

# Sinteza i karakterizacija amidnog prolijeka tafamidisa

---

**Grus, Nikola**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:998564>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikola Grus**

**Sinteza i karakterizacija amidnog prolijeka  
tafamidisa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Kristine Pavić.

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Pavić na pomoći, stručnom vodstvu, strpljenju i ukazanom povjerenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala i svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku kemiju na pomoći i ugodnom društvu u laboratoriju.*

*Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog školovanja.*

Rad je izrađen u sklopu projekta *Uloga transtiretina u leptomeningealnoj i cerebrovaskularnoj amiloidozi povezanoj sa sporadičnom Alzheimerovom bolesti i neuroprotektivni potencijal prolijeka tafamidisa – TransADamis* (voditeljica dr. sc. Ana Babić Perhoč, Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet) financiranog od strane Pfizer Inc. u sklopu programa *Global TTR Amyloidosis Research ASPIRE*.

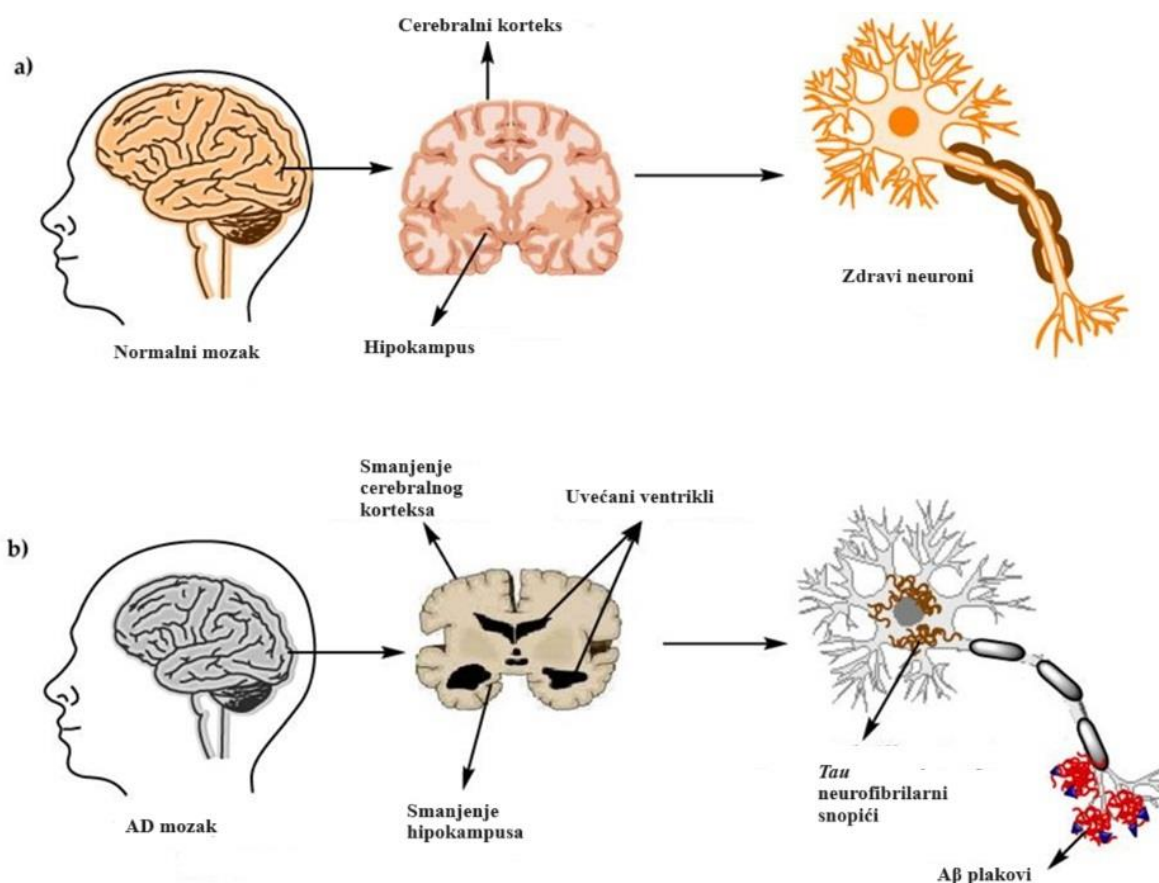
# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Alzheimerova bolest</b> .....	2
<b>1.2. Postojeća terapija Alzheimerove bolesti</b> .....	5
<b>1.2.1. Inhibitori kolinesteraze</b> .....	5
<b>1.2.2. Memantin</b> .....	6
<b>1.2.3. Monoklonska protutijela</b> .....	7
<b>1.3. Amiloidoze i transtiretin</b> .....	7
<b>1.4. Tafamidis</b> .....	9
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	13
<b>3.1. Sinteza <i>tert</i>-butil 4-(2-(3,5-diklorfenil)benzo[<i>d</i>]oksazol-6-karbonil)piperazin-1-karboksilata (1)</b> .....	15
<b>3.2. Sinteza (2-(3,5-diklorfenil)benzo[<i>d</i>]oksazol-6-il)(piperazin-1-il)metanona (2)</b> .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	17
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	28
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	30
<b>7. LITERATURA</b> .....	33
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	38
<b>9. PRILOZI</b> .....	41

## **1. UVOD**

## 1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je ireverzibilna progresivna neurodegenerativna bolest karakterizirana ekstracelularnim nakupljanjem amiloida  $\beta$  (engl. *amyloid  $\beta$* , A $\beta$ ) u plakove i agregacijom mikrotubularnih tau proteina u neuronima (Breijyeh i Karaman, 2020) i najčešći je tip demencije u starijih osoba. Prvi znakovi AD-a su suptilni gubitci memorije te blage promjene u raspoloženju. Sporo, ali neprekidno, kognitivne sposobnosti se smanjuju, dolazi do poteškoća u izražavanju i akumulacije bihevioralnih promjena, što značajno onemogućuje neovisnost oboljelog. Osim spomenutih bihevioralnih i mikroskopskih promjena, dolazi i do strukturalnih promjena u mozgu, odnosno dolazi do progresivnog nestajanja sinapsi, što rezultira vidljivim smanjenjem mozga u kasnijim fazama bolesti (Drew, 2018).



**Slika 1.** Fiziološka struktura mozga i neurona u (a) zdravom mozgu i (b) mozgu osobe koja boluje od AD (preuzeto iz Breijyeh i Karaman (2020) uz dopuštenje izdavača)

AD se može podijeliti na tri stadija: rana, srednja i kasna AD. U ranoj AD osoba je još uvijek samostalna, ali su mogući gubitci pamćenja, poput zaboravljanja poznatih riječi ili lokacije svakodnevno korištenih objekata. U srednjem stadiju AD-a simptomi demencije su izraženiji, dok su simptomi u kasnom stadiju AD-a izrazito teški, pa tako osoba gubi sposobnost odgovora na svoju okolinu te sposobnost razgovora, a na kraju i sposobnost kontrole pokreta (Stages of Alzheimer's, [www.alz.org/alzheimers-dementia/stages](http://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages), pristupljeno 18.04.2024.).

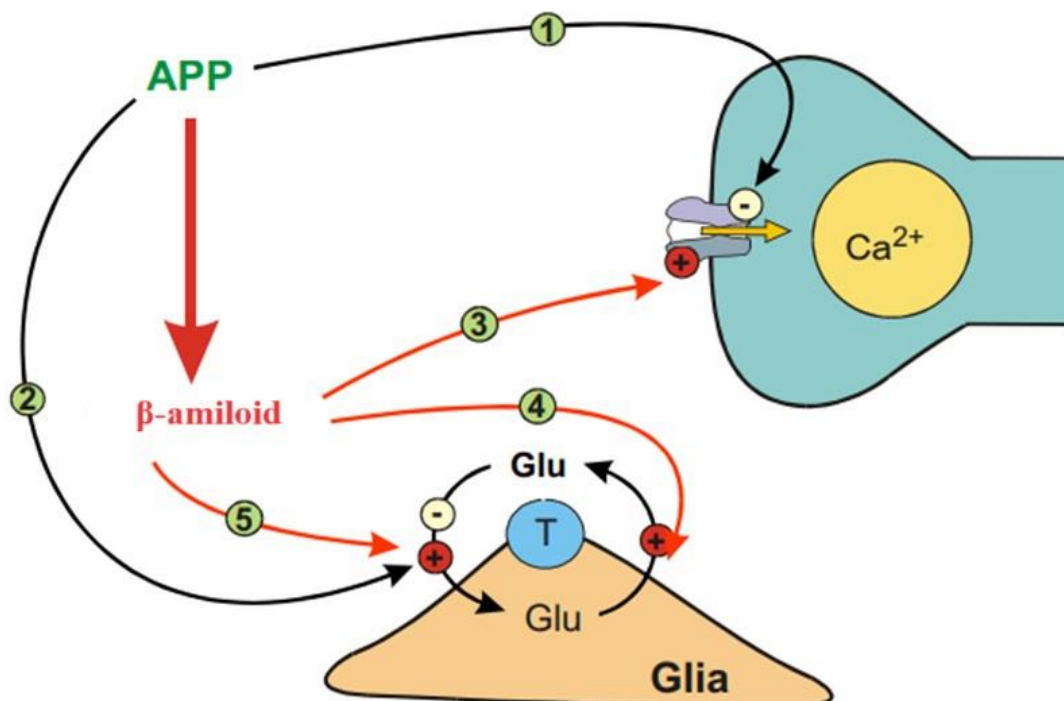
Pouzdana dijagnoza AD-a može se uspostaviti ukoliko postoji klinički utvrđena demencija, kognitivni deficiti u barem dva područja uz očuvanje svijesti te odsustvo drugih sustavnih poremećaja ili neuroloških deficita koji bi mogli biti odgovorni za progresivne deficite u kogniciji i pamćenju (McKhann i sur., 1984).

Na temelju genetičke osnove, AD može se podijeliti na dva oblika: nasljedni i sporadični oblik bolesti. Nasljedna AD naziva se i rani oblik AD-a (engl. *early-onset Alzheimer's disease*, EOAD). Ovaj oblik bolesti prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi se javljaju prije 65. godine života. Ovaj oblik bolesti manjim dijelom uzrokuju mutacije u genu za prekursor proteina A $\beta$  (engl. *amyloid- $\beta$  precursor protein*, APP), a većim dijelom mutacije u genima za presenelin 1 (engl. *presenelin 1*, P1) i presenelin 2 (engl. *presenelin 2*, P2). Prevalencija ovog oblika AD-a manja je od 0,1%. Češći, sporadični oblik AD-a javlja se nakon 65. godine života te se naziva i kasni oblik AD-a (engl. *late-onset Alzheimer's disease*, LOAD). Brojne studije ukazuju na postojanje velikog broja različitih gena koji bi mogli igrati ulogu u razvoju ovakvog oblika bolesti, ali još uvijek nisu utvrđeni geni koji bi direktno mogli biti odgovorni za razvoj bolesti (Malnar i sur., 2009).

AD čini 60% do 80% svih demencija. Procjenjuje se da demencija trenutno zahvaća oko 50 milijuna pacijenata širom svijeta te indirektno utječe na živote desetaka milijuna osoba koje se godinama moraju nositi s kognitivnim propadanjem bliskih osoba (Rostagno, 2022). Noviji podaci ukazuju na to da će se svjetska prevalencija do 2050. godine utrostručiti (Scheltens i sur., 2022). Osim utjecaja na živote pacijenata te živote njima bližnjih osoba, AD predstavlja i značajni financijski teret za zdravstveni sustav. *Alzheimer's Associations* procjenjuje da će troškovi za 2024. godinu iznositi oko 350 milijardi američkih dolara (Alzheimer's disease facts and figures, 2024., [www.alz.org](http://www.alz.org), pristupljeno 02.04.2024.).



Predloženi su različiti patološki mehanizmi koji bi mogli biti uzrok promjena koje se javljaju kod AD-a. Neki od tih mehanizama su agregacija A $\beta$  peptida i njegovo odlaganje u obliku plakova, hiperfosforilacija proteina tau što rezultira nastankom nakupina neurofibrilarnih snopića, neurovaskularna disfunkcija, upalni procesi i oksidativni stres. Vrlo je vjerojatno da središnju ulogu u patogenezi AD-a ima promijenjen metabolizam, odnosno razina peptida A $\beta$ . Promijenjen metabolizam peptida A $\beta$  je začetnik kaskade događaja koja završava neurodegeneracijom i AD-om. A $\beta$  je, suprotno prvotnim nagađanjima, protein koji nastaje u „normalnoj“, odnosno zdravoj stanici. U AD-u dolazi do povećanog stvaranja, pa tako i nakupljanja A $\beta$  uslijed promijenjenog procesiranja APP-a. U normalnim uvjetima vlada ravnoteža između nastajanja A $\beta$  iz APP-a djelovanjem  $\beta$ -sekretaze i  $\gamma$ -sekretaze te njegovog uklanjanja (Malnar i sur., 2009). APP inhibira djelovanje glutamata, odnosno djeluje kao antagonist glutamatnih receptora te uklanja glutamat iz sinapsi. S druge strane, A $\beta$  aktivira glutamatne *N*-metil-D-aspartat receptore (engl. *N-methyl-D-aspartate receptor*, NMDAR) te povećava koncentraciju glutamata u sinaptičkoj pukotini tako što potiče lučenje glutamata iz okolnih stanica. Tim djelovanjem na glutamatni sustav A $\beta$  potiče ekscitotoksično djelovanje glutamata (Parsons i sur., 2007).



