan-1-ol	100	100 (24-OAc; compuesto VI)

Ejemplo 4 (comparativo)Verificación del método de síntesis de pimecrolimus descrito en el documento EP427680

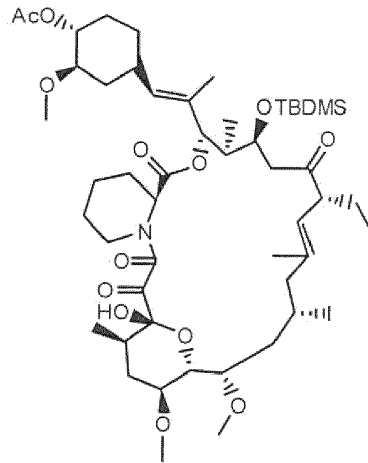
5 Se añaden imidazol (508 mg) y cloruro de *tert*-butildimetilsililo (1,125 g) en porciones a una disolución de 2 g (2,53 mmoles) de ascomicina en N,N-dimetilformamida anhidra (40 ml). La mezcla de reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 4,5 días. La reacción se procesa así diluyéndola con acetato de etilo (200 ml) y procesándola usando agua (5 x 100 ml). La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora dando el residuo a vacío para obtener un producto en bruto espumoso que posteriormente se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (1:30 p/p): se obtienen 2,1 g (2,05 mmoles; rendimientos del 81 % molar) de producto intermedio de 24,33-disililo de ascomicina por elución con n-hexano/acetato de etilo 3/1. Los datos químicos/físicos de tal producto intermedio coinciden con los indicados en el documento EP427680.

15 Se disuelven 2,1 g (2,05 mmoles) del producto intermedio de 24,33-disililo de ascomicina en una disolución con agitación a la temperatura de 0 °C compuesta de acetonitrilo (42 ml) y HF acuoso al 40 % (23,1 ml). La mezcla de reacción se mantiene con agitación a la temperatura de 0 °C durante 2 horas, a continuación se diluye con diclorometano (30 ml). A continuación, la reacción se lava en secuencia con una disolución acuosa saturada usando bicarbonato sódico (30 ml) y agua (30 ml). La fase orgánica separada se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora dando el residuo a vacío para obtener un residuo espumoso que posteriormente se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (1:30 p/p): se obtienen 839 mg (0,92 mmoles; rendimientos del 45 % molar) de producto intermedio de 24-monosililo de ascomicina por elución con diclorometano/metanol 9/1. Los datos químicos/físicos de tal producto intermedio coinciden con los obtenidos en el compuesto III esquema 2 y coinciden con los datos de bibliografía indicados en el documento EP427680. Una mezcla de 839 mg (0,92 mmoles; rendimiento 45 % molares) de producto intermedio de 24-monosililo de ascomicina, trifenilfosfina (337 mg) en tetracloruro de carbono (36,4 ml) se calienta con agitación a reflujo durante 15 horas. Después de este periodo la mezcla de reacción se evapora dando residuo a vacío para obtener un producto sólido purificado por cromatografía sobre gel de sílice (1:30 p/p): 535 mg (0,57 mmoles; rendimientos del 63 % molar) de producto intermedio de 24-monosililo de ascomicina, se obtienen derivado de 33-cloro por elución con n-hexano/acetato de etilo 2/1. Los datos químicos/físicos de tal producto intermedio coinciden con aquellos que los presentes inventores obtuvieron en el compuesto IV esquema 2 y coinciden con los datos de la bibliografía indicados en el documento EP427680.

