奈玛特韦手性中间体的合成工艺改进

董明明[1,2]，汤佳伟[2]，陈少欣[2]，张福利[2]，王建博[3*]，余 俊[2*]
（1. 上海工程技术大学化学化工学院，上海 201620；2. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院有限公司，上海 201203；
3. 国药控股有限公司，北京 100077）

摘要：文章对合成奈玛特韦的手性中间体（1*R*,2*S*,5*S*）-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2- 羧酸甲酯（**1**）盐酸盐的合成工艺进行了改进。以 6,6- 二甲基 -3- 氧杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（**2**）为起始原料，与脲发生氨化反应生成 6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（**9**）。**9** 经过还原反应制得 6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷（**5**），**5** 经过含有单胺氧化酶 AtMAON-M12 的工程菌催化氧化，立体选择性地生成（1*R*,5*S*）-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烯（**6**），**6** 再经加成、氰化、Pinner 反应后成盐制得 **1** 盐酸盐，纯度 99.9%，*ee* 值大于 99.9%，总收率达 60.5%。利用单胺氧化酶 AtMAON-M12 合成单一构型的化合物 **6**，不需要拆分，符合绿色化学的原子经济性原则。

关键词：奈玛特韦；中间体；单胺氧化酶；工艺改进
中图分类号：R978.7；TQ460.6 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)08-1187-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.006

Improved Synthetic Process of the Chrial Intermediate of Nirmatrelvir

DONG Mingming[1,2], TANG Jiawei[2], CHEN Shaoxin[2], ZHANG Fuli[2], WANG Jianbo[3*], YU Jun[2*]
(*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620;
2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203;
3. Sinopharm Group Co., Ltd., Beijing 100077*)

ABSTRACT: In this paper, the synthesis process of a key chrial intermediate of nirmatrelvir, named methyl (1*R*,2*S*,5*S*)-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylate(**1**) hydrochloride was improved. Compound 6,6-dimethyl-3-oxobicyclo[3.1.0]hexane-2,4-dione(**2**) was used as the starting material to synthesize 6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2,4-dione(**9**) by ammoniation with urea. Compound 6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]-hexane(**5**) was synthesized from **9** by reduction. Compound (1*R*,5*S*)-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexene(**6**) was stereoselectively synthesized from **5** via oxidation by the engineered bacteria containing monoamine oxidase AtMAON-M12. Compound **1** hydrochloride was obtained from **6** with purity of 99.9% and enantiomeric excess up to 99.9% by addition, cyanidation, Pinner reaction and salification, while the total yield reached 60.5%. The single enantiomer **6** was obtained by using monoamine oxidase AtMAON-M12 without resolution, which conformed to the green chemistry principle of atom economy.

Key Words: nirmatrelvir; intermediate; monoamine oxidase; process improvement

奈玛特韦（nirmatrelvir），化学名为（1*R*,2*S*,5*S*）-*N*-［(1*S*)-1- 氰基 -2-［(3*S*)-2- 氧代吡咯烷 -3- 基］乙基］-3-［(2*S*)-3,3- 二甲基 -2-(2,2,2- 三氟乙酰胺基)- 丁酰基］-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2- 甲酰胺，结构式如图 1 所示，于 2021 年 11 月作为帕罗韦德（Paxlovid）的有效成分获美国 FDA 批准，主要用于治疗轻度或中度新型冠状病毒感染[1—2]。

收稿日期：2023-04-05
基金项目：科技部国家重点研发计划“绿色生物制造”项目(2021YFC2102100)
作者简介：董明明(1994—)，男，硕士研究生，专业方向：药物合成工艺。
通信作者：王建博(1990—)，男，执业药师，从事药品质量研究与药事法规研究。
E-mail：15010153039@163.com
余 俊(1987—)，男，博士，从事药物合成工艺开发与研究。
E-mail：yujunsipi@126.com