**Slika 2.** Shematski prikaz utjecaja APP i A $\beta$  na glutamatni sustav (preuzeto iz Parsons i sur., 2007, uz dopuštenje izdavača)

Neurofibrilarni snopci sadrže hiperfosforilirani oblik proteina tau. Protein tau se normalno nalazi u neuronima, veže se na mikrotubule te regulira njihovo sastavljanje i stabilnost. Hiperfosforilacija proteina tau uzrokuje razgradnju mikrotubula i nakupljanje hiperfosforiliranog oblika proteina unutar stanice što kao posljedicu ima poremećaj u transportu unutar neurona te smetnje u sinaptičkoj funkciji neurona. Nakupljanje hiperfosforiliranog oblika tau proteina, za razliku od nakupljanja A $\beta$ , nije svojstveno samo za AD, već i za druge neurodegenerativne bolesti i oblike demencije (Malnar i sur., 2009).

## **1.2. Postojeća terapija Alzheimerove bolesti**

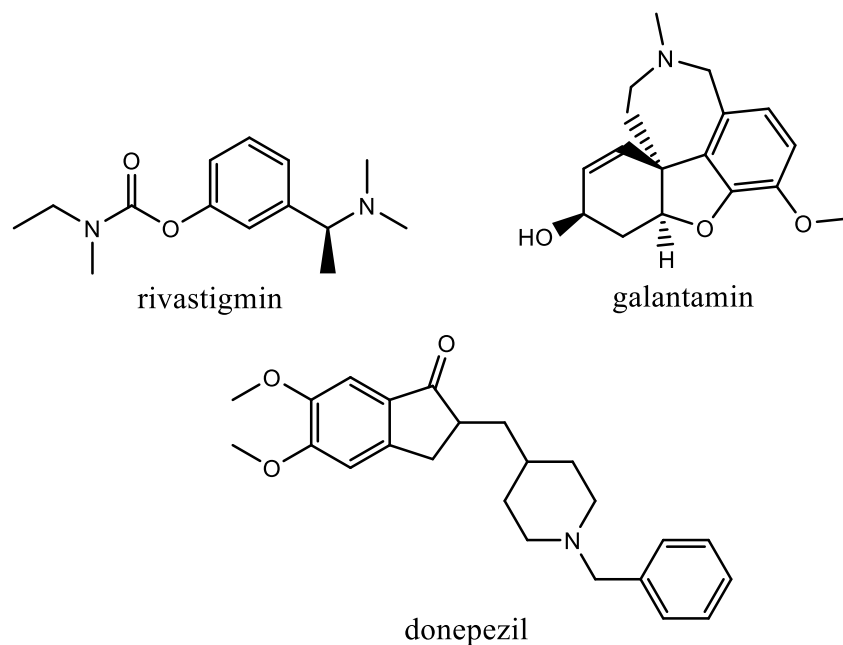
Današnja terapija više je fokusirana na tretiranje simptoma AD-a, a ne na samu bolest, odnosno nema adekvatne terapije koja bi mogla usporiti tijek bolesti. Trenutno su odobrena četiri lijeka za tretiranje AD-a podijeljena u dvije skupine: inhibitori kolinesteraze (donepezil, galantamin, rivastigmin) te lijek koji djeluje na glutamatni sustav (memantin). Najnoviji lijekovi su monoklonska protutijela koja potiču uklanjanje A $\beta$  (Nordvall i sur., 2023).

Prepoznate su i razne druge mete za simptomatsku terapiju AD-a, kao i za terapiju koja mijenja tijek bolesti. Moguće mete za terapiju koja mijenja tijek bolesti su proizvodnja A $\beta$ , degradacija A $\beta$ , uklanjanje A $\beta$ , prevencija A $\beta$  toksičnosti, tau protein, upala i mitohondrijska disfunkcija (Grill i sur., 2010).

### **1.2.1. Inhibitori kolinesteraze**

Usljed neurodegenerativnih procesa koji se odvijaju u AD dolazi do propadanja neurona, i to najviše kolinergičkih neurona. Taj nedostatak kolinergičkih neurona najizraženiji je u hipokampusu i korteksu. Inhibitori kolinesteraze inhibiraju razgradnju acetilkolina i tako povisuju koncentraciju acetilkolina u sinapsama (Chen i sur., 2022). Inhibitori kolinesteraze (engl. *cholinesterase*, ChE) koji se koriste u terapiji AD se dodatno mogu podijeliti u dvije skupine; selektivne inhibitore acetilkolinesteraze (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) te dvojne inhibitore AChE i butirilkolinesteraze (engl. *butyrylcholinesterase*, BChE). U selektivne inhibitore AChE ubrajaju se donepezil i galantamin, a u dvojne inhibitore AChE i BChE rivastigmin. Lijekovi se, osim u selektivnosti, razlikuju i u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima, što značajno utječe na sigurnost, tolerabilnost i učinkovitost (Grossberg, 2003). Donepezil je indiciran u svim stadijima bolesti, a rivastigmin i galantamin

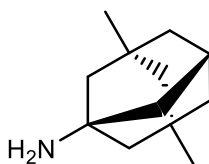
su indicirani kod blagog do srednje jakog oblika bolesti. Ova terapija omogućuje simptomatsko poboljšanje memorije, kognicije, raspoloženja i ponašanja i na taj način olakšava funkcioniranje u svakodnevnim aktivnostima (Grutzendler i Morris, 2001). Strukture spomenutih inhibitora kolinesteraze prikazane su na Slici 3.



**Slika 3.** Inhibitori kolinesteraza

### 1.2.2. Memantin

Memantin je antagonist glutamatnih NMDAR. Tim djelovanjem on smanjuje neurotoksično djelovanje glutamata za koje se smatra da je uključeno u patofiziologiju AD-a i drugih neurodegenerativnih bolesti. Memantin blokira pretjeranu aktivaciju NMDAR, ali omogućuje normalnu aktivnost tih receptora (Kuns i sur., 2023). Indiciran je za terapiju srednjeg do jakog oblika AD-a, a *off-label* se primjenjuje i u terapiji različitih psihijatrijskih stanja poput shizofrenije, bipolarnog poremećaja, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, depresije i drugih stanja (Bains i sur., 2022). Struktura memantina prikazana je na Slici 4.



**Slika 4.** Memantin

### 1.2.3. Monoklonska protutijela

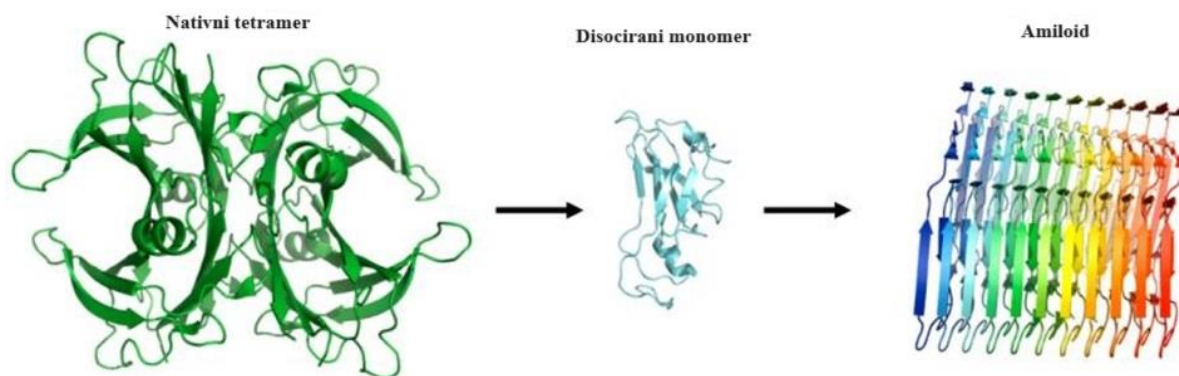
Monoklonska protutijela koja ciljaju A $\beta$  su najnovija dostupna terapija za AD. Ona vežu nakupine A $\beta$  te tako potiču klirens A $\beta$  iz mozga te potencijalno uklanjaju i izravne i neizravne štetne učinke A $\beta$ . Ovi lijekovi mijenjaju tijek bolesti te usporavaju kognitivno propadanje (Rabinovici i La Joie, 2023). Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) je odobrila dva monoklonska protutijela koja ciljaju A $\beta$  – adukanumab i lekanemab. Treće monoklonsko protutijelo, donanemab, trebalo bi biti odobreno do kraja 2024. Adukanumab i lekanemab su odobreni ubrzanim postupkom (fda.gov).

### 1.3. Amiloidoze i transtiretin

Amiloidoze su heterogena skupina bolesti koje nastaju kao rezultat odlaganja toksičnih netopljivih agregata proteina amiloida u različitim tkivima. Bolest može biti stečena ili nasljedna, te lokalizirana ili sustavna. Amiloid se može odlagati u jetri, slezeni, bubrezima, srcu, živcima i krvnim žilama te tako izazvati različite kliničke sindrome, poput kardiomiopatije, hepatomegalije, proteinurije, neuropatije te otkazivanja bubrega (Bustamante i Zaidi, 2023). Najčešći tipovi amiloidoza su primarna amiloidoza, sekundarna amiloidoza, obiteljska amiloidoza te amiloidoza divljeg tipa. Primarna amiloidoza je najčešći tip bolesti. Uzrokovana je prekomjernom proizvodnjom amiloidnih lakih lanaca imunoglobulina. Sekundarnu amiloidozu karakterizira protein serumski amiloid A. Taj protein normalno nastaje u organizmu kao odgovor na upalu ili infekciju, a do njegovog pojačanog odlaganja dolazi uslijed kroničnih upalnih stanja, poput reumatoidnog artritisa. Obiteljska amiloidoza je nasljedna bolest u kojoj organizam proizvodi mutantni oblik proteina transtiretina (TTR). Mutirani oblik TTR-a će vjerojatnije stvarati amiloidne nakupine. Amiloidoza divljeg tipa ili senilna amiloidoza se javlja u starijoj životnoj dobi, a nastaje kao rezultat odlaganja normalnog, nemutiranog oblika TTR-a (stanfordhealthcare.org).

TTR je tetramerni transportni protein sastavljen od četiri identične podjedinice izgrađene od 127 aminokiselina. Sintetizira se primarno u jetri i koroidnom pleksusu (engl. *choroid plexus*, CP), a izlučuje se u plazmu, cerebrospinalni likvor (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF) i oko. Visoko je očuvan u nekoliko vrsta sisavaca te u biljaka, nematoda i bakterija (Saponaro i sur., 2020). TTR prenosi tiroidni hormon tiroksin (T4) i protein koji veže retinol (engl. *retinol-binding protein*, RBP) u jetru. Tetramerni TTR može disocirati *in vivo* u fragmentirane ili

potpune monomere koji mogu agregirati. Takvi proteinski agregati nakupljaju se u tkivima, primarno u perifernim živcima i srcu. Mutacije u tom proteinu vezane su uz nasljednu transtiretinsku amiloidozu (ATTR). Tu bolest karakterizira pogrešno sklapanje TTR-a i nakupljanje amiloida, što dovodi do polineuropatije ili kardiomiopatije ovisno o tipu mutacije. Transtiretinska amiloidna kardiomiopatija može nastati i kao proces starenja, a ne mutacije u proteinu. Takav tip bolesti naziva se transtiretinska amiloidoza divljeg tipa (ATTRwt).



**Slika 5.** Predloženi mehanizam agregacije TTR-a. Nativni tetramer TTR je stabilan i fiziološki aktivan, dok disocijacija nenativnih monomera pokreće patofiziološke procese (preuzeto iz Saponaro i sur., 2020, uz dopuštenje izdavača)

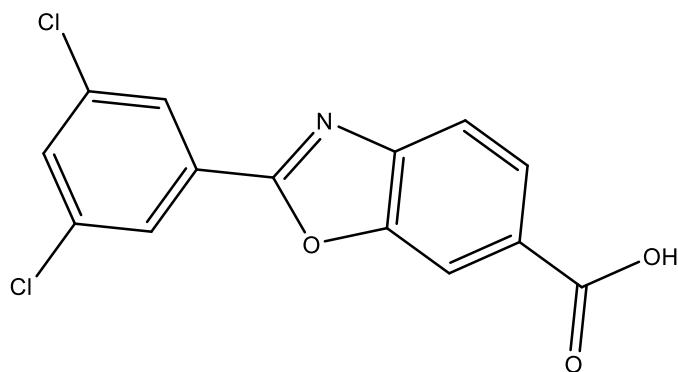
TTR je zanimljiva meta u terapiji neurodegenerativnih bolesti zbog njegovih prepoznatih neuroprotektivnih svojstava. Neuroprotektivni učinci TTR-a u AD-u dokazani su brojnim *in vivo* i *in vitro* studijama, kao i kliničkim studijama (Saponaro i sur., 2020). Schwarzman i suradnici su još 1996. opisali mogućnost TTR-a da inhibira agregaciju A $\beta$  i toksičnost (Schwarzman i sur., 1996).

Trenutna terapija transtiretinske amiloidoze zasniva se na stabilizaciji tetramernog oblika TTR-a te na smanjenju ekspresije TTR-a utišavanjem gena (Liz i sur., 2020). Ekspresija TTR-a može se smanjiti farmakološkim agensima. *Antisense* oligonukleotidi (engl. *antisense oligonucleotides*, ASO) su komplementarni ciljanoj glasničkoj ribonukleotidnoj kiselini (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) i na taj način blokiraju ekspresiju TTR-a. Primjer takvog lijeka je inotersen. Osim ASO, mogu se koristiti i male interferirajuće ribonukleinske kiseline (engl. *small interfering ribonucleic acid*, siRNA). siRNA su male, nekodirajuće, dvolančane molekule ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) koje prepoznaju i degradiraju ciljanu mRNA, u ovom slučaju mRNA za TTR. Primjeri ovakvih lijekova su patisiran i

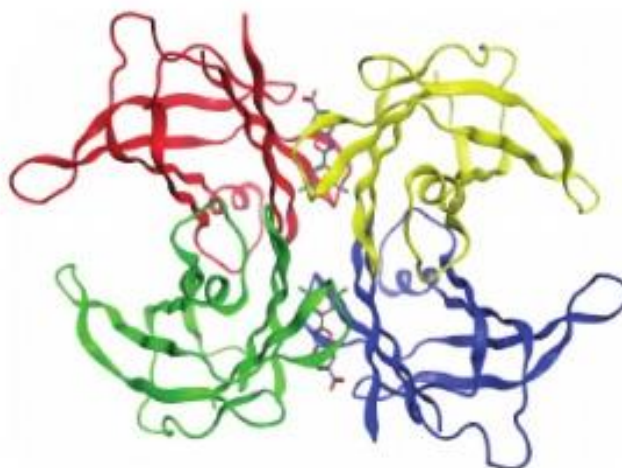
vutisiran (Mallus i Rizzello, 2023). Stabilizatori tetramernog oblika TTR-a vežu se na vezno mjesto za T4 ili stabiliziraju mutirani T119M oblik TTR-a. Prvoj skupini pripadaju tafamidis i diflunisal, a drugoj skupini akoramidis (Morfino i sur., 2023).

