

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901734552A1

Publication Date

20101122

Applicant

POLI INDUSTRIA CHIMICA SPA

Title

NUOVO APPROCCIO CHIMICO-ENZIMATICO ALLA SINTESI DEL  
PIMECROLIMUS

Descrizione dell'invenzione industriale a nome POLI INDUSTRIA CHIMICA SPA con sede a Milano, Via G. Marcora 11 avente per titolo "Nuovo approccio chimico-enzimatico alla sintesi del pimecrolimus".

### DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo approccio sintetico chimico-enzimatico per la preparazione del pimecrolimus.

Il pimecrolimus (*registry number* 137071-32-0; Figura 1) è un macrolide dotato di proprietà antinfiammatorie, antiproliferative ed immunosoppressive. Questa sostanza è presente come principio attivo nel farmaco Elidel® recentemente approvato in Europa ed in USA per il trattamento topico di stati infiammatori della pelle quali la dermatite atopica.

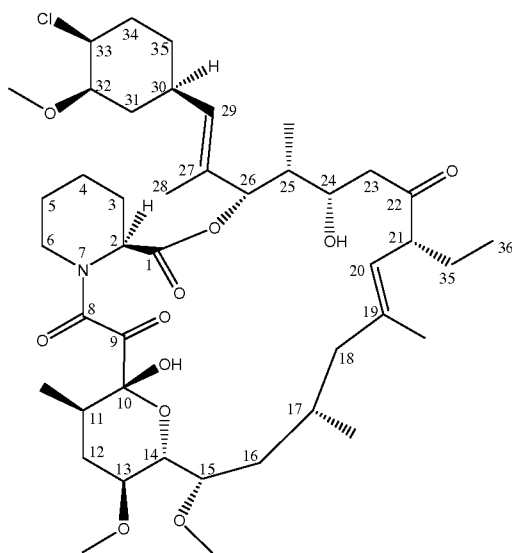
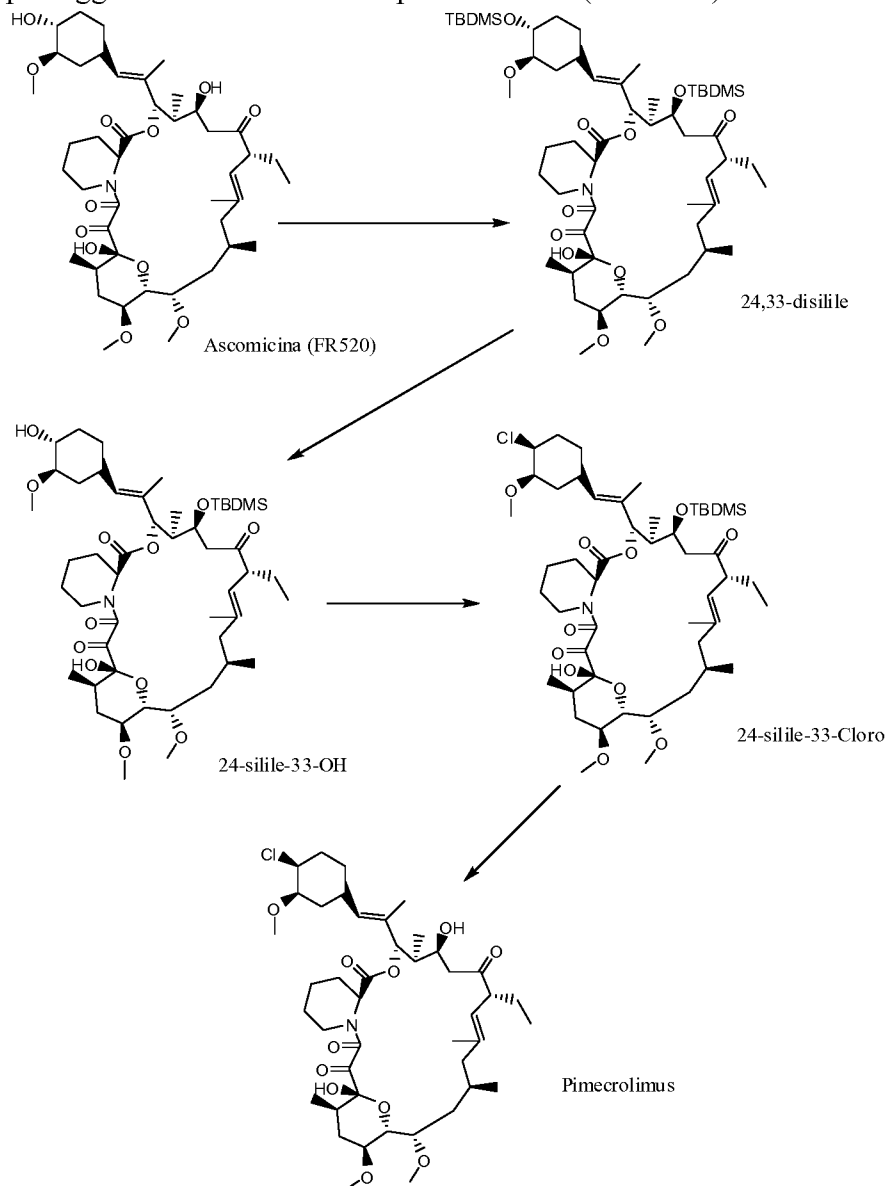


Figura 1: formula di struttura del pimecrolimus

### STATO DELL'ARTE

La preparazione del pimecrolimus è stata descritta per la prima volta nella domanda di brevetto EP427680 a nome Sandoz. In tale documento viene utilizzato come materiale di partenza ascomicina (composto identificato dal

registry number 11011-38-4), un prodotto naturale ottenuto per fermentazione da ceppi di Streptomiceti (quali ad esempio lo *Streptomyces hygroscopicus var ascomyceticus*, o lo *Streptomyces hygroscopicus tsukubaensis* N°9993). Dall'ascomicina attraverso una sequenza di quattro passaggi di sintesi si ottiene il pimecrolimus (schema 1)



Schema 1: via di sintesi descritta in EP427680

Dal punto di vista strutturale il pimecrolimus è il 33-epicloroderivato

dell'ascomicina. Come descritto in EP427680, la presenza contemporanea nella struttura dell'ascomicina di due gruppi idrossilici secondari in posizione 24 ed in posizione 33, richiede la protezione dell'idrossile in posizione 24 prima di effettuare la sostituzione del secondo idrossile in posizione 33 con un atomo di cloro.

Per arrivare alla monoprotezione dell'idrossile in posizione 24 dell'ascomicina, tale via di sintesi prevede la preparazione del 24,33-disilile derivato e la successiva rimozione selettiva del sililene in posizione 33.

L'elevato rapporto fra l'agente sililante ed il substrato e la non completa selettività del successivo stadio di deprotezione rende necessaria la realizzazione di due purificazioni cromatografiche su colonna di gel di silice (Baumann K., Bacher M., Damont A., Hogenauer K., Steck A. *Tetrahedron*, (2003), 59, 1075-1087).

Le rese globali di tale via di sintesi non sono riportate in letteratura; è stato sperimentalmente verificato dalla richiedente che tali rese sono circa del 20% molare a partire da ascomicina.

Altre vie di sintesi sono state recentemente proposte come alternative alla sintesi di EP427680.

In particolare, la domanda di brevetto internazionale WO2006040111 a nome Novartis prevede la sostituzione diretta dell'idrossile in posizione 33 dell'ascomicina con un atomo di cloro ed una seconda alternativa, descritta nella domanda di brevetto internazionale WO2006060614 a nome Teva, utilizza come intermedio sintetico un derivato solfonato in posizione 33 dell'ascomicina.

Entrambe le alternative sintetiche proposte non sono completamente

soddisfacenti in quanto in WO2006040111 gli agenti alogenanti proposti (clorofosforano e N-clorosuccinimide) non sono in grado, a detta degli stessi autori, di sostituire regioselettivamente la funzione idrossilica in posizione 33, mentre in WO2006060614 le caratteristiche qualitative del prodotto ottenuto sono, anche dopo purificazione cromatografica e/o cristallizzazione, modeste per un prodotto da utilizzare per uso farmaceutico (ovvero purezza del 96% come descritto nella parte sperimentale).

In generale, per la sintesi organica di molecole polifunzionali possono essere utilizzati sistemi enzimatici purificati (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); WO2006024582).

#### RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Sono quindi oggetto della presente invenzione processi alternativi per la preparazione del pimecrolimus a partire dall'ascomicina che sfruttano le caratteristiche di selettività dei sistemi enzimatici purificati con particolare riguardo alla possibilità di funzionalizzare in modo selettivo i gruppi idrossilici presenti in posizione 24 e 33 dell'ascomicina. Tale approccio rappresenta il primo esempio di sintesi chimico-enzimatica per la preparazione del pimecrolimus.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha come oggetto metodi di sintesi alternativi del pimecrolimus, che comprendono la funzionalizzazione enzimatica selettiva

dell'ossidril in posizione 33 o in posizione 24 dell'ascomicina.

