

شیمی داروی ضد ویروس رمدسیویر: از طراحی تا سنتز

دکتر سلیمه عمیدی^۱، دکتر راضیه قدسی^۲

۱. گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

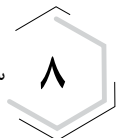
۲. گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

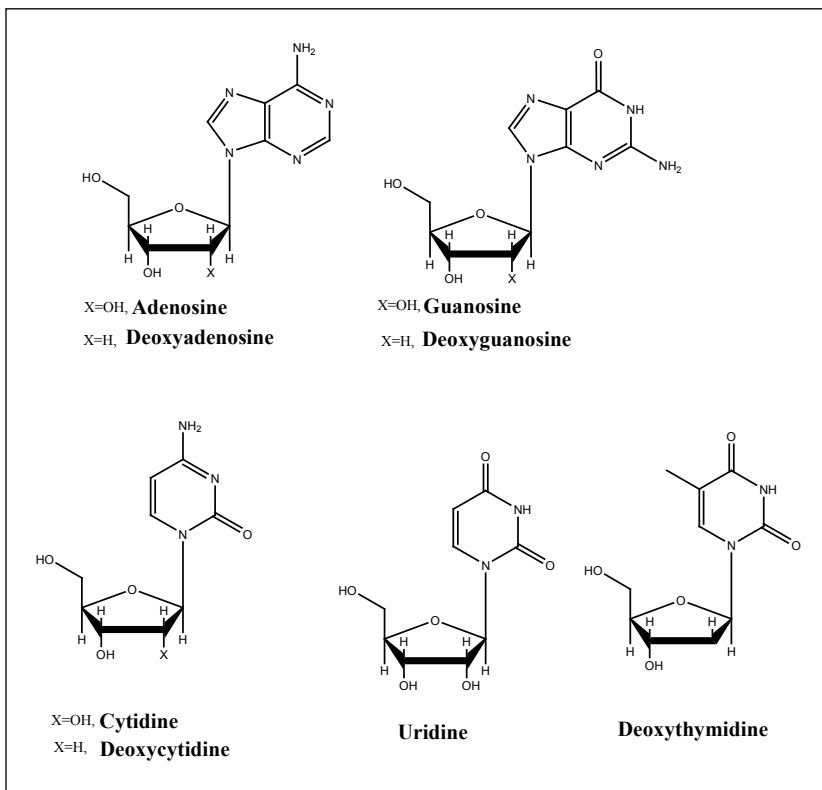
می‌شود، نباید برای انسان سمی باشد. یکی از روش‌های طراحی داروهای ضد ویروس، الهام گرفتن از ساختار پیش‌سازهای لازم برای رشد و تکثیر ویروس است. نوکلئوزیدهای طبیعی مانند سیتیدین، تیمیدین، اوریدین، گوانوزین و آدنوزین در ساختار RNA و DNA قرار دارند. با کوچک‌ترین تغییری در ساختار شیمیایی آنالوگ‌های طبیعی، این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان داروهای بالقوه در نظر گرفته شوند (شکل ۱). چنانچه ویروس، آنالوگ نوکلئوزیدی را به‌جای نوکلئوزید طبیعی در ساختار DNA و یا RNA خود استفاده نماید، ساختار طبیعی آن‌ها دستخوش تغییرات شده و سبب اختلال یا اتمام همانندسازی (Replication) و یا اختلال در سایر فرآیندهای بیولوژیک

با همه‌گیر شدن بیماری کووید - ۱۹ (COVID-19) در جهان، دانشمندان و محققان به منظور درمان و کنترل این بیماری ترکیبات و داروهای متعددی را مورد بررسی و مطالعه قرار دادند. یکی از ترکیبات ضد ویروس امیدبخش در دست تحقیق، رمدسیویر (Remdesivir) یا GS-۵۷۳۴ می‌باشد و کارآزمایی‌های بالینی متعدد و کنترل شده‌ای برای مطالعه اثربخشی و ایمنی رمدسیویر در درمان بیماران مبتلا به کووید - ۱۹ در حال انجام است (۱).

