

γ -氨基丁酸衍生物的化学-酶法合成研究进展

詹侃¹, 刘颖¹, 陈庆², 庄程翰², 郑仁朝^{1*}

1 浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

2 普洛药业股份有限公司, 浙江 金华 322118

詹侃, 刘颖, 陈庆, 庄程翰, 郑仁朝. γ -氨基丁酸衍生物的化学-酶法合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2831-2845.
ZHAN Kan, LIU Ying, CHEN Qing, ZHUANG Chenghan, ZHENG Renchao. Advances in the chemoenzymatic synthesis of gamma-aminobutyric acid derivatives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2831-2845.

摘要: γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)衍生物是一类治疗神经退行性疾病的高效抑制性神经递质药物, 市场需求较大。目前, GABA 衍生物的主要合成策略为化学法, 面临工艺复杂、产率低、原子经济性低、环境负担大等诸多挑战。化学-酶法合成 GABA 衍生物具有原子经济性好、产率高、环境友好等优点, 受到业内人士越来越多的关注。本文综述了 GABA 衍生物的化学和化学-酶合成方法, 并在此基础上, 介绍了典型 GABA 衍生物(如加巴喷丁、普瑞巴林和布瓦西坦等)的工业合成最新进展和未来发展方向。

关键词: γ -氨基丁酸; γ -氨基丁酸衍生物; 化学合成; 化学-酶法

Advances in the chemoenzymatic synthesis of gamma-aminobutyric acid derivatives

ZHAN Kan¹, LIU Ying¹, CHEN Qing², ZHUANG Chenghan², ZHENG Renchao^{1*}

1 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Apelo Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 322118, Zhejiang, China

Abstract: Gamma-aminobutyric acid (GABA) derivatives are a class of effective inhibitory neurotransmitters for treating neurodegenerative diseases, with an immense market demand. Chemical methods are currently the main synthetic strategies for GABA derivatives, facing challenges such as complex processes, low yields, low atom economy, and environmental burden.

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA2102900); 国家自然科学基金(22378362)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA2102900) and the National Natural Science Foundation of China (22378362).

*Corresponding author. E-mail: zhengrc@zjut.edu.cn

Received: 2024-01-12; Accepted: 2024-05-17

In recent years, chemoenzymatic synthesis of GABA derivatives has garnered increasing attention because of the high atom economy, high yields, and environmental friendliness. This article reviews the latest advances in the chemical synthesis and chemoenzymatic synthesis of GABA derivatives. Furthermore, it introduces the progress in the industrial synthesis of representative GABA derivatives such as gabapentin, pregabalin, and brivaracetam and prospects the future development of GABA derivatives.

Keywords: gamma-aminobutyric acid; gamma-aminobutyric acid derivatives; chemical synthesis; chemoenzymatic

γ -氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA), 又称 4-氨基丁酸(4-aminobutyric acid), 是一种非蛋白质氨基酸, 广泛存在于细菌以及脊椎动物中。在成熟的哺乳动物中枢神经系统中, GABA 是一种重要的抑制性神经递质^[1]。在中枢神经系统, GABA 由突触前神经元中的 L-谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)催化下脱羧产生^[2]。然后, 通过特定的 GABA 转运蛋白, 将其运送至神经元之间的缝隙, 实现神经信号传递^[3]。一旦到达目标神经元, GABA 与位于神经元表面的 GABA-A 和 GABA-B 受体相互作用, 这种互动导致神经元的电位变负, 使其更不容易触发动作电位, 从而减少神经元的兴奋^[4]。因此, 苯二氮卓类药物通过与 GABA-A 受体结合, 增加 GABA 在中枢神经系统中的抑制性传递, 从而达到治疗焦虑症^[5]以及精神分裂症的目的^[6]。GABA 被誉为大脑的天然镇定剂, 在调节人体多种功能方面发挥着关键作用, 如睡眠障碍^[7]、高血压^[8]、高血脂^[9]、免疫功能低下^[10]等。因此, 食品和饮料行业已开始将 GABA 添加到产品中, 以增加其抗焦虑和放松效果^[10]。

从外界摄取的 GABA 因其脂溶性低而不能穿过血脑屏障, 因此不能直接作为治疗中枢神经系统疾病的药物。人工合成的高脂溶性 GABA 衍生物, 可穿过血脑屏障, 激活 GABA 受体, 从而达到治疗疾病的目的。目前, 已上

市的 GABA 衍生物药物(图 1)被广泛用于癫痫、焦虑、双相情感障碍等疾病的治疗, 例如菲尼布特(phenibut)具有很好的抗抑郁活性^[11]; 巴氯芬(baclofen)能抑制兴奋性氨基酸神经递质的释放, 降低脊髓单突触和多突触反射的兴奋性, 显著缓解肌肉痉挛^[12]; 加巴喷丁(gabapentin)和普瑞巴林(pregabalin)主要通过调节通道运输功能的 $\alpha 2\delta$ 辅助亚基结合, 抑制神经元电压门控钙离子通道, 用于治疗疼痛、癫痫和焦虑^[13]; 新型抗癫痫药物布瓦西坦(brivaracetam)选择性地与突触囊泡蛋白 2A (SV2A)结合可减少兴奋性神经递质的释放, 调节脑内兴奋性递质和抑制性递质的平衡达到控制癫痫发作的效果^[14]。综上所述, GABA 衍生物具有重要临床价值, 本文就 GABA 衍生物的合成方法进行综述, 以期 GABA 衍生物合成方法的开发提供思路和途径。

1 GABA 衍生物的合成

GABA 衍生物(图 1)能够穿过血脑屏障, 在临床上可有效预防或治疗神经退行性疾病。因此, 人们在高效催化不对称合成 β -取代 GABA 方面付出了巨大的努力。 β -取代 GABA 衍生物的典型合成策略包括羰基化合物与硝基烯烃的 Michael 加成, 以及氰化物与 α, β -不饱和羰基化合物的 Michael 加成。

1.1 化学合成

羰基化合物与 α,β -不饱和硝基烯烃的Michael加成,是以醛作为底物进行的GABA衍生物合成路线。如乙醛和硝基烯烃在光学纯(*S*)-二苯基脯氨酸甲硅烷基醚的催化下进行不对称Michael加成,得到高产率和高*e.e.*值的 γ -硝基醛,在*t*-BuOH水溶液中氧化得到对应的硝基

酸,用雷尼镍还原硝基酸,再用HCl水溶液处理后得到(*S*)-巴氯芬盐酸盐。此外,如果在钨碳作用下还原硝基酸则可得到(*R*)-普瑞巴林^[14](图2路径I)。

Leyva-Pérez^[15]报道了多位点有机-无机混合固体催化剂催化醛类底物与硝基甲烷和丙二酸二甲酯进行多组分转化反应;非手性反应由商

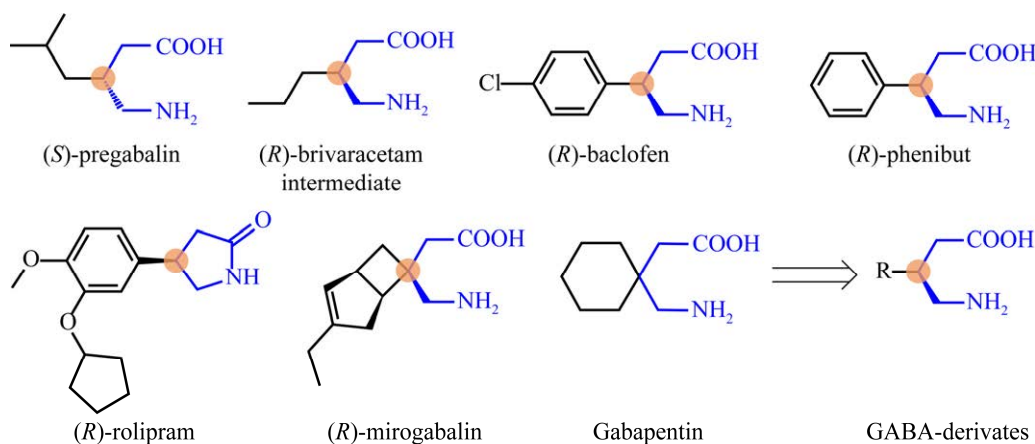


图1 典型的GABA衍生物

Figure 1 Typical GABA derivatives.