Attraverso lo *screening* effettuato sia in condizioni di idrolisi ed alcolisi utilizzando come substrato ascomicina 24, 33 diacetato (composto V dello schema 3), sia in condizioni di transesterificazione utilizzando come substrato ascomicina, sono stati valutati enzimi commercialmente disponibili, quali ad esempio le lipasi da *Candida antartica* (CAL B; E.C.3.1.1.3), da *Candida cylindracea* (CCL, E.C.3.1.1.3), da pancreas porcino (PPL; E.C.3.1.13) e da *Pseudomonas cepacia* (PFL, E.C.3.1.13).

E' stato così sorprendentemente trovato che la sola lipasi da *Candida antartica* (nella forme commercialmente disponibili di enzima libero o come enzima immobilizzato su una resina polimerica; quest'ultima forma nota anche come CAL B) nelle condizioni di transesterificazione irreversibile (condizioni che prevedono l'utilizzo di vinilacetato come agente acilante e *tert*-butildimetil etero come solvente), è in grado di acilare selettivamente la posizione 33 dell'ascomicina in modo quantitativo in 80 ore, così come la sola lipasi da *Candida antartica*, ed in particolare la CAL B, operando in condizioni di alcolisi sulla 24,33-diacetato ascomicina, si è sorprendentemente dimostrata in grado di portare chemoselettivamente al corrispondente 24-monoacetato dell'ascomicina (composto VI dello schema 3).

Oggetto della presente invenzione sono quindi i processi per la preparazione del pimecrolimus, caratterizzati dal fatto di comprendere uno stadio di acilazione e/o alcolisi enzimatica con lipasi da *Candida antartica*, dove preferibilmente detta lipasi da *Candida antartica* è CAL B (E.C.3.1.1.3.).

Inoltre, la presente invenzione ha come oggetto metodi di sintesi del pimecrolimus, comprendenti uno stadio di alcolisi enzimatica selettiva di esteri in posizione 33 dell'ascomicina, e più in dettaglio di suoi derivati quali la 33-acile-24 silil ascomicina e l'ascomicina diacetilata alle posizioni 24 e 33, ad opera di una lipasi da *Candida antarctica*, preferibilmente lipasi CAL B (E.C.3.1.1.3.)

Tale approccio rappresenta il primo esempio di sintesi chimico-enzimatica per la preparazione del pimecrolimus. Rispetto alle sintesi chimiche già descritte in letteratura, questo approccio presenta il vantaggio di poter utilizzare, su di una macromolecola polifunzionale come l'ascomicina o di suoi derivati, condizioni di reazione (ad esempio pH e temperatura) non estreme, minimizzando così la degradazione del prodotto stesso.

L'utilizzo della lipasi da *Candida antarctica* legata ad una matrice polimerica (CAL B), per realizzare la protezione/deprotezione delle funzioni idrossiliche presenti in posizione 33 e 24 dell'ascomicina rappresenta un ulteriore vantaggio di queste sintesi, in quanto l'utilizzo di un enzima supportato non solo semplifica notevolmente il *workup* di reazione, ma ne consente l'utilizzo in più cicli di uso. E' infatti noto che, diversamente dalle lipasi non supportate, la CAL B non solo sia insolubile nella maggior parte dei solventi organici ed in acqua, consentendone un facile recupero dal medium di reazione per semplice filtrazione, ma che tale tipo di lipasi supportata sia anche più stabile dal punto di vista dell'attività enzimatica (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.; Eigtvad, Peter.Novo

Ind. A/S, Bagsvaerd, Den. ACS Symposium Series (1989), 389 (*Biocatal. Agric. Biotechnol.*), 158-72).

Un altro oggetto della presente invenzione è un metodo per la sintesi del pimecrolimus, che comprende i seguenti stadi: a) acilazione enzimatica selettiva dell'ossidrile in posizione 33 dell'ascomicina; b) conversione del derivato 33-acilato così ottenuto nel corrispondente 24-*tert*-butildimetilsililetere; c) rimozione enzimatica (alcolisi) dell'acile in posizione 33 del composto preparato nello stadio b) per ottenere il 24-*tert*-butildimetilsililetere dell'ascomicina; d) sostituzione dell'ossidrile in 33 del 24-*tert*-butildimetilsililetere dell'ascomicina, con un atomo di cloro per ottenere il derivato 24-*tert*-butildimetilsilil-33-epicloro ascomicina; ed infine e) rimozione del *tert*-butildimetilsililetere in posizione 24.

In particolare, gli stadi sopra indicati vengono effettuati nel modo seguente:

a) la reazione di esterificazione chemoselettiva dell'ascomicina sull'idrossile in posizione 33 viene condotta in modo caratteristico utilizzando come enzima la lipasi da *Candida antarctica* (CAL B, E.C.3.1.1.3) in opportuno solvente organico, selezionato tra i solventi organici aprotici con un coefficiente di partizione (logP) superiore a 0,5, quali ad esempio toluene, n-esano, n-eptano, diclorometano, cloroformio e *tert*-butildimetiletere, in presenza di un agente acilante quale un estere attivato del tipo vinilestere o trifluoroetilestere C1-C8, preferibilmente trifluoroetilacetato oppure vinilacetato. Tale reazione di esterificazione viene condotta utilizzando un rapporto relativo tra mg ascomicina ed unità di CAL B compreso tra 0,1 ed 1, preferibilmente 0,4, sotto agitazione ad una temperatura compresa tra i 15 ed i 50°C, preferibilmente 30°C. Il

rapporto molare relativo tra ascomicina ed estere attivato è compreso tra 1 e 6 preferibilmente 4,5. La concentrazione del substrato alla quale viene realizzata tale reazione di transterificazione è compresa tra 0,01 e 0,1 molare.

b) la reazione di preparazione del 24-*tert*-butildimetilsilil-33-acil derivato di ascomicina viene realizzata in presenza di un agente sililante, quale il *tert*-butildimetilsilil cloruro od il *tert*-butildimetilsililtriflato, utilizzato in un rapporto molare relativo compreso tra 1/2 ed 1/7, preferibilmente 1/5, in presenza di una base organica, quale ad esempio imidazolo, piridina o 2,6-lutidina, preferibilmente 2,6-lutidina. Il rapporto molare relativo tra agente sililante e base organica è compreso tra 1/1 ed 1/4 preferibilmente 1/3. La reazione viene condotta in un solvente organico aprotico, quali ad esempio diclorometano od il tetraidrofurano, operando nell'intervallo di concentrazione 0,02-0,15 molare, preferibilmente 0,04 molare, ad una temperatura compresa tra 0° C e 40° C, preferibilmente 25° C.

c) la reazione enzimatica di preparazione del 24-*tert*-butildimetilsilil-33-OH di ascomicina (intermedio 24-silile-33-OH; composto III dello schema 2), ovvero la reazione di alcolisi in posizione 33, viene condotta in modo caratteristico utilizzando come enzima la lipasi da *Candida antartica* (CAL B, E.C.3.1.1.3). Il solvente organico utilizzato è selezionato tra i solventi aprotici con un log P superiore a 0,5 quali ad esempio *tert*-butilmetilil-etero, diclorometano o toluene, preferibilmente *tert*-butilmetilil-etero, in presenza di un alcool primario alifatico C1-C8, preferibilmente il n-ottan-1-olo. Tale reazione di alcolisi viene condotta utilizzando un rapporto relativo tra mg di