■ اساس طراحی مولکولی رمدسیویر

اساساً طراحی داروهای ضد ویروس کار آسانی نیست زیرا دارویی که باعث از بین بردن ویروس





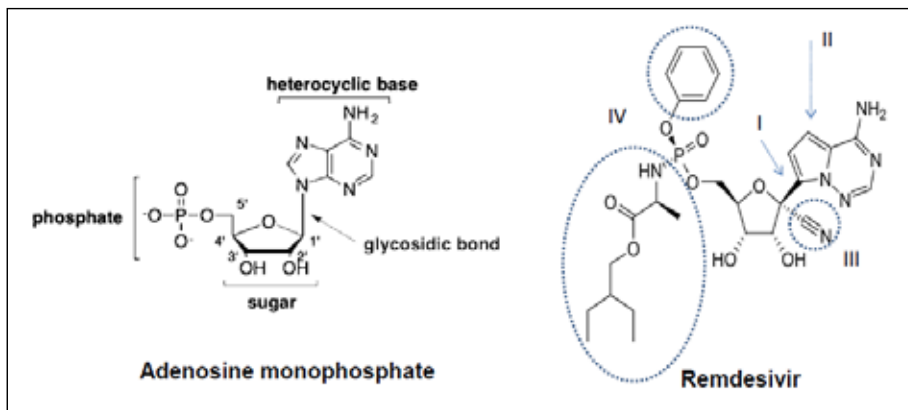
شکل ۱ - نوکلئوزیدهای طبیعی در ساختار DNA و RNA

کربن - کربن به یکدیگر متصل شده‌اند. این پیوند سبب افزایش پایداری ترکیب در مقابل بسیاری از آنزیم‌هایی می‌شود که پیوند گلیکوزیدی بین قند و باز را می‌شکنند (۳،۴). حضور گروه CN در ناحیه ۱' قند نیز ویژگی را در برابر پلیمراز و ویروسی افزایش می‌دهد و مانع از سمیت می‌شود (۴).

در فرآیند، همانندسازی DNA/RNA نوکلئوزیدها توسط کینازهای سلول میزبان یا ویروس، فسفریله و به فرم فعال تری فسفات تبدیل می‌شوند. بعد از آن توسط پلیمرازها و آنزیم‌ها شناسایی و در زنجیره

ویروس می‌شود (۲). رمدسیویر با فرمول مولکولی $C_{27}H_{35}N_6O_8P$ یک ترکیب ضد ویروس از دسته آنالوگ‌های نوکلئوزیدی می‌باشد.

رمدسیویر، مولکول تغییر یافته آدنوزین منوفسفات می‌باشد. آدنوزین از قند ریبوز و باز آلی آدین تشکیل شده است که از طریق تشکیل پیوند گلیکوزیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌گردد، در ساختار رمدسیویر نیز باز آلی نیتروژن دار به کار رفته، شباهت زیادی به آدین دارد اما در رمدسیویر قند و باز آلی از طریق پیوند



شکل ۲ - ساختار آدنوزین منوفسفات در سمت چپ و ساختار رمدهسیور در سمت راست نشان داده شده است. در مولکول رمدهسیور بخش I: پیوند کربن - کربن، بخش II: ساختار تغییر یافته باز آدنین، بخش III: گروه CN در ناحیه ۱' قند، بخش IV: گروه‌های آریل و استر اسید آمینه مشخص شده‌اند.