#### 1.4. Tafamidis

Tafamidis je prva terapija koja mijenja tijek bolesti za ATTR i ATTRwt. On stabilizira kvarternu strukturu TTR tetramera te tako smanjuje njegovu disocijaciju u monomere koji agregiraju i tako stvaraju amiloidne fibrile. Veže se na dva vezna mjesta za T4 na TTR-u, te tako stabilizira slabije TTR dimer-dimer interakcije (Lamb, 2021). Struktura tafamidisa prikazana je na Slici 6, a na Slici 7 je prikazan strukturni model vezanja tafamidisa na TTR.



**Slika 6.** Tafamidis



**Slika 7.** Strukturni model vezanja tafamidisa na TTR (preuzeto iz Buxbaum, 2012 uz dopuštenje izdavača)

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Prevalencija AD-a je u porastu, najviše zbog starenja opće populacije. Pretpostavlja se da će se do 2050. godine svjetska prevalencija bolesti utrostručiti. AD je progresivna, neurodegenerativna bolest koja značajno onemogućuje individualno funkcioniranje oboljelog, ali utječe i na kvalitetu života oboljelom bližnjih osoba. Osim toga, ona predstavlja značajni financijski teret za zdravstveni sustav. Pretpostavka je da će troškovi terapije ove bolesti u SAD-u 2024. godine iznositi 350 milijuna američkih dolara.

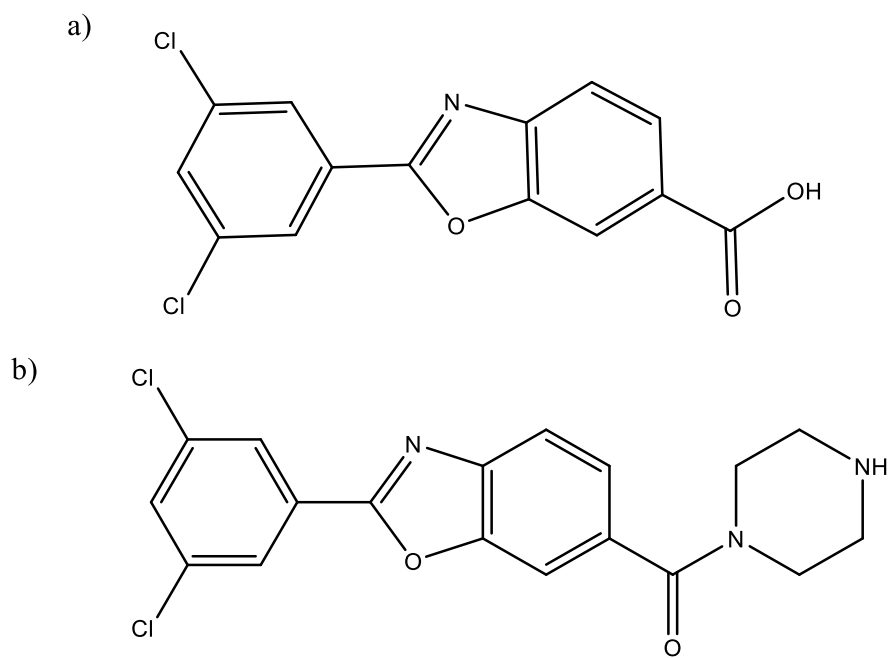
Postojeća terapija AD-a, izuzev nedavno odobrenih monoklonskih protutijela, samo je simptomatska. Monoklonska protutijela su najnoviji lijekovi, te su ujedno i lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti. Ona su odobrena po ubrzanom postupku, što znači da je njihova učinkovitost i sigurnost prosuđena na temelju surogatne krajnje točke. Surogatna krajnja točka predstavlja ishod u kliničkim studijama, koji je moguće odrediti prije kraja samih istraživanja.

Tafamidis je lijek indiciran za terapiju transtiretinske amiloidoze. Transtiretinsku amiloidozu karakterizira odlaganje amiloida u tkivima uslijed disocijacije transtiretina. Tafamidis stabilizira tetramernu nativnu formu transtiretina i tako blokira agregaciju i odlaganje amiloida. Najznačajnija i najizglednija hipoteza nastanka AD-a je amiloidna hipoteza. Ona govori da je ključni akter u patofiziologiji AD-a A $\beta$  koji se nakuplja uslijed prevelike proizvodnje A $\beta$  i/ili neadekvatnog uklanjanja istog. Međutim, tafamidis ne prelazi krvno-moždanu barijeru (KMB).

Cilj ovog rada je sinteza i karakterizacija amidnog prolijeka tafamidisa (Slika 8) koji ima mogućnost prolaska KMB-a na temelju prethodno opisanog postupka (Sinha i sur., 2020). Sintetizirani spoj te međuprodukt u sintezi karakterizirani su infracrvenom spektrometrijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR), masenom spektrometrijom (MS),  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR), a relativna čistoća produkata određena je tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Fizikalno-kemijska svojstva koja utječu na farmakokinetičke parametre predviđena su računalnim programom SwissADME.

Sposobnost amidnog prolijeka tafamidisa da stabilizira TTR u središnjem živčanom sustavu i ublaži streptozotocinom induciranu neurodegeneraciju i kognitivni deficit bit će ispitana *in vivo* studijama na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koje prelaze okvire ovog diplomskog rada.





**Slika 8.** Struktura (a) tafamidisa i (b) amidnog prolijeka tafamidisa

### **3. MATERIJALI I METODE**

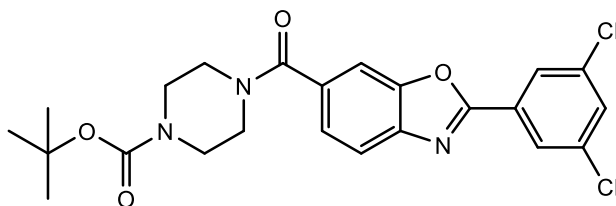
Tijek reakcija i čistoća produkta praćeni su tankoslojnom kromatografijom (engl. *thin layer chromatography*, TLC). Korištene su silikagel pločice 60 GF<sub>254</sub> (Merck, Njemačka) te diklormetan/metanol u omjeru 95:5 kao mobilna faza. Za kromatografiju na koloni kao nepokretna faza korišten je silikagel veličine čestica 0,063 – 0,200 mm (Sigma Aldrich, SAD), uz istu pokretnu fazu kao u TLC-u. Analizirani spojevi detektirani su UV zračenjem ( $\lambda = 254$  nm i  $\lambda = 366$  nm).

Infracrveni spektri su snimljeni na PerkinElmer Spectrum Two (PerkinElmer, SAD) spektrofotometru s Fourierovom transformacijom uz upotrebu UATR (engl. *Universal Attenuated Total Reflectance*) instrumentalnog dodatka s dijamantom kao unutarnjim refleksijskim elementom. <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV-600 (Bruker, SAD) kod 600 MHz za <sup>1</sup>H i kod 151 MHz za <sup>13</sup>C jezgru. Uzorci su mjereni u DMSO-*d*<sub>6</sub> otopinama na 20 °C u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kemijski pomaci izraženi su u ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard u <sup>1</sup>H, odnosno signal dimetilsulfoksida (DMSO) u <sup>13</sup>C spektru. Spektri masa su snimljeni spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije na instrumentu Shimadzu Nexera XR LCMS-2020 (Shimadzu, Japan). Pokretna faza sastojala se od Milli-Q vode kao komponente A i MeOH (HPLC kvaliteta, J. T. Baker) kao komponente B, dok je za stacionarnu fazu korištena Zorbax XDC C18 kolona (4,6 × 75 mm, 3,5 μm). Korištena je gradijentna elucija pri brzini protoka od 0,5 mL/min, a po analizi je injektirano 5 μL otopine analita. Početni uvjeti i gradijent podešeni su prema polaritetu analita. Koristio se detektor s nizom dioda (DAD, engl. *diode array detector*), a podaci su prikazani kao kromatogram ukupne valne duljine (TWC, engl. *total wavelength chromatogram*). Uvjeti za masenu spektrometriju bili su sljedeći: korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI) u pozitivnom i negativnom modu; napon kapilare postavljen je na 1,3 kV; protok plina za nebulizaciju bio je 1,5 L/min; a temperatura i protok plina za sušenje (dušika) bili su 300 °C i 10 L/min. Za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava koja utječu na farmakokinetičke parametre korišten je računalni alat SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska).

Sve korištene kemikalije i otapala bili su *p.a.* čistoće. Bezvodni *N,N*-dimetilformamid (DMF), otopina klorovodika (4,0 M) u dioksanu i etil-acetat nabavljeni su od tvrtke Sigma Aldrich (SAD); tafamidis je nabavljen od tvrtke SIA “Chemspace” (Latvija), a *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA), heksafluorofosfat azabenzotriazol tetrametil uronij (HATU) i *N*-Boc-piperazin su nabavljeni od tvrtke Tokyo Chemical Industries (Japan). Diklormetan (DCM) je nabavljen od

tvrtke Fischer Scientific (UK); metanol je nabavljen od tvrtke Honeywell (SAD); dietil-eter je nabavljen od tvrtke ITW Reagents (Njemačka), a dioksan je nabavljen od tvrtke Kemika (Hrvatska).

### 3.1. Sinteza *tert*-butil 4-(2-(3,5-diklorfenil)benzo[*d*]oksazol-6-karbonil)piperazin-1-karboksilata (**1**)



Tafamidis (1,22 g, 3,96 mmol, 1 eq), HATU (2,56 g, 6,732 mmol, 1,7 eq) i DIEA (1,536 g, 0,76 g/mL, 2,021 mL, 111,88 mmol, 3 eq) pomiješani u bezvodnom DMF-u (10 mL). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta dodan je *N*-Boc-piperazin (0,811 g, 4,356 mmol, 1,1 eq). Idući dan u reakcijsku smjesu dodana je destilirana voda do prestanka taloženja. Talog je odsisan te pročišćen kromatografijom na koloni uz mobilnu fazu diklormetan/metanol (95/5). Organsko otapalo upareno je pod sniženim tlakom, a talog rastavljen u eteru i odsisan. Dobiveni spoj **1** korišten je u idućem reakcijskom koraku.

Iskorištenje reakcije: 1185 mg (75%)

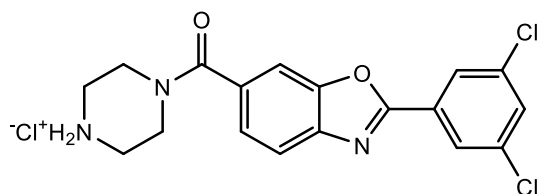
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,17 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 2H), 7,96 (t,  $J$  = 1,9 Hz, 1H), 7,92 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H), 7,91–7,88 (m, 1H), 7,50 (dd,  $J$  = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 3,63 (s, 4H), 3,42 (s, 1H), 1,41 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  168,33, 161,03, 153,82, 149,94, 142,00, 135,22, 133,76, 131,54, 129,41, 125,83, 124,46, 120,29, 110,27, 79,23, 39,66, 28,02.

IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  2982, 2900, 2863, 1687, 1631, 1590, 1569, 1548, 1489, 1456, 1414, 1363, 1331, 1282, 1247, 1164, 1137, 1108, 1051, 1010, 995, 960, 944, 935, 878, 858, 845, 803, 772, 742, 723, 664, 640, 587, 554, 479  $\text{cm}^{-1}$ .

Relativna čistoća (HPLC): 100%.

### 3.2. Sinteza (2-(3,5-diklorfenil)benzo[d]oksazol-6-il)(piperazin-1-il)metanona (2)



Spoj **1** (1185 mg, 2,488 mmol) otopljen je u dioksanu (6 mL) i dodana mu je HCl u dioksanu (4 M, 6 mL). Miješano je na sobnoj temperaturi. Idući dan talog odsisan. Talog je rastrljan u etil-acetatu te odsisan. Dobiveni spoj **2** je konačni produkt u ovoj sintezi.

Iskorištenje reakcije: 996 mg (97%)

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,43 (s, 2H), 8,17 (d,  $J = 1,9$  Hz, 2H), 7,97 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 7,97 (t,  $J = 1,9$  Hz, 1H), 7,94 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,55 (dd,  $J = 8,2, 1,5$  Hz, 1H), 3,57 (s, 4H), 3,18 (s, 4H).