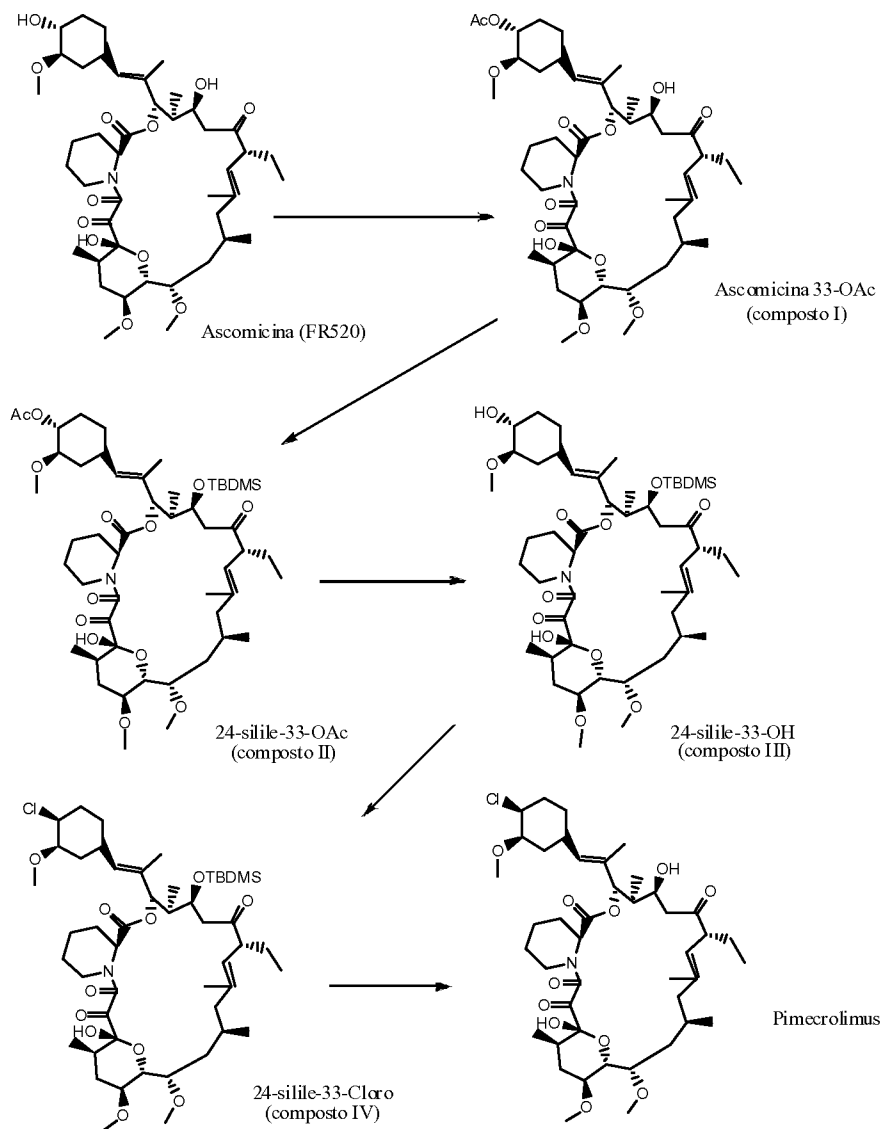
24-*tert*-butildimetilsilietere-33-acetil derivato di ascomicina ed unità di CAL B compreso tra 0,1 e 0,5, preferibilmente 0,25, operando sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 15° C e 60° C, preferibilmente 40° C. Il rapporto molare relativo tra substrato ed alcool primario alifatico è compreso tra 0,1 e 0,4, preferibilmente 0,2. La reazione viene condotta alla concentrazione del substrato compreso tra 0,01 e 0,1 molare, preferibilmente 0,02 molare.

d) la preparazione del 24- *tert*-butildimetilsilietere-33-epicloro ascomicina (intermedio 24-silile-33-Cloro; composto IV dello schema 2) viene condotta in modo caratteristico utilizzando come reagenti diclorotrifenilfosforano o N-clorosuccinimide; il reagente viene utilizzato in un rapporto molecolare relativo con il substrato compreso tra 1,2 e 1,8, preferibilmente 1,6, in un solvente aprotico quali ad esempio toluene, n-esano o diclorometano, preferibilmente toluene. Si opera ad una concentrazione del substrato compresa tra 0,05 e 0,1 molare, preferibilmente 0,07 molare, nell'intervallo di temperatura compreso tra 25° C e 80° C, preferibilmente a 60° C.

e) la rimozione del *tert*-butilsilietere in posizione 24 per ottenere il pimecrolimus viene effettuata mediante catalisi acida che può essere realizzata utilizzando acidi inorganici monoprotici quali l'acido fluoridrico o l'acido cloridrico od acidi organici quali l'acido p-toluensolfonico monoidrato o l'acido metansolfonico, preferibilmente l'acido p-toluensolfonico monoidrato, utilizzando un rapporto molare tra substrato ed acido compreso tra 1:0,3 e 1:1, preferibilmente 1:0,4, operando in un intervallo di temperatura compreso tra i 15 ed i 40 °C, preferibilmente 25°

C, per un tempo di reazione compreso tra le 24 e le 72 ore. Tale reazione viene condotta operando ad una concentrazione molare del substrato compresa tra lo 0,05 e lo 0,2 M, preferibilmente alla concentrazione 0,12 M, utilizzando come solvente di reazione miscele di solventi aprotici e protici utilizzati in un rapporto volumetrico relativo compreso tra 2/8 e 8/2. Esempi di solventi aprotici utilizzabili in tale stadio sono il diclorometano ed idrocarburi o miscela di idrocarburi C5-C7 lineari o ramificati, preferibilmente il diclorometano. Esempi di solventi protici utilizzabili in questo stadio sono gli alcoli C1-C4 lineari o ramificati, preferibilmente il metanolo.

Una sintesi preferita secondo il metodo sopra descritto, è schematizzata nel seguente schema 2:



Schema 2: sintesi del pimecrolimus per transesterificazione enzimatica dell'ascomicina.

Sul prodotto di partenza, ovvero l'ascomicina, viene condotta una transesterificazione irreversibile catalizzata dalle lipasi da *Candida antarctica* (CAL B) utilizzando vinilacetato come agente acilante e *tert*-butildimetil etero (TBDME) come solvente. In questo modo si ottiene l'acetilazione selettiva della posizione 33 dell'ascomicina in modo quantitativo in 80 ore.

Il prodotto di reazione ottenuto (intermedio ascomicina 33-OAc; composto I dello schema 2), senza alcuna purificazione, è stato convertito nel corrispondente 24-*tert*-butildimetilsililetere (intermedio 24-silile-33-OAc; composto II dello schema 2) con *tert*-butildimetilsililtriflato in diclorometano e 2,6-lutidina in 0,5 ore, con una resa del 75%.

Dopo purificazione cromatografica su gel di silice, l'acetato in posizione 33 dell'intermedio 24-silile-33-OAc è stato rimosso, sempre ad opera della CAL B in condizioni di alcolisi, ovvero utilizzando ottan-1-olo in *tert*-butildimetiletere fornendo il derivato 24-sililetere dell'ascomicina (composto III dello schema 2) con rese comprese tra l'80 ed il 100%.

Questo intermedio è stato convertito nel prodotto finale sostituendo l'ossidrile in 33 con un atomo di cloro, tramite la reazione con diclorotrifenilfosforano. Dopo purificazione cromatografica si è ottenuto l'intermedio 24-silile-33-cloro (composto IV dello schema 2).

Infine la rimozione del sililetere in posizione 24 utilizzando acido *p*-toluenosolfonico monoidrato in diclorometano/metanolo permette di ottenere il pimecrolimus a partire da ascomicina con rese globali di circa il 30%.

Si osserva quindi una resa più alta rispetto alle sintesi del pimecrolimus descritte in precedenza.

Il composto 24-silile-33-OAc (composto II dello schema 2), ovvero il composto 24-*tert*-butildimetilsilil-33-acetilascomicina è un composto che non è mai stato descritto in letteratura ed è stato sintetizzato e caratterizzato per la prima volta nella presente invenzione.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione è quindi rappresentato dal composto 24-*tert*-butildimetilsilil-33-acetilascomicina, ottenuto come

intermedio nel processo di sintesi enzimatica del pimecrolimus.

Oggetto della presente invenzione è anche l'uso come intermedio nella sintesi del pimecrolimus del composto 24-*tert*-butildimetilsilil-33-acetilascomicina.

Un altro oggetto della presente invenzione è un metodo per la sintesi del pimecrolimus, che comprende i seguenti stadi: a') preparazione dell'ascomicina acetilata alle posizioni 24 e 33; b') rimozione enzimatica (alcolisi) dell'acile in posizione 33 per ottenere ascomicina monoacetilata alla posizione 24; c') sostituzione dell'ossidrile in 33 dell'ascomicina con un atomo di cloro per ottenere il composto 24-acetato-33-epicloro ascomicina; d') rimozione dell'acetato in posizione 24.