پیش دارو از آنالوگ‌های نوکلئوزیدی منوفسفات / منوفسفونات از طریق پوشاندن گروه منوفسفات و منوفسفونات با گروه‌های آریل و استر اسیدهای آمینه، تکنولوژی ProTide¹ نامیده می‌شود. هدف این روش پوشاندن اتم‌های اکسیژن گروه‌های فسفات در آنالوگ‌های نوکلئوزیدی منوفسفات و بیوایزواستر آنها یعنی نوکلئوزید فسفونات می‌باشد تا در pH فیزیولوژیک خنثی باشند و به راحتی بتوانند وارد سلول شوند. گروه‌های آریل و یا استرهای اسید آمینه پوشانده می‌شوند که در این صورت داخل سلول شکسته می‌شوند (۵، ۲). تکنولوژی پیش‌دارو ProTide در کشف پیش‌داروهای نوکلئوزیدی منوفسفات و منوفسفونات‌ها بسیار مهم می‌باشد و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است. بسیاری از پیش‌داروهای نوکلئوتیدی به‌عنوان ترکیبات ضد ویروس HIV، ضد ویروس هپاتیت B (HBV)،

در حال ساخت مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای نوکلئوزیدها با ساختار تغییر یافته نیز همین روند انجام می‌شود اما یکی از مهم‌ترین محدودیت‌ها در به‌کارگیری آنالوگ‌های نوکلئوزیدی به‌عنوان دارو، ویژگی کینازهای دخیل در مراحل فسفریلاسیون می‌باشد. اولین مرحله فسفریلاسیون، مرحله محدودکننده سرعت برای تبدیل به فرم تری فسفات فعال می‌باشد. آنالوگ‌های نوکلئوزیدی همیشه به‌طور مؤثر توسط آنزیم شناسایی نشده و در مرحله اول غیر فعال می‌مانند، بنابراین، محققان تلاش کردند که از آنالوگ‌های نوکلئوزیدی منوفسفاتی استفاده نمایند. اما این ترکیبات نیز بسیار قطبی بوده و از غشا سلولی به‌خوبی عبور نمی‌کنند. علاوه بر این پایداری درون تن (*In vivo*) کمی داشته و در جریان خون دفسفریله می‌شوند و یا توسط آنزیم‌های سلولی، به‌ویژه فسفاتازها نیز ممکن است تخریب شوند. تهیه

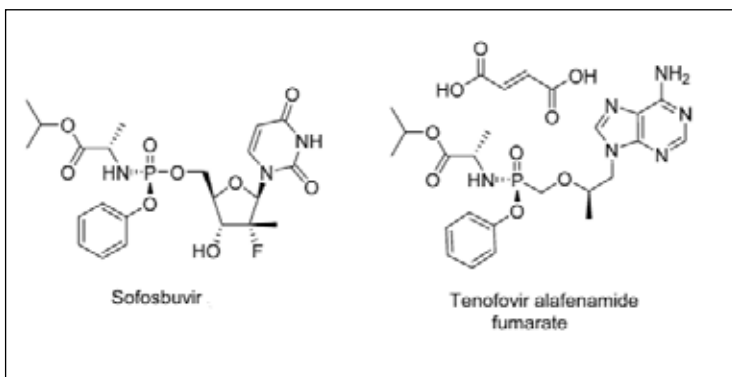
می‌شود و یک حلقه انیدرید پنج عضوی بسیار ناپایدار تشکیل می‌گردد که بعد از آن مولکول آب به گروه فسفات و یا به گروه کربونیل اسید آمینه حمله می‌کند و حلقه باز می‌شود و متابولیت آلانین GS-704277 تشکیل می‌گردد و توسط آنزیمی از نوع فسفرآمیداز پیوند بین فسفر و نیتروژن (P-N) شکسته می‌شود و نوکلئوزید منوفسفات آزاد می‌گردد. نوکلئوزید منوفسفات آزاد شده می‌تواند به وسیله نوکلئوزید فسفات کیناز میزبان (Host) فسفریله و به فرم فعال تری فسفات تبدیل شود در این صورت می‌تواند سوبسترای آنزیم RNA پلیمرز وابسته به RNA ویروس^۲ (RdRp) باشد (شکل ۴، ۵، ۱).