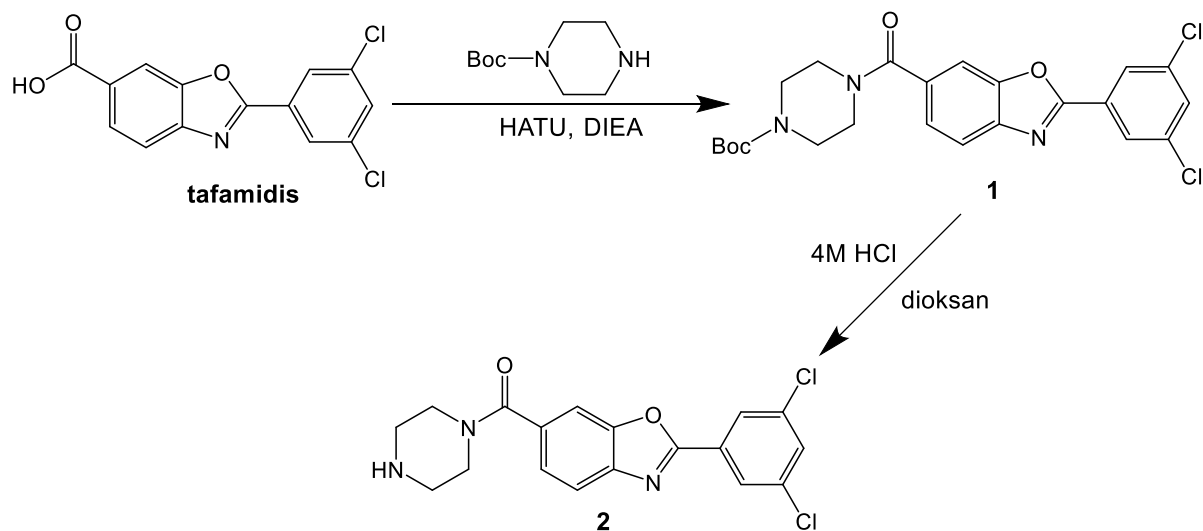
$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  168,40, 161,12, 149,91, 142,20, 135,23, 132,95, 131,59, 129,35, 125,83, 124,61, 120,35, 110,46, 42,43, 39,62.

IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3361, 2934, 2807, 2732, 2488, 1625, 1589, 1571, 1547, 1500, 1435, 1335, 1286, 1269, 1196, 1136, 1120, 1103, 1080, 1043, 1014, 953, 935, 915, 900, 873, 862, 839, 800, 770, 739, 727, 665, 635, 587, 498  $\text{cm}^{-1}$ .

Relativna čistoća (HPLC): 100%.

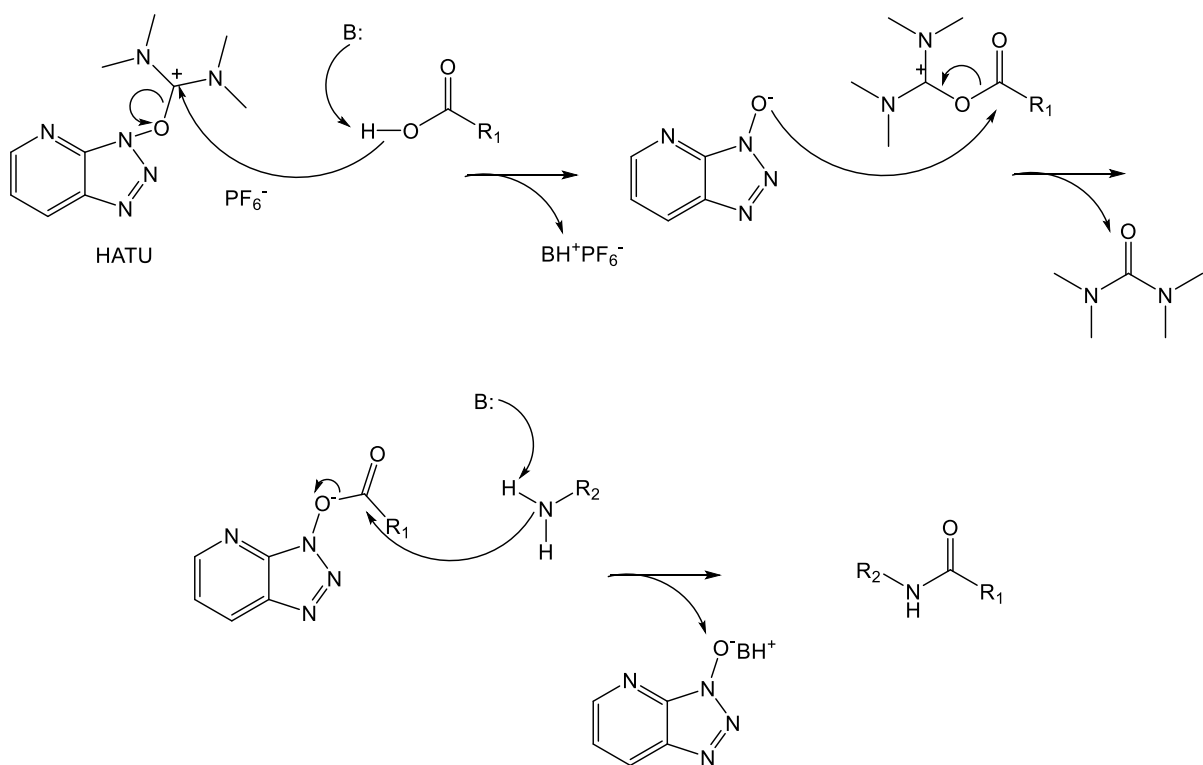
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu sintetiziran je amidni prolijek tafamidisa prema prethodno objavljenom postupku (Sinha i sur., 2020). Njegova sinteza provedena je prema Shemi 1.



**Shema 1.** Shema sinteze amidnog prolijeka tafamidisa

Prvi korak u sintezi amidnog prolijeka tafamidisa bila je priprava (2-(3,5-diklorfenil)benzo[*d*]oksazol-6-il)(piperazin-1-il)metanona (**1**). Spoj **1** sintetiziran je *coupling* reakcijom tafamidisa i *N*-Boc-piperazina pomoću *coupling* reagensa HATU i Hünigove baze DIEA. Hünigova baza DIEA deprotonira karboksilnu kiselinu tafamidis, pri čemu nastaje anion koji napada elektrofilni ugljikov atom *coupling* reagensa HATU. Nastali anion reagira s aktiviranom karboksilnom kiselinom i nastaje stabilniji aktivirani ester. Dodatkom amina u reakcijsku smjesu dolazi do nukleofilnog napada dušika na elektrofilni karbonilni ugljik aktiviranog estera, pri čemu nastaje konačni produkt amid. U reakciji je korišten suvišak Hünigove baze koji je potreban za deprotoniranje karboksilne kiseline i amina. Opći mehanizam *coupling* reakcije prikazan je na shemi 2. Sinteza i karakterizacija amida **1** prethodno je opisana (Sinha i sur., 2020).



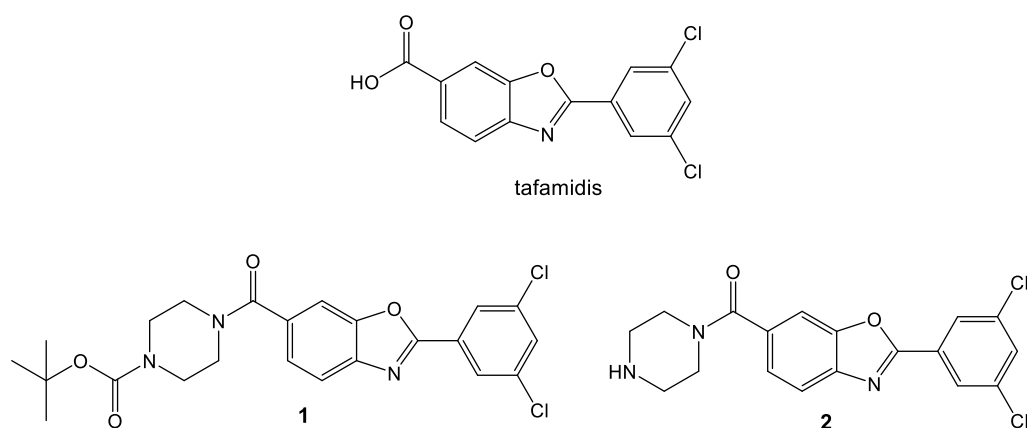
**Shema 2.** Opći mehanizam *coupling* reakcije

Sinteza željenog spoja **2** provedena je kiselim hidrolizom karbamata pomoću klorovodične kiseline u dioksanu (4 M). Sinteza i karakterizacija amida **2** prethodno je opisana (Sinha i sur., 2020).

Tijek sinteze te čistoća dobivenih produkata praćeni su tankoslojnom kromatografijom. Strukture spojeva **1** i **2** potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, FT-IR), a relativna čistoća određena je pomoću HPLC-a. U tablicama 1–4 dani su njihovi spektroskopski podaci, dok se spektri nalaze u prilogima.

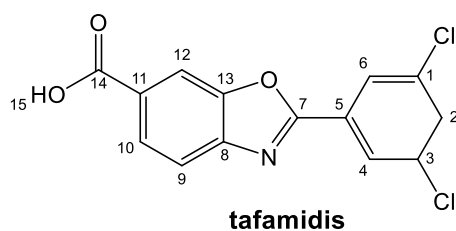


**Tablica 1.** Analitički i spektroskopski podaci za tafamidis te spojeve **1** i **2**.



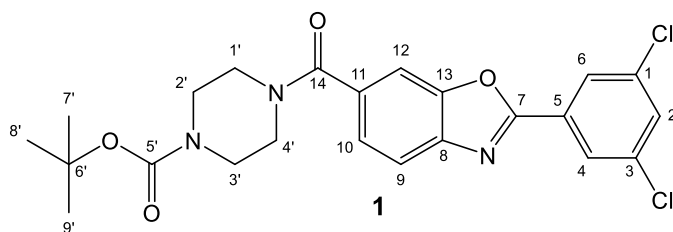
Spoj	Iskorištenje (%)	Molekulska formula	Molekulska masa	MS ( <i>m/z</i> )	FT-IR ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ )
Tafamidis	-	$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3$	308,11	-	2548, 1687, 1614, 1571, 1546, 1493, 1438, 1349, 1309, 1290, 1272, 1126, 1102, 944, 934, 886, 859, 848, 807, 791, 772, 745, 726, 678, 665, 600, 572, 542
<b>1</b>	75	$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4$	476,35	476 $[\text{M}+1]^+$ 498 $[\text{M}+23]^+$	2982, 2900, 2863, 1687, 1631, 1590, 1569, 1548, 1489, 1456, 1414, 1363, 1331, 1282, 1247, 1164, 1137, 1108, 1051, 1010, 995, 960, 944, 935, 878, 858, 845, 803, 772, 742, 723, 664, 640, 587, 554, 479
<b>2</b>	97	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$	376,25	376	3361, 2934, 2807, 2732, 2488, 1625, 1589, 1571, 1547, 1500, 1435, 1335, 1286, 1269, 1196, 1136, 1120, 1103, 1080, 1043, 1014, 953, 935, 915, 900, 873, 862, 839, 800, 770, 739, 727, 665, 635, 587, 498

**Tablica 2.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektroskopski podaci za tafamidis.



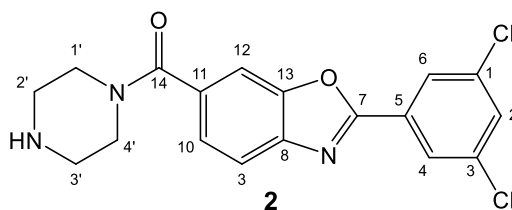
Spoj	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)
<b>Tafamidis</b>	13,27 (s, 1H, 15), 8,30 (dd, $J$ = 1,6, 0,6 Hz, 1H, 12), 8,19 (d, $J$ = 1,9 Hz, 2H, 4, 6), 8,06 (dd, $J$ = 8,3, 1,5 Hz, 1H, 10), 7,98 (t, $J$ = 1,9 Hz, 1H, 2), 7,95 (dd, $J$ = 8,3, 0,6 Hz, 1H, 9)	166,70 (14), 162,16 (7), 150,15 (13), 144,77 (8), 135,22 (1, 3), 131,77 (2), 129,27 (5), 128,75 (11), 126,55 (10), 126,02 (4, 6), 120,06 (9), 112,28 (12)

**Tablica 3.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektroskopski podaci za spoj **1**.



Spoj	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )	$^{13}\text{C}$ NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta/\text{ppm}$ , $J/\text{Hz}$ )
1	8,17 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H, 4, 6), 7,96 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H, 2), 7,92 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, 9), 7,91 – 7,88 (m, 1H, 12), 7,50 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H, 10), 3,63 (s, 4H, 1', 4'), 3,42 (s, 1H, 2', 3'), 1,41 (s, 9H, 7', 8', 9')	168,33 (14), 161,03 (7), 153,82 (5'), 149,94 (13), 142,00 (8), 135,22 (1, 3), 133,76 (11), 131,54 (2), 129,41 (5), 125,83 (4, 6), 124,46 (10), 120,29 (9), 110,27 (12), 79,23 (6'), 39,66 (1', 2', 3', 4'), 28,02 (7', 8', 9')

**Tablica 4.**  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektroskopski podaci za spoj **2**.



Spoj	$^1\text{H}$ NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ /ppm, J/Hz)
<b>2</b>	9,43 (s, 2H, 5'), 8,17 (d, $J = 1,9$ Hz, 2H, 4, 6), 7,97 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, 2), 7,97 (t, $J = 1,9$ Hz, 1H, 12), 7,94 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, 9), 7,55 (dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, 1H, 10), 3,57 (s, 4H, 1', 4'), 3,18 (s, 4H, 2', 3')	168,40 (14), 161,12 (7), 149,91 (13), 142,20 (8), 135,23 (1,3), 132,95 (11), 131,59 (2), 129,35 (5), 125,83 (4, 6), 124,61 (10), 120,35 (9), 110,46 (12), 42,43 (1', 4'), 39,62 (2', 3')

Fizikalno-kemijski deskriptori sintetizirane molekule te njihov utjecaj na farmakokinetiku određeni su pomoću besplatnog web alata SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)). Oralna bioraspoloživost podrazumijeva brzinu i obim apsorpcije oralno primijenjenog lijeka u sistemsku cirkulaciju. Ona je jedno od najvažnijih farmakokinetičkih svojstava koje novosintetizirana molekula mora zadovoljiti. Poznati su razni algoritmi za predviđanje oralne bioraspoloživosti lijekova, no najvažnija su dva: Lipinskijeva i Veberova pravila. Lipinskijeva pravila povezuju farmakokinetiku molekule sa specifičnim fizikalno-kemijskim svojstvima. Prema Lipinskom, da bi molekula imala odgovarajuću oralnu bioraspoloživost, mora imati relativnu molekulsku masu manju od 500, broj donora vodikovih veza maksimalno 6, broj akceptora vodikovih veza maksimalno 10 te logaritam koeficijenta razdijeljena ( $\log P$ ) manji od 5. Molekula mora zadovoljavati minimalno 3 od spomenuta 4 pravila (Lipinski i sur., 2001). Zadovoljavajuću oralnu bioraspoloživost prema Veberu imat će molekula koja nema više od 10 rotirajućih veza, čija polarnost površine određena zbrojem akceptora i donora vodikovih veza nije veća od 12, te čija je topološka ploština zone polarne površine (engl. *topological polar surface area*, TPSA) ne smije biti veća od  $120 \text{ \AA}^2$  (Veber i sur., 2002). Parametri koji su izračunati za spoj **2** prikazani su u tablici 5.

