

Antivirusno djelovanje favipiravira

Cerovski, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:862463>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Sara Cerovski

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ANTIVIRUSNO DJELOVANJE FAVIPIRAVIRA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Zagreb, 2023. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

30. kolovoza 2023.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD	1
§ 2. STRUKTURA I SINTEZA FAVIPIRAVIRA	3
2.1. Strukturne karakteristike favipiravira	3
2.2. Sinteza favipiravira.....	4
2.2.1. Polazni spojevi u sintezi favipiravira.....	4
2.2.2. Prvi sintetski putevi pripreve favipiravira	5
2.2.3. Noviji sintetski putevi pripreve favipiravira.....	7
2.2.4. Industrijska sinteza favipiravira	11
§ 3. METABOLIZAM FAVIPIRAVIRA	14
3.1. Upotreba i važnost favipiravira.....	14
3.2. Istraživanje mehanizma djelovanja favipiravira	15
§ 4. ZAKLJUČAK.....	19
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XX

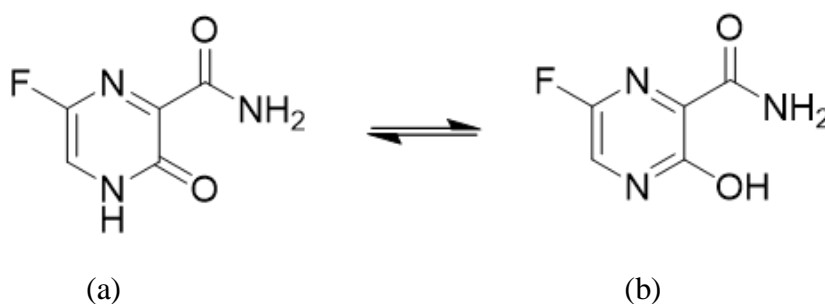
§ Sažetak

Favipiravir (6-fluor-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid, T-705, FPV) generički je antivirusni lijek učinkovit protiv RNK virusa. Otkriven je 2000. godine u Japanu gdje je prvotno korišten protiv virusa influence. Favipiravir se u organizmu pretvara iz neaktivnog u aktivni oblik favipiravir-ribofuranozil-5'-trifosfat (favipiravir-RTP) koji selektivno inhibira RNK-ovisnu RNK-polimerazu (RdRp) virusa. Kako je katalitička domena RdRp slično građena kod velikog broja virusa, favipiravir ima široki spektar primjene, a posebnu pozornost dobio je za vrijeme epidemije virusa Ebole i nedavne pandemije SARS-CoV-2. Od trenutka objavljivanja prve sinteze 2000. godine do danas opisano je više od deset postupaka pripreme favipiravira koji koriste različite polazne reaktante. U radu je razmotreno ukupno šest sintetskih puteva te industrijski postupak pripreme lijeka, zajedno s njegovim mehanizmom djelovanja.

§ 1. UVOD

Favipiravir (6-fluor-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid, FPV) djelatna je tvar antivirusnih lijekova koji sprječavaju replikaciju RNK virusa. Prvotno je korišten pri liječenju virusne bolesti influence te se pokazao uspješnim protiv svih tipova spomenutog virusa. Sinteza favipiravira prvi je puta objavljena 2000. godine u radu znanstvenika japanske kompanije Toyama Chemical Co., a 2014. godine odobreno je njegovo korištenje u medicinske svrhe.¹ Nakon dvije godine, 2016. godine, licencu za proizvodnju lijeka preuzima kineska kompanija Zhejiang Hisun Pharmaceuticals Co. Mehanizam djelovanja omogućava mu primjenu pri tretiranju velikog broja RNK virusa. Osim za liječenje influence, favipiravir je intenzivno istraživao tijekom epidemije Ebole u zapadnoj Africi 2014. godine i 2020. godine tijekom pandemije COVID-19. Lijek se prvotno prodaje pod imenom Avigan, taj naziv zadržan je i danas, no kako 2019. godine postaje generički lijek, od tada je dostupan i pod brojnim drugim imenima.

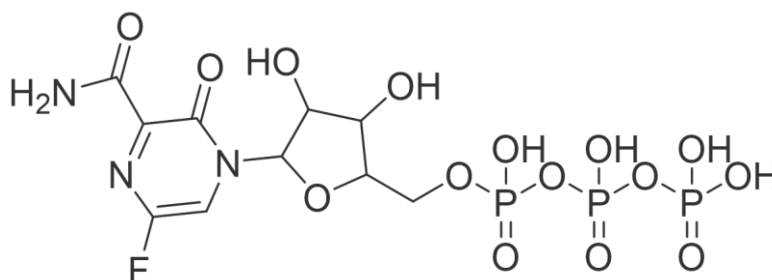
Favipiravir je po strukturi derivat pirazinkarboksamida kod kojeg je prisutna laktam-laktim tautomerija (slika 1), a ovisno o okruženju u kojem se nalazi postoji veća zastupljenost jednog od dva tautomera. Strukturni je analog purinskoj bazi gvaninu te je upravo ta sličnost temelj njegovog antivirusnog djelovanja.



Slika 1. Ravnoteža između tautomernih oblika favipiravira: (a) laktam i (b) laktim

Molekula favipiravira djeluje kao prolijek što znači da nakon ulaska u organizam prolazi kroz modifikacije koje ga prevode u aktivnu formu, odnosno dolazi to unutarstanične

fosforibozilacije i fosforilacije čime nastaje favipiravir-ribofuranozil-5'-trifosfat (F-RTP, slika 2). Virusna RNK-ovisna RNK-polimeraza (RdRp), enzim nužan za replikaciju virusa, greškom prepoznaje favipiravir-RTP kao purinski nukleotid i ugrađuje ga u novonastali RNK lanac, što inhibira djelovanje enzima te u konačnici sprječava transkripciju i replikaciju virusa, ali ne inhibira sintezu RNK ili DNK u stanicama domaćina.



Slika 2. Strukturna formula aktivnog metabolita favipiravir-ribofuranozil-5'-trifosfata (favipiravir-RTP)

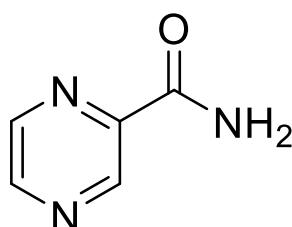
Prva sinteza favipiravira sastojala od sedam koraka počevši s 3-aminopirazin-2-karboksilnom kiselinom, a njeno iskorištenje bilo je manje od 1 %. Dosad je poznato više od deset postupaka pripreve favipiravira, a potraga za novim sintetskim putevima sa što većim iskorištenjem, manjim troškovima proizvodnje i bez upotrebe štetnih i opasnih kemikalija nastavlja se i danas. Odabrani sintetski postupci detaljno su objašnjeni u nastavku rada.

Cilj rada je prikazati i usporediti sintetske puteve pripreve favipiravira, istaknuti prednosti i glavne nedostatke svakog od njih te objasniti primjenu i mehanizam djelovanja lijeka na ljudski organizam.

§ 2. STRUKTURA I SINTEZA FAVIPIRAVIRA

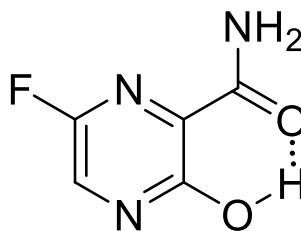
2.1. Strukturne karakteristike favipiravira

Favipiravir je molekula kemijskog naziva 6-fluor-3-hidroksi-2-pirazinkarboksiamid, farmaceutske oznake T-705, a kao lijek dostupan je pod nazivima avigan (abigan), avifavir, areplivir, fabiflu, favipira i favilavir. Navedeni spoj pripada skupini pirazinkarboksamida (slika 3), organskih spojeva koji sadrže pirazinski prsten na koji je vezana karbamoilna skupina.