In particolare, gli stadi sopra indicati vengono effettuati nel modo seguente:

a') la preparazione dell'ascomicina 24,33-diacetato (intermedio 24,33 diacetato; composto V dello schema 3) viene realizzata in modo caratteristico utilizzando come agenti acilanti acetil cloruro o anidride acetica, in un rapporto molare relativo con il substrato compreso tra 3 e 6, preferibilmente 4,5, in presenza di N,N-dimetilamminopiridina (DMAP), che viene utilizzata in un rapporto relativo con l'agente acilante compreso tra 1,0 e 1,2, preferibilmente 1,0. La reazione viene condotta utilizzando come solvente una base organica quale la piridina o la trietilammina, preferibilmente la piridina, operando alla concentrazione del substrato compreso tra 0,08-0,5 molare, preferibilmente 0,1 molare. La temperatura di questa reazione può essere compresa tra  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ , preferibilmente alla temperatura di  $0^{\circ}\text{C}$ .

b') la reazione enzimatica (alcolisi) di preparazione della 24-

acetilascomicina (intermedio 24-acetato-33-OH; composto VI dello schema 3) a partire da ascomicina 24,33-diacetato (intermedio 24,33-diacetato), viene condotta in modo caratteristico utilizzando come enzima la lipasi da *Candida antarctica* (CAL B, (E.C.3.1.1.3.)) in opportuno solvente organico selezionato tra i solventi aprotici con un log P superiore a 0,5, quali ad esempio *tert*-butilmetil etero, il diclorometano od il toluene, preferibilmente il *tert*-butilmetil etero, in presenza di un alcool primario alifatico C1-C8, preferibilmente il n-ottan-1-olo. Tale reazione viene condotta utilizzando un rapporto relativo tra mg di ascomicina 24,33-diacetato ed unità di CAL B compreso tra 0,1 e 0,5, preferibilmente 0,23, operando sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 15° C e 60° C, preferibilmente 30° C. Il rapporto molare relativo tra alcool primario alifatico e substrato è compreso tra 0,2 e 0,8, preferibilmente 0,5. La reazione viene condotta alla concentrazione del substrato compreso tra 0,01 e 0,1 molare, preferibilmente 0,02 molare.

c') la preparazione della 24-acetil-33-epicloro ascomicina (intermedio 24-acetato-33-cloro; composto VII dello schema 3) a partire da 24-acetil ascomicina viene realizzata in modo caratteristico utilizzando trifenilfosfina supportata polimericamente, commercialmente disponibile (a titolo circa 3 mmoli di trifenilfosfina per grammo di copolimero di stirene e divinilbenzene), in un rapporto molare (calcolata sul contenuto di trifenilfosfina) compreso tra 2,0 e 3,0 rispetto al substrato, preferibilmente 2,3. La reazione viene condotta in un solvente clorurato C1-C2 quali il solo tetracloruro di carbonio, o l'esacloroetano in presenza di un altro solvente organico aprotico apolare quale ad esempio idrocarburi alifatici C5-C8

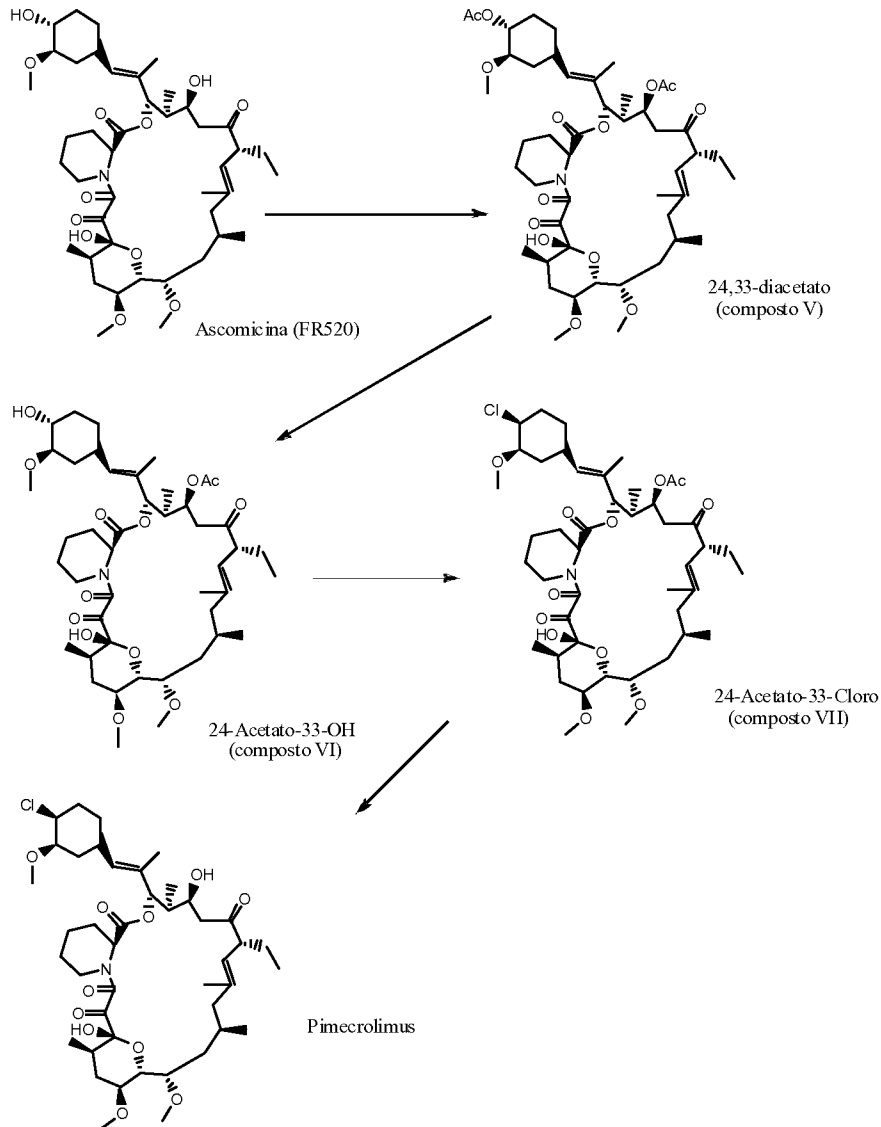
lineari o ramificato od idrocarburi aromatici quali ad esempio il toluene o lo xilene, preferibilmente il tetracloruro di carbonio, operando ad una temperatura compresa tra 60° C e 85° C, preferibilmente 77° C alla concentrazione del substrato compresa tra gli 0,05 e 0,20 molare, preferibilmente 0,1 molare.

d') la rimozione dell'acetato in posizione 24 per ottenere il pimecrolimus viene effettuata utilizzando una catalisi acida operando in un intervallo di temperatura compreso tra i 5 ed i 40°C in un solvente protico polare quale ad esempio alcoli C1-C8 lineari o ramificati, preferibilmente il metanolo, alla concentrazione del substrato compresa tra lo 0,05 e lo 0,2 M. Il catalizzatore acido utilizzabile in questo stadio può essere un acido monoprotico inorganico quale l'acido fluoridrico o l'acido cloridrico od un acido organico quale ad esempio l'acidi p-toluensolfonico monoidrato o l'acido metansolfonico, preferibilmente l'acido cloridrico. Il rapporto molare tra substrato ed acido ottimale in questo stadio è compreso tra 1:5 a 1:20, preferibilmente 1:13.

Vantaggiosamente, l'utilizzo di trifenilfosfina supportata, nella reazione di sostituzione dell'idrossile in posizione 33 con un atomo di cloro dello stadio c'), consente una notevole semplificazione del *workup* di tale stadio di sintesi che di fatto si riduce ad una semplice filtrazione. Un ulteriore vantaggio di tale modifica sintetica è rappresentato dal fatto che la trifenilfosfina supportata ossidata recuperata a fine reazione può essere riutilizzata, previa rigenerazione con triclorosilano (*registry number* 10025-778-2; Regent S.L., Lee D.P. *Journal of Organic Chemistry*, (1975), 40, 1669-1670), nello stesso processo.

La sintesi secondo il metodo sopra descritto, è schematizzata nel seguente

schema 3:



Schema 3. Sintesi del Pimecrolimus per alcolisi catalizzata da enzimi dal 33,24-diacetato di Ascomicina

Una sintesi preferita secondo il metodo sopra descritto, prevede la reazione dell'ascomicina con anidride acetica e dimetilamminopiridina (DMAP) in piridina a 0° C. In 1 ora è stato preparato il 24, 33-diacetato derivato (composto V dello schema 3; 95% di resa).

E' stato sorprendentemente trovato che, anche su questo substrato, la lipasi da *Candida antarctica* (CAL B; E.C.3.1.1.3), operando in condizioni di alcolisi, è in grado di portare chemoselettivamente al corrispondente 24-monoacetato dell'ascomicina (composto VI dello schema 3).

Così il 24, 33-diacetato (composto V) dell'ascomicina è stato convertito nel 24-monoacetato (24-acetato-33-OH; composto VI) nel corso di una trasformazione catalizzata da CAL B con ottan-1-olo in *tert*-butildimetil etero (TBDME) (100%, in 5 ore)

Il cloro in posizione 33 è stato introdotto per reazione con trifenilfosfina supportata e tetracloruro di carbonio con rese del 40% a dare l'intermedio 24-acetato-33-cloro (composto VII dello schema 3).

L'utilizzo della trifenilfosfina supportata in questo stadio di sintesi come alternativa all'utilizzo della trifenilfosfina, già descritta in letteratura, per introdurre il cloro sull'ascomicina protetta sull'idrossile in posizione 24, ha consentito, a parità di rese di conversione, di semplificare notevolmente il *workup* di reazione che, nel caso delle trifenilfosfina supportata, viene realizzato per semplice filtrazione della miscela di reazione ed evaporazione del filtrato sotto vuoto.

Tale reattivo presenta inoltre il vantaggio di poter essere riutilizzato, previa rigenerazione con triclorosilano, nello stesso processo.