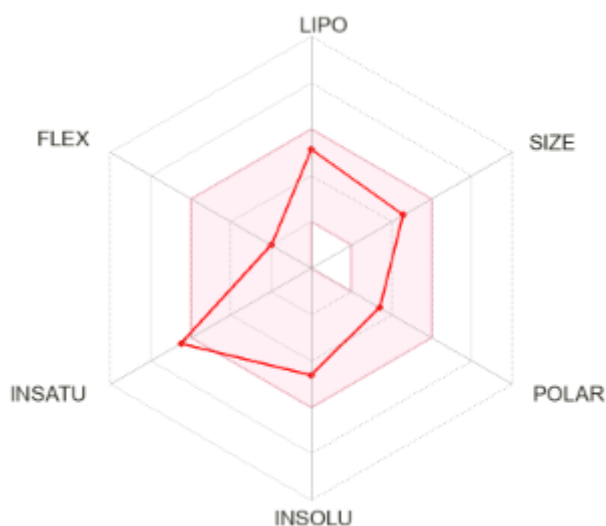
**Tablica 5.** Pregled fizičko-kemijskih svojstava koja utječu na oralnu bioraspoloživost izračunatih putem aplikacije SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch))

<b>Spoj</b>	<b>2</b>
<b>Molekulska formula</b>	$C_{18}H_{15}Cl_2N_3O_2$
<b><i>M</i> (g/mol)</b>	412,7
<b>log <i>P</i></b>	3,49
<b>Broj donora vodikove veze</b>	1
<b>Broj akceptora vodikove veze</b>	4
<b>Zbroj donora i akceptora vodikove veze</b>	5
<b>Broj rotirajućih veza</b>	3
<b>TPSA (Å<sup>2</sup>)</b>	58,37
<b>Lipinskijeva pravila</b>	4/4
<b>Veberova pravila</b>	3/3
<b>log <i>S</i></b>	-4,62
<b>Udio <i>C<sub>sp</sub></i><sup>3</sup></b>	0,22
<b>Broj rotirajućih veza</b>	3

Prema izračunatim parametrima sintetizirani spoj u potpunosti zadovoljava Lipinskijeva i Veberova pravila te mu se stoga predviđa visoka oralna bioraspoloživost. Visoka oralna bioraspoloživost potvrđena je i *in vivo* istraživanjima provedenim od strane Sinha i sur. (Sinha i sur., 2020) na mišjem modelu AD-a. Miševima je tijekom dva tjedna davan spoj **2** u vodi za piće te mu je određena plazmatska koncentracija, kao i koncentracija u mozgu.

*Bioavailability radar* (Slika 9) je grafički prikaz utjecaja šest fizikalno-kemijskih svojstava na oralnu bioraspoloživost. Dijagram je šesterokutnog oblika; svaki vrh predstavlja jedno fizikalno-kemijsko svojstvo, a ružičasto polje predstavlja optimalni raspon tog svojstva. Šest fizikalno-kemijskih svojstava koji utječu na oralnu bioraspoloživost su veličina molekule, polarnost, lipofilnost, netopljivost, nezasićenost te fleksibilnost spoja. Lipofilnost (LIPO) se izražava logaritmom koeficijenta razdjeljenja (log *P*) koji je izračunat programom XLOGP 3.2.2., a optimalna vrijednost nalazi se između -0,7 i +5,0. Veličina molekule (SIZE) kvantificirana je molarnom masom (*M*) te joj vrijednost mora biti između 150 i 500 g/mol. Polarnost molekule (POLAR) izražena je ploštinom zone polarne površine (TPSA) čija vrijednost mora biti između 20 i 130 Å<sup>2</sup>. Netopljivost (INSOLU) je izražena kao negativni logaritam molarne topljivosti (log *S*) koji ne smije biti manji od -6. S druge strane, nezasićenost (INSATU) izražena je kao udio ugljika u *sp*<sup>3</sup> hibridizaciji u odnosu na ukupan broj ugljika, a on mora biti veći od 0,25. Fleksibilnost (FLEX) kvantificirana je brojem rotirajućih veza koji

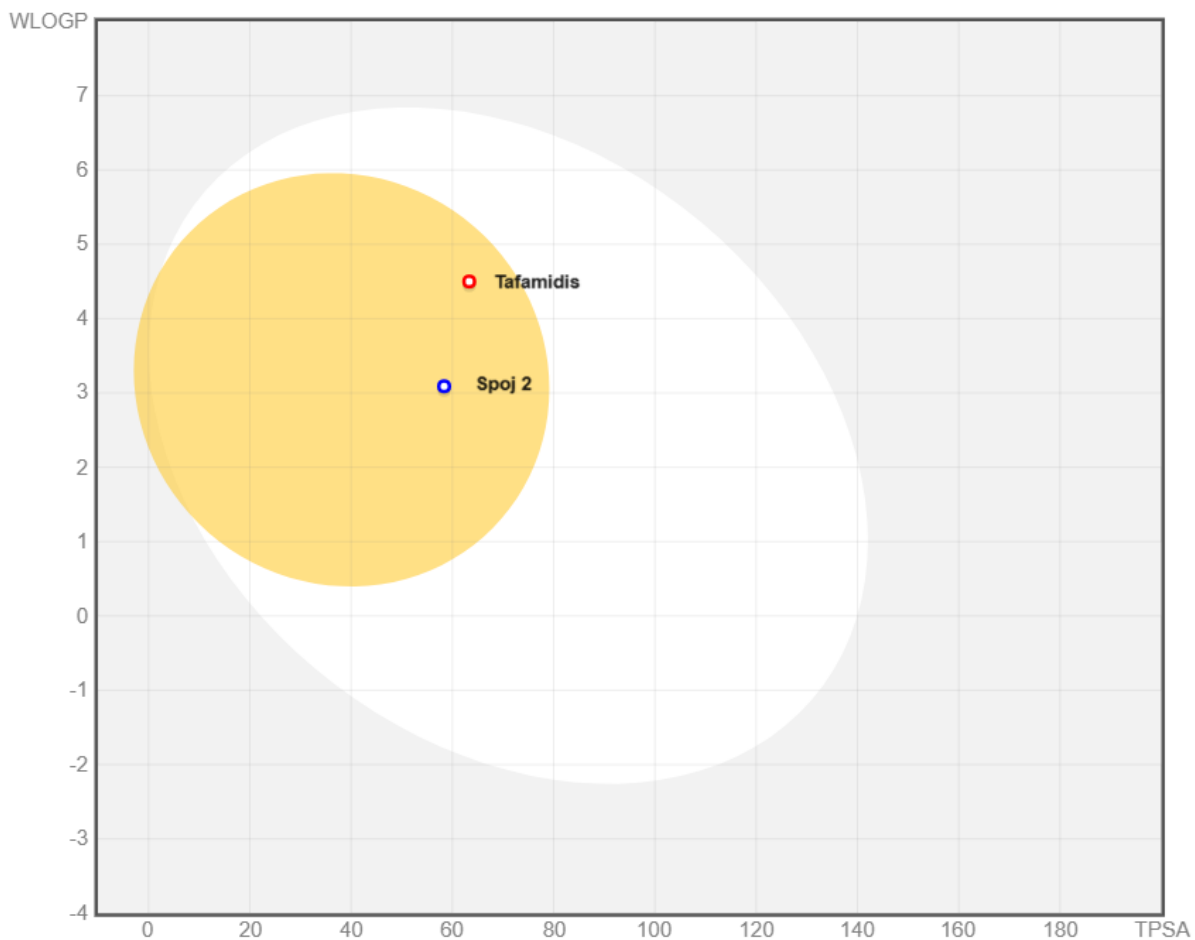
ne smije biti veći od 9 (Daina i sur., 2017). Web alat SwissADME crvenom bojom iscrtava šesterokut za analizirani spoj ovisno o njegovim vrijednostima fizičko-kemijskih svojstava. U tablici 5 su prikazane i ove vrijednosti fizikalno-kemijskih parametra za sintetizirani spoj.



**Slika 9.** Bioavailability radar sintetiziranog spoja **2** (<http://www.swissadme.ch/>)

Iz podataka prikazanih na slici 9 vidljivo je da sintetizirani amid **2** zadovoljava pet od postavljenih šest parametara – lipofilnost, veličinu molekule, polarnost, netopljivost i fleksibilnost. Parametar koji ne zadovoljava jer nije unutar optimalnog područja, a opisuje nezasićenost molekule, 0,22 za spoj **2**.

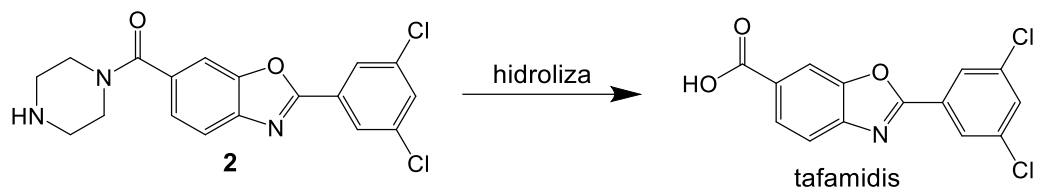
*Boiled EGG* model grafički je prikaz koji na temelju strukture molekule predviđa njene farmakokinetičke parametre, a stvoren je na web stranici SwissADME kao i prethodno spomenuti *Bioavailability radar*. U ovom grafičkom prikazu (Slika 10) spoj **2** je označena plavom točkom, što označava da je on supstrat P-glikoproteina (P-gp), dok je tafamidis označen crvenom točkom, što znači da on nije supstrat P-glikoproteina. P-gp je eksprimiran u različitim regijama, uključujući mozak, bubrege, jetru i gastrointestinalni trakt (GIT). Esencijalna je komponenta KMB-a te ograničava ulazak stranih toksičnih supstanci u mozak (Juvale II i sur., 2022). Informacija o tome je li molekula supstrat P-glikoproteina ili ne bitna je za procjenu mogućnosti prolaska molekule kroz gastrointestinalnu stijenku i krvno-moždanu barijeru. Također, spojevi koji se nalaze unutar bijelog polja se pasivno apsorbiraju iz GIT-a, a oni unutar žutog polja dodatno prelaze KMB (Daina i sur., 2017).



**Slika 10.** *Boiled EGG* model sintetiziranog amida **2** i tafamidisa (preuzeto s <http://www.swissadme.ch/>)

Prema podacima dobivenim na modelu *Boiled EGG*, za spoj **2** se predviđa pasivna apsorpcija kroz gastrointestinalnu stijenku i prelazak KMB-a što je u skladu s rezultatima prethodno spomenutih *in vivo* ispitivanja (Sinha i sur., 2020). Za spoj **2** je također predviđeno da je supstrat P-gp-a čija je ekspresija izražena u endotelnim stanicama kapilara mozga te utječe na postizanje određene koncentracije lijeka u središnjem živčanom sustavu djelujući kao efluksna pumpa koja aktivno izbacuje lijek na periferiju. Međutim, iz *in vivo* studija je poznato da spoj **2** učinkovito prelazi KMB i akumulira se u mozgu te podliježe djelomičnoj hidrolizi do aktivnog lijeka tafamidisa (Shema 3) za koji model *Boiled EGG* predviđa da nije supstrat P-gp-a. Unatoč korisnosti računalnih modela, važno je napomenuti i njihova ograničenja s obzirom da je i za tafamidis predviđen prelazak KMB-a iako je iz *in vivo* studija poznato da on ne prelazi KMB u odgovarajućem opsegu što je i razlog pripreve prolijeka u kojem je maskirana polarna karboksilna skupina kako bi se osigurala odgovarajuća doprema lijeka u

mozak. Stoga je potrebno eksperimentalno potvrditi je li piperazinski amid **2** doista supstrat P-gp-a.



**Shema 3.** Biotransformacija piperazinskog amida **2** u aktivni tafamidis hidrolizom



## **5. ZAKLJUČAK**

U ovom radu opisana je sinteza amidnog prolijeka tafamidisa. Sinteza i karakterizacija provedene su u okviru projekta *Uloga transtiretina u leptomeningealnoj i cerebrovaskularnoj amiloidozi povezanoj sa sporadičnom Alzheimerovom bolesti i neuroprotektivni potencijal prolijeka tafamidisa – TransADamis* koji se provodi na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Sintetiziran i karakteriziran je (2-(3,5-diklorfenil)benzo[*d*]oksazol-6-il)(piperazin-1-il)metanon (**2**) te njegov prekursor, *tert*-butil-4-(2-(3,5-diklorfenil)benzo[*d*]oksazol-6-karbonil)piperazin-1-karboksilat (**1**). Spojevi su prethodno opisani u literaturi.