Slika 3. Strukturna formula molekule pirazinkarboksamida

Najjednostavniji pirazinkarboksiamid prikazan na slici 3. zvan je i pirazinamid, a koristi se kao lijek protiv zarazne bakterijske bolesti tuberkuloze. Iako strukturnu razliku pirazinamida i favipiravira čine samo dvije funkcijske skupine, primjena i mehanizam djelovanja ovih spojeva potpuno su drugačiji. Pirazinamid se metabolizira u jetri gdje nastaje njegov glavni metabolit pirazinoična kiselina koja je aktivna protiv bacila tuberkuloze, dok favipiravir prelazi u favipiravir-RTP i zaustavlja replikaciju virusa. Dvije dodatne funkcijske skupine u strukturi molekule favipiravira su hidroksilna skupina na C3 atomu te atom fluora na C6 atomu. Navedene skupine utječu na reaktivnost i polarnost spoja, kao i na interakcije s drugim molekulama, posebice enzimima. Pri određivanju kristalne strukture favipiravira utvrđeno je da se radi o planarnoj molekuli u kojoj intramolekulske vodikove veze O–H...O zatvaraju šesteročlani prsten (slika 4).²



Slika 4. Strukturna formula molekule favipiravira s istaknutom intramolekulskom vodikovom vezom

Vrsta tautomerije prisutna kod molekule favipiravira naziva se laktam-laktimska tautomerija. Pri prevođenju jednog tautomera u drugi, odnosno laktama u laktim, dolazi do premještanja protona, pa se ova podvrsta tautomerije naziva i prototropijom (slika 1). Prototropija uključuje i keto-enolni par, aldoza-ketoza par te enamin-imin par. U biološkim sustavima ova se vrsta tautomerije susreće kod aminokiselina, dušičnih baza i kod ugljikohidrata. Iako se možda čini kako premještaj jednog protona nema veliki utjecaj na svojstva spoja, upravo je suprotno. Prelaskom jednog tautomera u drugi kod molekule se mijenja elektronska struktura te može doći do promjene biološke aktivnosti, neveznih interakcija, stabilnosti, topljivosti i drugih svojstava.

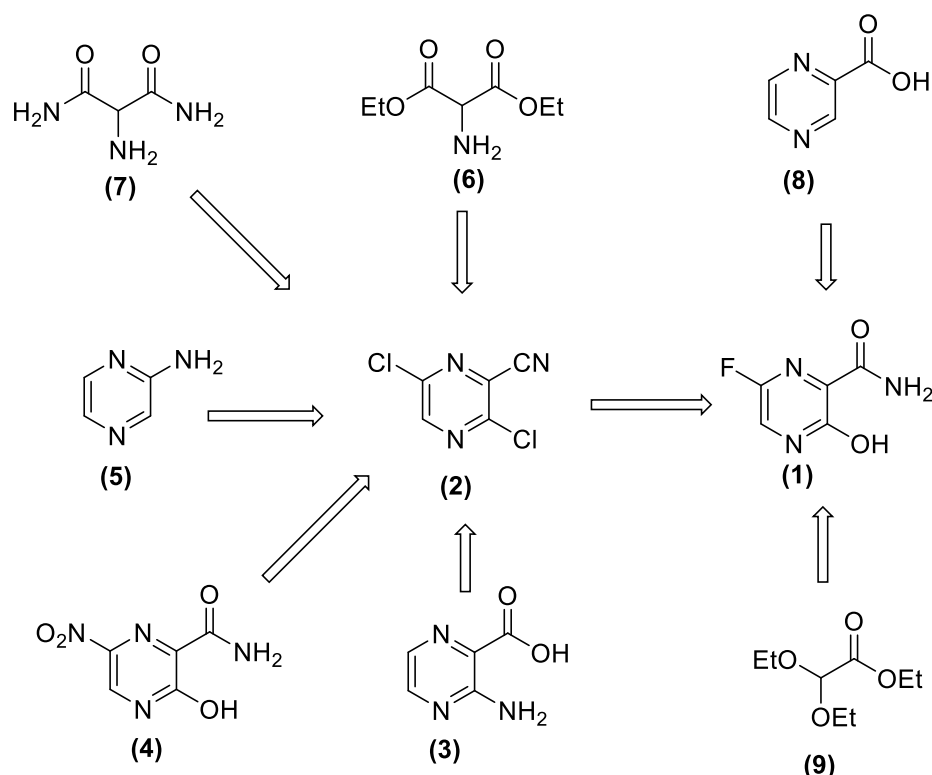
Pri dizajniranju novih lijekova važno je poznavanje mogućih tautomernih formi molekule lijeka jer tautomerizacija može utjecati na farmakološko ponašanje lijeka. Ovome u prilog govori i podatak da otprilike 21 % spojeva u bazi lijekova, točnije njihove molekule, mogu postojati u obliku tautomera.³ Eksperimentalna istraživanja favipiravira pokazala su da je u neutralnom mediju ravnoteža pomaknuta prema laktimu (enolni oblik), a u kiselom mediju prema laktamu (keto-oblik).⁴

2.2. Sinteza favipiravira

2.2.1. Polazni spojevi u sintezi favipiravira

Sintezu favipiravira (**1**) moguće je izvesti iz velikog broja početnih spojeva, a često se svode na zajednički međuprodukat (**2**) iz kojeg nastaje ciljna molekula. Kako bi sinteze opisane u nastavku bile jasnije, prikazane su molekule spojeva koji su korišteni kao reaktanti u nekima od njih (slika 5). Favipiravir je moguće sintetizirati počevši od 3-aminopirazin-2-karboksilne kiseline (**3**) prema znanstvenicima Furutu i Egawi,⁵ koji su proveli prvu sintezu, te prema

znanstveniku Liu.⁶ 3-hidroksi-6-nitropirazin-2-karboksamid (**4**) bio je početni spoj u sintezi koju su 2009. godine objavili Jordis i Belder.⁷ Godine 2019. započinje sintezu favipiravira s 2-aminopirazinom (**5**),⁵ Furuta 2001. godine kao reaktant koristi dietil-aminomalonat (**6**),⁸ a deset godina kasnije spoj postaje komercijalno dostupan te 2011. godine izlazi unaprijeđena sinteza s 2-aminomalonamidom (**7**) kao početnim spojem. Znanstvenik Shi 2014. godine sintezu započinje s 3-hidroksipirazin-2-karboksilnom kiselinom (**8**),⁹ a 2020. godine Titova i Fedorova objavljuju sintezu s početnim spojem etil-dietoksiacetatom (**9**).¹⁰