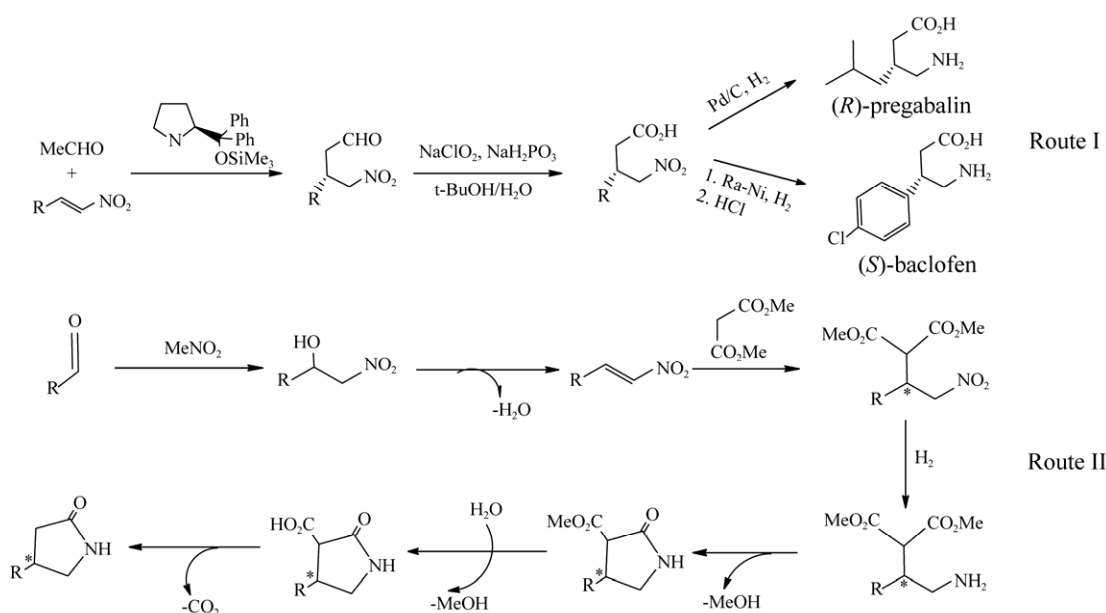


图2 以醛类和硝基烯烃为原料合成GABA衍生物

Figure 2 Synthesis of GABA derivatives from aldehydes and nitroolefin.

业可得的固体催化剂催化,而手性反应由尿素修饰的奎宁生物碱衍生物在介孔硅质材料上催化形成硝基酯化合物;粗品转移至第二反应器内,在金属负载催化剂的存在下进行硝基的非均相催化加氢生成伯胺,然后通过自发酰胺化,剩余酯基团热脱羧,最终生成 GABA 类似物(图 2 路径II);总体而言,这种使用 2 种固体催化剂的 7 步反应,整个过程仅使用一种溶剂就可获得外消旋或光学纯的 GABA 衍生物;该反应副产物是水、二氧化碳以及甲醇,三废少,符合绿色化学要求。

此外,以酯为底物,与硝基烯烃进行反应合成 GABA 衍生物的具体方法如下:硝基烯烃与丙二酸二乙酯在 3,5-双(三氟甲基)苯和叔氨基的硫脲催化剂作用下进行 Michael 加成反应得到的 Michael 加合物,通过一次重结晶将产物的光学纯度提高至 99%;然后,在甲醇溶液中与 $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$ 还原环化,通过水解和脱羧后转化为内酰胺,再进一步水解得到(R)-巴氯芬盐酸盐,产率 94%^[14];通过叔氨基对丙二酸二乙酯进行去质子化以及硝基和硫脲部分之间形成氢键的双重活化,实现了有机催化 Michael

加成反应的高对映选择性(图 3)。

Reznikov 等^[16]使用了一种由(1*R*,2*R*)-1,2-二苯基乙烷-1,2-二胺衍生的新型手性配体 Ni(II) 配合物,在其作用下,丙二酸二乙酯不对称加成得到(*S*)-2-(2-硝基-1-苯乙基)丙二酸二乙酯(*e.e.*值 96%)和(*R*)-二乙基 2-(1-硝基戊基)丙二酸二乙酯(*e.e.*值 91%),最终合成布瓦西坦关键中间体(4*R*)-4-丙基吡咯烷-2-酮。

2017 年, Sim 等^[17]开发了以水作为反应介质,通过 β,β -二取代硝基烯烃的不对称 Michael 加成反应,合成具有立体中心的手性 GABA 类似物(图 4);通过手性方酰胺催化剂(quinine-derived squaramide, QN-SQA),极不活泼的 β,β -二取代硝基烯烃与二硫代丙二酸酯顺利进行对映选择性 Michael 加成反应,得到目标产物;水作为反应介质让原本不起反应的底物发生新的催化反应,开发的“on water”方案成功应用于一锅法合成手性 GABA 类似物。

不饱和腈的不对称氢化被证明是一种合成 GABA 衍生物的替代方法。然而,这些方法需要在相对苛刻的条件下进行还原反应(图 5)。

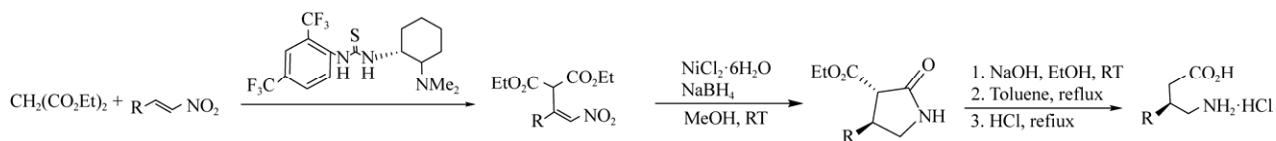


图 3 丙二酸二乙酯和硝基烯烷合成 GABA 衍生物

Figure 3 GABA derivatives were synthesized from ester substrates and nitroolefin. RT represents room temperature.

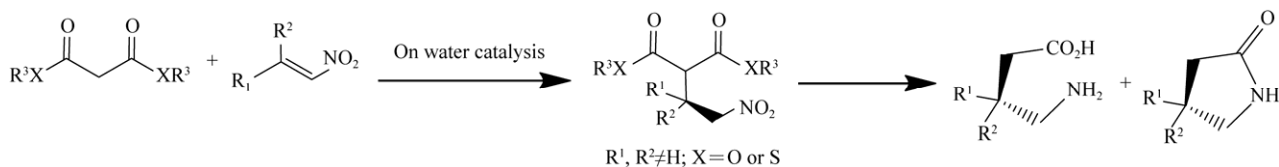


图 4 水催化 β,β -二取代硝基烯烃与二硫代丙二酸酯合成 GABA 衍生物

Figure 4 Water catalyzed synthesis of GABA derivatives of-disubstituted nitroolefin with dithiomalonic ester.

近期, Zhu 等^[18]以铜为催化剂, 以烯烃为底物合成 GABA 衍生物提供了一条有效途径, 通过对铜催化剂的进一步筛选, 确定 CuI 为最佳催化剂, 收率可达 79%。

1.2 化学-酶法合成 GABA 衍生物

2009 年, Fryszkowska 等^[19]利用厌氧细菌还原酶不对称合成(S)- β -芳基- β -氰基-丙酸酯, 然后通过 $\text{Me}_3\text{SiCH}_2\text{N}_2$ 进行质子化和酯化, 将甲酯中的腈基还原为相应的胺, 随后通过成环反应, 得到的 γ -内酰胺在盐酸条件下发生水解, 最后得到纯的(S)-巴氯芬盐酸盐(图 6)。同样, 2015 年 Brenna 等^[20]通过老黄酶(OYE1)色氨酸 116 位突变体催化(Z)- β -芳基- β -氰基丙烯酸酯

用于制备 β -取代- γ -氨基丁酸的关键中间体, (Z)- β -芳基-氰基丙烯酸酯在 OYE1-W116L 生物酶还原作用下, 以优异的产率获得 β -芳基- β -氰基酯, 再通过同样方式还原氰基, 产生的 γ -内酰胺用 HCl 水解, 可得到(R)-巴氯芬和(R)-菲尼布特的盐酸盐; 该方法用于合成 β -芳基取代的 γ -氨基丁酸衍生物, 具有良好的总产率和高对映体纯度, 比许多其他生产 GABA 衍生物的合成方法更方便且周期短得多。