30 Se disuelven 535 mg (0,57 mmoles) de producto intermedio de 24-monosililo de ascomicina, derivado de 33-cloro con agitación a temperatura ambiente en acetonitrilo (16,4 ml) y HF acuoso al 40 % (0,44 ml). La mezcla de reacción se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 45' y a continuación se diluye con acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica se lava así en secuencia con una disolución acuosa de bicarbonato sódico (70 ml) con agua (2 x 70 ml) y así se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se evapora a vacío para obtener un sólido que posteriormente se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (1:30 p/p): se obtienen 323 mg (0,399 mmoles; rendimiento del 70 % molares) de pimecrolimus por elución con n-hexano/acetato de etilo 2/3. Las características químicas/físicas del producto obtenido coinciden con los datos indicados en la bibliografía referentes a pimecrolimus; el rendimiento global del proceso es del 16 %.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar pimecrolimus, caracterizado porque comprende una etapa de acilación enzimática y una etapa de alcoholólisis enzimática con lipasa de *Candida antarctica*, según las siguientes etapas:
- 5 a) acilación enzimática selectiva del hidroxilo en la posición 33 de ascomicina con lipasa de *Candida antarctica*, en presencia de un agente acilante y un disolvente orgánico;
- b) conversión del derivado acilado en 33 así obtenido en el 24-*terc*-butil-dimetil-silil éter correspondiente, con un agente sililante en presencia de una base orgánica;
- 10 c) eliminación enzimática con lipasa de *Candida antarctica* del acilo en la posición 33 del compuesto preparado en la etapa b), en presencia de un disolvente orgánico y un alcohol alifático primario C₁-C₈, obteniendo 24-*terc*-butil-dimetil-silil éter de ascomicina.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que la lipasa de *Candida antarctica* es CAL B (E.C.3.1.1.3.).
3. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha alcoholólisis es una alcoholólisis selectiva de ésteres de ascomicina en la posición 33 o de derivados sililados de los mismos, preferentemente de ésteres C₁-C₄ o de derivados sililados de los mismos.
- 15 4. Proceso según la reivindicación 3, caracterizado porque dichos ésteres de ascomicina en la posición 33 o derivados sililados de los mismos son 33-acil-24-silil-ascomicina y la ascomicina diacetilada en las posiciones 24 y 33.
5. Proceso según la reivindicación 1, en el que el agente acilante de la etapa a) está seleccionado de un éster vinílico o un éster de trifluoroetilo C₁-C₈, preferentemente acetato de vinilo o acetato de trifluoroetilo.
- 20 6. Proceso según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico de las etapas a) y c) es un disolvente orgánico aprótico con un coeficiente de reparto que supera 0,5, preferentemente tolueno, n-hexano, n-heptano, diclorometano, cloroformo o *terc*-butil dimetil éter en la etapa a) y, preferentemente *terc*-butil dimetil éter, diclorometano o tolueno, incluso más preferentemente *terc*-butil dimetil éter, en la etapa c).
7. Proceso según la reivindicación 1, en el que el agente sililante de la etapa b) es cloruro de *terc*-butildimetilsililo o triflato de *terc*-butildimetilsililo.
- 25 8. Proceso según la reivindicación 1, en el que la base orgánica de la etapa b) es imidazol, piridina o 2,6-lutidina, preferentemente 2,6-lutidina.
9. Proceso según la reivindicación 1, en el que el alcohol alifático primario de la etapa c) es n-octan-1-ol.
10. Proceso según la reivindicación 1, que comprende la sustitución del hidroxilo en 33 de 24-*terc*-butil-dimetil-silil éter de ascomicina con un átomo de cloro, obteniéndose el derivado de 24-*terc*-butildimetilsilil-33-epi-cloro-ascomicina, y la posterior eliminación del *terc*-butil-dimetil-silil éter en la posición 24.
- 30 11. Proceso según la reivindicación 10, en el que la sustitución del hidroxilo en 33 del 24-*terc*-butil-dimetil-silil éter de ascomicina con un átomo de cloro se lleva a cabo usando diclorotriphenilfosforano o N-clorosuccinimida.
12. Proceso según la reivindicación 10, en el que la eliminación del *terc*-butil-dimetil-silil éter en la posición 24 se lleva a cabo por medio de catálisis ácida con ácidos inorgánicos monopróticos, preferentemente ácido fluorhídrico o ácido clorhídrico, o ácidos orgánicos, preferentemente ácido p-toluenosulfónico monohidratado o ácido metanosulfónico, incluso más preferentemente ácido p-toluenosulfónico monohidratado.
- 35 13. 24-*terc*-butildimetilsilil-33-acetil-ascomicina de fórmula:



Compuesto II (esquema 2)

14. Uso del compuesto según la reivindicación 13, como producto intermedio de reacción en la síntesis de pimecrolimus.