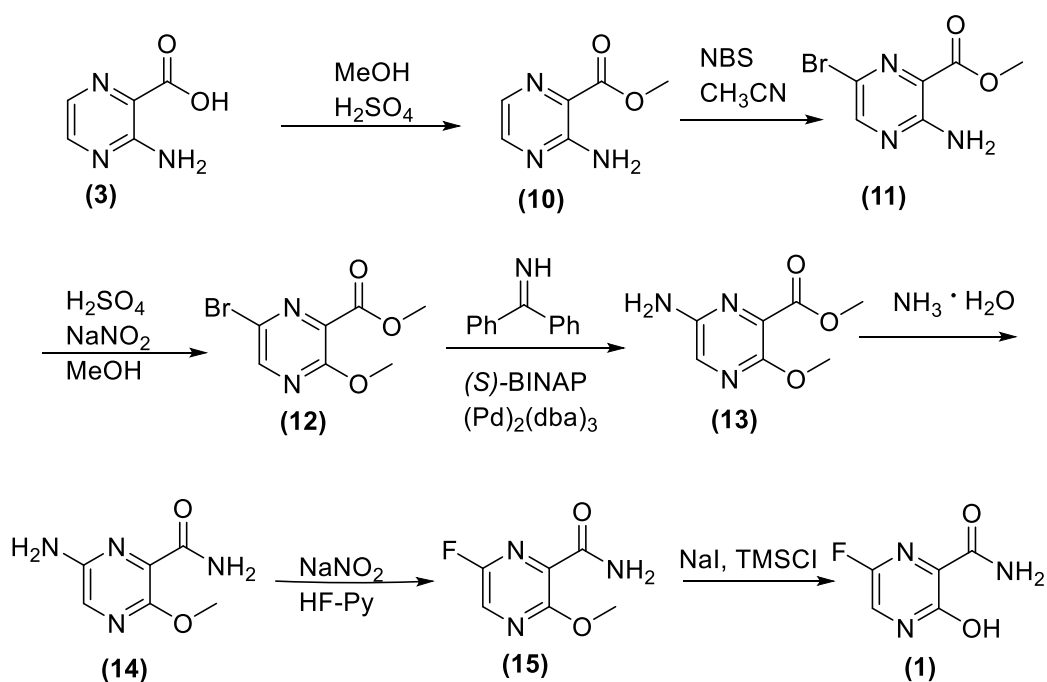


Slika 5. Polazni spojevi i međuprodukti u sintezama favipiravira¹¹

2.2.2. Prvi sintetski putevi priprave favipiravira

Sintezu favipiravira 2000. godine objavio je i patentirao tim znanstvenika iz Japanske kompanije Toyama Chemical Co, podružnice multinacionalnog konglomerata Fujifilm, a Y. Furuta jedan je od znanstvenika koji je sudjelovao u stvaranju prvog sintetskog puta koji se sastojao od sedam koraka (slika 6).¹⁰ Početni spoj ove sinteze 3-aminopirazin-2-karboksilna kiselina (**3**) Fischerovom esterifikacijom uz metanol i sumpornu kiselinu kao katalizator prevedena je u metilni ester **10**. Djelovanjem *N*-bromosukcinimida (NBS) C6 atom spoja **10** bromiran je pri čemu je nastao spoj **11**. Dodatkom natrijeva nitrita u kiselom mediju najprije

nastaje diazonijeva sol, čime se dobiva bolja izlazna skupina za sljedeći korak – nukleofilni napad kisika molekule metanola te nastaje spoj **12**. Idući korak je aminacija pomoću difenilmetanimina uz difenilfosfino-binaftil ((*S*)-(-)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil, (*S*)-BINAP) i Pd₂(dba)₃ koji zajedno kataliziraju reakciju dajući spoj **13**. Inače, (*S*)-BINAP je kiralni spoj koji se može koristiti zajedno s katalizatorima prijelaznih metala kako bi se kontrolirala stereokemija kemijske reakcije. Zagrijavanjem u vodenoj otopini amonijaka metilni ester prelazi u primarni amid te nastaje spoj **14**. Nakon toga, djelovanjem Olahova reagensa, nukleofilnog fluorirajućeg sredstva koje se sastoji od fluorovodika i piridina, na C6 atom uvedena je fluoridna skupina. Dodatkom natrijevog jodida i trimetilsilil-klorida (TMSCl) spoju **15** dobivena je ciljna molekula **1**.

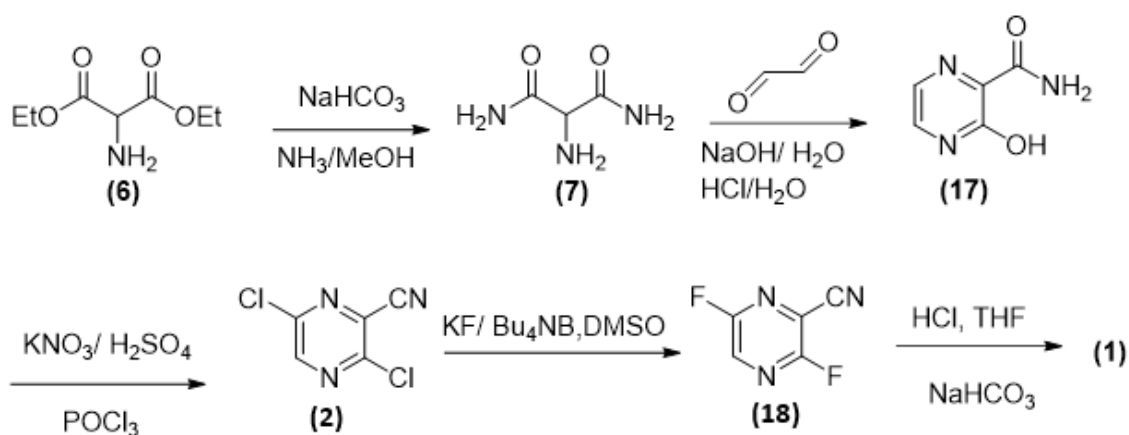


Slika 6. Shematski prikaz prve objavljene sinteze lijeka favipiravira iz 2000. godine¹²

Jedan od nedostataka ove sinteze bila je upotreba toksičnih i skupih reagensa. Posebni izdatak predstavljao je (*S*)-BINAP koji katalizira uvođenje amino-skupine te Olahov reagens, visoko korozivna i toksična smjesa. Osim navedenog, ukupno iskorištenje reakcije bilo je manje od 1 % što nije zadovoljavalo profitabilnu proizvodnju na industrijskoj skali.¹⁰

Kako bi riješili probleme prvog sintetskog puta isti tim znanstvenika nastavlja razvijati sintezu te 2001. godine objavljuju novi sintetski put u kojem je polazni spoj cjenovno dostupniji

dietil-aminomalonat (**6**) (slika 7).⁸ U dva koraka sinteze dobiven je novi međuprodukt 3-hidroksipirazin-2-karboksamid (**17**) koji je nastao reakcijom glioksala s primarnim aminom **7** u kiselom mediju. Nastali amid **17** reagira s fosforil-kloridom (POCl_3) i kalijevim nitratom u kiselom te dolazi do adicije dvaju atoma klora i dehidratiranja amida u nitril **2**. Atomi klora spoja **2** supstituiraju se zatim atomima fluora pri čemu nastaje spoj **18**. Reakcija spoja **18** s klorovodikom u tetrahidrofuranu i dodatak natrijeva hidrogenkarbonata dovodi do nastajanja favipiravira (**1**). Iskorištenje ove reakcije bilo je 17 % što je znatno više nego što je dobiveno prethodnom sintezom.⁸

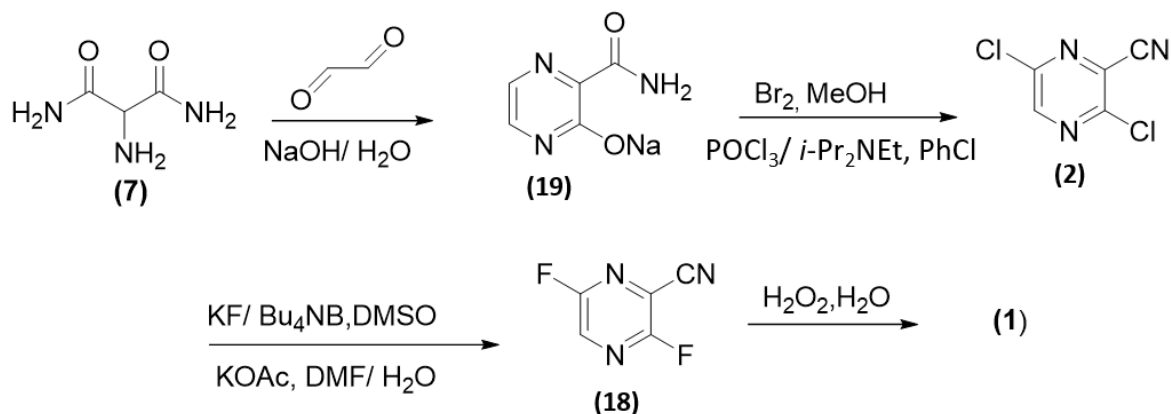


Slika 7. Shematski prikaz unaprijeđenog sintetskog puta dobivanja favipiravira iz 2001. godine⁸