در واقع رمدسیویر یک پیش داروی منوفسفاته می‌باشد و در بدن بعد از تری فسفاته شدن می‌تواند با آدنوزین تری فسفات (ATP) در قرار گیری در ساختار RNA رقابت کند. با استفاده آنزیم از نوکلئوزید تری فسفاته تشکیل شده از رمدسیویر و قرار دادن آن در داخل رشته RNA سبب می‌شود که پس از

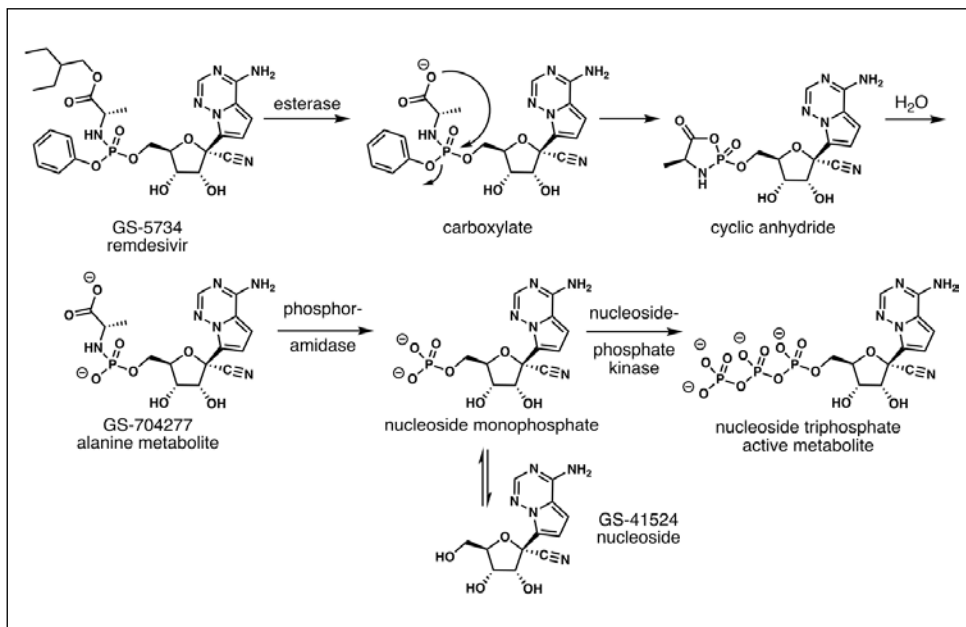
ضدویروس هپاتیت C (HCV)، ضدویروس ابولا و برخی نیز به عنوان ترکیبات ضدسرطان ساخته شده‌اند. پیش‌داروی فسفونامیدات تنوفویر آلفانامید (Tenofovir alafenamide) برای درمان ایدز و پیش‌داروی فسفرآمیدات سوفوسبوویر (Sofosbuvir) برای درمان هپاتیت C، توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) تأیید شده‌اند (۵، ۴) (شکل ۳). در رمدسیویر گروه فسفات توسط فنیل و استر اسید آمینه (اتیل بوتیل L- آلانینات) پوشانده شده است تا نفوذپذیری آن به داخل سلول افزایش یابد (۶، ۴).

■ مکانیسم تبدیل پیش دارو به داروی فعال

زمانی که رمدسیویر وارد سلول می‌شود ابتدا باید متابولیزه شود تا نوکلئوزید منوفسفات آزاد شود. در مرحله اول، استر متصل به آمینو اسید توسط استراز شکسته می‌شود. گروه کربوکسیلات آزاد حاصل در pH فیزیولوژیک دارای بار منفی است و به فسفات یا فسفونات حمله کرده و باعث ترک گروه فنوکسید



شکل ۳ - ساختار تنوفویر آلفانامید (Tenofovir alafenamide) و سوفوسبوویر (Sofosbuvir)



شکل ۴ - رمدهیویر (GS-5734) و نحوه تبدیل آن به متابولیت فعال (نوکلوئوزید تری فسفات) (Y)