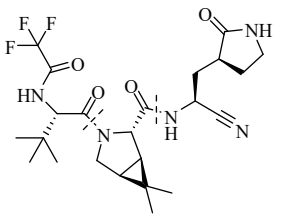


图 1　奈玛特韦的化学结构

Fig.1　Chemical Structure of Nirmatrelvir

（1*R*,2*S*,5*S*）-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2- 羧酸甲酯（**1**）是合成奈玛特韦的关键手性中间体，目前的合成路线主要有 3 条（图 2）。路线①：用 6,6- 二甲基 -3- 氧杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（**2**）与苄胺反应，生成 3- 苄基 -6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（**3**），**3** 经氢化铝锂还原得 3- 苄基 -6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷（**4**），**4** 经钯炭催化氢化生成 6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷（**5**），**5** 发生氧化反应生成一对对映体，即（1*R*,5*S*）-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烯（**6**）和（1*S*,5*R*）- 型的 **6'**，**6** 和 **6'** 与氰化钾反应生成（1*R*,2*S*,5*S*）-2- 氰基 -6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷（**7**）和（1*S*,2*R*,5*R*）- 型的 **7'**，**7** 和 **7'** 与氯化氢甲醇溶液反应，生成 **1** 和（1*S*,2*R*,5*R*）- 型的 **1'**，**1** 和 **1'** 经 D-（+）- 对甲基二苯甲酰酒石酸（D-DTTA）拆分后成盐酸盐得 **1** 盐酸盐[3—4]。路线②：用 **2** 与脲反应生成 6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（**9**），**9** 经硼氢化钠 / 碘还原生成 **5**，之后步骤与路线①相同[5]。路线③：用含有单胺氧化酶 MAON401 的工程菌催化 **5**，立体选择性地制备 **6**，**6** 与亚硫酸氢钠反应制备得（1*R*,2*R*,5*S*）-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -

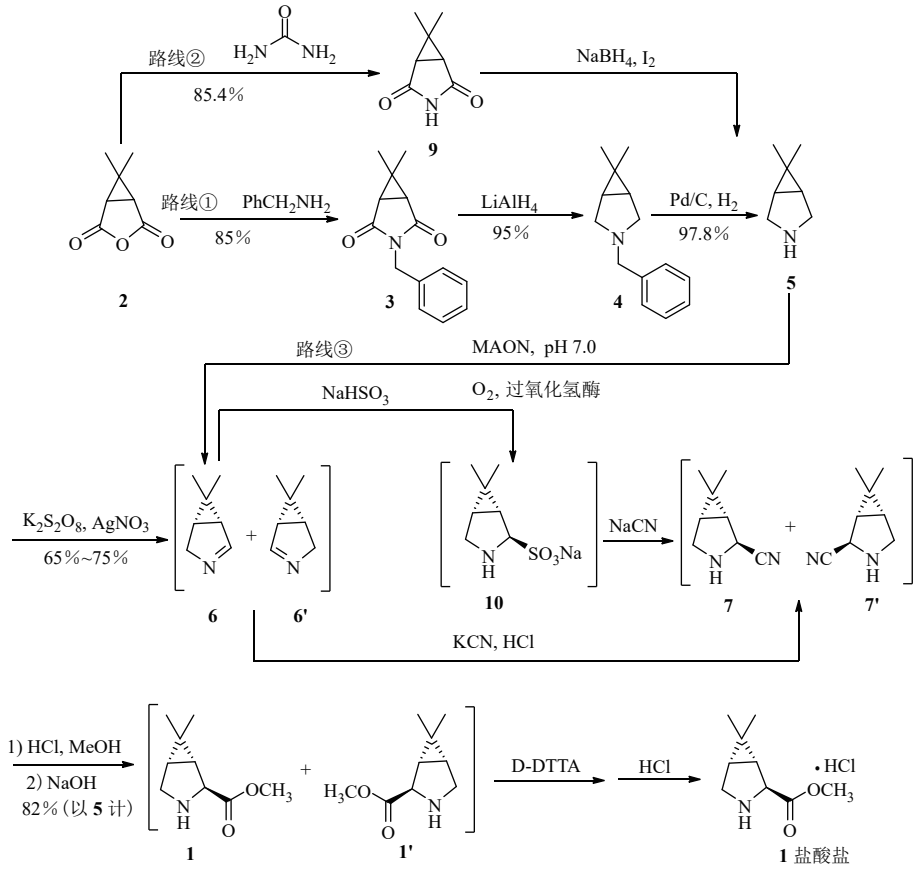


图 2　1 盐酸盐的文献合成路线

Fig.2　Synthetic Routes of **1** Hydrochloride in the Literature

2- 磺酸钠（**10**），**10** 与氰化钠反应制备得到 **7**，**7** 在酸性条件下与甲醇反应，生成 **1**，**1** 与氯化氢成盐得 **1** 盐酸盐[6]。