2.2.3. Noviji sintetski putevi priprave favipiravira

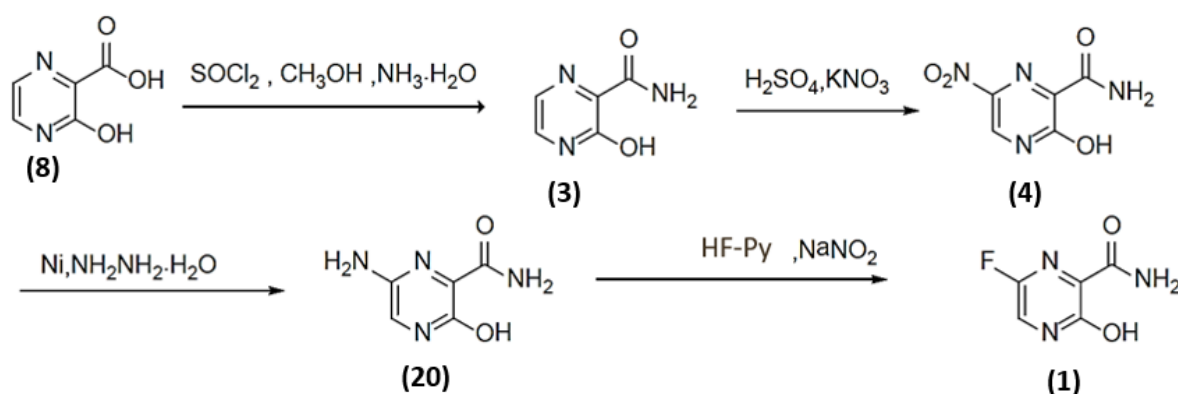
2-aminomalonamid (**7**) se pokazao kao dobar izbor polaznog spoja te 2011. godine Toyama u suradnji s Nippon Soda Corporation objavljuje novu sintezu prikazanu na slici 8. koja uvelike prati sintezu iz 2001. godine. Dodatak glioksala početnom spoju **7** u bazičnoj otopini natrijeva hidroksida rezultira nastankom natrijeva 3-karbamoilpirazin-2-olat (**19**), soli spoja **17** iz prethodne sinteze. Prije kloriranja spoja **19** adiran je manje reaktivni i selektivniji brom što je dovelo do nastajanja međuprodukta **2**. Slijedilo je fluoriranje i hidroliza u prisutnosti vodikovog peroksida i nastanak konačnog spoja **1**.^{8,13} Opisane sinteze imaju identične međuprodukte, a

razlikuju se jedino u korištenim reagensima i načinima dobivanja tih međuprodukta što rezultira dvostruko većim iskorištenjem u potonjoj.¹³



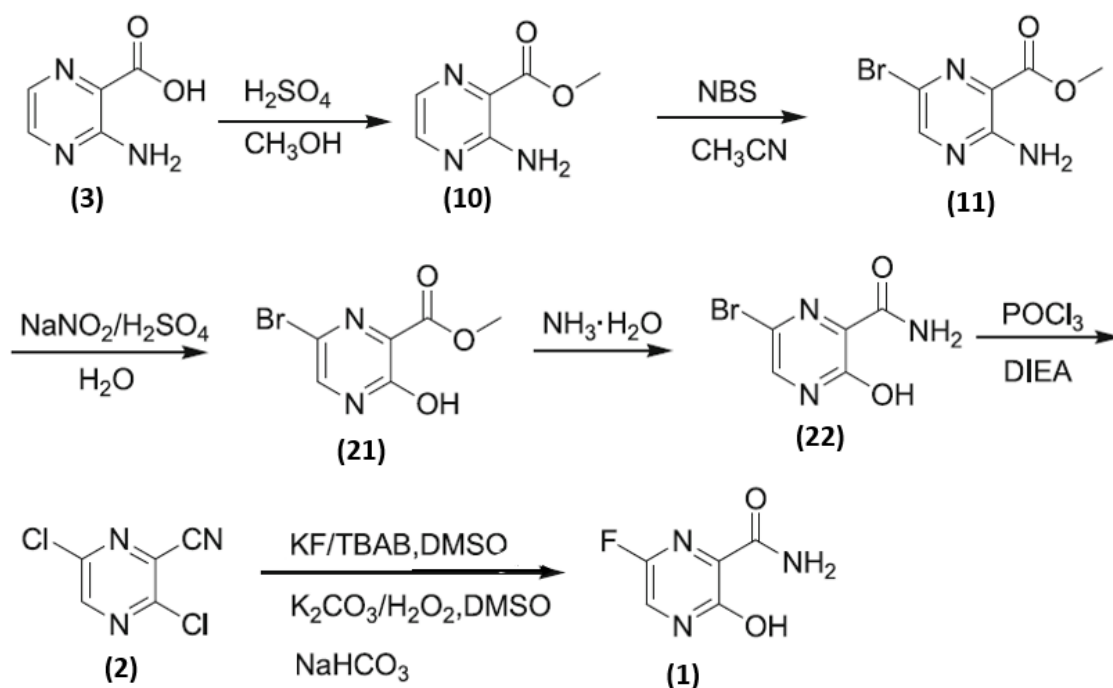
Slika 8. Shematski prikaz sinteze favipiravira iz 2011. godine nastale u suradnji farmaceutske firme Toyama i Nippon Soda Corporation⁸

Kineski znanstvenici, među kojima je bio i Shi,⁹ 2014. godine uspješno su sintetizirali favipiravir u četiri reakcijska koraka, počevši s amidacijom 3-hidroksipirazin-2-karboksilne kiseline (8) gdje nastaje 3-hidroksipirazin-2-karboksamid (3) (slika 9). Nakon toga je na pirazinski prsten uvedena nitro-skupina pomoću kalijeva nitrata u prisutnosti sumporne kiseline čime je nastao 3-hidroksi-6-nitropirazin-2-karboksamid (4). Kako bi u idućem koraku nastao 6-amino-3-hidroksipirazin-2-karboksamid (20) bilo je potrebno reducirati nitro-skupinu. U tu svrhu isprobano je više metoda redukcije od kojih je prva bila redukcija vodikom koja je rezultirala velikim brojem nusprodukata i iskorištenjem od 30 %. Nezadovoljni rezultatima autori su isprobali reakciju s cinkom i amonijakom, ali ni to nije bilo uspješno te je u konačnici redukcija uz pomoć Raney-niklovog katalizatora i hidrazina rezultirala manjim brojem nusprodukata i većim iskorištenjem od 77 %. Dodatkom Olahova reagensa na mjesto amino-skupine uveden je atom fluora te nastaje favipiravir 1 u iskorištenju od 8 %. Iako otkrivena sinteza nije imala veliko iskorištenje, produkt je dobiven u manjem broju koraka, a uz to F. Shi i suradnici prvi su uspješno dobili kristalnu strukturu spoja kojom je pokazano da od neveznih interakcija prevladavaju vodikove veze i interakcije slaganja.