■ روش اول سنتز رمدهیویر

این سنتز دارای پنج مرحله می باشد (شکل ۵).
□ مرحله اول: واکنش گلیکوزیلاسیون (تشکیل بانده کربن - کربن)

واکنش ریبولاکتون (ترکیب ۱) با هسته برمومپیرولوتری آزین (ترکیب ۲) منجر به تشکیل پیوند کربن - کربن می شود. در این واکنش از محافظت N با گروه سیلیل استفاده شده است و به دنبال آن تعویض لیتیم - هالوژن با استفاده از واکنش بوتیل لیتیم و دمای ۷۸- درجه انجام شده است. پیرو لوتری آزین لیتیم دار با ریبولاکتون (ترکیب ۱) جفت شده و مخلوط ایزومر ۱ نوکلئوزید (ترکیب ۳) تشکیل می شود.

اضافه شدن چند نوکلئوتید به RNA، ساخت رشته RNA ویروس خاتمه یابد و آنزیم مهار شود (۸، ۱).

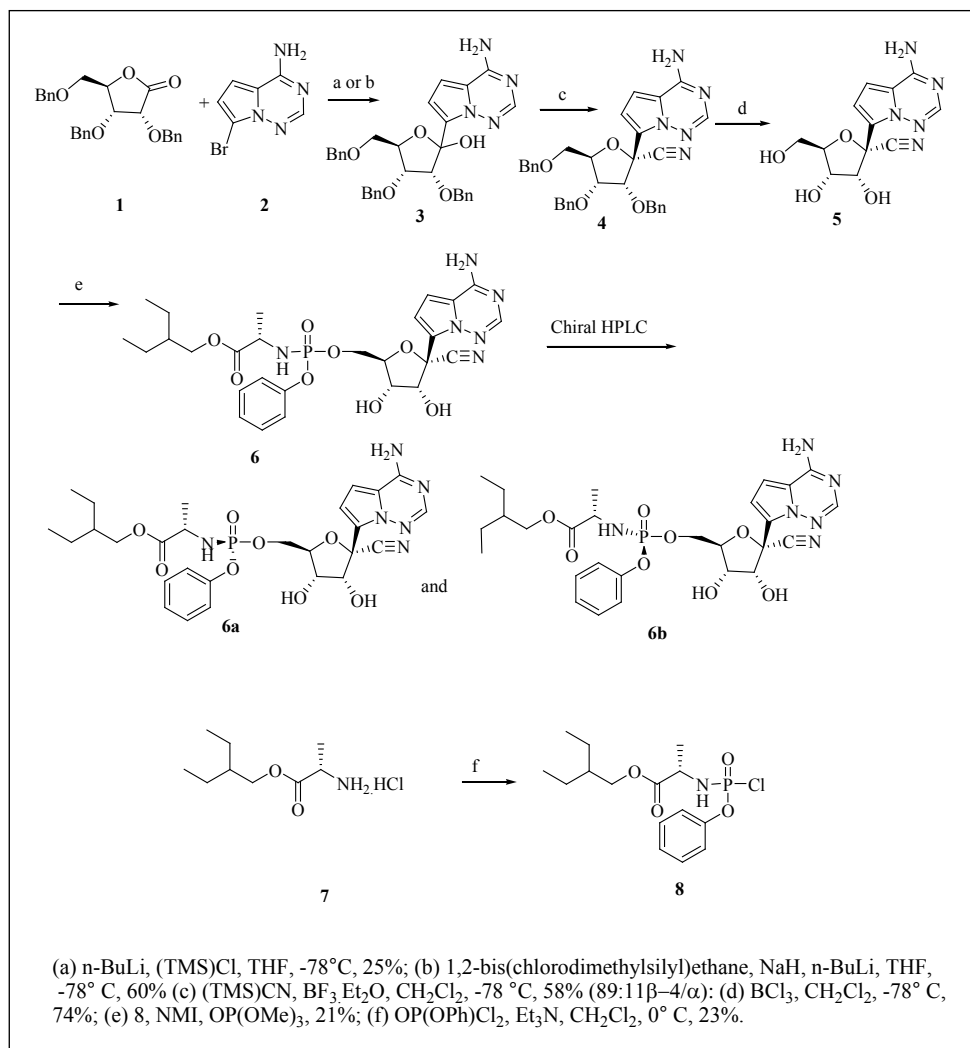
■ سنتز رمدهیویر

سنتز رمدهیویر از مواد اولیه نیاز به واکنشگرهای متعدد و شرایط ویژه دارد که برخی از مواد شیمیایی مورد نیاز و واکنشها خطرناک نیز می باشند. همچنین از آنجایی که مولکول رمدهیویر دارای شش مرکز کایرال می باشد برای به دست آوردن ایزومر خالص مورد نظر نیز، نیاز به روش های جداسازی کایرال و یا کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالای تهیه ای (Preparative HPLC) می باشد (۹، ۱۰، ۴).

سیانید $(\text{TMSCN})_3$ وارد واکنش می‌شود و بعد از خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی، آنومر بتا (ترکیب ۴) به دست می‌آید.

□ مرحله دوم: قرار دادن گروه CN در موقعیت ۱' قند

در این مرحله گروه CN در موقعیت ۱' قند قرار داده می‌شود. ترکیب ۳ با تری‌متیل‌سیلیل



شکل ۵ - روش اول سنتز رمدسیویر (۶b)