La rimozione dell'acetato in posizione 24 con 3N HCl in metanolo a temperatura ambiente (rese del 40%) ha fornito il pimecrolimus con caratteristiche identiche ad un campione di riferimento e rese globali del 13% (Schema 3). Gli intermedi di processo ascomicina 24,33-diacetato (composto V), ascomicina 24-monoacetato (composto VI) e ascomicina 24-

acetato-33-epiclolo (composto VII) non sono descritti in letteratura e sono stati sintetizzati e caratterizzati per la prima volta nella presente invenzione. Un ulteriore aspetto della presente invenzione è quindi rappresentato dai composti ascomicina 24,33-diacetato, ascomicina 24-monoacetato e ascomicina 24-acetato-33-cloro, ottenuti come intermedi nel processo di sintesi enzimatica del pimecrolimus.

Oggetti della presente invenzione sono anche gli usi come intermedi nella sintesi del pimecrolimus dei composti ascomicina 24,33-diacetato, ascomicina 24-monoacetato e ascomicina 24-acetato-33-cloro.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione, senza in alcun modo limitarla.

#### ESEMPI

##### Materiali e metodi

Nei seguenti esempi, le analisi  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) sono state registrate in deuterocloroformio su apparecchiatura Bruker AM500; i valori riportati degli spettri sono in ppm ( $\delta$ ) e si riferiscono ai picchi diagnostici dell'isomero principale.

Le analisi IR sono state registrate su apparecchiatura Perkin Elmer FT IR (Mod. Spectrum One) equipaggiato con ATR. Le analisi polarimetriche sono state effettuate su apparecchiatura Perkin Elmer (Mod.343). Gli spettri di massa sono stati registrati su apparecchiatura Finnigan LCQ Deca Thermoquest spectrometer (Ion trap; ESI positiva) utilizzando la tecnica di infusione diretta.

I valori calorimetrici differenziali (DSC) riportati sono stati registrati su apparecchiatura Perkin Elmer (Mod. DSC7) alla velocità di riscaldamento di  $5^\circ \text{C/min}$ . Le lipasi da *Candida antarctica* (CAL B 2 U/mg; E.C.3.1.1.3),

da *Candida cylindracea* (CCL 15-25 U/mg; E.C.3.1.1.3), da pancreas porcino (PPL  $\geq 200$  U/mg; E.C.3.1.13), da *Pseudomonas cepacia* (PFL 50 U/mg; E.C.3.1.13) e la trifenilfosfina supportata (circa 3,2 mmoli/g di trifenilfosfina) sono state acquistati dalla Fluka. L'ascomicina utilizzata come reattivo iniziale della sintesi è stata preparata dalla Poli Industria Chimica SpA, Quinto de Stampi, Rozzano (MI), Italy.

### Esempio 1

#### Preparazione del 33-acetil derivato di ascomicina (composto I dello schema II)

Ad una soluzione di ascomicina (100 mg; 0,126 mmol) in toluene (8 ml) e acetato di vinile (4,5 eq; 0,473 g) viene aggiunta lipasi da *Candida antarctica* (CAL B, Novozym 435) [0,140 g (2 U/mg) FLUKA]. Si mantiene la reazione sotto agitazione alla temperatura di 30° C per 80 h quindi l'enzima viene allontanato per filtrazione ed il filtrato concentrato a pressione ridotta a dare 105 mg di 33-acetil ascomicina.

Un campione di tale intermedio è stato purificato per scopi analitici per cromatografia su gel di silice (n-esano/acetone = 8/2 v/v come eluenti) e quindi cristallizzato da acetone/acqua.

Su tale campione sono state effettuato le seguenti analisi:  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz)  $\delta$ : 2,10 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 3,92 e 4,70 (24CH e 33CH); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3484.245, 2935.287, 1735.331, 1649.741, 1450.039, 1372.278; DSC: endoterma a 134,25° C;  $[\alpha]_{\text{D}} = -74,0^\circ$  (c=0,5  $\text{CHCl}_3$ ).

Spettro di MS (ESI +): m/z: 856,4 (M+23; 100,0%)

Analisi elementare calcolata per  $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{NO}_{13}$ : C 64,80%; H, 8,58%; N, 1,68%; O, 24,94%

Analisi elementare trovata: C 64,78%; H, 8,54%; N, 1,59%; O, 24,89%

Preparazione del 24-*tert*-butildimetilsililacetil derivato di ascomicina (intermedio 24-silile-33-Oac; composto II dello schema 2)

Ad una soluzione di 33-acetilderivato di ascomicina (150 mg; 0,18 mmoli) in diclorometano (5ml) si aggiungono 2,6-lutidina (0,290g; 2,7 mmoli) e *tert*-butildimetilsililtriflato (0,238g; 0,9 mmoli). Si lascia la reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo questo periodo la miscela di reazione viene lavata con una soluzione satura di bicarbonato di sodio (5 ml) e la fase organica ottenuta viene lavata in sequenza con HCl 0,1N (5 ml per 3 volte) e con una soluzione al 30% di NaCl (5ml). La fase organica viene anidrificata su solfato di sodio, filtrata e concentrata sotto vuoto a residuo a dare 128 mg di prodotto.

Spettro di MS (ESI +): m/z: 970,5 (M+23; 100,0%)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz)  $\delta$ : 0,05 e 0,06 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0,90 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-Si), 2,10 (CH<sub>3</sub>CO), 4,70 (33CH)

IR (cm<sup>-1</sup>): 3462.948, 2934.450, 1739.236, 1649.937

Analisi elementare calcolata per C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>13</sub>Si: C 64,59%; H, 9,03%; N, 1,48%; O, 21,93%

Analisi elementare trovata: C 64,50%; H, 9,05%; N, 1,41%; O, 21,88%

DSC= endoderma a 236,43° C.  $[\alpha]_D = -81,4^\circ$  (c=0,5 CHCl<sub>3</sub>).

Preparazione del 24-*tert*-butildimetilsililacetil derivato di ascomicina (intermedio 24-silile-33-OH; composto III dello schema 2)

Ad una soluzione di 24-*tert*-butildimetilsililacetil derivato di ascomicina (50 mg; 0,053 mmoli) in *tert*-butilmetilacetil (4 ml) si aggiungono n-ottan-1-olo (0,035g; 0,265 mmoli) e CAL B (Novozym 435)

[0,100 g (2 U/mg) FLUKA]. Si mantiene la reazione sotto agitazione alla temperatura di 40° C per 120 ore. Dopo questo periodo la miscela di reazione viene filtrata ed il filtrato viene evaporato sotto vuoto a residuo a dare un grezzo di reazione che viene purificato per cromatografia su gel di silice: per eluizione con etere di petrolio/acetone 7/3 si recuperano 44 mg di prodotto (0,048 mmoli).

Le proprietà chimico fisiche del prodotto ottenuto sono in accordo con quelle di un campione di riferimento ottenuto seguendo il brevetto EP427680.

Preparazione del 24-*tert*-butildimetilsilil-etere-33-epicloro ascomicina (intermedio 24-silile-33-cloro; composto IV dello schema 2)

Ad una sospensione di diclorotrifenilfosforano (99,95g) in toluene anidro (1,1 litri), sotto agitazione a temperatura ambiente (20-25°C) in atmosfera inerte, viene aggiunta una soluzione di 24-silile FR520, ovvero 24-silile ascomicina (165 g; 0,18 moli) in toluene anidro (1,4 litri) e piridina (50 ml). Terminata l'aggiunta la miscela di reazione viene riscaldata alla temperatura di 60° C per 1 ora.

Dopo questo periodo si porta la temperatura della miscela di reazione a 25° C e quindi si lava la fase organica in sequenza con acqua (1 volta con 1 L) e con una soluzione acquosa di NaCl al 10% (4 volte con 1 L ogni volta), quindi viene anidrificata su solfato di sodio, filtrata e concentrata sotto vuoto a dare circa 250 g di un solido umido di toluene. Tale residuo viene ripreso con n-esano (500 ml) e quindi evaporato a secchezza (al fine di rimuovere il toluene presente). Il residuo viene stemperato in n-esano (500 ml) sotto agitazione a temperatura ambiente per circa 45 minuti e quindi il

solido indisciolti allontanato per filtrazione su buckner (è il sottoprodotto del diclorofosforano).

Il filtrato viene concentrato a pressione ridotta a dare 148,6 g di un solido che viene successivamente purificato per cromatografia su gel di silice (eluizione con n-eptano/acetone = 9/1) a dare 123 g (0,13 moli) di prodotto.

Le proprietà chimico fisiche del prodotto ottenuto sono in accordo con quelle descritte in letteratura (EP427680).

#### Preparazione del pimecrolimus da 24-*tert*-butildimetilsililetere-33-epicloro ascomicina

L'intermedio 24-silile-33 cloro (123g; 0,13 Moli; composto IV dello schema 2) viene sciolto sotto agitazione a temperatura ambiente in una miscela diclorometano/metanolo=1/1=v/v (1,1 litri) quindi viene aggiunto acido p-toluensolfonico monoidrato (10,11 g).