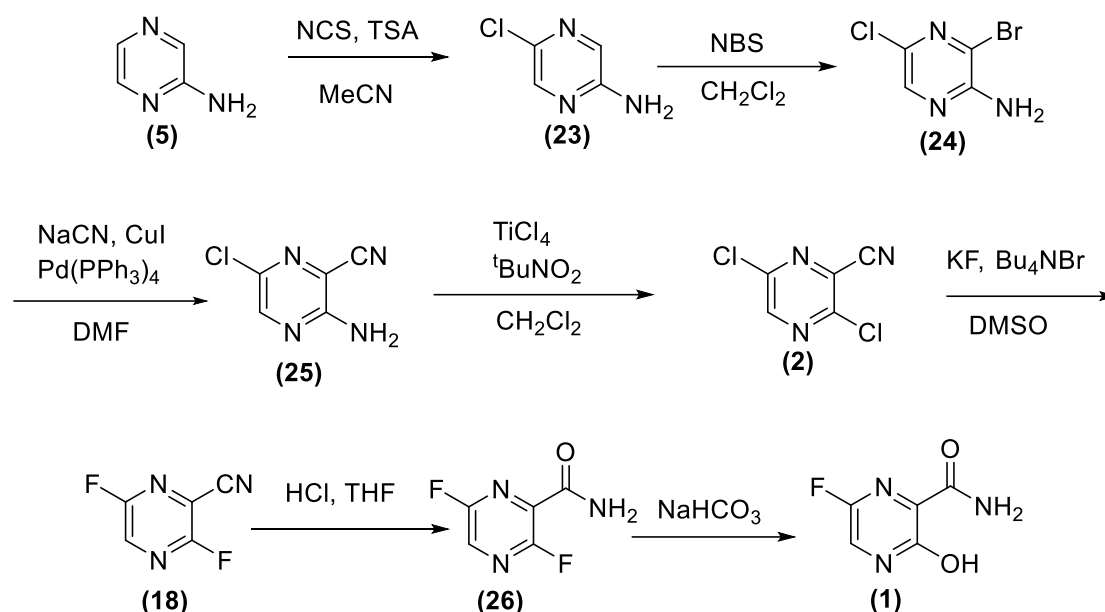


Slika 9. Shematski prikaz sinteze favipiravira iz 2014. godine⁹

Drugačiji pristup pronašao je 2017. godine drugi kineski znanstvenik Feng Liu koji objavljuje sintezu favipiravira gdje u zadnjem koraku uvodi „one-pot“ sintezu i prekrizalizaciju svakog međuprodukta nastalog u prijašnjim koracima (slika 10).¹¹ Sintezu započinje s 3-aminopirazin-2-karboksilnom kiselinom (3) te u prvih nekoliko koraka prati Furutovu prvotnu sintezu (spojevi 3–11) do pripreve ključnog međuprodukta metil-3-amino-6-brompirazin-2-karboksilata (11). Prema Liu, čistoća ovog spoja je bila važna za uspješnu pripremu 3,6-diklorpirazin-2-karbonitrila (2). Spoj 2 dobiven je dodatkom natrijeva nitrita u kiselom mediju, a spoj 22 zagrijavanjem u vodenoj otopini amonijaka te u idućem koraku uz prisutnost POCl_3 i *N,N*-diizopropiletilamina (DIEA) nastaje 3,6-diklorpirazin-2-karbonitril (2). Kako „one-pot“ sinteza prethodi nastanku produkta u jednom koraku izvode se tri reakcije, a to su zamjena klorovog atoma s fluorovim uz pomoć kalijeva fluorida u prisutnosti tetrabutilamonijeva bromida (Bu_4NBr), zatim hidroliza i aminoliza dodatkom vodikova peroksida u prisutnosti bazičnog kalijeva karbonata te na kraju reakcija s natrijevim hidrogenkarbonatom. Dobiveni produkt 1 izoliran je prekrizalizacijom.¹⁴

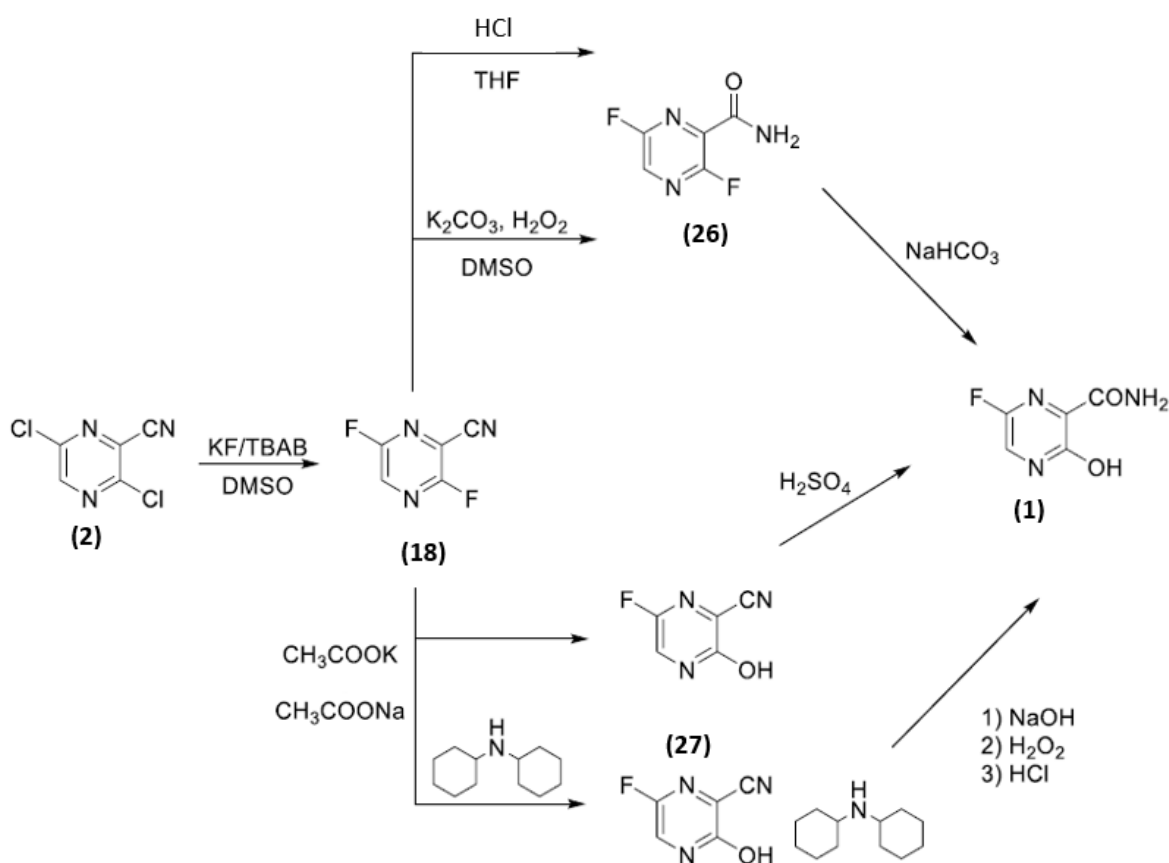
Slika 10. Shematski prikaz sinteze favipiravira prema Liu⁶

Poučen sintezama prijašnjih znanstvenika, 2019. godine Guo uspijeva pronaći metodu kojom bi proizvodnja favipiravira rezultirala velikim iskorištenjem pa time i bila isplativija. Umjesto štetnog reagensa kao što je fosforil-klorid koristi blaži reagens diklormetan. Sinteza počinje s lako dostupnim 2-aminopirazinom (5) koji se regioselektivno klorira (23), a zatim bromira dajući spoj 24. U sljedećem koraku na mjesto broma pomoću Pd-katalizatora uvodi se cijano-skupina (25), nakon čega je rađena diazotacija kao uvod u Sandmeyerovu reakciju kloriranja čime nastaje dikloropirazin-2-karbonitril (2). Slijedi zamjena klorovog atoma s fluorovim reakcijom nukleofilne aromatske supstitucije koju prati hidrolitička reakcija i nastaje spoj 18 čijom hidrlizom nastaje spoj 26. Naposljetku, u prisutnosti natrijeva karbonata i otopine 1,4-dioksana iz spoja 26 nastaje željeni produkt 1, kao što je prikazano na slici 12, u iskorištenju od 12-18 %.

Slika 11. Shematski prikaz sinteze favipiravira prema Guo⁵

2.2.4. Industrijska sinteza favipiravira

Otkrivanje specifične molekule spoja koja će imati traženi biološki učinak samo je jedan dio složenog procesa otkrivanja lijeka u što je uključeno ispitivanje učinkovitosti, sigurnosti i stabilnosti spoja, što je pak povezano s njegovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. Na temelju svega spomenutog utvrđuje se koji će način primjene lijeka imati željeni terapijski učinak, odnosno hoće li to biti, primjerice, intravenozno ili oralno uzimanje. Takva istraživanja su neophodna jer ulaskom molekule lijeka u organizam može doći do kemijskih reakcija koje bi poništile njegovu djelotvornost ili štoviše izazvale suprotni učinak. Uz to treba unaprijed razmatrati postoji li mogućnost skladištenja i transportiranja odabranog oblika lijeka. U industrijskoj proizvodnji lijeka traže se sintetske metode koje će biti izvedive i ekonomične za proizvodnju lijeka u velikim količinama i sa što manjim troškovima. To znači da od prvotnih sinteza gdje spoj nastaje u količinama mjerljivim u gramima, treba doći do metode dobivanja tvari na skali od nekoliko stotina kilograma.

