



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104066743 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201380006432. 7

(22) 申请日 2013. 01. 24

(30) 优先权数据

12152413. 6 2012. 01. 25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/051339 2013. 01. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/110704 EN 2013. 08. 01

(73) 专利权人 格莱克特生物技术公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 乌尔夫·尼尔松 哈康·莱弗勒

巴拉拉姆·穆克霍帕迪艾

维萨·拉普特

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

C07H 15/18(2006. 01)

A61K 31/7028(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007/0185039 A1, 2007. 08. 09,

WO 02/057284 A1, 2002. 07. 25,

WO 2005/113569 A1, 2005. 12. 01,

Pernilla, et al., .Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin - ligand interactions.. 《Analytical Biochemistry》. 2004, 第 334 卷 (第 1 期), 第 36-47 页 .

审查员 吴慧

权利要求书3页 说明书27页

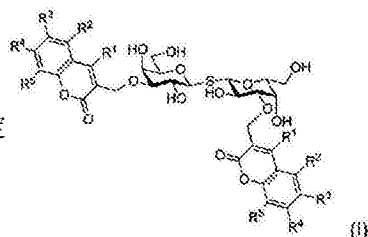
(54) 发明名称

半乳糖凝集素的新型半乳糖苷抑制剂

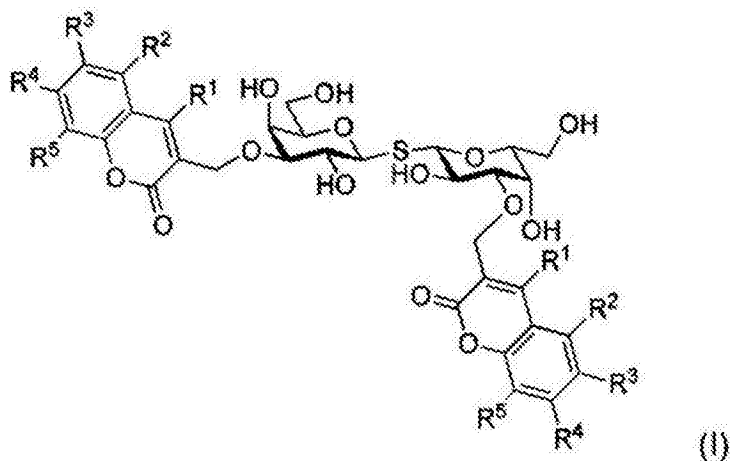
(57) 摘要

本发明涉及由可容易得到的 3-O- 炔丙基 -D- 吡喃半乳糖苷衍生物制备的且具有作为例如 (i. a.) 半乳糖凝集素抑制剂的效果的新型化合物、所述化合物作为药物的用途以及所述化合物用于制造在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症的药物的用途, 其中, 所述半乳糖凝集素优选为半乳糖凝集素 -3。该新化合

物由通式 (I) 限定



1. 一种通式 (I) 的化合物：



其中：

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地选自由氢、 C_{1-4} 烷基、卤素、 C_{1-4} 烷氧基、 OCF_3 、羟基所组成的组，或者其中 R^2 和 R^3 连接以形成苯环，并且 R^1 、 R^4 和 R^5 均为氢。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中， R^5 是氢。

3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^2 和 R^3 中的一个为氟， R^2 和 R^3 中的不为氟的那一个是氢并且 R^1 、 R^4 和 R^5 均为氢。

4. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^3 和 R^4 中的一个为羟基，并且 R^3 和 R^4 中不为羟基的那一个是氢，并且 R^1 、 R^2 和 R^5 均为氢。

5. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^2 和 R^3 是氟，并且 R^1 、 R^4 和 R^5 均为氢，或者其中 R^3 和 R^4 是氟，并且 R^1 、 R^2 和 R^5 均为氢。

6. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^2 是氯并且 R^1 、 R^3 、 R^4 和 R^5 均为氢。

7. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^2 和 R^3 连接形成苯环并且 R^1 、 R^4 和 R^5 均为氢。

8. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 均为氢。

9. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的化合物，其中，所述化合物选自由以下所组成的组：

双 - {3-O-[(2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(7- 氯 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(7- 甲氧基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(7- 羟基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(6- 羟基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(3H- 萘并 [2,1-b] 吡喃 -3- 酮 -2- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双 - {3-O-[(6- 叔丁基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基}

基} 硫烷、

双-{3-O-[(6-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6,7-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5,6-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6-三氟甲氧基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-O-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、和

双-{3-O-[(7-甲基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷。

10. 根据权利要求1所述的化合物,其中,所述化合物选自由以下所组成的组:

双-{3-O-[(2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(7-羟基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6-羟基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6,7-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、和

双-{3-O-[(5,6-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷。

11. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自由以下所组成的组:

双-{3-O-[(6-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(6,7-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷、

双-{3-O-[(5-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基}

硫烷、

双 - {3-O-[(5- 氟 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基)- 甲基]- β -D- 吡喃半乳糖酰基 } 硫烷、和

双 - {3-O-[(5, 6- 二氟 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基)- 甲基]- β -D- 吡喃半乳糖酰基 } 硫烷。

12. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中, 所述化合物是双 - {3-O-[(5, 6- 二氟 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基)- 甲基]- β -D- 吡喃半乳糖酰基 } 硫烷。

13. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其用作药物。

14. 一种药物组合物, 包含权利要求 1-12 中任一项所述的化合物以及药用佐剂、稀释剂、赋形剂和 / 或载体。

15. 根据权利要求 14 所述的药物组合物, 包含 1-99 重量%的药用佐剂、稀释剂、赋形剂和 / 或载体以及 1-99 重量%的根据权利要求 1-12 中任一项所述的化合物。

16. 权利要求 1-12 中任一项所述的化合物用于制造在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症的药物的用途。

17. 根据权利要求 16 所述的用途, 其中, 所述哺乳动物是人类。

18. 根据权利要求 17 所述的用途, 其中, 所述半乳糖凝集素是半乳糖凝集素 -3。

19. 根据权利要求 16-18 任一项所述的用途, 其中, 所述病症选自由炎症、纤维化、脓毒性休克、癌症、自身免疫性疾病、代谢性疾病、心脏病、心力衰竭、病理性血管生成和眼部疾病所组成的组。

20. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述纤维化选自由肺纤维化、肝纤维化、肾脏纤维化、眼部纤维化和心脏纤维化所组成的组。

21. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述病理性血管生成是眼部血管生成或与眼部血管生成有关的疾病或病况。

22. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述眼部疾病选自年龄相关性黄斑变性和角膜新血管形成。

23. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述病症是癌症。

24. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述病理性血管生成是与癌症有关的新血管形成。

半乳糖凝集素的新型半乳糖苷抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及新型化合物、所述化合物作为药物的用途以及用于制造在哺乳动物中用于治疗与半乳糖凝集素和配体结合相关的任何病症的药物的用途。本发明还涉及包含所述新型化合物的药物组合物。

背景技术

[0002] 半乳糖凝集素是具有特征性的糖识别结构域 (CRD) 的蛋白质 (Barondes et al., 1994 ;Leffler et al., 2004)。这是一种具有如下两个定义特征的约 130 个氨基酸 (约 15kDa) 的紧密折叠的 β -三明治:1) β -半乳糖结合位点和 2) 约七个氨基酸的序列基序的足够相似性,它们的大部分(约六个残基)构成 β -半乳糖结合位点。但是,相邻于 β -半乳糖位点的位点需要紧密结合天然糖类且这些的不同偏好产生对天然糖类具有不同的精细特异性的半乳糖凝集素。