– کربن از طریق واکنش ریپولاکتون (ترکیب ۱) با ترکیب یددار (ترکیب ۹) تشکیل می‌شود. تعویض هالوژن – فلز در ترکیب حاوی ید (ترکیب ۹) راحت‌تر انجام می‌گیرد و سازگار با کمپلکس $(i\text{-PrMgCHLiCl})$ می‌باشد. در این مرحله به جای استفاده از بوتیل لیتیم از واکنشگر توربو – گرینبارد $(i\text{-PrMgCHLiCl})^4$ استفاده شده است. در این روش، سنتز نوکلئوزید در دمای ملایم‌تر انجام شده، بازده ثابت و بالاتری دارد و امکان سنتز ترکیب در حجم زیاد را فراهم می‌سازد.

در مرحله دوم نیز مشابه روش سنتز اول گروه CN به ناحیه ۱' نوکلئوزید (ترکیب ۳) اضافه می‌شود اما ترکیب ۴ با نسبت آنومری بیش از ۹۵:۵ آنومر بتا به دست می‌آید. استفاده از تریفلیک اسید $(\text{TfOH})^5$ منجر به بازده بالا و انتخابی بودن بالایی شده و نیاز به جداسازی کایرال در این مرحله وجود ندارد. مرحله سوم و چهارم در روش دوم سنتز شامل برداشتن گروه محافظت‌کننده بنزیل (دبنزیله کردن) و اضافه کردن گروه محافظ استوناید می‌باشد. در این مرحله بعد از برداشتن گروه محافظت‌کننده بنزیل، گروه‌های OH ناحیه ۲' و ۳' با استوناید محافظت می‌شوند و این امر باعث می‌شود که واکنش بعدی یعنی جفت شدن نوکلئوزید ۱۰ با جز پیش‌دارو (ترکیب ۱۲) با بازده مناسب‌تری انجام شود. مرحله آخر جفت شدن نوکلئوزید محافظت شده با استوناید (ترکیب ۱۰) و ترکیب پارا نیتروفتولات ۲ – اتیل بوتیل – L – آلانینات (ترکیب ۱۲) می‌باشد. در این مرحله، جفت شدن در حضور MgCl_2 انجام می‌شود و محصول دیاستروسلکتیو از طریق واکنش جانشیننی نوکلئوفیلی دو مولکولی^۶

□ مرحله سوم: برداشتن گروه محافظت‌کننده بنزیل (دبنزیله کردن)

در نهایت با حذف گروه‌های محافظ تری‌بنزیل، نوکلئوزید (ترکیب ۵) به دست می‌آید.