Sintetiziranim spojevima struktura je potvrđena analitičkim (MS) i spektroskopskim metodama (FT-IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR) te im je određena relativna čistoća. Na temelju strukture amidu **2** predviđeni su fizikalno-kemijski parametri koji utječu na oralnu bioraspodjivu i mogućnost prelaska KMB-a. Farmakokinetička svojstva predviđena su pomoću besplatnog web programa SwissADME te uspoređena s postojećim podacima iz *in vivo* istraživanja.

U daljnjim istraživanjima, koja prelaze okvire ovog rada, sintetiziranom amidu će se ispitati sposobnost stabilizacije TTR-a u središnjem živčanom sustavu i ublažavanja streptozotocinom inducirane neurodegeneracije i kognitivnog deficita *in vivo* čime će se dobiti novi uvidi u patofiziološke mehanizme amiloidogeneze u mozgu i neuroprotektivnu ulogu TTR-a.

## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

AChE	acetilkolinesteraza
AD	Alzheimerova bolest (engl. <i>Alzheimer's disease</i> )
APP	prekursor proteina amiloid- $\beta$
ASO	<i>antisense</i> oligonukleotidi
ATTR	nasljedna transtiretinska amiloidoza
ATTRwt	transtiretinska amiloidoza divljeg tipa
A $\beta$	amiloid $\beta$
BChE	butirilkolinesteraza
ChE	kolinesteraza
CP	koroidni pleksus (engl. <i>choroid plexus</i> )
CSF	cerebrospinalni likvor (engl. <i>cerebrospinal fluid</i> )
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i> )
DMSO	dimetilsulfoksid
EOAD	rani oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i> )
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
FT-IR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
GIT	gastrointestinalni trakt
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
KMB	krvno-moždana barijera
LC/MS	spregnuta tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije
LOAD	kasni oblik Alzheimerove bolesti (engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i> )
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MS	masena spektrometrija
NMDAR	<i>N</i> -metil-D-aspartat receptor
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
P1	presenelin 1
P2	presenelin 2
P-gp	P-glikoprotein
RBP	protein koji veže retinol (engl. <i>retinol-binding protein</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )

siRNA	mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i> )
T4	tiroksin
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i> )
TMS	tetrametilsilan
TPSA	topološka ploština zone polarne površine (engl. <i>topological polar surface area</i> )
TTR	transtiretin
TWC	kromatogram ukupne valne duljine (engl. <i>Total Wavelength Chromatogram</i> )
UATR	univerzalna prigušena totalna refleksija (engl. <i>universal attenuated total reflectance</i> )
UV	ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje

## **7. LITERATURA**

- Aducanumab (marketed as Aduhelm) Information. 2021.,  
<https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/aducanumab-marketed-aduhelm-information>, pristupljeno 12.04.2024.
- Ahmed Juvalé II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*, 2022, 8, e09777.
- 2024 Alzheimer's disease facts and figures. 2024.,  
<https://www.alz.org/media/documents/alzheimers-facts-and-figures.pdf>, pristupljeno 26.05.2024.
- Bains RS, Kaur M, Marwaha R, Bains KN, Mehta R, Garg G. A Systematic Review of Off-Label Use of Memantine for Neuropsychiatric Disorders Other than Dementia. *Adv Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2022, 11, 263.
- Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 2020, 25, 5789.
- Amyloidosis. 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470285/>, pristupljeno 26.05.2024.
- Amyloidosis Types. 2017., <https://stanfordhealthcare.org/medical-conditions/blood-heart-circulation/amyloidosis/types.html>, pristupljeno 12.04.2024.
- Buxbaum J. Evaluation of tafamidis as first-line therapeutic agent for transthyretin familial amyloidotic polyneuropathy. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 2011, 2, 165-173.
- Chen ZR, Huang JB, Yang SL, Hong FF. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*, 2022, 27, 1816.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 7, 42717, 1-13.

Drew L. An age-old story of dementia. *Nature*, 2018, 559, 2-3.

FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Disease Treatment, 2023., <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment>, pristupljeno 12.04.2023.

Grill JD, Cummings JL. Current therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10, 711-728.

Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2003, 64, 216-35.

Grutzendler J, Morris JC. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Drugs*, 2001, 61, 41-52.

Memantine. 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500025/>, pristupljeno 26.05.2024.

Lamb, Y.N. Tafamidis: A Review in Transthyretin Amyloid Cardiomyopathy. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2021, 21, 113-121.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46, 3-26.

Liz MA, Coelho T, Bellotti V, Fernandez-Arias MI, Mallaina P, Obici L. A Narrative Review of the Role of Transthyretin in Health and Disease. *Neurol Ther*, 2020, 9, 395-402.

Mallus MT, Rizzello V. Treatment of amyloidosis: present and future. *Eur Heart J Suppl*, 2023, 25, B99-B103.



- Malnar M, Košiček M, Hećimović S. Alzheimerova bolest : od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina*, 2009, 45, 234-243.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 1984, 34, 939-944.
- Morfino P, Aimo A, Vergaro G, Sanguinetti C, Castiglione V, Franzini M, Perrone MA, Emdin M. Transthyretin Stabilizers and Seeding Inhibitors as Therapies for Amyloid Transthyretin Cardiomyopathy. *Pharmaceutics*, 2023, 15, 1129.
- Nordvall G, Lundkvist J, Sandin J. Gamma-secretase modulators: a promising route for the treatment of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16, 1279740.
- Parsons CG, Stöffler A, Danysz W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 2007, 53, 699-723.
- Rabinovici GD, La Joie R. Amyloid-Targeting Monoclonal Antibodies for Alzheimer Disease. *JAMA*, 2023, 330, 507-509.
- Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 2022, 24, 107.
- Saponaro F, Kim JH, Chiellini G. Transthyretin Stabilization: An Emerging Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease? *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 8672.
- Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2021, 397, 1577-1590.
- Schwarzman AL, Goldgaber D. Interaction of transthyretin with amyloid beta-protein: binding and inhibition of amyloid formation. *Ciba Found Symp*, 1996, 199, 146-60.

Sinha A, Chang JC, Xu P, et al. Brain Permeable Tafamidis Amide Analogs for Stabilizing TTR and Reducing APP Cleavage. *ACS Med Chem Lett.* 2020, 11, 1973-1979.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615-2623.

## **8. SAŽETAK/SUMMARY**

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta *Uloga transtiretina u leptomeningealnoj i cerebrovaskularnoj amiloidozi povezanoj sa sporadičnom Alzheimerovom bolešću i neuroprotektivni potencijal prolijeka tafamidisa – TransADamis* Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća sintezu i *in vivo* ispitivanje sposobnosti amidnog prolijeka tafamidisa da stabilizira TTR u središnjem živčanom sustavu i ublaži streptozotocinom induciranu neurodegeneraciju i kognitivni deficit.

Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija amidnog prolijeka tafamidisa. Sinteza je započeta prevođenjem karboksilne kiseline tafamidisa do odgovarajućeg piperazinskog amida **1** s *tert*-butiloksikarbonilnom zaštitnom skupinom nakon čega je zaštitna skupina hidrolizirana čime je dobiven konačni produkt **2**.

Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (FT-IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS), a relativna čistoća određena je pomoću HPLC-a. Konačni produkt u potpunosti zadovoljava Lipinskijeva i Veberova pravila koja se koriste za predviđanje oralne biorasploživosti lijekova. Također, web alat SwissADME predviđa visoku oralnu biorasploživost i mogućnost prelaska KMB-a amida **2** što je u skladu s rezultatima prethodno objavljene studije *in vivo*.

Učinak amida **2** na stabilizaciju TTR-a u središnjem živčanom sustavu i ublažavanje neurodegeneracije bit će ispitan u daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada.

Ključne riječi: tafamidis, Alzheimerova bolest, transtiretin, amidni prolijek

This work is part of the research conducted at the Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, within the project *Role of Transthyretin in Leptomeningeal and Cerebrovascular Amyloidosis Associated with Sporadic Alzheimer's Disease and the Neuroprotective Potential of Tafamidis Prodrug – TransADamis* of the School of Medicine, University of Zagreb, which encompasses the synthesis and *in vivo* testing of the ability of the amide prodrug of tafamidis to stabilize TTR in the central nervous system and mitigate streptozotocin-induced neurodegeneration and cognitive deficit.

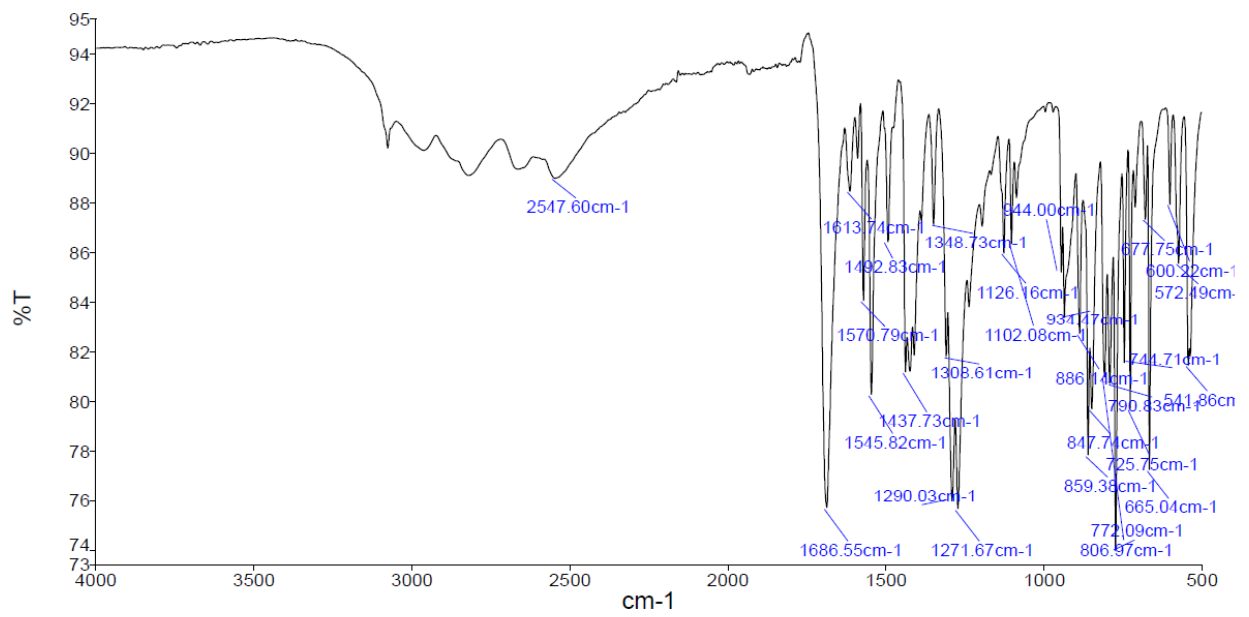
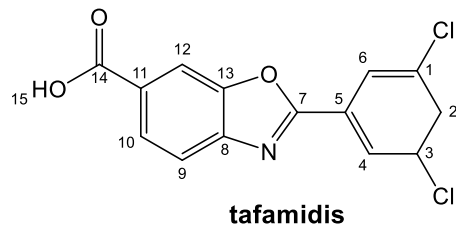
The aim of this thesis was the synthesis and characterization of the amide prodrug of tafamidis. The synthesis began with the conversion of tafamidis carboxylic acid to the corresponding piperazine amide **1** with a *tert*-butoxycarbonyl protecting group, followed by hydrolysis of the protecting group to obtain the final product **2**.

The structures of all synthesized compounds were confirmed by standard analytical and spectroscopic methods (FT-IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS), and the relative purity was determined by HPLC. The final product fully complies with Lipinski's and Veber's rules used to predict the oral bioavailability of drugs. Additionally, the web tool SwissADME predicts high oral bioavailability and the ability of amide **2** to cross the blood-brain barrier, which is consistent with the results of a previously published *in vivo* study. The effect of amide **2** on the stabilization of TTR in the central nervous system and the mitigation of neurodegeneration will be examined in further research beyond the scope of this paper.