[0003] 最近完成的人类、小鼠和大鼠的基因组测序显示,在一个哺乳动物基因组中有 15 个半乳糖凝集素和半乳糖凝集素样蛋白,在物种之间具有轻微的变化 (Leffler et al., 2004)。

[0004] 半乳糖凝集素亚基在单肽链中可以含有一个或两个 CRD。第一类(单-CRD 半乳糖凝集素)在脊椎动物中可以以单体或二聚体(两种类型)出现。迄今为止研究最彻底的半乳糖凝集素是二聚半乳糖凝集素-1和在溶液中为单体但是当遇到配体时可以聚集并形成多聚体的半乳糖凝集素-3(Leffler et al., 2004)。这些是首先发现的半乳糖凝集素并且在许多组织中非常丰富。

[0005] 现在,在 PubMed 中具有超过 3500 篇关于半乳糖凝集素的出版物,如上所述,大部分是关于半乳糖凝集素-1(>900)和半乳糖凝集素-3(>1600)的。强有力的证据表明了半乳糖凝集素在例如炎症和癌症中的作用并且最近在专刊 (Leffler(编者), 2004b) 中综述了进展。

[0006] 半乳糖凝集素作为在游离核糖体上没有信号肽的细胞质蛋白合成。它们的 N-末端是被乙酰化的(细胞质蛋白的一种典型修饰)并有它们驻留于胞质溶胶中很长一段时间(非典型的分泌蛋白)。从中,它们可以靶向细胞核、特异的细胞质位点(cytosolic site),或者由非经典的(非-ER-高尔基体(non-ER-Golgi))途径分泌(诱导的或组成型的),该途径目前未知的,但是可能类似于例如 IL-1 的外运(export) (Leffler et al., 2004)。他们还可以在所有这些区室中发挥功能;对于半乳糖凝集素-3,在备受重视的杂志中刊登的确凿证据支持其在细胞核中的 RNA 剪接、在胞质溶胶中抑制细胞凋亡以及对细胞信号传导和粘附的多种胞外作用中的作用 (Leffler(编者), 2004b)。半乳糖凝集素-7 和半乳糖凝集素-12 也通过在某些细胞中增强细胞凋亡和调节细胞周期及分化而在胞质溶胶(cytosol)中起作用(Hsu 和 Liu 在 Leffler(编者), 2004b 中)。大部分半乳糖凝集素也在细胞外通过使糖蛋白(例如层粘连蛋白、整联蛋白和 IgE 受体)交联可能形成超分子有序排列(Brewer et al., 2002)而起作用并且由此可能调节细胞粘附和诱导的细

胞内信号。与此相关的,最近几年已经看到了这些半乳糖凝集素功能的分子机制的出现,涉及在涉及在膜内形成微区(格子)(Dam et al., 2008 ;Garner et al., 2008),这反过来影响细胞内运输和糖蛋白受体的细胞表面呈现(Delacour et al., 2007 ;Lau et al., 2007 ;Lau et al. 2008)。这在细胞培养中、在无效突变体小鼠中(Blois et al., 2007 ;Gedronneau et al., 2008 ;Thijssen et al., 2007 ;Toscano et al., 2007 ;Saegusa et al., 2009) 和使用半乳糖凝集素(Blois et al., 2007 ;Perone et al., 2009) 或半乳糖凝集素抑制剂(John et al., 2003 ;Pienta et al., 1995 ;Glinsky et al., 1996) 治疗的动物中已经得到了证明。

[0007] 半乳糖凝集素-3 抑制剂的潜在治疗用途

[0008] 半乳糖凝集素-3 已经牵涉于多种现象,由此,抑制剂可能具有多种用途。容易察觉这是因为缺乏特异性或缺乏科学焦点。因此,根据阿司匹林和环氧合酶(COX-I 和 II) 进行类推是有用的。COX 产生的各种前列腺素的前体并因此参与了多样化的生物学机制。它们的抑制剂,阿司匹林和其他 NSAID(非甾体抗炎药),也具有广泛和多样化的效果。尽管如此,这些抑制剂是医学上非常有用,并且它们具有若干不同的具体应用。