La reazione si mantiene sotto agitazione alla temperatura di 20-25° C per 72 ore, quindi alla miscela di reazione viene aggiunta una soluzione di acqua (600 ml) e bicarbonato di sodio (4,46 g). La miscela di reazione viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti, la fase organica quindi viene separata e lavata con una soluzione acquosa al 10% di cloruro di sodio (600 ml).

La fase organica viene anidrificata su solfato di sodio, filtrata e concentrata sotto vuoto a dare 119 g di pimecrolimus grezzo. Tale grezzo viene purificato per cromatografia su gel di silice (n-esano/acetone come eluenti) e quindi cristallizzato da acetato di etile, cicloesano/acqua a dare 66 g (81,5 mmoli) di pimecrolimus purificato.

I dati chimico fisici ottenuti sono in accordo con i dati riportati in

letteratura.

### Esempio 2

#### Preparazione dell'ascomicina 24,33-diacetato (intermedio 24, 33-diacetato; composto V dello schema 3)

Ad una soluzione di ascomicina (200 mg; 0,25 mmoli) in piridina (2,5 ml), sotto agitazione alla temperatura di 0° C, vengono aggiunti DMAP (4,5 eq; 0,136 g) ed anidride acetica (4,5 eq; 0,114 g).

Si mantiene la reazione sotto agitazione per 1,5 ore alla temperatura di 0° C quindi si diluisce con acqua e si estrae con acetato di etile (3 volte con 5 ml). Gli estratti organici vengono lavati con HCl 0,5 N (5 volte con 10 ml), anidrificati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrati sotto vuoto.

Il residuo è stato purificato per cromatografia su gel di silice (n-esano/acetone 8/2 v/v come eluente) a dare ascomicina 24,32-diacetato (210 mg; 0,24 mmoli).

Su tale campione purificato abbiamo effettuato le seguenti analisi:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) δ: 2,02 e 2,06 (2 CH<sub>3</sub>CO), 5,20 e 4,70 (24CH e 33CH);

IR (cm<sup>-1</sup>): 3462.749, 2935.824, 1734.403, 1650.739, 1449.091, 1371.079.

DSC: picco endotermico a 234.10° C ; [α]<sub>D</sub> = -100,0° (C=0,5 CHCl<sub>3</sub>).

Spettro di MS (ESI+): m/z: 898,4 (100,0%; m+23)

Analisi elementare calcolata per C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>14</sub>: C 64,44%; H 8,40%; N 1,60%; O 25,57%

Analisi elementare trovata: 64,55%; H 8,44%; N 1,61%; O 25,40%

#### Preparazione della 24-acetil ascomicina (intermedio 24-acetato-33-OH; composto VI dello schema 3)

Ad una soluzione di ascomicina 33,24-diacetato (500 mg; 0,57 mmol) in TBDME (25 ml) e n-ottan-1-olo (4,5 eq; 0,371 g) viene aggiunta lipasi da *Candida antartica* (CAL B Novozym 435) [1,1 g (2 U/mg) FLUKA]. Si mantiene la reazione sotto agitazione a 30° C per 100 ore, quindi l'enzima viene allontanato per filtrazione ed il filtrato ottenuto concentrato sotto pressione ridotta a dare 425 mg (0,51 mmoli) di prodotto.

Un campione è stato purificato per scopi analitici per cromatografia su gel di silice (n-esano/acetone = 7:3 v/v come eluenti) e quindi cristallizzato da acetone/acqua.

Su tale campione purificato abbiamo effettuato le seguenti analisi: <sup>1</sup>H-NMR (500MHz) δ: 2,05 (CH<sub>3</sub>CO); IR (cm<sup>-1</sup>): 3491.528, 2935.860, 1744.728, 1710.227, 1652.310, 1448.662, 1371.335. DSC: picco endotermico a 134.68° C; [α]<sub>D</sub> = -102.7° (c=0,5 CHCl<sub>3</sub>)

Spettro di MS (ESI +): m/z: 856,4 (M+23; 100,0%)

Analisi elementare calcolata per C<sub>45</sub>H<sub>71</sub>NO<sub>13</sub>: C 64,80%; H, 8,58%; N, 1,68%; O, 24,94%

Analisi elementare trovata: C 64,71%; H, 8,49%; N, 1,60%; O, 24,97%

#### Preparazione della 24-acetil-33epiclolo ascomicina (intermedio 24-Acetano-33-cloro; composto VII dello schema 3)

Ad una soluzione di 24-acetil ascomicina (400 mg; 0,48 mmoli) in tetracloruro di carbonio (5 ml) si aggiunge trifenilfosfina supportata (0,335 g; 1,1 mmoli). Si mantiene la miscela di reazione a riflusso per 3 ore quindi si raffredda a temperatura ambiente. La sospensione ottenuta viene filtrata ed il filtrato viene concentrato sotto vuoto a residuo a dare 0,45g di grezzo di reazione che viene purificato per cromatografia su gel di silice: per

eluizione con etere di petrolio/acetone = 90/10 si ottengono 163mg (0,19 mmoli) di prodotto.

$^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 2,08 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 4,60 (33CH); IR ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3464.941, 2934.360, 1738.993, 1650.366, 1450.424, 1371.557; DSC: picco endotermico a 231.67° C

$[\alpha]_{\text{D}} = -75.2^\circ$  ( $c=0,5$   $\text{CHCl}_3$ )

Spettro di MS (ESI +): m/z: 874,3 (M+23; 100,0%)

Analisi elementare calcolata per  $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{ClNO}_{12}$ : C 63,40%; H, 8,28%; Cl, 4,16%; N, 1,64%; O, 22,52%

Analisi elementare trovata: C 63,31%; H, 8,30%; Cl, 4,05%; N, 1,58%; O, 22,42%.

#### Preparazione di pimecrolimus da 24-acetil-33-epicloro ascomicina

Una soluzione di 24-acetil-33-epicloro ascomicina (200 mg; 0,23 mmoli; composto VII) in metanolo (2 ml) e HCl 3N (1 ml) viene posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 40 ore. Dopo questo periodo la reazione viene neutralizzata con una soluzione acquosa di bicarbonato, il metanolo evaporato sotto vuoto. La miscela acquosa viene estratta con diclorometano (3 volte con 5 ml), anidrificata su solfato di sodio, filtrata e concentrata a residuo a dare un residuo che viene purificato per cromatografia su gel di silice (n-esano/acetone come eluenti) e quindi cristallizzato da acetato di etile, cicloesano/acqua a dare 78 mg di pimecrolimus purificato (0,096 mmoli).

Le caratteristiche chimico fisiche del prodotto ottenuto sono in accordo con i dati riportati in letteratura per il pimecrolimus.

#### Esempio 3

Screening di lipasi: transesterificazione su ascomicina ed alcolisi su ascomicina 33,24-diacetato (composto V dello schema 3)

La regioselettività delle reazioni enzimatiche è stata determinata attraverso l'utilizzo dell'analisi  $^1\text{H-NMR}$ . Il 24,33-diacetato dell'ascomicina (composto V) e il 24-e33-monoacetati (rispettivamente composti VI dello schema 3 e I dello schema 2) non sono caratterizzati in letteratura. L'unico estere dell'ascomicina descritto è il 24,33-diformiato: per questo composto i protoni in posizione 24 e 33 danno due segnali diagnostici rispettivamente a 5,22 e 4,71 ppm.

Nello spettro del 33-monoacetato (composto I) sono presenti due picchi a 3,92 e 4,70 ppm compatibili con la struttura proposta.

Nello spettro del 24,33-diacetato (composto V) dell'ascomicina tali protoni cadono a 5,20 e 4,70 ppm.

Nello spettro del 24-acetato (composto VI) si nota che è modificata la zona tra 5,0 e 5,4 ppm ed assente il picco a 4,7 ppm.

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riassunti i dati sperimentali relativi alle reazioni enzimatiche condotte su ascomicina ed ascomicina 33,24-diacetato (composto V) in esterificazione (transesterificazione), idrolisi ed alcolisi.