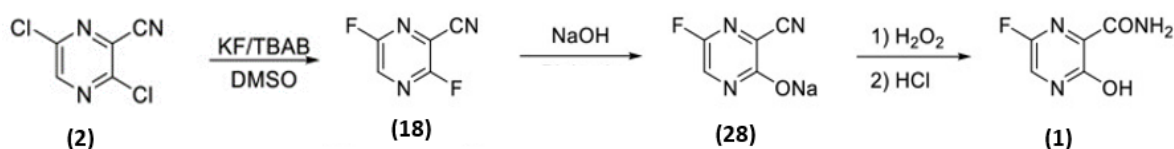


Slika 12. Shematski prikaz sintetskih puteva dobivanja favipiravira iz međuprodukta 3,6-diklorpirazin-2-karbonitrila¹¹

Zbog velikog broja metoda pripreve favipiravira, od kojih neke uključuju velik broj reakcijskih koraka, nepraktično je bilo optimizirati sve postupke. Zato su odabrane četiri sinteze koje imaju isti međuprodukt 3,6-diklorpirazin-2-karbonitril (2) te su uspoređena tri posljednja koraka koji vode do favipiravira (slika 12). Prva je bila ranije opisana Guova sinteza u kojoj nakon izolacije spoja 18 dolazi do hidrolize cijano-skupine s koncentriranom otopinom HCl te nastaje spoj 26 i na kraju se dodatkom vodene otopinom NaHCO_3 , uvodi hidroksilna skupina. Druga je Liuova sinteza iz 2017. godine, odnosno „one-pot“ sinteza koja uključuje fluoriranje, hidrolizu cijano-skupine i hidroksilaciju u jednoj reakcijskoj smjesi. U ovoj metodi 3,6-diklorpirazin-2-karbonitril (2) nije izoliran, nego nakon dodatka acetata, slijedi dodavanje dicikloheksilamina kako bi nastala dicikloheksilaminska sol 6-fluor-3-hidroksipirazin-2-karbonitrila (2). Dobivena sol razdijeljena je između vodene otopine NaOH i toluena kako bi se uklonio dicikloheksilamin, nakon čega slijedi hidroliza nitrila u vodenoj fazi s vodikovim

peroksidom čime je dobivena natrijeva sol favipiravira i u posljednjem koraku je dodan HCl za neutralizaciju.

Izolacija međuprodukta **2** kako bi ga se dobilo u čvrstome stanju je korak pri kojem se iz reakcije gubi značajna količina nastalog produkta, kao što je to rađeno u svim sintezama, osim u Liuovoj „one-pot“ sintezi. Zbog toga je ona rezultirala najvećim iskorištenjem. Međutim, takva sinteza može rezultirati nastankom reakcijske smjese iz koje će izolacija konačnog produkta biti otežana. Stoga je bolji pristup ekstrakcija međuprodukta **2** iz reakcijske smjese i direktna upotreba istog za iduću reakciju bez dodatnih pročišćavanja koja su rađena u prijašnjim sintezama, pri čemu gubitak međuprodukta nije bio velik. Takav sintetski put prikazan je na slici 13. Nakon fluoriranja s KF, međuprodukt **2** je ekstrahiran s toluenom čemu je zatim dodana razrijeđena vodena otopina NaOH što je rezultiralo nastankom spoja **28** u obliku natrijeve soli. Slijedi hidroliza nitrila pomoću vodikovog peroksida i neutralizacija dodatkom klorovodične kiseline te nastaje produkt **1** velike čistoće (> 99 %). Ovaj postupak nema nepotrebnih gubitaka međuprodukta **2** te koristi jeftinije reagense, a rezultira velikom čistoćom konačnog produkta **1** zbog čega nisu potrebni dodatni postupci pročišćavanja. Iskorištenje reakcije u tom slučaju iznosi 43 %.¹¹



Slika 13. Shematski prikaz modificirane sinteze favipiravira¹¹

Unaprijeđeni postupak sinteze favipiravira putem 3,6-diklorpirazin-2-karbonitrila (**2**) ne razlikuje se drastično od prijašnjih sinteza, ali male promjene na velikoj skali imaju puno veći utjecaj. Izbjegavanje postupka pročišćavanja međuprodukta **2**, kao i korištenje jeftinijih reagensa doprinosi ekonomičnoj i jednostavnijoj sintezi favipiravira koja se može prilagoditi različitim razmjerima.

§ 3. METABOLIZAM FAVIPIRAVIRA

3.1. Upotreba i važnost favipiravira

Influenca je akutna zarazna bolest dišnog sustava koju uzrokuju tri tipa RNK virusa influence, tipovi A, B i C, a kolokvijalno je poznatija pod nazivom gripa. Svake godine tijekom jeseni i zime u područjima s umjerenom klimom virusi tipa A i tipa B predstavljali su potencijalnu opasnost od nastanka epidemije, što je pokrenulo interes za potragom antivirusnih lijekova koji će suzbiti djelovanje virusa influence.

Favipiravir je pokazao učinkovitost protiv svih vrsta virusa influence, uključujući i vrste otporne na inhibitore neuraminidaze.¹⁵ Općenito, antivirusni lijekovi trebaju imati određene karakteristike kao što su primjerice djelovanje u ranom stadiju životnog ciklusa virusa, selektivnost i primjena na više vrsta virusa, a favipiravir zadovoljava sve uvjete. Taj spoj je analog gvanina (slika 14) koji u svojoj strukturi sadrži pirazinski prsten te se veže na virusnu RNK-ovisnu RNK-polimerazu (RdRp) što uzrokuje inhibiciju njezinog djelovanja. Mehanizam djelovanje još se uvijek istražuje, ali postoji niz eksperimenata, opisanih u idućem odlomku, koji su znatno pridonijeli boljem razumijevanju mehanizma. Utvrđeno je kako favipiravir selektivno inhibira djelovanje RdRp influence, ali da isti učinka ima i na mnoge druge RNK viruse.

U području zapadne Afrike u periodu od 2014. do 2016. izbila je epidemija Ebola virusa, te je od 28 616 zabilježenih slučajeva zaraze njih 11 310 završilo smrću. Kako cjepiva protiv svih oblika Ebole još nisu otkrivena, upotreba antivirusnih lijekova bila je i ostaje neizbježna. Zbog mogućnosti suzbijanja teške virusne zaraze influencom, pokreće se interes za proširenjem primjene favipiravira i kreću ispitivanja njegove djelotvornost i kod ostalih RNK virusa, tako i u borbi protiv Ebole. Međutim, klinička ispitivanja u vrijeme epidemije nisu bila dovršena te favipiravir nije bio odobren kao lijek protiv virusa Ebole. Određeno je da pacijenti smiju primiti samo manju dozu od preporučene što je smanjilo učinkovitost favipiravira, ali svejedno se pokazao djelotvornim u liječenju i olakšao podnošenje simptoma ovog često smrtonosnog virusa. Istraživanja favipiravira u liječenju zaraze Ebola virusom provode se i danas, a za sada

sugeriraju da je preporučena doza lijeka sigurna za upotrebu i učinkovita te primjena favipiravira ostaje kao opcija u liječenju osoba zaraženih Ebola virusom.¹⁶

Tijekom niza godina, utvrđeno je da lijek zaista učinkovito sprječava replikaciju mnogih RNK virusa. Neki primjer skupina virusa koje je trenutno moguće tretirati favipiravirom su arenavirusi i flavivirusi. Arenavirusi su uzročnici stalnih infekcija glodavaca, koji te viruse prenose na ljude, a najpoznatiji predstavnik ove skupine je virus groznice Lassa. Flavivirusi su skupina virusa čiji su prenositelji člankonošci, a najpoznatiji predstavnik je virus žute groznice, čest u zemljama Južne Amerike.¹²