[0009] 所以如果半乳糖凝集素如同 COX 一样是一些基本的生物学调控机制的一部分(目前未知),它们很可能在不同的背景中‘就其本性而言可以用于’不同的目的。如同 NSAID 一样,半乳糖凝集素抑制剂预期不会破坏(wipe out) 整个系统,但预期会使平衡倾斜一点。

[0010] 抑制炎症

[0011] 在无效突变体小鼠中,通过半乳糖凝集素-3 在炎症部位的细胞中诱导对免疫细胞的各种影响(例如,在中性粒细胞中的氧化猝发(oxidative burst) 和单核细胞中的趋化性(chemotaxis))、以及主要在嗜中性粒细胞和巨噬细胞中降低炎症反应,指示了半乳糖凝集素-3 的促炎作用(在 Leffler(编者), 2004b 中)。另外,敲除小鼠的 Mac-2BP(一种半乳糖凝集素-3 配体)增加了炎症反应(Trahey et al., 1999)。重要的是,最近的研究已经确定,半乳糖凝集素-3 在巨噬细胞 M2 分化和肌成纤维细胞的活化中是关键的限速因素,其影响纤维化的发展(Mackinnon et al., 2008 ;Mackinnon et al., 2012)。

[0012] 炎症是机体对侵入的生物体和组织损伤的保护性反应。然而,如果不平衡,它经常也是破坏性的并且作为许多疾病的病理的一部分发生。正因为如此,对炎症的药理学调整存在极大的医学兴趣。半乳糖凝集素-3 抑制剂预期将为可以用于此的医药库(arsenal) 提供重要补充。

[0013] 纤维化相关病况的治疗

[0014] 半乳糖凝集素-3 在纤维化中可能发挥作用的想法来自于对巨噬细胞分化的细胞和体外研究(Mackinnon et al., 2008) 以及来自于对巨噬细胞分化和肌成纤维细胞活化的体内研究(Mackinnon et al., 2012)。简单地说,假设如下:半乳糖凝集素-3 已显示出延长了细胞表面停留并由此增加了 TGF- β 受体的响应性(Partridge et al., 2004),其转而调节备选(alternative) 巨噬细胞向 M2 巨噬细胞的分化以及肌成纤维细胞的活化。因此,由于半乳糖凝集素-3 是 TGF- β 信号转导和备选巨噬细胞分化及肌纤维母细胞活化的内源性增强子的良好候选物,因此半乳糖凝集素-3 抑制剂在治疗纤维化和不良组织重塑中可以是很有用的。

[0015] 癌症的治疗

[0016] 大量的免疫组织化学研究显示了某些半乳糖凝集素在癌症中的改变表达 (van den Brule et al. 和 Bidon et al. 在 Leffler(编者), 2004b 中), 并且例如半乳糖凝集素-3 现在是甲状腺癌的既定组织化学标志物。半乳糖凝集素-3 在癌症中的作用的直接证据来自小鼠模型, 主要由 Raz et al., 但也有其他人 (在 Leffler(编者), 2004b 中)。在配对的肿瘤细胞系 (具有降低或增加表达的半乳糖凝集素-3) 中, 诱导半乳糖凝集素-3 引起更多的肿瘤和转移, 而抑制半乳糖凝集素-3 引起较少的肿瘤和转移。已经提出半乳糖凝集素-3 由于抗细胞凋亡而促进肿瘤生长、促进血管生成或者通过影响细胞黏附而促进转移。由上可知, 明显地半乳糖凝集素-3 的抑制剂可以具有宝贵的抗癌效果。实际上, 声称但未证明抑制半乳糖凝集素-3 的糖类已经报道为具有抗癌效果。在发明人自己的研究中, 含有 CRD 的半乳糖凝集素-3 的片段通过充当显性负性抑制剂而在小鼠模型中抑制了乳腺癌 (John et al., 2003)。最近, 在细胞试验和体外 (Lin et al., 2009) 以及在体内 (Glinsky et al., 2009) 使用小分子抑制半乳糖凝集素-3 已经证明的确极大地增强了肿瘤细胞对辐射和标准促凋亡药物的敏感性。