笔者团队^[21]使用腈水解酶固定化细胞对异丁基丁二腈进行区域选择性和对映选择性水解获得(S)-3-氰基-5-甲基己酸, 随后通过一步加氢转化为普瑞巴林(图 7); 该方法路线较短, 原料

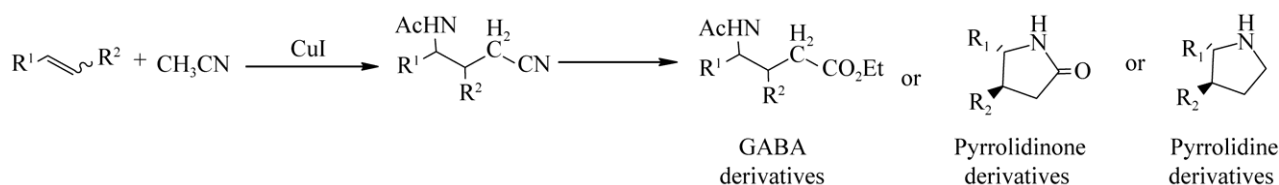


图 5 铜催化不饱和腈合成 GABA 衍生物

Figure 5 Copper catalyzes the synthesis of unsaturated nitrile from GABA derivatives.

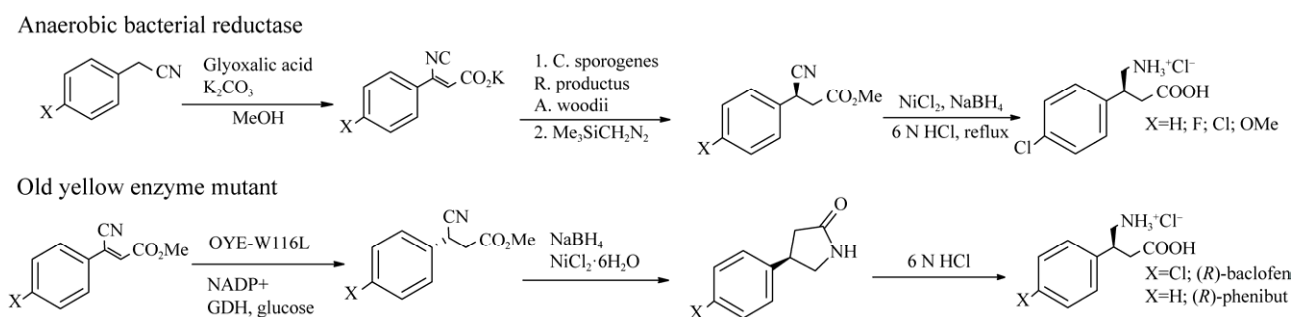


图 6 酶催化合成 β -芳基取代的 GABA 衍生物

Figure 6 Enzyme-catalyzed synthesis of β -aryl substituted GABA derivatives.

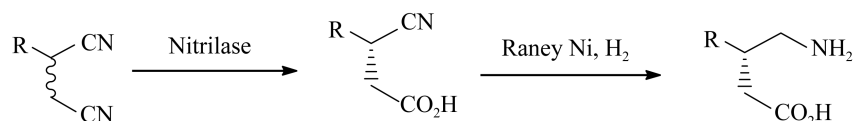


图 7 腈水解酶的固定化细胞化学-酶法合成 GABA 衍生物

Figure 7 Chemoenzymatic synthesis of PGB catalyzed by immobilized cells harboring nitrilase.

利用率高,并且通过利用固定化细胞作为生物催化剂,可在多个批次重复使用,成本降低,产物分离简便。该方法将化学催化剂、天然酶和设计的人工生物催化剂有机地结合,为 GABA 衍生物的合成提供了更加经济的途径。

2 典型 GABA 衍生物的合成方法

2.1 加巴喷丁

加巴喷丁(gabapentin, GBP),化学名为 1-(氨基)-环己烷乙酸,分子式为 $C_9H_{17}NO_2$,结构与 γ -氨基丁酸相似,是 GABA 的 β 位取代衍生物^[22],但 GBP 对 GABA 受体无亲和力,因此不与 GABA 受体产生相互作用^[23]。GBP 的作用机制是通过作用于中枢系统电压门控钙离子通道的 $\alpha 2\delta$ -1 亚基蛋白,降低 $\alpha 2\delta$ -1 亚基的表达水平,使钙离子通道关闭,减少钙离子内流,减少神经系统兴奋性递质的释放,从而起到镇痛作用^[24-25]。临床上加巴喷丁常用于治疗部分性癫痫^[25]以及慢性疼痛和神经病理性疼痛的治疗和预防^[23]。此外,GBP 在治疗焦虑症、睡眠障碍和酒精中毒方面有突出表现^[24-26]。加巴喷丁分子结构简单,是一种两性分子,同时含有氨基和羧基。合成加巴喷丁通常以环己酮等六元环化合物作为起始材料。

Griffiths 等^[27]以环己酮和丙二酸二乙酯为原料,如图 8 Route I 所示经过 Knoevenagel 缩合形成丙二酸二乙酯,随后与 HCN 生成丙二酸二乙酯(1-氰环己基),再经过催化加氢、成环反应、水解得到加巴喷丁;该路线操作简单,是实验室化学合成加巴喷丁最简便的方法之一,但问题是丙二酸二乙酯与酮的 Knoevenagel 缩合通常很困难,反应需要 2-4 倍量的吡啶,产生大量吡啶络合物需要经过特殊处理处置,增加了处理成本,且化学污染严重;此外,在反

应过程中加入剧毒物质 NaCN 或 KCN,不仅存在安全隐患,而且污染处理困难且价格昂贵。在此基础上,图 8 Route II 以环己酮为原料,经过环合、水解、缩合、氨解和 Hofmann 降解反应,共 5 步反应得到加巴喷丁^[28],缩短了反应步骤,简化了操作,但在水解反应生成 2-(1-羧甲基环己基)乙酸过程中需要大量加热的浓硫酸,需要加入大量的生石灰中和处理,由此会产生大量废渣;并且由于硫酸浓度过高,水解后的产物呈黑色,需要脱色处理,增加了工艺过程,同时反应过程对设备的腐蚀非常严重^[29]。奚才明等^[30]对环己酮进行 Knoevenagel 反应时,对反应条件进行改进,将乙腈作为反应剂及溶剂,使反应时间由 7 h 缩短至 3 h;Michael 加成反应中,用乙醚代替异丙醚作萃取剂,经 Pd-C 催化氢化还原、延长水解反应时间至 9 h、Raney Ni 催化氢化和水解、成盐等反应步骤制得抗癫痫药盐酸加巴喷丁,总收率 14% (图 8 Route III)。改进后的工艺成本较低、后处理简便,但缺点是需要用到有毒的硝基甲烷,并且氢化反应需要用到较高的氢气压力,对设备要求较严格。

此外,图 8 Route IV 的化学-酶法合成加巴喷丁的路线中采用 1-氰基环己基乙腈作为反应底物通过区域选择性腈水解酶在温和条件下进行水解反应生成 1-氰基环己基乙酸,再通过加氢、内酰胺水解、碱化等反应,直接得到产物加巴喷丁^[31]。该合成路线反应过程较易控制,操作简单、危险性低而且相对绿色环保,但其收率不高且未能进行工业化放大生产验证。Cagnoli 等^[32]采用环己基甲醛作为起始原料,通过 4 步反应成功合成了加巴喷丁;这一合成途径具有反应条件温和、避免了大量有毒有害危险试剂的使用、反应步骤相对简短等优点。然而这个方法的挑战在于,与使用环己酮相比,