Tabella 1: Esterificazione enzimatica di ascomicina

<b>Lipasi</b>	<b>Solvente</b>	<b>Estere attivato</b>	<b>Tempo (ore)</b>	<b>Conversione % (prodotto ottenuto)</b>
PFL	Cloroformio	Vinilacetato	100	0
PPL	Toluene	Vinilacetato	94	0
CCL	Toluene	Vinilacetato	92	0

CAL B	Acetonitrile	Vinilacetato	53	30 (33-OAc; composto I)
CAL B	Toluene	Vinilacetato	80	100 (33-OAc; composto I)

PFL: lipasi da *Pseudomonas cepacia* (PFL, E.C.3.1.13)

PPL: lipasi da pancreas porcino (PPL; E.C.3.1.13)

CCL: lipasi da *Candida cylindracea* (CCL, E.C.3.1.1.3)

CAL B: lipasi da *Candida antarctica* (CAL B; E.C.3.1.1.3)

Tabella 2: Alcolisi ed idrolisi di ascomicina 33,24-diacetato (composto V dello schema 3)

<b>Lipasi</b>	<b>Solvente</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tempo (ore)</b>	<b>Conversione % (prodotto ottenuto)</b>
CAL B	Toluene	Acqua	80	0
CAL B	Toluene	Metanolo	48	0
CAL B	Toluene	n-butano	100	0
CAL B	Toluene	n-ottan-1- olo	120	30 (24-OAc; composto VI)
CAL B	<i>tert</i> - butilmetiletere	n-ottan-1- olo	100	100 (24-OAc; composto VI)

p. Il Mandatario

D.ssa Claudia Finetti

della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No: 1211)

## RIVENDICAZIONI

- 1) Processo per la preparazione del pimecrolimus, caratterizzato dal fatto di comprendere uno stadio enzimatico di acilazione e/o alcolisi con lipasi da *Candida antarctica*.
- 2) Processo secondo la rivendicazione 1, dove la lipasi da *Candida antarctica* è CAL B (E.C.3.1.1.3.).
- 3) Processo secondo la rivendicazione 1, comprendente i seguenti stadi:
  - a) acilazione enzimatica selettiva dell'ossidrile in posizione 33 dell'ascomicina con lipasi da *Candida antarctica*, in presenza di un agente acilante e di un solvente organico;
  - b) conversione del derivato 33-acilato così ottenuto nel corrispondente 24-*tert*-butildimetilsililetere, con un agente sililante in presenza di una base organica;
  - c) rimozione enzimatica con lipasi da *Candida antarctica* dell'acile in posizione 33 del composto preparato nello stadio b), in presenza di un solvente organico e di un alcol primario alifatico C1-C8, ottenendo il 24-*tert*-butildimetilsililetere dell'ascomicina.
- 4) Processo secondo la rivendicazione 3, dove l'agente acilante dello stadio a) è scelto tra un vinilestere o un trifluoroetilestere C1-C8, preferibilmente vinilacetato o trifluoroetilacetato.
- 5) Processo secondo la rivendicazione 3, dove il solvente organico degli stadi a) e c) è un solvente organico aprotico con un coefficiente di partizione superiore a 0,5, preferibilmente toluene, n-esano, n-eptano, diclorometano, cloroformio o *tert*-butildimetiletere nello stadio a) e, preferibilmente *tert*-butildimetiletere, diclorometano o toluene, ancora più

preferibilmente *tert*-butildimetiletere, nello stadio c).

6) Processo secondo la rivendicazione 3, dove l'agente sililante dello stadio b) è *tert*-butildimetilsilil cloruro o *tert*-butildimetilsililtriflato.

7) Processo secondo la rivendicazione 3, dove la base organica dello stadio b) è imidazolo, piridina o 2,6-lutidina, preferibilmente 2,6-lutidina.

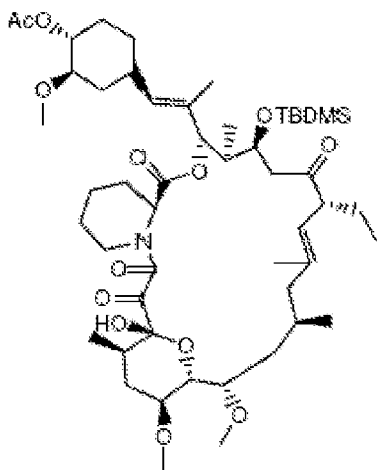
8) Processo secondo la rivendicazione 3, dove l'alcool primario alifatico dello stadio c) è n-ottan-1-olo.

9) Processo secondo la rivendicazione 3, comprendente la sostituzione dell'ossidrilico in 33 del 24-*tert*-butildimetilsililetere dell'ascomicina con un atomo di cloro, ottenendo il derivato 24-*tert*-butildimetilsilil-33-epicloro ascomicina, e la successiva rimozione del *tert*-butildimetilsililetere in posizione 24.

10) Processo secondo la rivendicazione 9, dove la sostituzione dell'ossidrilico in 33 del 24-*tert*-butildimetilsililetere dell'ascomicina con un atomo di cloro viene effettuata utilizzando diclorotriphenilfosforano oppure N-clorosuccinimide.

11) Processo secondo la rivendicazione 10, dove la rimozione del *tert*-butildimetilsililetere in posizione 24 viene effettuata con mediante catalisi acida con acidi inorganici monoprotici, preferibilmente acido fluoridrico o acido cloridrico, od acidi organici, preferibilmente acido p-toluensolfonico monoidrato o acido metansolfonico, ancora più preferibilmente acido p-toluensolfonico monoidrato.

12) 24-*tert*-butildimetilsilil-33-acetilascomicina di formula:



Composto II (schema 2)

13) Uso del composto di cui alla rivendicazione 12, come intermedio di reazione nella sintesi del pimecrolimus.

14) Processo secondo la rivendicazione 1, comprendente i seguenti stadi:

a') preparazione dell'ascomicina acetilata alle posizioni 24 e 33, a partire da ascomicina ed un agente acilante in un solvente organico, in presenza di N,N-dimetilamminopiridina;

b') rimozione enzimatica con lipasi da *Candida antarctica* dell'acile in posizione 33 del composto preparato nello stadio a'), in presenza di un solvente organico e di un alcol primario alifatico C1-C8, ottenendo ascomicina monoacetilata alla posizione 24.

15) Processo secondo la rivendicazione 14, dove l'agente acilante dello stadio a') è acetilcloruro oppure anidride acetica.

16) Processo secondo la rivendicazione 14, dove il solvente organico dello stadio a') è una base organica, preferibilmente piridina oppure trietilammina.

17) Processo secondo la rivendicazione 14, dove il solvente organico dello stadio b') è un solvente organico aprotico con un coefficiente di partizione

superiore a 0,5, preferibilmente *tert*-butildimetil etero, diclorometano o toluene, ancora più preferibilmente *tert*-butildimetil etero.

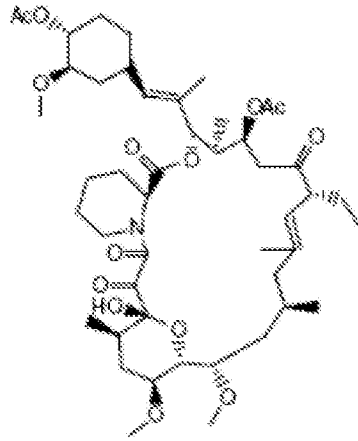
18) Processo secondo la rivendicazione 14, dove l'alcool primario alifatico dello stadio b') è n-ottan-1-olo.

19) Processo secondo la rivendicazione 14, comprendente la sostituzione dell'ossidrilico in 33 dell'ascomicina monoacetilata alla posizione 24 con un atomo di cloro, ottenendo il derivato 24-acetato-33-epicloro ascomicina, e la successiva rimozione dell'acetato in posizione 24.

20) Processo secondo la rivendicazione 19, dove la sostituzione dell'ossidrilico in 33 dell'ascomicina monoacetilata alla posizione 24 con un atomo di cloro viene effettuata utilizzando trifenilfosfina supportata polimericamente, in un solvente clorurato C1-C2, preferibilmente tetracloruro di carbonio, o esacloroetano in presenza di un altro solvente organico aprotico apolare, preferibilmente idrocarburi alifatici C5-C8 lineari o ramificati od idrocarburi aromatici, preferibilmente toluene o xilene.

21) Processo secondo la rivendicazione 19, dove la rimozione dell'acetato in posizione 24 viene effettuata mediante catalisi acida con acidi monoprotici inorganici, preferibilmente acido fluoridrico o acido cloridrico, o acidi organici, preferibilmente acido p-toluensolfonico monoidrato o acido metansolfonico, ancora più preferibilmente acido cloridrico.

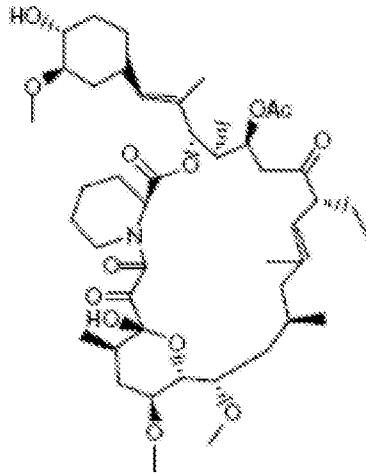
22) Ascomicina 24,33-diacetato di formula:



Composto V (schema 3)

23) Uso del composto di cui alla rivendicazione 22, come intermedio di reazione nella sintesi del pimecrolimus.