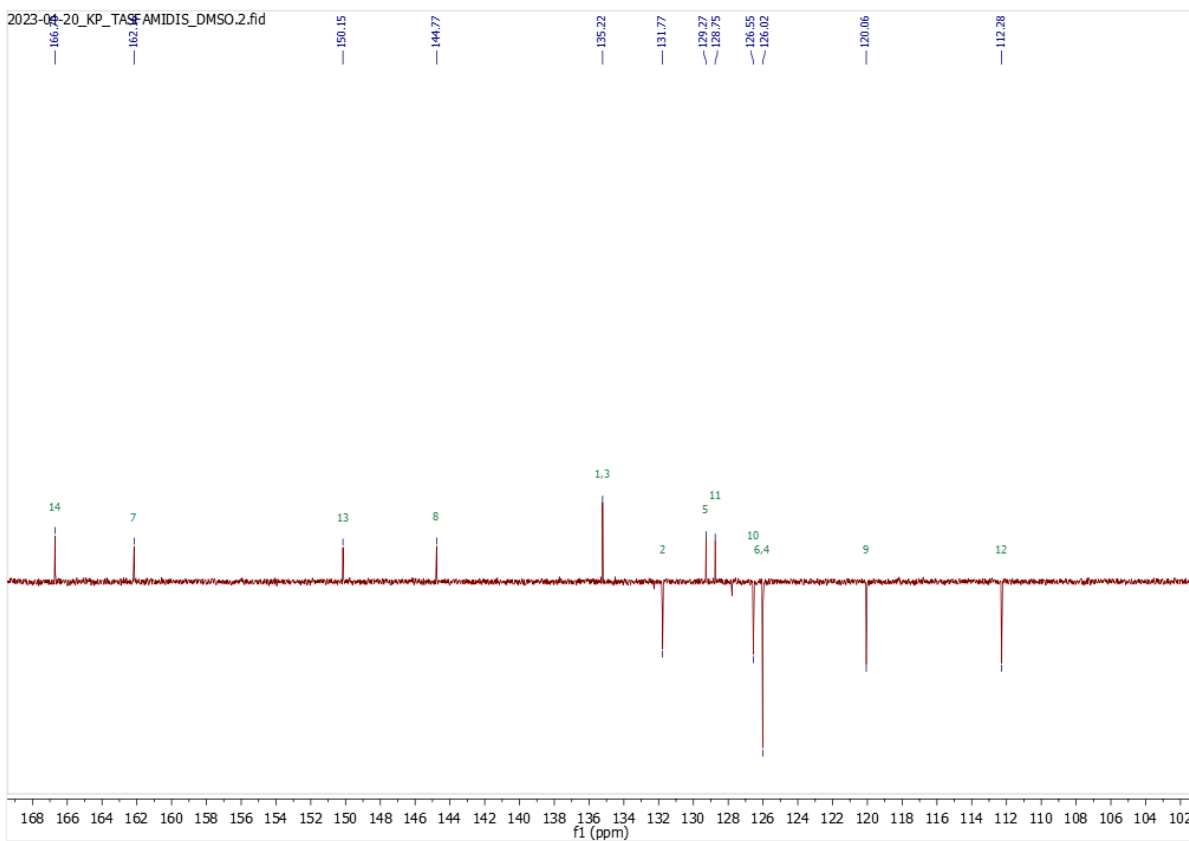
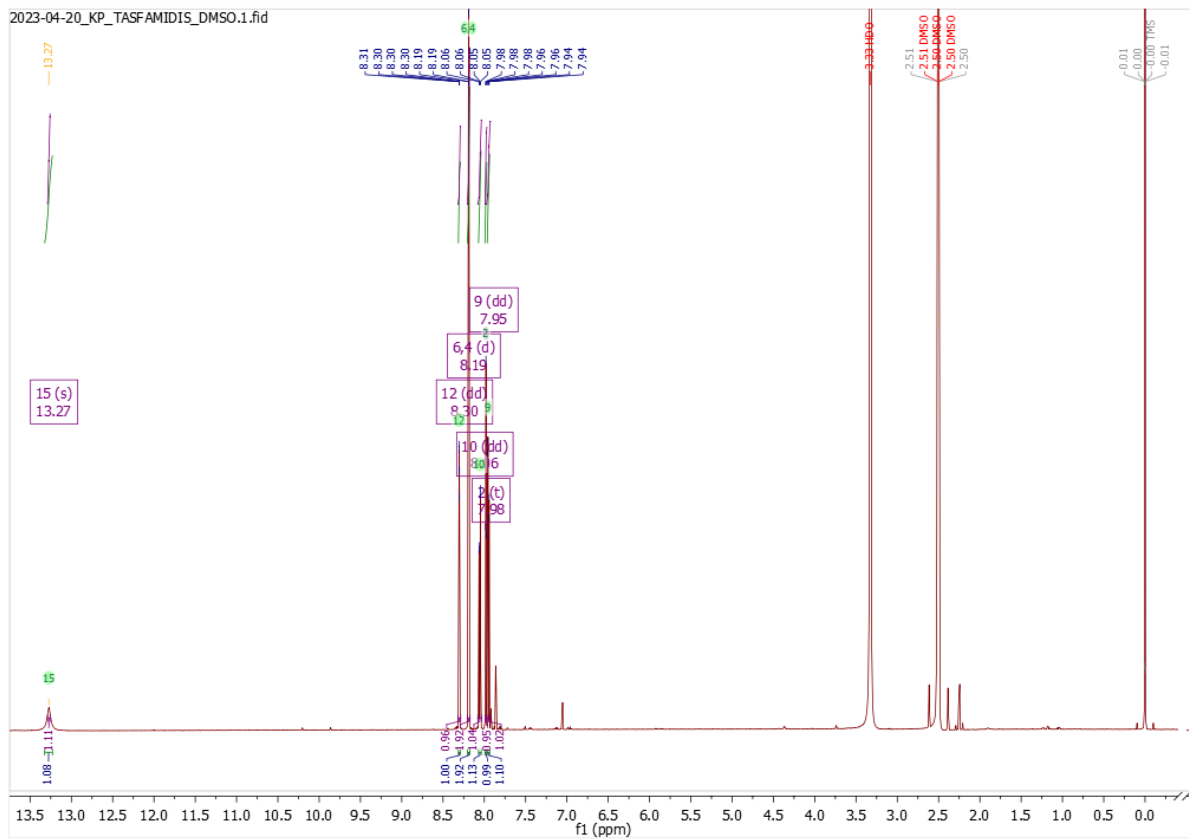
Keywords: tafamidis, Alzheimer's disease, transthyretin, amide prodrug

## **9. PRILOZI**

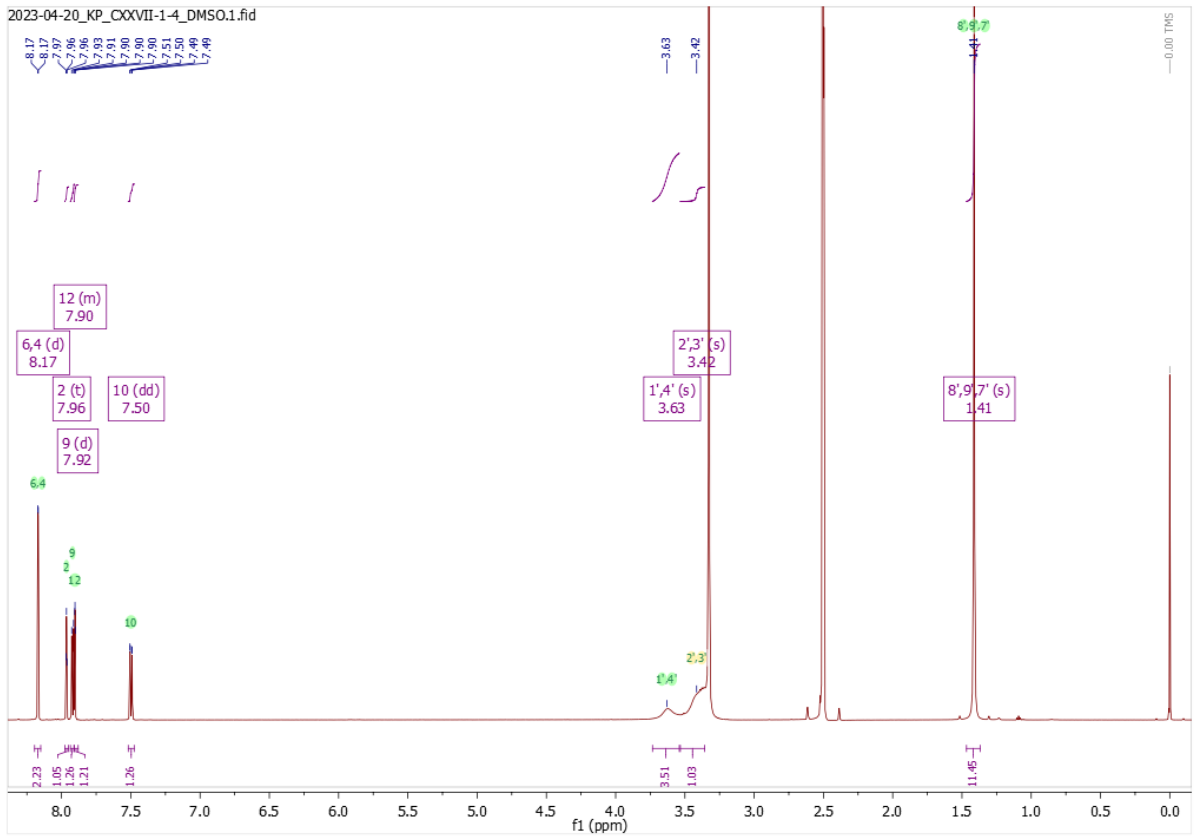
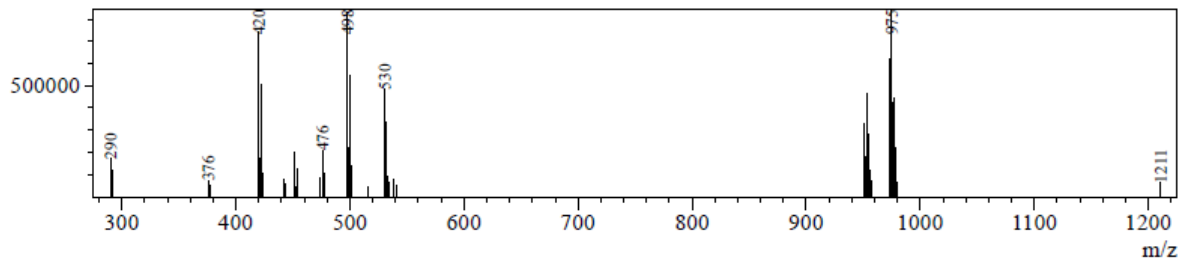
U prilogima su prikazani snimljeni kromatogrami, FT-IR, MS,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri tafamidisa, prekursora i konačnog produkta.