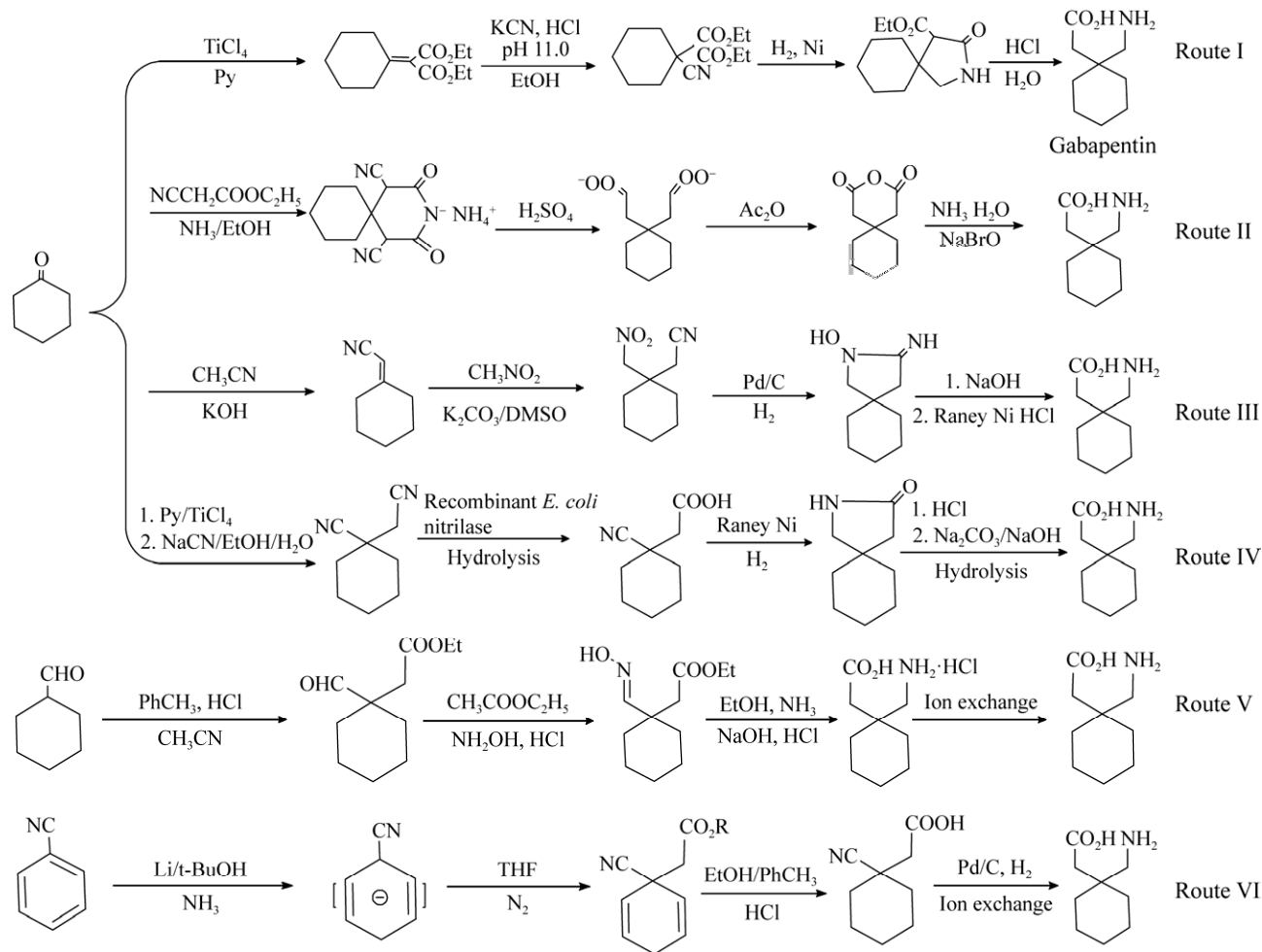


图 8 加巴喷丁合成路线
Figure 8 Gabapentin synthesis route.

起始原料环己基甲醛的成本较高, 从而导致经济效率较低, 这一因素限制了该方法在工业上的实际应用。另外, 有研究人员^[32]尝试以苯甲腈为起始原料, 经过 5 步反应生成加巴喷丁; 起始原料苯甲腈的价格要略高环己酮, 增加了其生产成本; 另一方面, 反应过程中要使用极为活泼的锂和大量昂贵的钯碳催化剂, 而且该路径的前 2 步反应需要在冰水浴中进行, 反应条件苛刻、经济效率低, 不适用于工业化生产。

所有报道的加巴喷丁的合成涉及将戊二酸酐衍生物作为中间体, 戊二酸酐衍生物是由环己酮经过几个步骤制备的。酸酐开环后, 2 个羧

基中的 1 个通过 Hofmann、Curtius 或 Lossen 重排转化为 NH_2 基团, 该反应步骤复杂且需要使用昂贵的叠氮化物和异氰酸酯保护剂。

2.2 普瑞巴林

普瑞巴林 (pregabalin, PGB), 化学名为 (S)-3-(氨基甲基)-5-甲基己酸, 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_2$, 属于 GABA 衍生物^[33]。普瑞巴林通过与钙离子通道中突触前 $\alpha 2\text{-}\beta$ 亚单位结合来调节神经末梢使钙离子内流, 从而减少谷氨酸、血清素、多巴胺等多种神经递质的释放, 抑制神经元的兴奋性, 最终达到减轻神经性疼痛和减少癫痫发作频率等目的^[34]。普瑞巴林在临床上不仅用于

治疗糖尿病引起的神经痛、带状疱疹神经痛、脊髓神经痛等在内的多种神经病理性疼痛的作用,并且对社交性的焦虑障碍、广泛性焦虑障碍以及惊恐等精神类疾病均有治疗效果^[35-36]。普瑞巴林与加巴喷丁作用机理相似,都是通过调节中枢神经系统中的压力依赖性钙通道而起作用,但普瑞巴林与 $\alpha_2\text{-}\delta$ 亚单位结合的亲和力是加巴喷丁的6倍以上^[37]。相较于加巴喷丁,普瑞巴林在治疗神经痛和癫痫病时具有药代动力学和药效更好、更安全,以及持续时间更长的优点^[38-39]。普瑞巴林具有广阔的市场前景和良好的临床效果,含有一个手性中心普瑞巴林分子的 S 型异构体药理活性是 R 型异构体的10倍左右,所以目前临床上使用的是药理活性更高的 S 型异构体^[38]。

目前国内外报道的普瑞巴林的合成方法主要可以分为全化学合成法和化学-酶法两大类,包括:(1)手性拆分法。通过使用手性拆分试剂将消旋底物分离成手性部分,然后合成普瑞巴林的手性结构。(2)不对称催化法。通过使用手性催化剂或手性配体来引发不对称反应,实现对底物的手性选择性修饰,从而制备普瑞巴林的手性结构。(3)手性化合物为起始原料,在后续反应中将其进一步反应转化为普瑞巴林的方法。(4)化学-酶法即酶催化手性拆分法。通过使用如脂肪酶、酯酶或腈水解酶等在内的酶,来实现底物的手性选择性转化,从而制备普瑞巴林的手性结构。

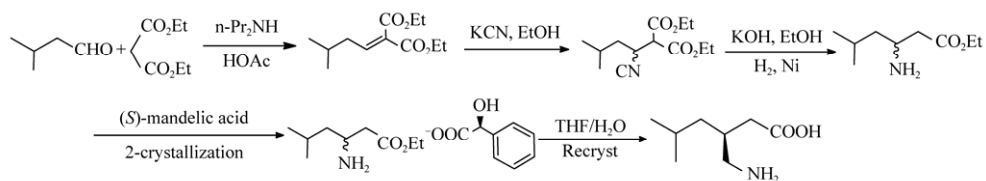
第一代普瑞巴林合成工艺是以异戊醛和丙二酸二乙酯为原料(图9),经Knoevenagel缩合、Michael加成得到关键中间体2-羧乙基-3-氰基-5-甲基己酸乙酯,再以其为起始材料,在一锅中通过水解、还原和脱羧三步单独反应,生成外消旋的普瑞巴林,再通过手性拆分试剂(S)-扁桃酸的三步结晶过程得到 S 构型的普瑞巴林^[40-41]。

尽管这条路线具有成本效益,但路线较长导致收率不高,且在早期没有进行手性拆分,导致另一构型不能进行回收。除此之外,异丁醛和丙烯腈通过Baylis-Hillman反应得到烯炔衍生物,再经过酯化反应后转化成碳酸二乙酯,用铈Me-DuPHOS催化剂对3-氰基-5-甲基己-3-烯酸盐进行不对称氢化反应得到(S)-3-氰基-5-甲基己酸酯,进一步使用均相镍催化剂进行加氢反应即可得到 S 构型的普瑞巴林^[42]。该路线能得到收率优异、 $e.e.$ 值为99.8%的普瑞巴林,但手性催化剂 $[(R,R)\text{-MeDuPHOS}]\text{Rh}(\text{COD})\text{BF}_4$ 价格昂贵,不符合工业化生产要求。