□ مرحله چهارم و پنجم: جفت شدن نوکلئوزید (ترکیب ۵) با کلریدات (ترکیب ۸) و خالص‌سازی رمدهیویر (ترکیب ۶b)

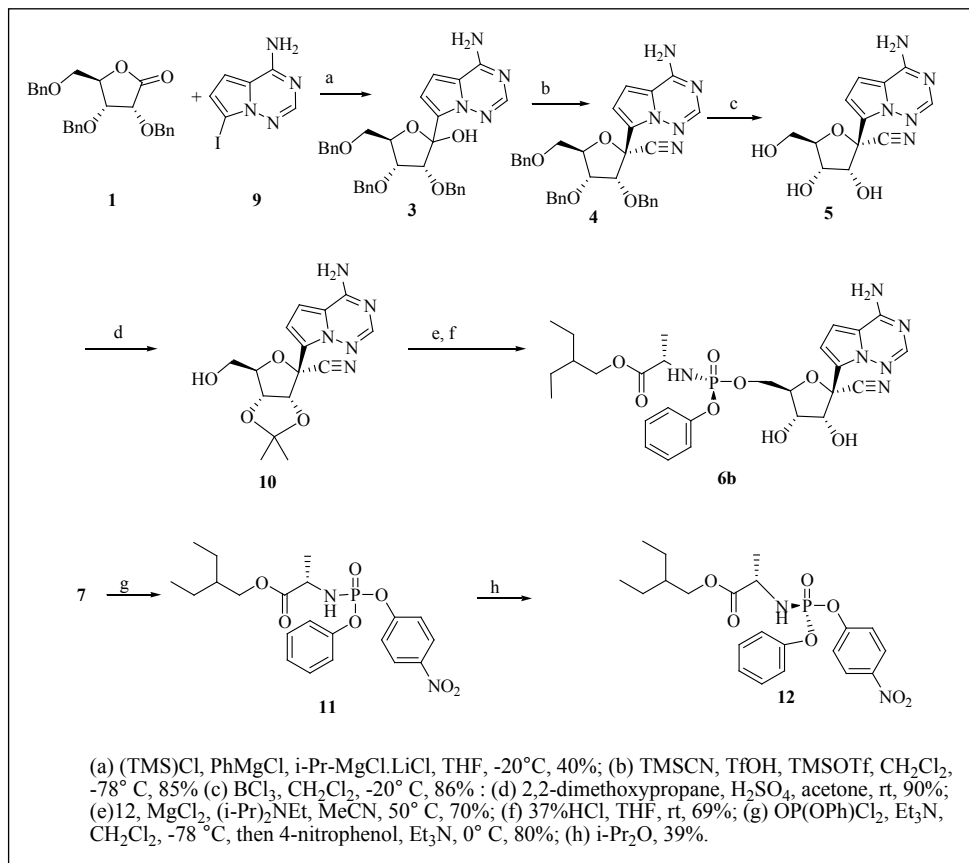
مخلوط دیاستریومر استخلاف پیش‌دارو فسفر آمیدوبیل کلریدات (ترکیب ۸) با کمک مشتق L – آلانین ساخته می‌شود. در نهایت، طی واکنش نوکلئوزید (ترکیب ۵) و کلریدات (ترکیب ۸) مخلوط پیش‌داروی فسفر آمیدات با نسبت دیاستریومری ۱:۱ تشکیل می‌شود. دو دیاستریومر با استفاده از HPLC با ستون کایرال از یکدیگر جدا می‌شوند.

□ چالش‌ها و محدودیت‌های روش اول سنتز

روش اول سنتز دارای مشکلات و محدودیت‌هایی است که این روش را برای سنتز رمدهیویر در حجم زیاد نامناسب می‌کند. از جمله این مشکلات می‌توان به متغیر بودن و غیر قابل پیش‌بینی بودن بازده واکنش‌ها، انتخابی بودن نامناسب، استفاده از دمای کرایوژنیک، نیاز به کروماتوگرافی کایرال و ... اشاره نمود.