Krajem prosinca 2019. godine u Wuhanu u Kini izbila je epidemija novog koronavirusa nazvanog teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2). Već do ožujka 2020. godine virusna zaraza proširila se svijetom te je proglašena globalna pandemija. Istraživanja lijekova i cjepiva protiv SARS-CoV-2 odvijala su se izvanrednom brzinom kako bi se što prije riješila pandemija. Kako SARS-CoV-2 pripada skupini RNK virusa, favipiravir ponovno postaje predmet mnogih istraživanja. Klinička istraživanja djelomično su se pokazala uspješnima jer je došlo do poboljšanja općenitog stanja pacijenata, ali nije bilo značajnog učinka na uklanjanje virusa.¹⁷ Rusija, Japan, Saudijska Arabiji i još nekoliko država je unatoč tome nastavilo koristiti ovaj lijek kod blažih slučajeva oboljenja od virusa jer ne izaziva veće nuspojave, međutim nije korišten kod trudnica zbog moguće teratogenosti.¹⁸

3.2. Istraživanje mehanizma djelovanja favipiravira

Kako bi se razjasnio mehanizam djelovanja favipiravira, prvo je trebalo eksperimentalno potvrditi u kojoj fazi ciklusa života RNK virusa lijek djeluje. Pokus je izveden na način da su stanice zaražene virusom influence tretirane favipiravirom u različito vrijeme životnog ciklusa virusa te je nakon deset sati izmjerena količina virusa u svakom eksperimentu. Ustanovljeno je da je favipiravir učinkovit jedino ako se dodaje za vrijeme replikacije virusa te da nema nikakvog učinka ni na jednu drugu fazu, što je bio jasni indikator da favipiravir djeluje na replikaciju virusa.

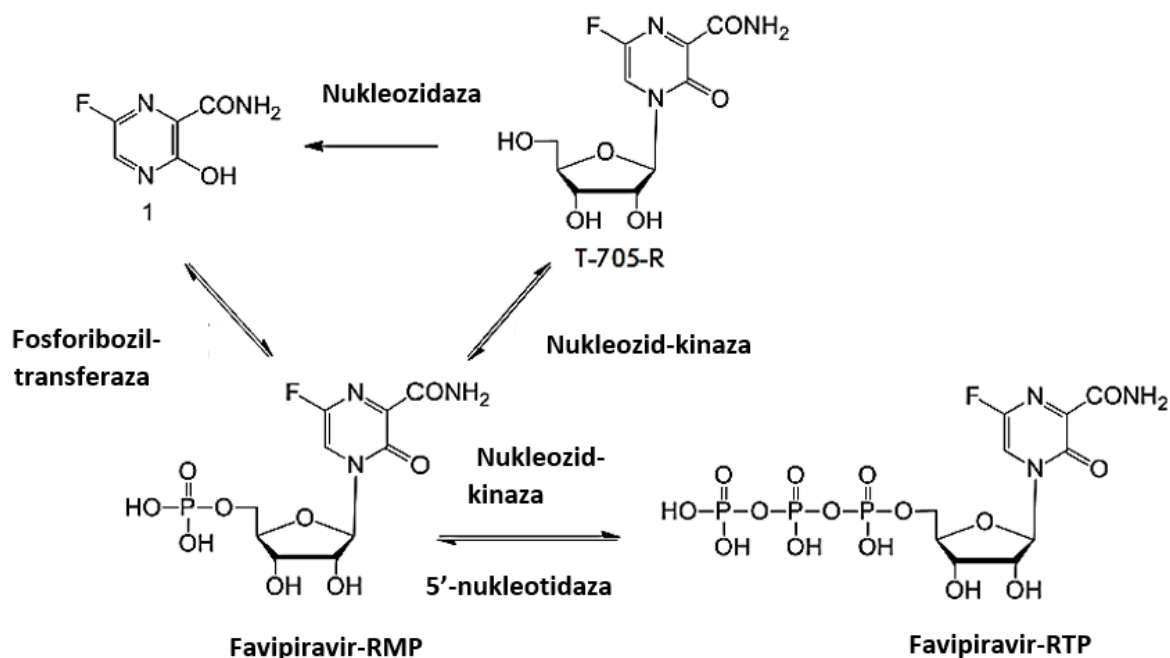
Ranije je spomenuta strukturna sličnost purinske baze gvanina s favipiravirom (slika 14), a kako bi se vidjelo ima li ta sličnost poveznice s mehanizom djelovanja izveden je pokus¹² u kojem je dodano prvo deset puta više purinskih baza, a u idućem pokusu isto toliko pirimidinskih. U pokusima je uočeno da samo dodatak viška purinskih baza smanjuje inhibicijsko djelovanje favipiravira zbog kompeticije za vezanjem na RdRp. Time je potvrđeno da favipiravir na neki način djeluje kao pseudo-purinska baza.



Slika 14. Strukturne formule molekula favipiravira (a) i gvanina (b)

U nastavku istraživanja ekstrahirani su stanični metaboliti djelovanja favipiravira iz Madin-Darby psećih stanica bubrega (*Madin-Darby canine kidney*, MDCK), model staničnih linija sisavaca koje se koriste u biomedicinskim istraživanjima, te su razdvojeni pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Pronađeni su metaboliti ribofuranozil-5'-trifosfat (RTP), favipiravir-ribofuranoza i favipiravir-ribofuranozil-5'-monofosfat (favipiravir-RMP), a pretvorba favipiravira u navedene metabolite odvija se prije ulaska u zaraženu stanicu, odnosno u izvanstaničnom tkivu (slika 15). Zatim su izvedena mjerenja ugrađivanja ³²P označenog gvanozin-trifosfat (GTP-a) u RNK-polimerazu virusa influence u prisutnosti različite količine sintetiziranog favipiravir-RTP. Otkriveno je da favipiravir-RTP već pri nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama inhibira djelovanje RNK-polimeraze. Isti pokus izveden je i s drugim metabolitima favipiravira, odnosno favipiravir-RMP i favipiravir-ribofuranozom, ali utjecaja na polimeraznu aktivnost ni u kojoj od ispitanih koncentraciji nije bilo. Time je ustanovljeno kako favipiravir djeluje kao prolijek koji fosforilacijom prelazi u aktivnu formu, favipiravir-RTP, te kao takav inhibira replikaciju virusa na način da ga polimeraza zamijeni za GTP te ga ugradi u novonastalu virusnu RNK. Druga mogućnost je da se favipiravir-RTP veže za domenu polimeraze i time onemogućuje polimerazi da ugrađuje nove nukleotide koji su ključni za replikaciju i transkripciju virusne RNK. Kasnije provedena *in vitro* istraživanja išla su u korist prve teorije te je dokazano kako polimeraza zaista može greškom umjesto GTP

ugraditi favipiravir-GTP. Potvrda za to bila je letalna mutageneza uzrokovana ugradnjom favipiravir-RTP na genomu virusa influence koja je rezultirala smanjenjem replikacije virusa te širenjem zaraze.