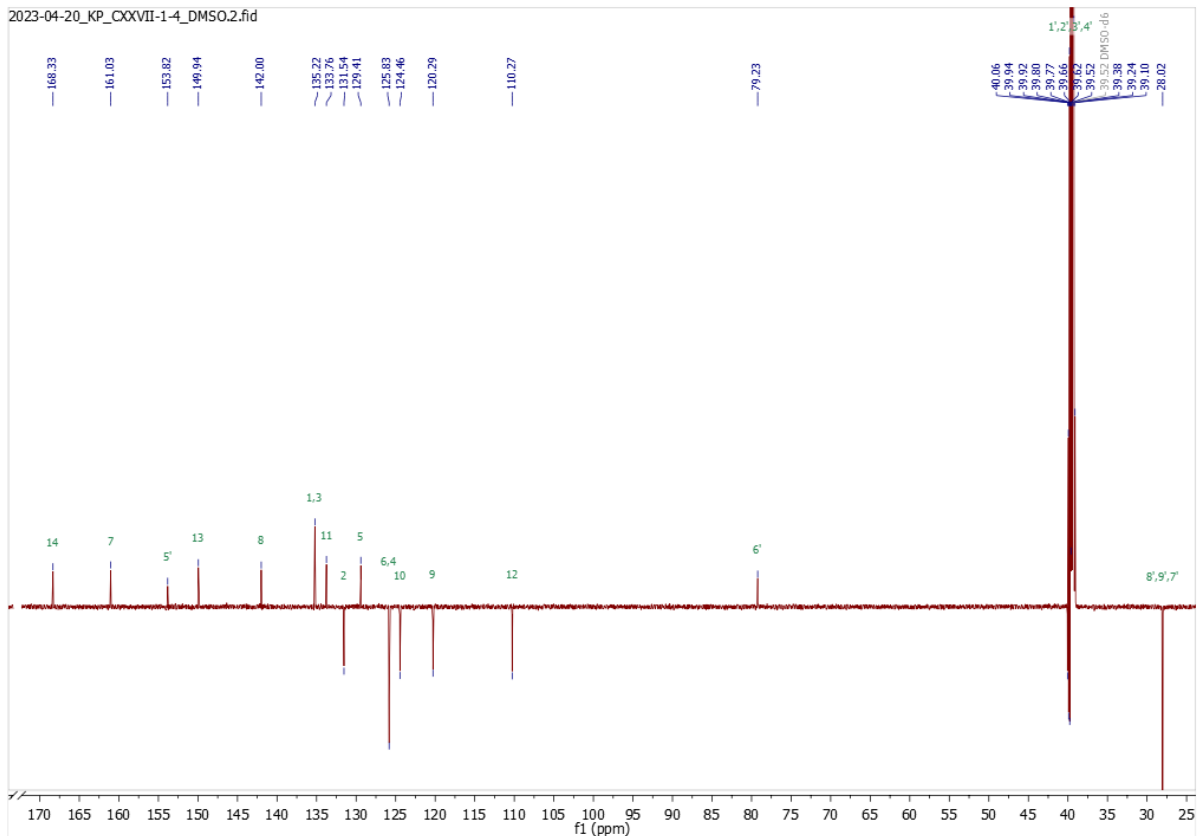


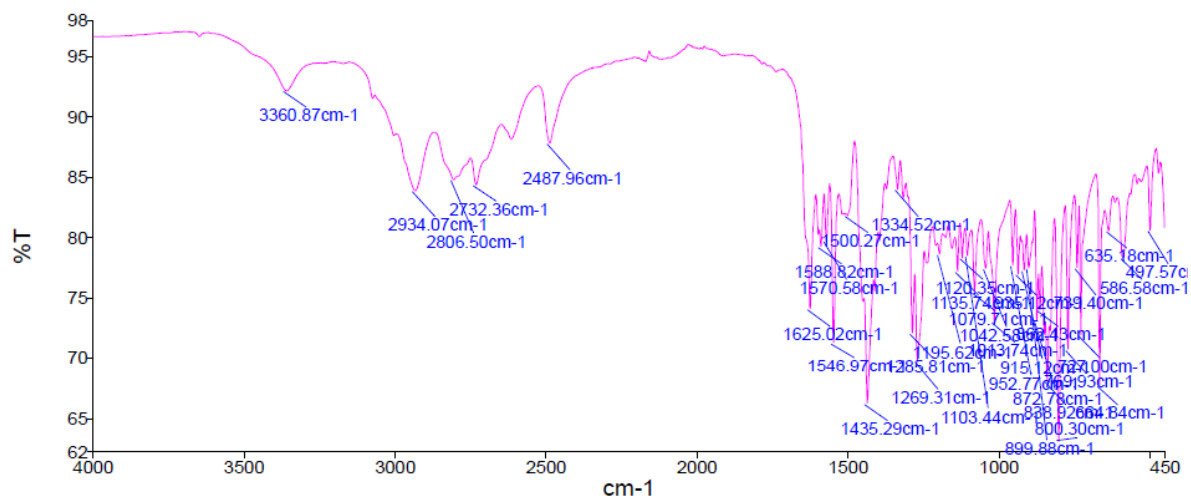
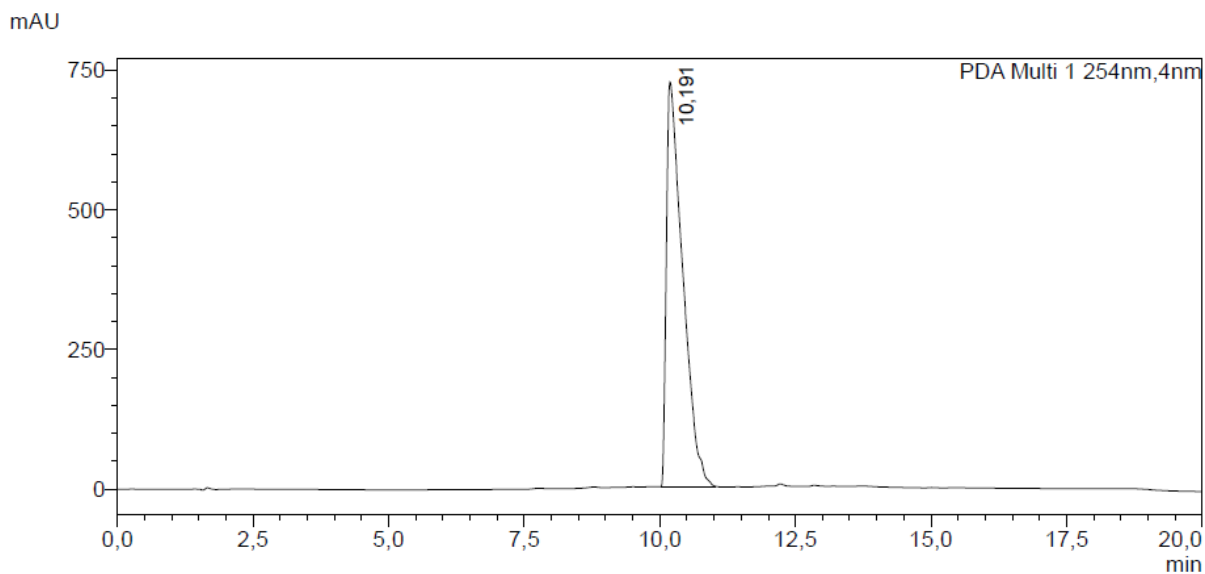
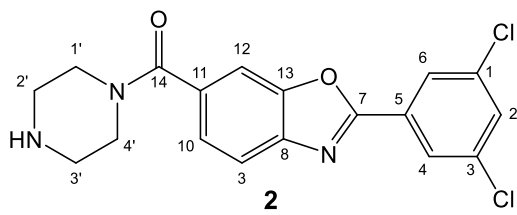


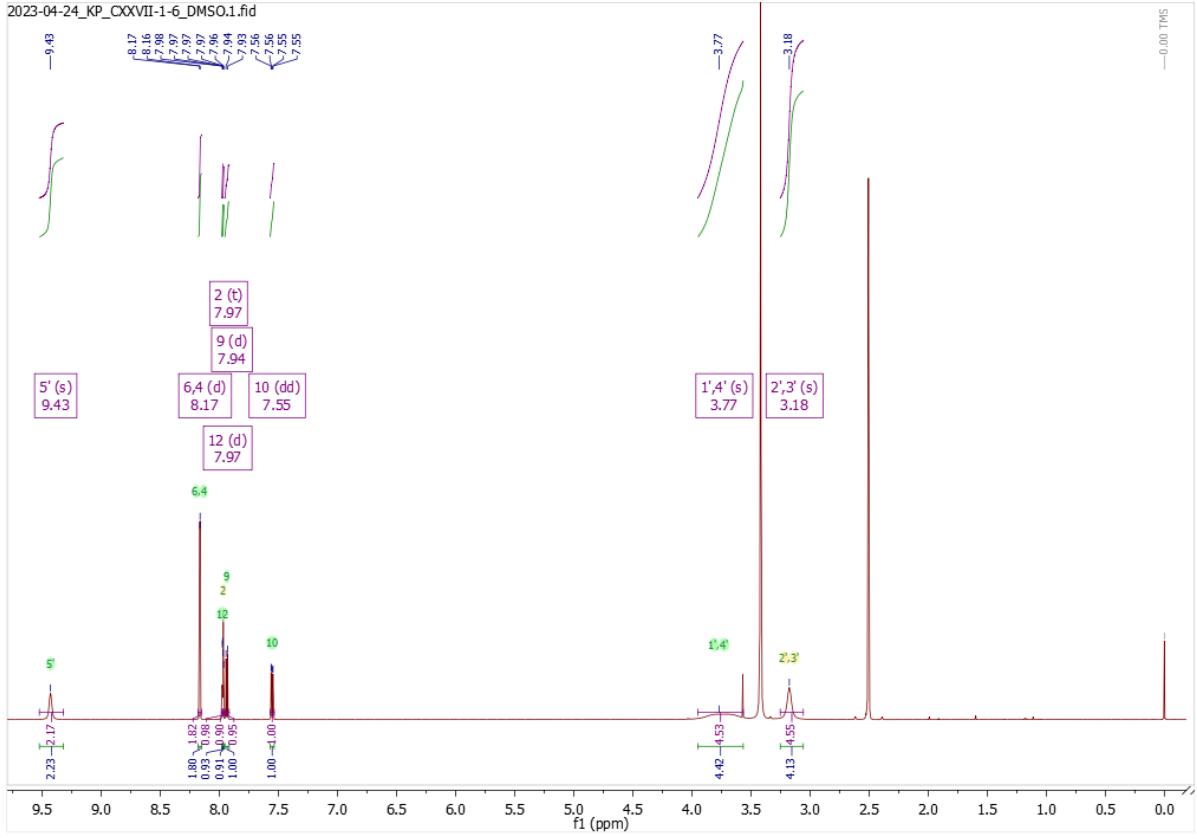
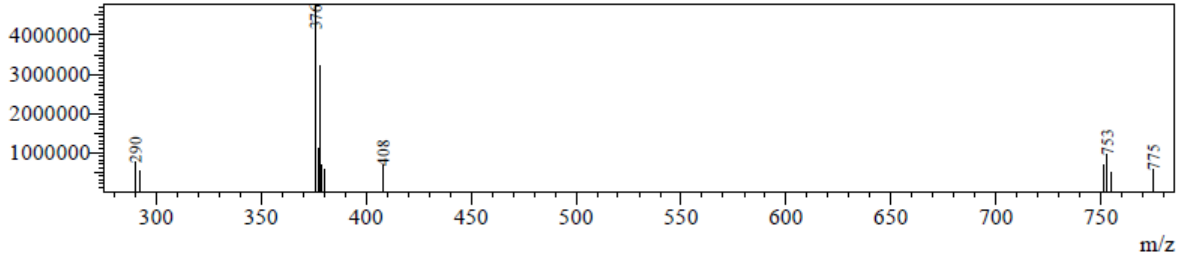


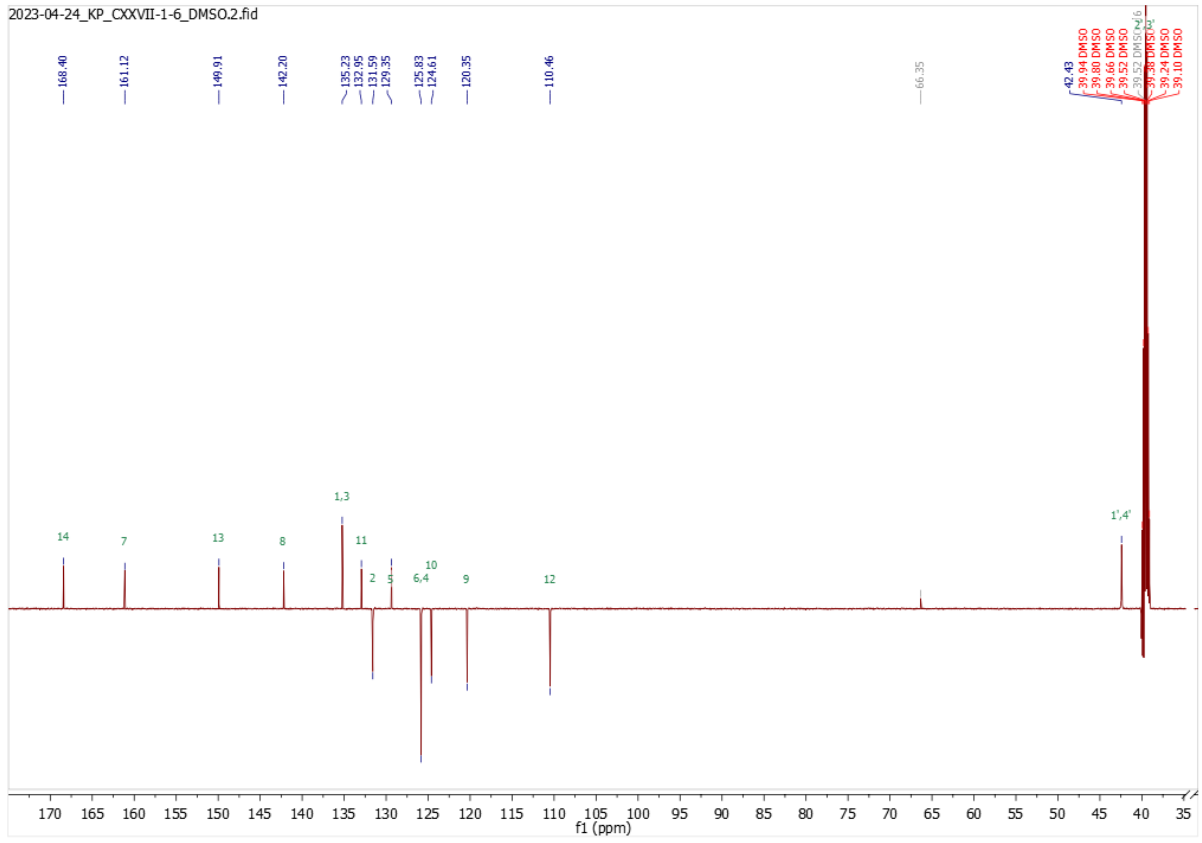












**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC  
DOCUMENTATION CARD**



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### SINTEZA I KARAKTERIZACIJA AMIDNOG PROLIJEKA TAFAMIDISA

Nikola Grus

#### SAŽETAK

Ovaj rad dio je istraživanja provedenog u Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Uloga transtiretina u leptomeningealnoj i cerebrovaskularnoj amiloidozi povezanoj sa sporadičnom Alzheimerovom bolesti i neuroprotektivni potencijal prolijeka tafamidisa – TransADamis Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji obuhvaća sintezu i *in vivo* ispitivanje sposobnosti amidnog prolijeka tafamidisa da stabilizira transtiretin (TTR) u središnjem živčanom sustavu i ublaži streptozotocinom induciranu neurodegeneraciju i kognitivni deficit.

Cilj ovog rada bila je sinteza i karakterizacija amidnog prolijeka tafamidisa. Sinteza je započeta prevođenjem karboksilne kiseline tafamidisa do odgovarajućeg piperazinskog amida **1** s *tert*-butiloksikarbonilnom zaštitnom skupinom nakon čega je zaštitna skupina hidrolizirana čime je dobiven konačni produkt **2**.

Strukture svih sintetiziranih spojeva potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (FT-IR, <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, MS), a relativna čistoća određena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Konačni produkt u potpunosti zadovoljava Lipinskijeva i Veberova pravila koja se koriste za predviđanje oralne biorasploživosti lijekova. Također, web alat SwissADME predviđa visoku oralnu biorasploživost i mogućnost prelaska KMB-a amida **2** što je u skladu s rezultatima prethodno objavljene studije *in vivo*.

Učinak amida **2** na stabilizaciju TTR-a u središnjem živčanom sustavu i ublažavanje neurodegeneracije bit će ispitan u daljnjim istraživanjima koja prelaze okvire ovog rada.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 10 grafičkih prikaza, 5 tablica i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tafamidis, Alzheimerova bolest, transtiretin, amidni prolijek

Mentor: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Kristina Pavić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Babić Perhoč**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medicinal chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF TAFAMIDIS AMIDE PRODRUG

**Nikola Grus**

#### SUMMARY

This work is part of the research conducted at the Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, within the project Role of Transthyretin in Leptomeningeal and Cerebrovascular Amyloidosis Associated with Sporadic Alzheimer's Disease and the Neuroprotective Potential of Tafamidis Prodrug – TransADamis of the School of Medicine, University of Zagreb, which encompasses the synthesis and *in vivo* testing of the ability of the amide prodrug of tafamidis to stabilize transthyretin (TTR) in the central nervous system and mitigate streptozotocin-induced neurodegeneration and cognitive deficit.

The aim of this thesis was the synthesis and characterization of the amide prodrug of tafamidis. The synthesis began with the conversion of tafamidis carboxylic acid to the corresponding piperazine amide **1** with a *tert*-butoxycarbonyl protecting group, followed by hydrolysis of the protecting group to obtain the final product **2**.

The structures of all synthesized compounds were confirmed by standard analytical and spectroscopic methods (FT-IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, MS), and the relative purity was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The final product fully complies with Lipinski's and Veber's rules used to predict the oral bioavailability of drugs. Additionally, the web tool SwissADME predicts high oral bioavailability and the ability of amide **2** to cross the blood-brain barrier, which is consistent with the results of a previously published *in vivo* study. The effect of amide **2** on the stabilization of TTR in the central nervous system and the mitigation of neurodegeneration will be examined in further research beyond the scope of this paper.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 10 figures, 5 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tafamidis, Alzheimer's disease, transthyretin, amide prodrug

Mentor: **Kristina Pavić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Kristina Pavić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ana Babić Perhoč, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb School of Medicine

**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.