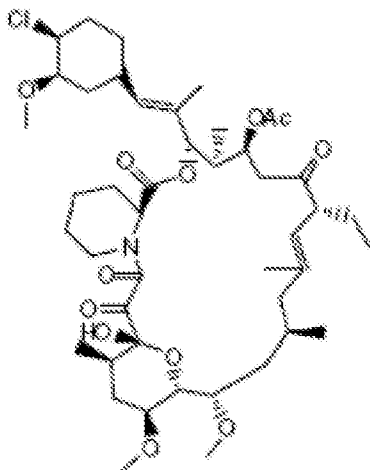
24) Ascomicina 24-monoacetato di formula:



Composto VI (schema 3)

25) Uso del composto di cui alla rivendicazione 24, come intermedio di reazione nella sintesi del pimecrolimus.

26) Ascomicina 24-acetato-33-epiclورو di formula:



Composto VII (schema 3)

27) Uso del composto di cui alla rivendicazione 26, come intermedio di reazione nella sintesi del pimecrolimus.

p. Il Mandatario

D.ssa Claudia Finetti

della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No: 1211)

## CLAIMS

- 1) Process for the preparation of pimecrolimus, characterised in that it comprises an enzymatic acylation and/or alcoholysis step performed with a lipase from *Candida antarctica*.
- 2) Process according to claim 1, wherein the lipase from *Candida antarctica* is CAL B (E.C.3.1.1.3.).
- 3) Process according to claim 1, comprising the following steps:
  - a) selective enzymatic acylation of the hydroxyl in the position 33 of ascomycin with a lipase from *Candida antarctica*, in the presence of an acylating agent and of an organic solvent;
  - b) conversion of the 33-acylated derivative so obtained into the corresponding 24-*tert*-butyldimethylsilyl ether, with a silylating agent in the presence of an organic base;
  - c) enzymatic removal with lipase from *Candida antarctica* of the acyl in the position 33 of the compound prepared in step b), in the presence of an organic solvent and of a primary aliphatic alcohol C1-C8, obtaining 24-*tert*-butyldimethylsilyl ether ascomycin.
- 4) Process according to claim 3, wherein the acylating agent of step a) is selected between a vinyl ester or trifluoroethyl ester C1-C8, preferably vinyl acetate or trifluoroethyl acetate.
- 5) Process according to claim 3, wherein the organic solvent of steps a) and c) is an aprotic organic solvent with a partition coefficient higher than 0,5, preferably toluen, n-hexane, n-heptane, dichloromethane, chloroform or *tert*-butyldimethyl ether in the step a) and, preferably *tert*-butyl dimethyl ether, dichloromethane or toluen, more preferably *tert*-butyl dimethyl ether,

in the step c).

6) Process according to claim 3, wherein the silylating agent of step b) is *tert*-butyldimethylsilyl chloride or *tert*-butyldimethylsilyltriflate.

7) Process according to claim 3, wherein the organic base of step b) is imidazole, pyridine or 2,6-lutidine, preferably 2,6-lutidine.

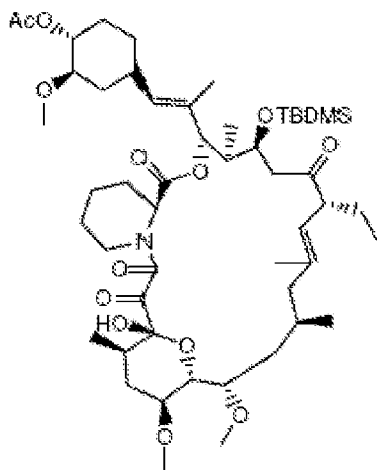
8) Process according to claim 3, wherein the primary aliphatic alcohol of step c) is n-octan-1-ol.

9) Process according to claim 3, comprising the substitution of hydroxyl in 33 of 24-*tert*-butyldimethylsilyl ether ascomycin with a chlorine atom, obtaining the derivative 24-*tert*-butyldimethylsilyl-33-epichloro ascomycin, and the subsequent removal of the *tert*-butyldimethylsilyl ether in position 24.

10) Process according to claim 9, wherein the substitution of hydroxyl in 33 del 24-*tert*-butyldimethylsilyl ether of ascomycin with a chlorine atom is performed with dichloro triphenylphosphorane or N-chlorosuccinimide.

11) Process according to claim 10, wherein the removal of *tert*-butyldimethylsilyl ether in position 24 is performed with acidic catalysis performed with inorganic monoprotic acids, preferably fluoridric acid or hydrochloridric acid, or organic acids, preferably p-toluenesulfonic acid monohydrate or methanesulfonic acid, more preferably p-toluenesulfonic acid monohydrate.

12) 24-*tert*-butyldimethylsilyl-33-acetylascomycin of formula:



Compound II (scheme 2)

13) Use of the compound of claims 12, as reaction intermediate in the synthesis of pimecrolimus.

14) Process according to claim 1, comprising the following steps:

a') preparation of ascomycin acetylated in the position 24 and 33, starting from ascomycin and an acylating agent in an un organic solvent, in the presence of N,N-dimethylamino pyridine;

b') enzymatic removal with lipase from *Candida antarctica* of the acyl in the position 33 of the compound prepared in step a'), in the presence of an organic solvent and of a primary aliphatic alcohol C1-C8, obtaining ascomycin monoacetylated at the position 24.

15) Process according to claim 14, wherein the acylating agent of the step a') is acetyl chloride or acetic anhydride.

16) Process according to claim 14, wherein the organic solvent of the step a') is an organic base, preferably pyridine or triethylamine.

17) Process according to claim 14, wherein the organic solvent of the step b') is an aprotic organic solvent with a partition coefficient higher than 0,5, preferably *tert*-butyl dimethyl ether, dichloromethane or toluene, more

preferably *tert*-butyl dimethyl ether.

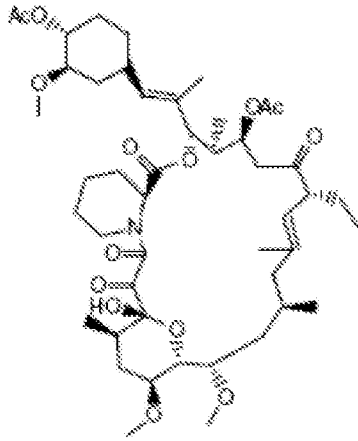
18) Process according to claim 14, the primary aliphatic alcohol of step b') is n-octan-1-ol.

19) Process according to claim 14, comprising the substitution of hydroxyl in 33 of ascomycin monoacetylated in the position 24 with a chlorine atom, obtaining the derivative 24-acetate-33-epichloro ascomycin, and the subsequent removal of the acetate in the position 24.

20) Process according to claim 19, wherein the substitution of hydroxyl in 33 of ascomycin monoacetylated in the position 24 with a chlorine atom is performed using triphenylphosphine polymer bound, in chlorinated solvent C1-C2, preferably carbon tetrachloride or hexachloroethane in the presence of another aprotic apolar organic solvent, preferably linear or branched aliphatic hydrocarbons C5-C8 or aromatic hydrocarbons, preferably toluene or xylene.

21) Process according to claim 19, wherein removal of the acetate in the position 24 is performed with acidic catalysis performed with inorganic monoprotic acids, preferably fluoridric acid or hydrochloridric acid, or organic acids, preferably p-toluenesulfonic acid monohydrate or methanesulfonic acid, more preferably hydrochloridric acid.

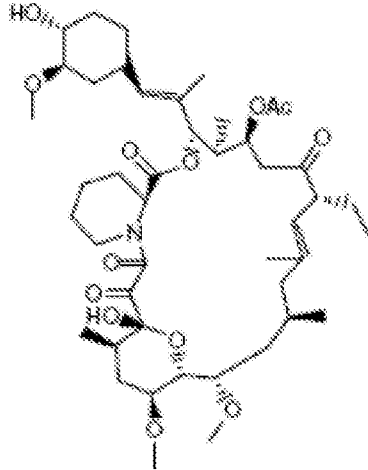
22) Ascomycin 24,33-diacetate of formula:



Compound V (scheme 3)

23) Use of the compound of claims 22, as reaction intermediate in the synthesis of pimecrolimus.

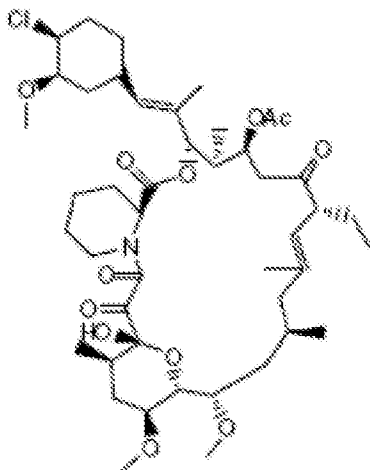
24) Ascomycin 24-monoacetate of formula:



Compound VI (scheme 3)

25) Use of the compound of claims 24, as reaction intermediate in the synthesis of pimecrolimus.

26) Ascomycin 24-acetate-33-epichloro of formula:



Compound VII (scheme 3)

27) Use of the compound of claims 26, as reaction intermediate in the synthesis of pimecrolimus.

p. Il Mandatario

D.ssa Claudia Finetti

della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No: 1211)