路线①反应步骤冗长，总收率 21.6%，其中 **3** 的还原使用了氢化铝锂，在工业化生产中存在安全隐患，且后处理时乳化情况严重，操作烦琐。路线②在路线①的基础上进行了优化，但仍需使用 D-DTTA 拆分对映异构体，拆分收率 47.3%。路线③的起始物料为化合物 **5**，在经过酶促反应氧化 **5** 时，底物质量浓度最大只能到 65 g/L，生产效率低、废水量大。

本研究在路线②和路线③的基础上，参考相关文献[6—9]，综合 2 条路线的优势，对 **1** 合成路线进行了以下 4 点改进和优化（图 3）。

（1）以 **2** 和脲为起始物反应得到 **9**，文献[5]中的后处理方式为降温至 25 ℃、加水，使用甲基叔丁基醚萃取，减压蒸除有机溶剂得到 **9**。重复文献方法时发现：（a）甲基叔丁基醚萃取效率不高，水相中仍有化合物 **9** 剩余；（b）甲基叔丁基醚会萃取出部分的脲，后续步骤无法除去；（c）“蒸除溶剂得到固体”这一操作在工业大规模生产中难以实现。本研究使用降温至 85 ℃后加水、再于 - 5 ～ 0 ℃下析晶的操作，更加符合工业操作习惯，过滤后即可得到 **9**，简单快捷，同时结晶操作可以除去脲，收率 95%（文献[5]：85%），化学纯度 99.9%。

（2）对 **9** 经硼氢化钠 / 三甲基氯硅烷（TMSCl）还原生成 **5** 的步骤，做了如下改进：（a）选择了硼氢化钠 /TMSCl 替代文献中的硼氢化钠 / 碘还原体系，革除碘单质的使用，降低成本；（b）筛选了硼氢化钠和 TMSCl 的用量，均为 5 当量时反应转化率大于 97%；（c）文献的后处理方式为先用甲醇淬灭、经盐酸调节至酸性后解络合，再用饱和碳酸钠溶液调节 pH 值至碱性，萃取、浓缩有机相得到粗品 **5**。该步操作烦琐，酸碱调节过程中产生了大量的废盐氯化钠。本研究根据文献[8]报道，发现氢氧化钠也可以解络合，因此优化后处理方法为直接用 30%氢氧化钠溶液淬灭、解络合，简化了操作，避免产生废盐氯化钠。用甲基叔丁基醚萃取，浓缩后减压蒸馏得到 **5**，收率 93%（文献未报道收率），化学纯度 99.0%。

（3）从 **5** 到 **10** 的合成中，根据文献[6]报道，为了消除 **6** 对酶活的抑制作用，加入亚硫酸氢钠使 **6** 转化为 **10**，并且加入过氧化氢酶将反应中的过氧化氢转化为水和氧气（图 4）。本研究筛选了来自炭黑曲霉（*Aspergillus carbonarius* ITEM 5010，M1）、新寄生曲霉（*Aspergillus novoparasiticus*，M2）、花生曲霉菌（*Aspergillus arachidicola*，M3）、土曲霉（*Aspergillus terreus*，M4）、黑曲霉（*Aspergillus niger*，M5）、可可球二孢（*Lasiodiplodia theobromae*，M6）的野生型单胺氧化酶（基因序列均来自基因序列数据库 NCBI），以及突变体[9]M7、M8、M9、M10、M11、M12 的活性，经活性检测试验发现，单胺氧化酶 AtMAON-M12 活性最强，最终选其作为催化剂。经过对酶促反应的温度、初始 pH 值、底物浓度、菌体浓度的筛选，最终确定的优化反应条件为：100 g/L 的化合物 **5**，反应体系 pH 7.0 ～ 7.5，反应温度 25 ～ 30 ℃以及 60 g/L 菌体浓度，催化氧化 20 h，可使转化率达 99%以上。酶促反应优化后的参数与文献[6]条件接近。酶促反应完毕后，过滤除去菌体便可投入下步反应，避免了萃取、干燥、蒸除有机相等后处理步骤，操作简便。

（4）由于上一步的产物 **10** 为钠盐，不易从水中取出，且下一步氰化反应制备 **7** 所用的溶剂也是水，因此采取叠缩工艺由 **5** 制备 **7**，操作简便，收率 85%，化学纯度 99.0%。根据文献[5]报道操作，**7** 经过 Pinner 反应后成盐制得 **1** 盐酸盐。