[0017] 半乳糖凝集素-1 也常常在低分化的癌细胞中过表达, 并且可以在特定的癌症类型中诱导半乳糖凝集素-9 或其相关的半乳糖凝集素-4 和半乳糖凝集素-8 (Huflejt 和 Leffler, 2004; Leffler(编者), 2004b)。半乳糖凝集素-1 在活化的 T- 细胞中诱导细胞凋亡并且在体内对自体免疫疾病具有显著的免疫抑制作用 (Rabinovich et al.; 和 Pace et al. 在 Leffler(编者), 2004b 中)。因此, 这些半乳糖凝集素在癌症中的过表达可以协助肿瘤防御由宿主产生的 T- 细胞响应。

[0018] 许多年前已经为半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 建立了无效突变体小鼠 (Poirier, 2002)。在动物室条件下这些小鼠通常显然是健康和繁殖的。但是, 最近的研究已经显示出半乳糖凝集素-3 无效突变体在嗜中性粒细胞和巨噬细胞的功能 (如上所述) 中和在骨形成中、以及半乳糖凝集素-1 无效突变体在神经和肌肉细胞再生 / 分化中的不典型表型 (Leffler et al., 2004; Poirier, 2002; Watt 在 Leffler(编者), 2004b 中)。最近已经生成了半乳糖凝集素-7 和半乳糖凝集素-9 无效突变体小鼠, 并且其在动物室条件下也非常健康, 但是还没有详细的进行分析。表达的部位、特异性和其他性质的差异使得不同的半乳糖凝集素在功能上不太可能彼此替换。如在动物室条件下可以观察到的, 在无效突变体小鼠中的观察可能表明半乳糖凝集素对于基本的生命支持功能不是必需的。相反, 它们可能是正常功能的优化子 (optimizers) 和 / 或在动物室条件下没有发现应激条件中是必需的。在无效突变体小鼠中强作用的缺乏可能使得半乳糖凝集素抑制剂作为药物更有利。如果按照上文所提议的, 半乳糖凝集素活性促进了病理状况而对正常状况作用较小, 那么抑制它们将具有更小的不希望的副作用。

[0019] 血管生成的治疗

[0020] 通过 VEGF 受体-2 (VEGFR-2) 的血管内皮生长因子 (VEGF) 信号转导是主要的血管生成通路。已经发表的研究显示, 半乳糖凝集素-1 (Gal-1) 和半乳糖凝集素-3 (Gal-3) 是 VEGF/VEGFR-2 信号通路的重要调节剂。还已经发表, 预期半乳糖凝集素抑制剂 TDX 在防病理性血管生成上具有疗效 (Chen2012)。

[0021] 已知的抑制剂

[0022] 天然配体

[0023] 固相结合测定和抑制测定已经鉴定了具有结合半乳糖凝集素能力的大量糖类和糖缀合物 (glycoconjugates, 糖轭合物) (由 Leffler, 2001 和 Leffler et al., 2004 综述)。所有的半乳糖凝集素均以 0.5-1mM 的 K_d 结合乳糖。D- 半乳糖的亲和力低 50-100 倍。N- 乙酰乳糖胺及相关的二糖的结合与乳糖大约相同, 但是对于某些半乳糖凝集素, 它们可以更差结合或者更好至最高达 10 倍结合。半乳糖凝集素 -3 的最佳的小糖类配体是携带有连接至乳糖或 LacNAc- 残基的血型 A- 决定簇的那些, 并且发现它们的结合比乳糖更好至最高达约 50 倍。半乳糖凝集素 -1 没有表现出对这些糖类的偏好性。