■ روش دوم سنتز رمدهیویر

روش دوم سنتز نیز مشابه روش اول دارای پنج مرحله می‌باشد اما با تغییراتی که در برخی واکنش‌ها و شرایط انجام آن‌ها صورت گرفته بازده واکنش‌ها و انتخابی بودن آن‌ها تغییر کرده است (شکل ۶). مرحله اول از روش دوم سنتز، مشابه روش قبل تشکیل پیوند کربن – کربن است اما باند کربن



شکل ۶ - روش دوم سنتز رمدسیویر (6b)

طراحی مولکول رمدسیویر، بسیار منطقی انجام شده است و سنتز این دارو نیاز به واکنش‌های خاص و در بعضی مراحل به واکنشگر کایرال نیاز دارد که باعث افزایش هزینه سنتز این دارو می‌شود. امید است این داروی ارزشمند بتواند باعث نجات جان انسان‌ها در برابر ویروس‌های مختلف از جمله ویروس کووید - ۱۹ گردد که زندگی ما انسان‌ها را دچار مشکل کرده است.

(SN₂) به‌دست می‌آید. مرکز کایرال فسفر دچار وارونگی می‌شود و در نهایت، با حذف گروه محافظ، ترکیب رمدسیویر (ترکیب 6b) به‌صورت تک ایزومر با بازده حدود ۶۹ درصد به‌دست می‌آید. به‌طور کلی، روش دوم سنتز نسبت به روش اول سنتز از دما و شرایط ملایم‌تری استفاده شده است و انتخابی بودن و بازده بالاتری داشته و قابلیت سنتز ترکیب با حجم بالاتر را دارد (۴).

1. ProTide: PROdrug + nucleoTIDE
2. RNA-dependent RNA polymerase
3. Trimethylsilyl cyanide
4. Turbo Grignard reagent
5. Triflic acid
6. Biomolecular nucleophilic substitution (SN2) reaction

1. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, Simeonov A, Shen M, Patnaik S. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci* 2020; 6(5): 672-683.
2. Yates MK, Seley-Radtke KL. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res* 2019; 162(October 2018): 5-21.
3. Seley-Radtke KL, Yates MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part I: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res* 2018; 154: 66-86.
4. Siegel D, Hui HC, Doerffler E, Clarke MO, Chun K, Zhang L. Discovery and Synthesis of a Phosphoramidate Prodrug of a Pyrrolo[2,1-f][triazin-4-amino] Adenine C-Nucleoside (GS-5734) for the Treatment of Ebola and Emerging Viruses. *J Med Chem* 2017; 60(5): 1648-1661.
5. Mehellou Y, Rattan HS, Balzarini J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic. *J Med Chem* 2018; 61(6): 2211-2226.
6. Yan VC, Muller FL. Advantages of the Parent Nucleoside GS-441524 over Remdesivir for Covid-19 Treatment. *ACS Med Chem Lett* 2020; 9;11(7): 1361-1366.
7. Remdesivir - Wikipedia [Internet]. [cited 2020 Sep 2]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Remdesivir#cite_ref-Eastman_2020_103-0
8. Amirian ES, Levy JK. Current knowledge about the antivirals remdesivir (GS-5734) and GS-441524 as therapeutic options for coronaviruses. *One Heal* 2020; 9: 100128.
9. Vieira T, Stevens AC, Chtchemelinine A, Gao D, Badalov P, Heumann L. Development of a Large-Scale Cyanation Process Using Continuous Flow Chemistry En Route to the Synthesis of Remdesivir. *Org Process Res Dev* 2020; 10; acs.oprd.0c00172.
10. Synthesis of Remdesivir by Mackman [Internet]. [cited 2020 Aug 5]. Available from: <https://www.organic-chemistry.org/totalsynthesis/totsyn07/remdesivir-mackman.shtml>