综上所述，改进后的工艺由起始物料 **2** 制备 **1** 盐酸盐的总收率为 60.5%［以 **2** 计，文献[5—6]：17.1%（化学拆分法），49.5%（生物酶法）］，目标产物纯度 99.9%，手性纯度大于 99.9%。

实验部分

6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2,4- 二酮（9）

反应瓶中加入 **2**（上海北卡医药技术有限公司，98%，100 g，714 mmol）和脲（51.4 g，857 mmol），升温至 130 ℃反应 0.5 h，无气体释放后，升至 160 ℃反应 3 h，GC 法［色谱柱 Agilent DB-5 柱

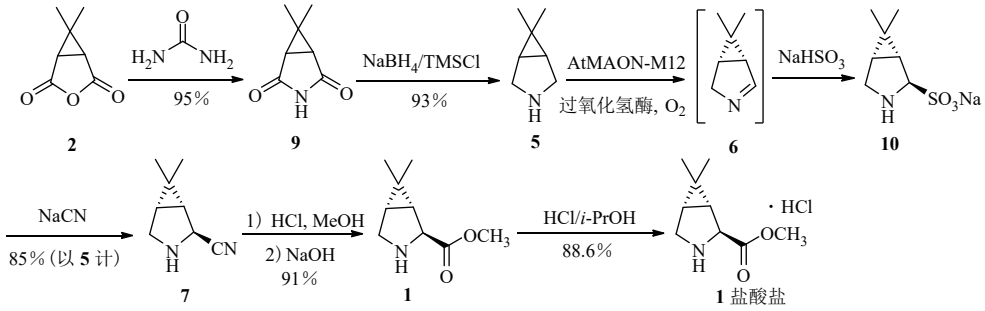


图 3　1 盐酸盐的化学 - 酶法合成

Fig.3　Chemical-enzymatic Synthesis of **1** Hydrochloride

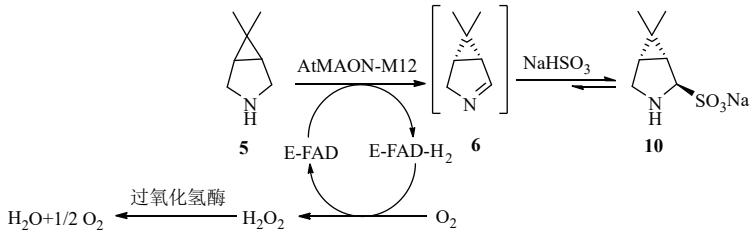


图 4　酶法催化氧化 5

Fig.4　Enzyme-catalytic Oxidation of **5**

(0.32 mm×30 mm×1.0 μm)；进样口温度 250 ℃；检测器 氢火焰离子化检测器 (FID)；检测温度 250 ℃，100 ℃保持 5 min，以 10 ℃ /min 的速率程序升温至 250 ℃保持 5 min；分流比 10 ∶ 1；载气流速 1.0 mL/min；进样体积 10 μL］跟踪反应。冷却至 85 ℃，加水 (100 mL)，搅拌 0.5 h，再冷却至 - 5 ～ 0 ℃下搅拌 0.5 h，加水 (50 mL)，过滤，滤饼干燥，得白色固体 **9**(94.3 g，95％)，mp 140 ～ 143 ℃，纯度 99.9％(检测条件与中控 GC 方法相同，其他化合物纯度测定也采用相同方法)。ESI-MS(*m*/*z*)：140.10［M+H］$^+$；^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.81(s, 1H), 1.98(d, *J*=1.6 Hz, 2H), 1.28(s, 3H), 1.17(s, 3H)；^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.69, 34.98, 34.66, 26.09, 15.74。

6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 (5)

反应瓶中加入 **9**(100 g，718 mmol) 和四氢呋喃 (2 000 mL)，于 - 15 ～ - 10 ℃分 4 次加入硼氢化钠 (136 g，3 590 mmol)，于 0 ～ 10 ℃缓慢滴加 TMSCl(405 g，3 700 mmol)，滴加完毕后于 25 ℃搅拌 0.5 h，升至 70 ℃回流反应 8 h，GC 法跟踪反应。原料剩余小于 3％时，冷却至 25 ℃，减压蒸除溶剂四氢呋喃。于 - 10 ～ 0 ℃下用 30％氢氧化钠溶液调至 pH 12 ～ 13。过滤，滤液升至 60 ℃搅拌反应 4 h，冷却至 25 ℃，用甲基叔丁基醚 (150 mL×3) 萃取，有机相用饱和氯化钠溶液 (50 mL) 洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除溶剂，得橙色黏稠状液体，继续减压蒸馏，收集 31 ℃ /1 MPa 馏分，得无色透明液体 **5**(74.39 g，93％)，纯度 99.0％。ESI-MS(*m*/*z*)：112.10［M+H］$^+$；^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.96(d, *J*=11.2 Hz, 2H), 2.73(dd, *J*=11.2、3.2 Hz, 2H), 1.78(s, 1H), 1.14(s, 1H), 0.88(dd, *J*=6.4、2.8 Hz, 6H)；^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 46.82, 30.61, 26.97, 18.97, 13.17。