[0024] 已经提出了将聚乳糖胺型的较大的糖类作为半乳糖凝集素的优选的配体。在溶液中, 使用携带有聚乳糖胺的糖肽, 对于半乳糖凝集素 -3 已经具有关于此的证据, 但是对于半乳糖凝集素 -1 则没有 (Leffler 和 Barondes, 1986)。已经报道了经修饰的植物果胶多糖结合半乳糖凝集素 -3 (Pienta et al., 1995)。

[0025] 已经确定, 上述作为半乳糖凝集素 -3 的配体的天然糖类不适合于在药物组合物中用作活性组分, 因为它们对胃中的酸性水解和对于酶促降解敏感。另外, 天然糖类在本质上是亲水性的, 并且在口服给予后不容易经胃肠道吸收。

[0026] 半乳糖凝集素特异性

[0027] 使用通过上述的小天然糖类的抑制对半乳糖凝集素特异性的研究表明, 所有的半乳糖凝集素都结合乳糖、LacNAc 和相关的二糖类, 但是半乳糖凝集素 -3 能够更好地结合某些更长的糖类 (Leffler 和 Barondes, 1986)。这些更长的糖类的特征在于具有添加至其结合延伸的结合沟的半乳糖的 C-3 位 (在例如乳糖或 LacNAc 中) 的另外的糖残基。这种沟的形状在半乳糖凝集素之间不同, 表明相同的延伸将不会由不同半乳糖凝集素相等地结合。

[0028] 合成的抑制剂

[0029] 最初作为天然化合物在血清中鉴定出了偶联至具有抗癌活性的氨基酸的糖类, 但是随后制备出了合成的类似物 (Glinsky et al., 1996)。其中, 具有偶联至氨基酸的乳糖或半乳糖的那些抑制半乳糖凝集素, 但是仅具有与对应的未衍生化的糖大约相同的效力。抑制半乳糖凝集素 -3 的化学修饰形式的柑橘果胶 (Piatt 和 Raz, 1992) 在体内显示出抗肿瘤活性 (Pienta et al., 1995; Nangia-Makker et al., 2002)。

[0030] 具有最多达四个乳糖部分的簇分子在当结合至半乳糖凝集素 -3 时显示出强的多价作用, 但结合至半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -5 时则不会 (Vrasidas et al., 2003)。具有七个半乳糖、乳糖或 N- 乙酰基乳糖胺残基的基于环糊精的糖簇分子也显示出对半乳糖凝集素 -3 的强的多价作用, 但对半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -7 作用较弱 (Andre et al., 2004)。与乳糖相比, 在乳糖残基中制成多价的星状树枝状聚合物 (Starburst dendrimers) (André et al., 1999) 和糖聚合物 (Pohl et al., 1999; David et al., 2004) 已经被描述为具有轻微改善效力的半乳糖凝集素 -3 抑制剂。已经被确定为半乳糖凝集素 -3 配体的前述合成化合物不适合于在药物组合物中用作活性组分, 因为它们本质上是亲水性的并且经口服给予后不容易从胃肠道中吸收。

[0031] 上述的天然寡糖、糖簇分子、糖树枝状聚合物和糖聚合物极性过高并且过大以致于不能被吸收, 并且在一些情况下大到足以在患者中产生免疫应答。另外, 它们对胃中酸性水解和酶促水解敏感。因此, 需要小的合成分子。

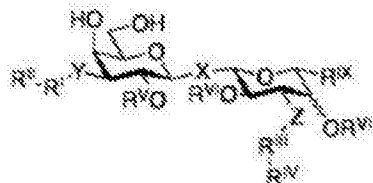
[0032] 已知硫代二半乳糖苷是合成的且是水解稳定的、但是为极性的抑制剂, 与 N- 乙酰