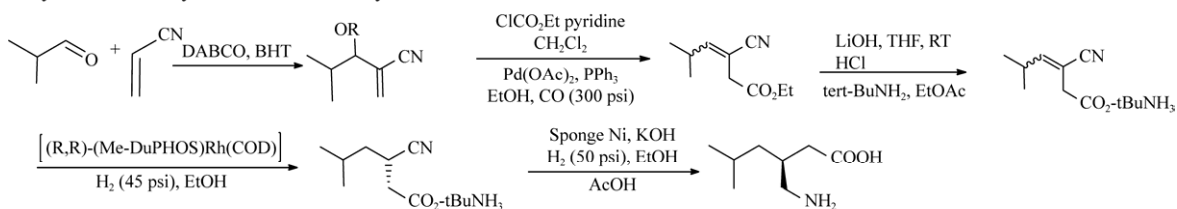
Yuen^[43]研究了一种基于Evans手性恶唑烷酮烷基化反应合成普瑞巴林的方法,首先4-甲基戊酸经过亚硫酸氯处理转化为相应的酰基氯,然后将(4*R*,*SS*)-(+)-4-甲基-5-苯基-2-恶唑烷酮的阴离子酰化,得到酰基恶唑烷酮化合物,在二异丙基氨基锂(lithium diisopropylamide, LDA)条件下,用溴乙酸苄酯对其进行烷基化,得到的烷基化产物通过氢氧化锂、过氧化氢以及还原剂进行还原后处理,除去酰基恶唑烷酮上的手性助剂,并使用亚硫酸氢钠溶液、亚硫酸钠调节pH,硼烷二甲硫络合物还原酸为相应的醇,再通过对甲苯磺酰氯、叠氮化钠处理,将醇转化为叠氮化物,最后通过钨催化加氢得到(S)-3-(氨甲基)-5-甲基己酸;该合成工艺总收率为20.6%, $e.e.$ 值为99.5%,收率较低,步骤复杂繁琐,反应条件要求严格,不符合工业化生产要求。

以L-亮氨酸为起始原料,通过硝化反应得到的 R -溴酸在乙酸叔丁酯作用下进行酯交换得到溴酯化合物,在过量的丙二酸二乙酯作用直接进行下一步反应,经过酸化、成环反应得到的手性内酯在三甲基碘化硅作用下开环,并通过叠氮化物精制得到普瑞巴林^[40]。此合成路

Chiral resolution

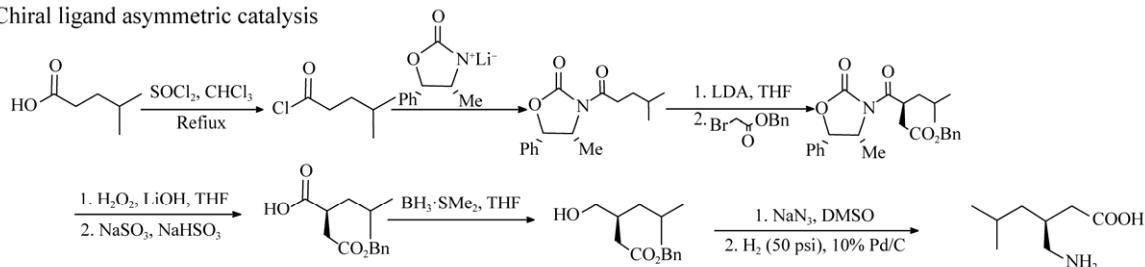


Asymmetric catalysis with chiral catalyst

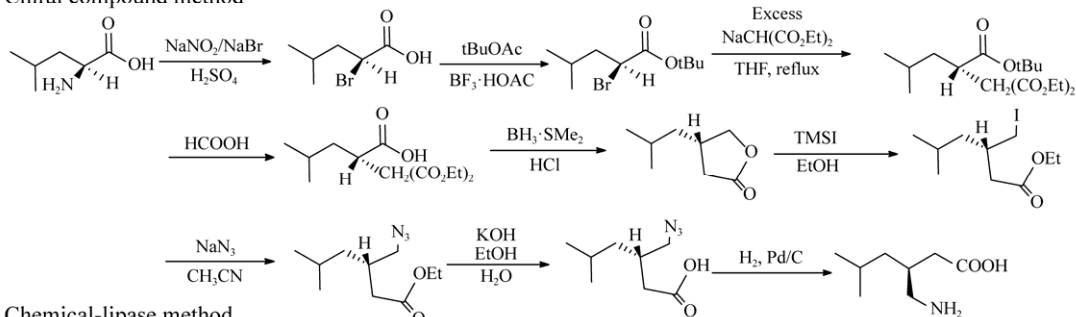


Pregabalin

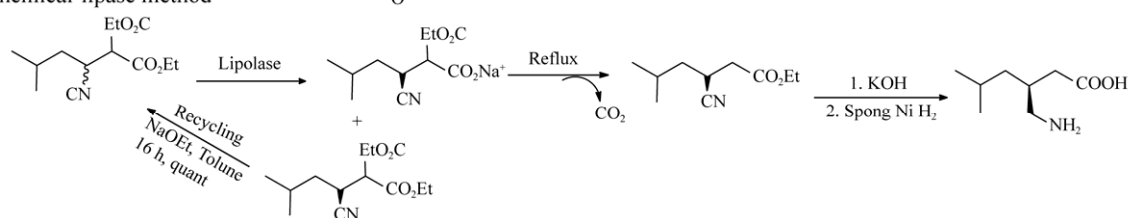
Chiral ligand asymmetric catalysis



Chiral compound method



Chemical-lipase method



Chemical-nitrilase method

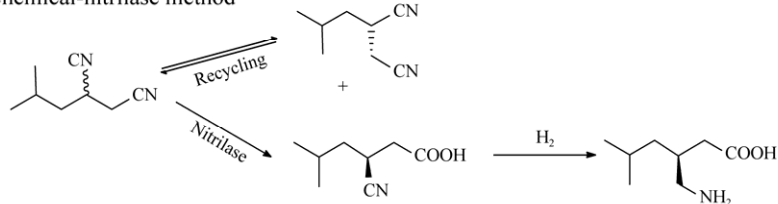


图9 普瑞巴林合成路线

Figure 9 Pregabalin synthesis route. LDA: Lithium diisopropylamide. THF: Tetrahydrofuran; DABCO: Triethylenediamine; BHT: Butylated hydroxytoluene; TMSI: N-(trimethylsilyl)imidazole.

线起始物质直接携带手性,但含有手性的起始物价格昂贵、合成路线较长,不适合工业化生产。

化学-酶法合成普瑞巴林的方法中, Martinez 等^[42]利用市售脂肪酶对外消旋体 2-羧乙基-3-氰基-5-甲基己酸乙酯进行酶催化反应脱酯生成己酸,避免产物抑制作用,通过快速热脱羧生成不溶于水的(S)-3-氰基-5-甲基己酸乙酯,然后通过简单的水解,还原得到高产率和高纯度的普瑞巴林;另外,未参加反应的 R 型底物在乙醇钠的作用下自消旋化,回收之后就可以循环利用。与第一代工艺相比,这种合成工艺在合成之初就可以实现 R 型底物的外消旋化进行回收再利用,显著提高了工艺效率;另外,除了酶催化步骤,其余 3 个化学反应都在水中进行,减少了化学废物排放量,对环境更友好,更符合“绿色化学”理念。此外,有报道^[44]通过对多种腈水解酶进行克隆,最终筛选出来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的腈水解酶 AtNit1 对底物异丁基丁二腈(isobutylsuccinonitrile, IBSN)有高对映选择性($E>150$),并能够催化生成普瑞巴林的关键手性中间体(S)-3-氰基-5-甲基己酸,通过简单的加氢还原即可生成产物普瑞巴林。

2.3 布瓦西坦

布瓦西坦(brivaracetam, BRV),化学名为(S)-2-((R)-2-氧代-4-丙基吡咯烷-1-基)丁酰胺,分子式为 $C_{11}H_{20}N_2O_2$,于 2016 年 2 月 19 日被美国食品和药物管理局(Food and drug administration, FDA)批准上市^[45],主要用于治疗 16 岁及以上患者的部分性癫痫发作^[46]。布瓦西坦对神经递质囊泡蛋白 2A (SV2A)具有高度亲和力,可以选择性地与之结合,SV2A 位于突触前膜,参与调节神经递质的释放和囊泡循环,从而维持突触囊泡的正常功能^[47]。与 SV2A 的结合使得抗癫痫药物能够减少兴奋性神经递质的释放,通过平衡大脑内兴奋性和抑制性递质的比例,从