(1*R*,2*R*,5*S*)-6,6- 二甲基 -3- 氮杂双环［3.1.0］己烷 -2- 磺酸钠 (10)

单胺氧化酶 AtMAON-M12 工程菌的制备：

单胺氧化酶基因[9]（已公开序列，来源菌株：*Pseudogymnoascus*）委托金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成，克隆入pET28a(+)载体，转入大肠埃希菌BL21(DE3)感受态细胞，挑单菌，在LB液体培养基（胰蛋白胨10.0 g，酵母提取物5.0 g，NaCl 10.0 g，去离子水1 000 mL，pH 7.0）中培养，获得可以诱导表达重组单胺氧化酶的基因工程菌。再将工程菌接种到含50 μg/mL卡那霉素的LB液体培养基中，在37 ℃、220 r/min的恒温摇床柜中培养14 h，得到种子培养液。将种子培养液按0.5%的比例接种到含50 μg/mL卡那霉素抗性的LB液体培养基上，然后在37 ℃、220 r/min的发酵罐（5 L）中培养至OD_{600}>3.0。加入浓度为0.5 mmol/L的异丙基硫代半乳糖苷（IPTG），降温至28 ℃诱导蛋白表达，继续培养16 h，放罐，离心（10 500×*g*）0.5 h，取下层菌体，待用。

将**5**（100 g，900 mmol）、亚硫酸氢钠（113 g，1 080 mmol）和水（200 mL）于-5～0 ℃溶清，得底物混合液，备用。另将磷酸缓冲液（800 mL）、上述AtMAON-M12（菌体湿重4.0%，37.5 g）、过氧化氢酶液（北京索莱宝科技有限公司，2×10^5 u/g，7.5 g），于25～30 ℃混匀，缓慢滴加上述底物混合液，6 h滴加完毕后搅拌反应20 h，过程中用10%氢氧化钠溶液调至pH 7.0～7.5，并缓慢通入氧气，GC法（条件同化合物**9**）跟踪反应。待化合物**5**剩余量小于0.1%时，停止反应，反应液用硅藻土（20 g）过滤，所得含**10**的反应液直接用于下步反应。

（1*R*,2*S*,5*S*）-2-氰基-6,6-二甲基-3-氮杂双环[3.1.0]己烷（7）

在0～10 ℃下，向上述反应液中滴加30%氰化钠水溶液（27.5 g，168 mmol），滴毕用30%氢氧化钠溶液调至pH 9.5～10.5，搅拌0.5 h，GC法跟踪反应。待化合物**6**剩余量小于0.5%后，加入甲基叔丁基醚（200 mL）搅拌1 h，加入硅藻土（10 g）过滤，滤液用甲基叔丁基醚（200 mL×2）萃取，有机相用饱和氯化钠溶液（50 mL）洗涤，经无水硫酸钠干燥后过滤，减压蒸除溶剂，得淡黄色固体**7**（18.4 g，85%，以**5**计）。mp 45～48 ℃，纯度99.0%［示差折光检测法：色谱柱Gemini C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相30 mmol/L高氯酸钠溶液（pH 2.0）和乙腈（体积比80∶20）；柱温30 ℃；流速1 mL/min；进样量10 μL；检测器Waters 410型示差检测器］。ESI-MS（*m/z*）：137.10[M+H]$^+$；^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 3.94（s, 1H）, 3.33～3.35（m, 1H）, 3.02（d, *J*=7.2 Hz, 1H）, 1.68（s, 1H）, 1.57（d, *J*=4.8 Hz, 1H）, 1.47～1.49（m, 1H）, 1.05（d, *J*=10.4 Hz, 6H）；^{13}C NMR（100 MHz, $CDCl_3$）δ: 121.43, 48.18, 45.91, 33.10, 29.49, 26.72, 19.68, 13.22。