基乳糖胺几乎一样有效 (Leffler 和 Barondes, 1986)。已经证明, 在 C-3' 携带有芳香酰胺或取代的苄基醚的 N-乙酰基乳糖胺衍生物是半乳糖凝集素 -3 的高效抑制剂, 具有低至 $4.8 \mu\text{M}$ 的无先例的 IC_{50} 值, 与天然 N-乙酰基乳糖胺二糖相比, 这是 20 倍的提高 (Sörme et al., 2002; Sörme et al., 2003b)。由于存在芳香酰胺基部分, 这些衍生物在整体上更不具极性, 并由此更加适合于在体内作为抑制半乳糖凝集素的试剂。另外, 已经证明 C3-三唑基半乳糖苷是与一些半乳糖凝集素的相应 C3-酰胺一样有效的抑制剂。因此, 任何适当地构造的半乳糖 C3-取代基可以赋予增强的半乳糖凝集素亲和力。

[0033] 然而, C3-酰氨基 - 衍生的化合物和 C3-三唑基 - 衍生的化合物仍然对体内水解降解敏感, 原因在于在半乳糖和 N-乙酰基乳糖胺的糖基部分中存在糖苷键, 并且, 虽然它们是半乳糖凝集素 -3 的有效的小分子抑制剂, 但是仍需要进一步提高亲和力和稳定性。因此, 已经开发出基于硫代二半乳糖苷的 3, 3' - 双酰胺基 - 衍生化或 3, 3' - 双三唑基 - 衍生化的抑制剂 (Cumpstey et al., 2005b; Cumpstey et al., 2008; Salameh et al., 2010; WO/2005/113569 和 US2007185041; WO/2005/113568, US7, 638, 623B2), 它们缺少水解和酶解不稳定的 O-糖苷键。这些抑制剂对于多种半乳糖凝集素也表现出优异的亲和力 (下降至低 nM 范围 (等级, range) 内的 Kd)。然而, 虽然对半乳糖凝集素表现出高亲和力, 但是 3, 3' - 衍生化的硫代二半乳糖苷仍然包含缺点, 在它们的多步骤合成中涉及双反转反应以得到 3-N-衍生化的半乳糖结构单元。另外, 硫代二半乳糖苷中的一个半乳糖环的环己烷置换已经证明模仿半乳糖环并因此提供效率接近双酰胺基 - 衍生物和双三唑基 - 硫代二半乳糖苷衍生物的半乳糖凝集素 -1 和 -3 抑制剂 (WO/2010/126435)。用取代的环己烷置换 D-吡喃半乳糖单元降低了极性并且最有可能还降低代谢易感性, 从而改善药物样性质。

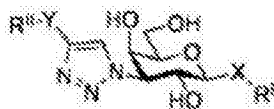
[0034] 一些早先描述的化合物具有下列通式

[0035]



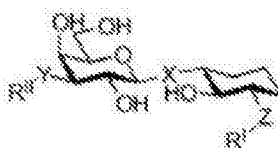
[0036] 如 WO/2005/113568 中所述, 和

[0037]



[0038] 如 WO/2005/113569 中所述, 其中 R 可以是 D-半乳糖, 和

[0039]



[0040] 如 WO/2010/126435 中所述。

[0041] 因此, 由于朝向半乳糖 3-N-衍生化 (Z 和 Y 优选地为氮原子) 的制造方法 (其涉及以现有技术化合物的复杂保护的 D-吡喃半乳糖衍生物的双反转反应) 不太理想, 所以在