而达到控制癫痫发作的效果^[48]。与上一代抗癫痫药物左乙拉西坦相比,布瓦西坦的亲和力更强,约为其 15–30 倍,这使得布瓦西坦的使用剂量相对较低,约为左乙拉西坦的 10%^[47]。

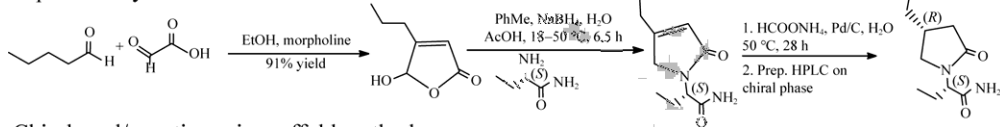
布瓦西坦的最新合成方法可分为 4 类:(1) 手性高效液相色谱分离法;(2) 手性库/对映体支架法;(3) 不对称合成法;(4) 对映体拆分法^[49],其中对映体拆分法中又包含立体异构拆分和化学-酶法拆分(图 10)。

美国专利 US2003120080A1 报道,戊醛和乙醛酸以吗啡啉为催化剂催化缩合形成羟基咪喃酮后还原胺化,得到吡咯烷酮的非对映体混合物(白色固体);通过 HPLC 手性色谱柱用乙醇/庚烷(1:1)分离 2 种非对映体,得到布瓦西坦^[50],使用手性 HPLC 分离非对映体的方法对于工业上大规模合成布瓦西坦是不可取的。

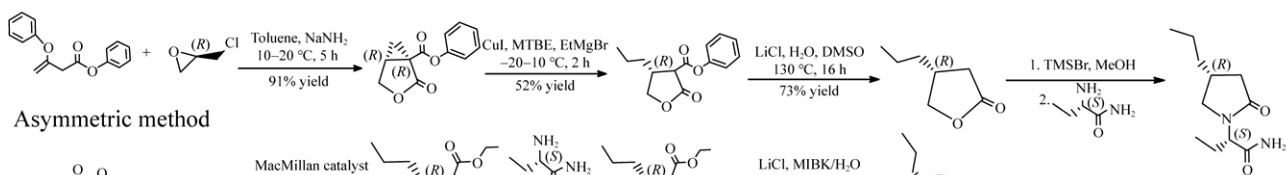
以 R-环氧氯丙烷为对映体支架,与丙二酸二乙酯缩合,之后在甲基叔丁基醚溶剂(methyl tert-butyl ether, MTBE)中与乙基溴化镁反应得到的中间体,用氯化锂处理后通过 Krapcho 脱羧反应得到关键手性中间体 γ -丁内酯衍生物,用三甲基硅烷进一步开环获得(R)-3-溴甲基己酸甲酯,最后,在碱性介质存在下与 S-2-氨基丁酰胺环化反应得到布瓦西坦^[51]。该方法对于手性底物合成布瓦西坦存在一定优势,但对于非手性底物而言成本相对较高。

2019 年,专利 CN109574778A 中公开了一种制备布瓦西坦的新合成方法^[52];该合成路线始于有机催化剂介导的不对称反应,使用(2R,5S)-2-(叔丁基)-3,5-二甲基-咪唑烷-4-酮(MacMillan 咪唑烷酮)作为催化剂。戊醛和 2-溴丙二酸二乙酯在三氧化二铋和荧光灯(compact fluorescent lamp, CFL)作用下反应,得到具有所需的立构中心(R)-二乙基-2-(1-氧戊烷-2-基)丙二酸酯,随后与(S)-2-氨基丁酰胺及三乙酰氧基

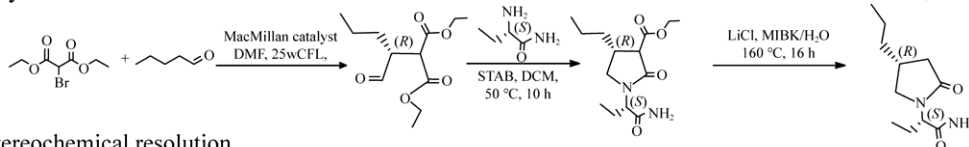
Separation by chiral HPLC



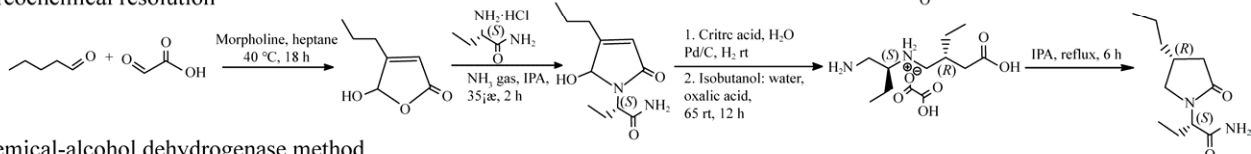
Chiral pool/enantiomeric scaffold method



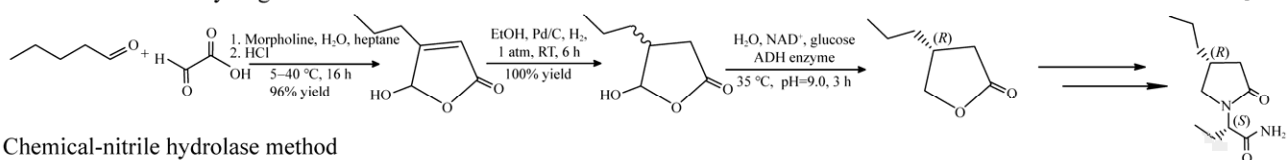
Asymmetric method



Stereochemical resolution



Chemical-alcohol dehydrogenase method



Chemical-nitrile hydrolase method

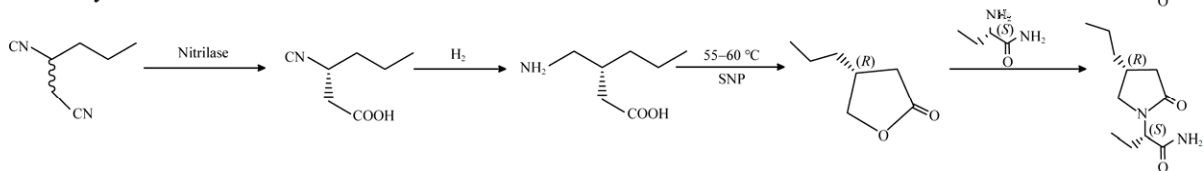


图 10 布瓦西坦合成路线

Figure 10 Brivaracetam synthesis route. MTBE: Methyl tert-butyl ether; MIBK: Methyl isobutyl ketone; IPA: Isopropanol; ADH enzyme: Alcohol dehydrogenase; SNP: Sodium nitroprusside.