（1*R*,2*S*,5*S*）-6,6-二甲基-3-氮杂双环[3.1.0]己烷-2-羧酸甲酯（1）盐酸盐

将**7**（18.4 g，135.1 mmol）用少量甲基叔丁基醚溶清，0～10 ℃下缓慢滴加至30%氯化氢的甲醇溶液（156.04 g，1 280 mmol）中，滴毕于0～10 ℃反应1 h，升温至50 ℃搅拌反应2 h后，降至25 ℃，减压蒸除溶剂。用水50 mL溶清，加甲基叔丁基醚（200 mL），用30%氢氧化钠调至pH 9.0～9.5，搅拌0.5 h，用甲基叔丁基醚（200 mL×2）萃取，有机相经无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压蒸除溶剂，得淡黄色油状物**1**（20.8 g，91%）。GC法检测，纯度98.6%。*ee*值99.9%［HPLC归一化法：色谱柱Chiralcel OD-H柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相正己烷、乙醇和二乙胺（体积比98∶2∶0.1）；检测波长230 nm；柱温30 ℃；流速1 mL/min；进样量10 μL。化合物**1**和**1'**的保留时间为5.19和5.90 min］。ESI-MS（*m/z*）：170.11[M+H]$^+$；^{1}H NMR（400 MHz, DMSO-d_6）δ: 4.13（d, *J*=1.2 Hz, 1H）, 3.80（s, 3H）, 3.58～3.61（m, 1H）, 3.04（dd, *J*=8.4、1.2 Hz, 1H）, 1.89（dd, *J*=5.2、1.2 Hz, 1H）, 1.75～1.78（m, 1H）, 1.09（m, 3H）, 1.04（m, 3H）；^{13}C NMR（150 MHz, $CDCl_3$）δ: 168.16, 58.50, 52.75, 44.87, 32.19, 28.81, 25.07, 21.67, 13.32。

将**1**用甲基叔丁基醚（40 mL）溶清，加20%氯化氢的异丙醇溶液（23 g），缓慢滴加甲基叔丁基醚（40 mL），室温搅拌1 h，冰水浴下搅拌2 h，过滤，用冰甲基叔丁基醚和异丙醇（体积比4∶1，10 mL）

淋洗，于 45 ℃减压干燥至恒重，得白色粉末 **1** 盐酸盐（22.4 g，88%）。mp 162 ～ 165 ℃，GC 法检测，保留时间 15.26 min，化学纯度 99.9%；HPLC 法计算手性异构体的纯度，手性色谱图保留时间 5.18 min，*ee* 值 99.9%。

参考文献：

[1] HAMMOND J, LEISTER-TEBBE H, GARDNER A, *et al*. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2022, **386**(15): 1397-1408.

[2] OWEN D R, ALLERTON C M N, ANDERSON A S, *et al*. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 [J]. *Science*, 2021, **374**(6575): 1586-1593.

[3] WU G, CHEN F X, PAITOON R, *et al*. Process for the preparation of 6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane compounds and enantiomeric salts thereof: WO, 2007075790 [P]. 2007-07-05.

[4] THIERRY B, PATRICE D. Process for the preparation of 6,6-dimethyl-3-azabicyclo-[3.1.0]-hexane compounds utilizing bisulfite intermediate: WO, 2008082508 [P]. 2008-09-18.

[5] 徐兰霞. 抗丙肝药物伯赛匹韦的合成工艺研究[D]. 上海: 上海医药工业研究院硕士学位论文, 2014.

[6] LI T, LIANG J, AMBROGELLY A, *et al*. Efficient, chemoenzymatic process for manufacture of the boceprevir bicyclic[3.1.0]proline intermediate based on amine oxidase-catalyzed desymmetrization [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(14): 6467-6472.

[7] GHISLIERI D, HOUGHTON D, GREEN A P, *et al*. Monoamine oxidase (MAO-N) catalyzed deracemization of tetrahydro-β-carbolines: substrate dependent switch in enantioselectivity [J]. *ACS Catal*, 2013, **3**(12): 2869-2872.

[8] DI GIOIA M L, BELSITO E L, LEGGIO A, *et al*. Reduction of amide carbonyl group and formation of modified amino acids and dipeptides [J]. *Tetrahedron Lett*, 2015, **56**(16): 2062-2066.

[9] 祝　俊, 陈　剑, 徐　飞, 等.一种单胺氧化酶突变体及其应用: 中国, 114480319 [P]. 2022-05-13.