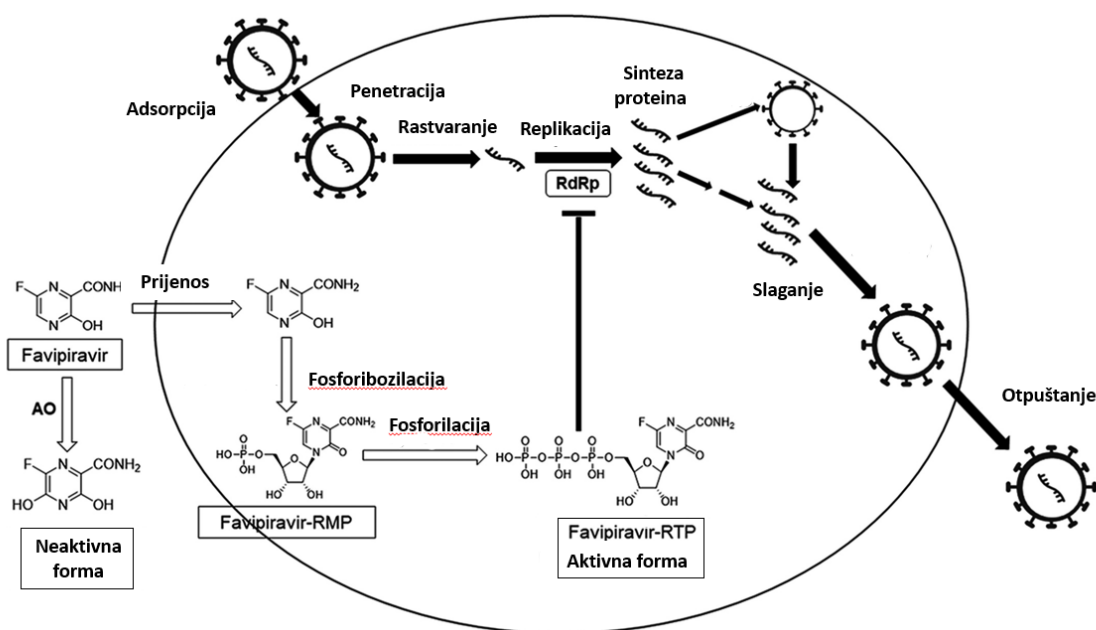


Slika 15. Shematski prikaz postupka pretvorbe prolijeka favipiravira u aktivni oblik favipiravir-RTP⁸

Način na koji favipiravir inhibira RdRp valjalo je detaljnije istražiti, stoga su napravljena još dva istraživanja. Jedno istraživanje vodio je znanstvenik Jin,¹² koji je sa svojim timom konstruirao RNK predložak koji formira tzv. ukosnicu, odnosno strukturu važnu za replikaciju RNK virusa. Tako konstruirana RNK dodana je kompleksu RNK-polimeraze, u prisutnosti favipiravir-RTP. Promatran je utjecaj ugradnje favipiravir-RTP u novonastali lanac u fazi elongacije. Uočeno je da se ugradnjom jedne molekule favipiravira djelomično zaustavlja produljenje lanca, a ugradnjom više molekula dolazi do potpunog sprječavanja produljenja RNK lanca. Drugo istraživanje vodili su Sangawa i njegovi suradnici¹² koji su proučavali fazu inicijacije transkripcije koju provodi također RNK-polimeraza te utvrdili da se ugradnjom samo jedne molekule favipiravir-RTP zaustavlja daljnje produljenje lanca, što objašnjava djelotvornost favipiravira pri izrazito malim koncentracijama.

Da bi se proučila selektivnost djelovanja lijeka proveden je pokus kojim se željelo usporediti djelovanje lijeka na stanice domaćina i virusa. S jedne strane ispitivano je djelovanje na ljudsku RNK i DNK-polimerazu, a s druge strane na virusnu. Već pri polovici inhibicijske

koncentracije dolazi do inhibicije aktivnosti virusne polimeraze, dok kod ljudskih polimeraza inhibicija od 50 % nije bila uočena ni pri dodatku puno veće koncentracije favipiravir-RTP. Zaključeno je da je favipiravir 2,650 puta više selektivan prema virusnoj polimerazi nego prema bilo kojem enzimu iz ljudskog organizma. Mehanizam djelovanja shematski je prikazan na slici 16.¹²



Slika 16. Shematski prikaz unutarstanične pretvorbe i mehanizma djelovanja prolijeka favipiravira koji inhibira replikaciju virusa¹⁹

§ 4. ZAKLJUČAK

Favipiravir je antivirusni lijek koji se od 2014. koristi pri liječenju težih oblika infekcije virusom influenza. Njegov mehanizam antivirusnog djelovanja, koji proizlazi iz aktivnog oblika molekule favipiravir-RTP, temelji se na inhibiciji djelovanja virusne RdRp, odnosno sprječavanju replikacije i uzrokovanju mutacije na virusnom genomu, čime se u konačnici onemogućuje nastajanje novih aktivnih virusa u stanici domaćina. Ispitivan je i učinak favipiravira pri liječenju SARS-CoV-2, a rezultati su pokazali kako je učinkovit jedino pri lakšim oblicima bolesti. Sinteza favipiravira moguća je iz različitih početnih molekula te najčešće uključuje nastajanje 3,6-diklorpirazin-2-karbonitrila kao međuprodukta. Sinteze se većinom sastoje od uobičajnih lako provedivih organskih reakcija, kao što su esterifikacija i amidacija, međutim kod neizbježnih reakcija fluoriranja i kloriranja često su potrebni reagensi koji nisu u skladu s konceptima zelene kemije. Novije metode nastoje izbjeći skupe i štetne reagense te povećati iskorištenje reakcija, ali trenutno niti jedna sinteza nije posebno istaknuta kao najisplativija. Zbog toga se i dalje istražuju novi sintetski putevi dobivanja favipiravira, koji bi pospješili njegovu proizvodnju na većim skalama i tako omogućili veću dostupnost ovog multifunkcionalnog lijeka.

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. Y. Furuta, B.B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D.F. Smee, D.L. Barnard, *Antiviral Res.* **100** (2013) 446–454.
2. F. Shi, Z. Li, L. Kong, Y. Xie, T. Zhang, W. Xu, *Drug Discov. Ther.* **8** (2014) 117–120.
3. Y.C. Martin, *Drug Discov. Today Technol.* **27** (2018) 59–64.
4. L. Antonov, *Theor Chem Acc* **139** (2020).
5. Q. Guo, M. Xu, S. Guo, F. Zhu, Y. Xie, J. Shen, *Chem. Pap.* **73** (2019) 1043–1051.
6. F.L. Liu, C.Q. Li, H.Y. Xiang, S. Feng, *Chem. Pap.* **71** (2017) 2153–2158.
7. S. V Beldar, U. Jordis, Synthetic Studies towards the Antiviral Pyrazine Derivative T-705, n.d.
8. I.D. Konstantinova, V.L. Andronova, I. V. Fateev, R.S. Esipov, *Acta Naturae* **14** (2022) 16–38.
9. F. Shi, Z. Li, L. Kong, Y. Xie, T. Zhang, W. Xu, *Drug Discov. Ther.* **8** (2014) 117–120.
10. Y.A. Titova, O. V. Fedorova, *Chem. Heterocycl. Compd. (N Y)* **56** (2020) 659–662.
11. H. Karatas, E.H.A. Hanashalshahaby, U. Catal, Y.E. Butun, E. Kurt, S. Gursel, A. Kaya, M. Guzel, *Chem. Pap.* **77** (2023) 1695–1702.
12. Y. Furuta, B.B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D.F. Smee, D.L. Barnard, *Antiviral Res.* **100** (2013) 446–454.
13. Hara, (12) United States Patent, 2014.
14. G. Arora, R. Shrivastava, P. Kumar, R. Bandichhor, D. Krishnamurthy, R.K. Sharma, A.S. Matharu, J. Pandey, M. Rizwan, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* **4** (2021).
15. Y. Furuta, B.B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D.F. Smee, D.L. Barnard, *Antiviral Res.* **100** (2013) 446–454.
16. J. Guedj, G. Piorowski, F. Jacquot, V. Madelain, T.H.T. Nguyen, A. Rodallec, S. Gunther, C. Carbonnelle, F. Mentré, H. Raoul, X. de Lamballerie, *PLoS. Med.* **15** (2018).
17. D.B. Shrestha, P. Budhathoki, S. Khadka, P.B. Shah, N. Pokharel, P. Rashmi, *Virolog. J.* **17** (2020) 141.
18. S. Joshi, J. Parkar, A. Ansari, A. Vora, D. Talwar, M. Tiwaskar, S. Patil, H. Barkate, *International Journal of Infectious Diseases* **102** (2021) 501–508.
19. Y.X. Du, X.P. Chen, *Clin. Pharmacol. Ther.* **108** (2020) 242–247.