硼氢化钠(sodium triacetoxyborohydride, STAB)还原胺化,最后在甲基异丁基酮(methyl isobutyl ketone, MIBK)高温脱羧得到布瓦西坦。该合成路线大大减少了繁琐的合成步骤,产率优良(60%),但催化剂制备复杂、价格昂贵。

立体异构拆分法以戊醛和乙醛酸在吗啡啉催化下的缩合反应开始,得到的中间体在(S)-2-氨基丁酰胺盐酸盐存在下进行还原胺化,生成(2S)-2-(2-羟基-5-氧代-3-丙基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丁酰胺,通过柠檬酸酸化进行内酰胺开环,然后进行氢化反应,与草酸成盐反应,得

到低产率的己酸化合物,最后在异丙醇中回流得到布瓦西坦^[53]。

专利 CN109852644A 以戊醛和乙醛酸为反应物,在吗啡啉中缩合获得中间体,通过 Pd/C 催化剂获得 5-羟基-4-丙基-二氢咪喃-2(3H)-酮最后通过从枯草芽孢杆菌提取的醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)酶还原,得到(R)-4-丙基二氢咪喃-2(3H)-酮,后续通过进一步反应可获得布瓦西坦^[54]。采用化学-酶法合成布瓦西坦关键丁内酯中间体采用了生物酶催化剂,不采用传统复杂的贵金属催化剂,从而在

制备过程中降低了成本, 并且避免了贵金属对环境的不良影响, 但过程中外消旋混合物转化为非对映体, 需要通过色谱柱分离, 损失了 50% 的异构体^[54]。

笔者团队通过定向改造的脲水解酶催化得到产物(*R*)-3-氰基己酸, 在 Raney Ni 催化剂作用下进行氢化反应形成(*R*)-3-氨基己酸, 在硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)进一步成环反应生成布瓦西坦手性中间体(*R*)-4-丙基二氢吡喃-2(3*H*)-酮, 通过与(*S*)-2-氨基丁酰胺反应即可得到布瓦西坦。该法避免了过多繁琐的化学步骤, 反应总收率最高可达 14.0%, 显著降低了污染。

3 总结与展望

GABA 衍生物因其巨大的市场潜力而备受瞩目, 合成策略主要涵盖了化学法和化学-酶法。然而, 现行方法存在着步骤繁琐、产率低以及环境污染等困难。在工业合成中, 典型 GABA 衍生物的合成路线各有创新之处, 但多数存在技术瓶颈或合成缺陷, 难以实现工业化生产。尽管全化学合成法中的不对称合成能够高效合成手性结构, 但多数需要昂贵的催化剂和有毒有害试剂, 且有机小分子催化剂难合成、难回收, 不利于工业规模应用。化学-酶催化法, 即利用生物酶催化底物生成特定的产物, 相对于化学催化而言, 反应条件温和, 具有良好的选择性, 反应环保^[55-56]。这种通过酶催化获得关键手性中间体, 然后再通过化学方法合成所需的 GABA 衍生物的化学-酶法逐渐成为工业合成的重要选择。尽管该方法存在步骤收率低的问题, 但正在逐步实现拆分后的异构体的循环利用, 从而提高总体收率, 并逐步应用于工业化生产。

总之, GABA 衍生物具有多重生理活性,

开发 GABA 衍生物将为疾病机制的研究和新药研发提供新的途径。为了降低合成成本、保护环境, 我们期待出现更多简单高效、适合工业化应用的化学-酶法合成路线, 以造福人类健康。

REFERENCES

- [1] OCHOA-DELA PAZ LD, GULIAS-CAÑIZO R, D'ABRIL RUÍZ-LEYJA E, SÁNCHEZ-CASTILLO H, PARODÍ J. The role of GABA neurotransmitter in the human central nervous system, physiology, and pathophysiology[J]. *Revista Mexicana De Neurociencia*, 2021, 22(2): 67-76.
- [2] XIE XY, RO KS, WU HL, DU L, ZHAO L, XIE JL, WEI DZ. A novel γ -aminobutyric acid biosynthetic pathway in *Lentilactobacillus curieae* CCTCC M 2011381T[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 124: 160-167.
- [3] MOTIWALA Z, ADURI NG, SHAYE H, HAN GW, LAM JH, KATRITCH V, CHEREZOV V, GATI C. Structural basis of GABA reuptake inhibition[J]. *Nature*, 2022, 606: 820-826.
- [4] SILVERMAN RB. Design and mechanism of GABA aminotransferase inactivators. treatments for epilepsies and addictions[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(7): 4037-4070.
- [5] PLUSKAL T, WENG JK. Natural product modulators of human sensations and mood: molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(5): 1592-1637.
- [6] HOSÁK L, LIBIGER J. Antiepileptic drugs in schizophrenia: a review[J]. *European Psychiatry*, 2002, 17(7): 371-378.
- [7] PRADHAN T, JUNG HS, JANG JH, KIM TW, KANG C, KIM JS. Chemical sensing of neurotransmitters[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(13): 4684-4713.
- [8] RASHMI D, ZANAN R, JOHN S, KHANDAGALE K, NADAF A. γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications[M]// *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 413-452.
- [9] OH SH, MOON YJ, SOH JR, CHA YS. Effect of water extract of germinated brown rice on adiposity and obesity indices in mice fed a high fat diet[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2005, 10(3): 251-256.

- [10] ZHANG BH, VOGELZANG A, MIYAJIMA M, SUGIURA Y, WU YB, CHAMOTO K, NAKANO R, HATAE R, MENZIES RJ, SONOMURA K, HOJO N, OGAWA T, KOBAYASHI W, TSUTSUI Y, YAMAMOTO S, MARUYA M, NARUSHIMA S, SUZUKI K, SUGIYA H, MURAKAMI K, et al. B cell-derived GABA elicits IL-10⁺ macrophages to limit anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2021, 599(7885): 471-476.
- [11] WELEFF J, KOVACEVICH A, BURSON J, NERO N, ANAND A. Clinical presentations and treatment of phenibut toxicity and withdrawal: a systematic literature review[J]. *Journal of Addiction Medicine*, 2023, 17(4): 407-417.
- [12] KENT CN, PARK C, LINDSLEY CW. Classics in chemical neuroscience: baclofen[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2020, 11(12): 1740-1755.
- [13] HONG JSW, ATKINSON LZ, AL-JUFFALI N, AWAD A, GEDDES JR, TUNBRIDGE EM, HARRISON PJ, CIPRIANI A. Gabapentin and pregabalin in bipolar disorder, anxiety states, and insomnia: systematic review, meta-analysis, and rationale[J]. *Molecular Psychiatry*, 2022, 27: 1339-1349.
- [14] HAN JL, ESCORIHUELA J, FUSTERO S, LANDA A, SOLOSHONOK VA, SOROCHINSKY A. Asymmetric Michael addition in synthesis of β -substituted GABA derivatives[J]. *Molecules*, 2022, 27(12): 3797.
- [15] LEYVA-PÉREZ A, GARCÍA-GARCÍA P, CORMA A. Multisite organic-inorganic hybrid catalysts for the direct sustainable synthesis of GABAergic drugs[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2014, 53(33): 8687-8690.
- [16] REZNIKOV AN, KAPRANOV LE, IVANKINA VV, SIBIRYAKOVA AE, RYBAKOV VB, KLIMOCHKIN YN. Nitroalkenes in the Ni(II) catalyzed asymmetric Michael addition. convenient route to the key intermediate of brivaracetam[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2018, 101(12): 1-13.
- [17] SIM JH, SONG CE. Water-enabled catalytic asymmetric Michael reactions of unreactive nitroalkenes: one-pot synthesis of chiral GABA-analogs with all-carbon quaternary stereogenic centers[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2017, 56(7): 1835-1839.
- [18] ZHU NB, WANG T, GE L, LI YJ, ZHANG XH, BAO HL. γ -amino butyric acid (GABA) synthesis enabled by copper-catalyzed carboamination of alkenes[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(18): 4718-4721.
- [19] FRYSZKOWSKA A, FISHER K, GARDINER JM, STEPHENS GM. A short, chemoenzymatic route to chiral β -aryl- γ -amino acids using reductases from anaerobic bacteria[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2010, 8(3): 533-535.
- [20] BRENNA E, CROTTI M, GATTI FG, MONTI D, PARMEGGIANI F, POWELL RW III, SANTANGELO S, STEWART JD. Opposite enantioselectivity in the bioreduction of (Z)- β -aryl- β -cyanoacrylates mediated by the tryptophan 116 mutants of old yellow enzyme 1: synthetic approach to (R)- and (S)- β -aryl- γ -lactams[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2015, 357(8): 1849-1860.
- [21] ZHANG Q, WU ZM, LIU S, TANG XL, ZHENG RC, ZHENG YG. Efficient chemoenzymatic synthesis of optically active pregabalin from racemic isobutylsuccinonitrile. *Organic Process Research & Development*. 2019, 23(9): 2042-2049.
- [22] CHANG CY, CHALLA CK, SHAH J, ELOY JD. Gabapentin in acute postoperative pain management[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 631756.
- [23] CHINCHOLKAR M. Gabapentinoids: pharmacokinetics, pharmacodynamics and considerations for clinical practice[J]. *British Journal of Pain*, 2020, 14(2): 104-114.
- [24] CHINCHOLKAR M. Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: a narrative review[J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2018, 120(6): 1315-1334.
- [25] MANEUF YP, LUO ZD, LEE K. $\alpha\delta$ and the mechanism of action of gabapentin in the treatment of pain[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2006, 17(5): 565-570.
- [26] GOODMAN CW, BRETT AS. A clinical overview of off-label use of gabapentinoid drugs[J]. *JAMA Internal Medicine*, 2019, 179(5): 695-701.
- [27] GRIFFITHS G, METTLER H, MILLS LS, PREVIDOLI F. Novel syntheses of gabapentin via addition of hydrocyanic acid to cyclohexylidenemalonate or cyano(cyclohexylidene)acetate[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1991, 74(2): 309-314.
- [28] 姜英子, 朴虎日, 全哲山, 张春波. 加巴喷丁的合成工艺改进[J]. *中国现代应用药学*, 2004, 21(1): 35-36. JIANG YZ, PIAO HR, QUAN ZS, ZHANG CB. Improved the synthetic method of gabapentin[J]. *The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2004, 21(1): 35-36 (in Chinese).

- [29] 张建飞. 加巴喷丁绿色合成工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
ZHANG JF. Studies on greener process for gabapentin synthesis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011 (in Chinese).
- [30] 奚才明, 孙笑宾, 吕心阳. 盐酸加巴喷丁的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(4): 255-257.
XI CM, SUN XB, LÜ XY. Synthesis of gabapentin hydrochloride[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2007, 38(4): 255-257 (in Chinese).
- [31] 王应朋. 化学—酶法合成加巴喷丁的工艺研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
WANG YP. The study of gabapentin synthetic process by a chemoenzymatic route[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [32] CAGNOLI R, GHELFI F, PAGNONI UM, PARSONS AF, SCHENETTI L. Hydro-de-halogenation and consecutive deprotection of chlorinated N-amidopyrrolidin-2-ones with Raney-Ni: an effective approach to gabapentin[J]. Tetrahedron, 2003, 59(50): 9951-9960.
- [33] DIVI MKP, RAO BLM, RAO AN. Simple, improved synthesis of 3-azaspiro[5,5]undecane-2,4-dione, the precursor of gabapentin[J]. Organic Preparations and Procedures International, 2013, 45(6): 504-506.
- [34] LUO ZD, CHAPLAN SR, HIGUERA ES, SORKIN LS, STAUDERMAN KA, WILLIAMS ME, YAKSH TL. Upregulation of dorsal root ganglion (α)₂(δ) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats[J]. The Journal of Neuroscience, 2001, 21(6): 1868-1875.
- [35] FINK K, DOOLEY DJ, MEDER WP, SUMAN-CHAUHAN N, DUFFY S, CLUSMANN H, GÖTHERT M. Inhibition of neuronal Ca(2+) influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex[J]. Neuropharmacology, 2002, 42(2): 229-236.
- [36] CHONG L. Molecular cloning[J]. Science, 2001, 292(5516): 446.
- [37] SHNEKER BF, McAULEY JW. Pregabalin: a new neuromodulator with broad therapeutic indications[J]. The Annals of Pharmacotherapy, 2005, 39(12): 2029-2037.
- [38] LANNEAU C, GREEN A, HIRST WD, WISE A, BROWN JT, DONNIER E, CHARLES KJ, WOOD M, DAVIES CH, PANGALOS MN. Gabapentin is not a GABAB receptor agonist[J]. Neuropharmacology, 2001, 41(8): 965-975.
- [39] BELLIOTTI TR, CAPIRIS T, EKHATO IV, KINSORA JJ, FIELD MJ, HEFFNER TG, MELTZER LT, SCHWARZ JB, TAYLOR CP, THORPE AJ, VARTANIAN MG, WISE LD, TI ZS, WEBER ML, WUSTROW DJ. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the α (2)- δ protein[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 48(7): 2294-2307.
- [40] PERUCCA E. Pregabalin as adjunctive treatment of partial seizures[J]. CNS Drugs, 2005, 19(3): 273-274.
- [41] HOEKSTRA MS, SOBIERAY DM, SCHWINDT MA, MULHERN TA, GROTE TM, HUCKABEE BK, HENDRICKSON VS, FRANKLIN LC, GRANGER EJ, KARRICK GL. Chemical development of CI-1008, an enantiomerically pure anticonvulsant[J]. Organic Process Research & Development, 1997, 1(1): 26-38.
- [42] MARTINEZ CA, HU SH, DUMOND Y, TAO JH, KELLEHER P, TULLY L. Development of a chemoenzymatic manufacturing process for pregabalin[J]. Organic Process Research & Development, 2008, 12(3): 392-398.
- [43] YUEN PW, KANTER GD, TAYLOR CP, VARTANIAN MG. Enantioselective synthesis of PD144723: a potent stereospecific anticonvulsant[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1994, 4(6): 823-826.
- [44] XIE ZY, FENG JL, GARCIA E, BERNETT M, YAZBECK D, TAO JH. Cloning and optimization of a nitrilase for the synthesis of (3S)-3-cyano-5-methyl hexanoic acid[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 41(3/4): 75-80.
- [45] PALLERIA C, COZZA G, KHENGAR R, LIBRI V, de SARRO G. Safety profile of the newest antiepileptic drugs: a curated literature review[J]. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23(37): 5606-5624.
- [46] MILOVANOVIC JR, JANKOVIC SM, PEJČIĆ A, MILOSAVLJEVIĆ M, OPANČINA V, RADONJIĆ V, PROTRKA Z, KOSTIĆ M. Evaluation of brivaracetam: a new drug to treat epilepsy[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2017, 18(13): 1381-1389.
- [47] GILLARD M, FUKS B, LECLERCQ K, MATAGNE A. Binding characteristics of brivaracetam, a selective, high affinity SV2A ligand in rat, mouse and human brain: relationship to anti-convulsant properties[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 664(1/2/3): 36-44.
- [48] ZONA C, PIERI M, CARUNCHIO I, CURCIO L, KLITGAARD H, MARGINEANU DG. Brivaracetam

- (ucb 34714) inhibits Na(+) current in rat cortical neurons in culture[J]. *Epilepsy Research*, 2010, 88(1): 46-54.
- [49] GAYKE M, NARODE H, EPPA G, BHOSALE RS, YADAV JS. Synthetic approaches toward the synthesis of brivaracetam: an antiepileptic drug[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(3): 2486-2503.
- [50] DIFFERDING E, KENDA B, LALLEMAND B, MATAGNE A, MICHEL P, PASAU P, TALAGA P. 2-OXO-1-pyrrolidine derivatives processes for preparing them and their uses: US20230120080A1[P]. 2023-06-26.
- [51] 黄绍智, 石磊, 陈奕文, 许雅文. 一种布瓦西坦的制备方法: CN105646319.A[P]. 2016-06-08.
HUANG SZ, SHI L, CHEN YW, XU YW. Method of preparing brivaracetam: CN105646319.A[P]. 2016-06-08 (in Chinese).
- [52] 刘地发, 欧阳婷, 何智斌, 郭训发, 赖正茂, 俞盼行, 付敏. 一种布瓦西坦及其中间体的制备方法: CN109574778B[P]. 2022-06-14.
LIU DF, OUYANG T, HE ZB, GUO XF, LAI ZM, YUN PX, FU M. Preparation method of brivaracetam and intermediates thereof: CN109574778B[P]. 2022-06-14 (in Chinese).
- [53] HANRONG Y, QI Y, LI T, WANG B. Brivaracetam intermediate, preparation method therefor and preparation method for brivaracetam: US11518741B2[P]. 2022-12-06.
- [54] 孙传民. 一种制备布瓦西坦中间体的方法: CN109852644B[P]. 2023-04-07.
SUN CM. Method for preparing brivaracetam intermediate: CN109852644B[P]. 2023-04-07 (in Chinese).
- [55] YU SS, LI JL, YAO PY, FENG JH, CUI YF, LI JJ, LIU XT, WU QQ, LIN JP, ZHU DM. Inverting the enantiopreference of nitrilase-catalyzed desymmetric hydrolysis of prochiral dinitriles by reshaping the binding pocket with a mirror-image strategy[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2021, 60(7): 3679-3684.
- [56] 陈曦, 吴凤礼, 樊飞宇, 吴洽庆, 朱敦明. 手性医药化学品的绿色生物合成[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4240-4262.
CHEN X, WU FL, FAN FY, WU QQ, ZHU DM. Green biosynthesis of chiral pharmaceutical chemicals[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4240-4262 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)