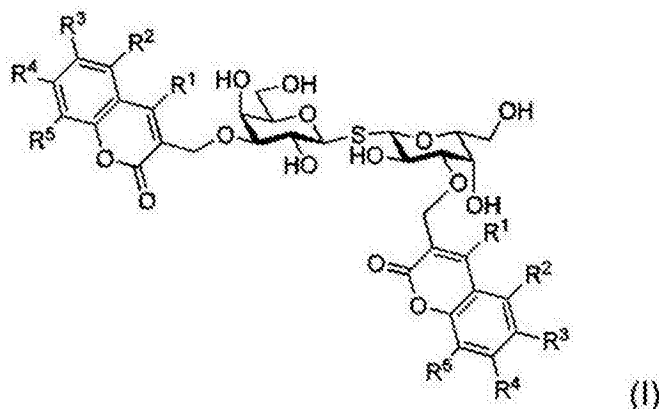
针对半乳糖凝集素特别是半乳糖凝集素-1和半乳糖凝集素-3的抑制剂领域中仍然具有相当大的需求。

发明内容

[0042] 因此,本发明涉及通过 3-O-炔丙基-半乳糖衍生物容易制造的化合物,其在硫代二半乳糖苷 I 的 03- 和 03'- 位置处携带有香豆基甲基 (coumarylmethyl) 部分,并且具有可与现有技术已知化合物相媲美的半乳糖凝集素-结合活性。

[0043] 本文中公开的化合物具有通式 (I)

[0044]



[0045] 其中：

[0046] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地选自由氢、可选取代的烷基、卤素、至少一个碳可选取代的烷氧基、羟基、取代的羰基、可选取代的酰氧基和可选取代的氨基所组成的组。在相邻位置处的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的两个、三个、四个或五个可以连接以形成一个或多个环,其中其余的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地选自上述组。

[0047] 从结构 (I) 中可以明显看出,吡喃糖环的构型是 β -D- 半乳糖。

[0048] 本发明还涉及上述的化合物作为药物的用途。

[0049] 另外,本发明涉及包含一种或多种上述化合物和至少一种药用佐剂、稀释剂、赋形剂和 / 或载体的药物组合物。

[0050] 另外,本发明涉及上述化合物在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症的用途。

[0051] 另外,本发明涉及上述化合物用于制造用于在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症的药物的用途。

[0052] 另外,本发明涉及用于在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症的方法,其中,向需要所述治疗的哺乳动物给予治疗有效的至少一种权利要求 1-4 中任一项所述的化合物。

[0053] 本文中所公开的化合物主要是半乳糖凝集素-3 抑制剂。但是,在一定程度上,至少其中的一些也是其他半乳糖凝集素的抑制剂。

[0054] 香豆基取代的硫代二半乳糖苷作为半乳糖凝集素抑制剂的设计

[0055] 现有技术描述了将增强亲和力的结构部分连接到硫代二半乳糖苷的 3- 和 3'- 位的不同方法。所描述的部分通过 O 或 N 连接到硫代二半乳糖苷的。但是,为了获得对半乳

糖凝集素且特别是半乳糖凝集素-3的高亲和力,这些结构部分应当通过N(酰胺键或三唑环)连接至硫代二半乳糖苷的3-和3'-位的芳族基团(Cumpstey et al., 2005b; Cumpstey et al., 2008; Salameh et al., 2010; W02005113569/US2007185041; W02005113568、US7,638,623B2)。通过O连接的结构部分提供了抑制作用,但是具有更低的亲和力(Delaine et al., 2008)。通过N连接到硫代二半乳糖苷的3-和3'-位的要求导致用于将N原子引入到硫代二半乳糖苷的3-和3'-位置时非最佳延长的合成顺序。发明人已经发现,通过将O-炔丙基连接到硫代二半乳糖苷的3-和3'-位可以获得在硫代二半乳糖苷的3-和3'-位更加容易得到的O-连接的结构部分。使用众所周知的有效化学转化可以将O-炔丙基转化为不同的杂环芳环体系。将吡喃半乳糖衍生物上的3-O-炔丙基转化为香豆基甲基结构,然后实施硫代二半乳糖苷形成确实得到了具有与现有技术3,3'-二酰胺基-和3,3'-三唑基-硫代二半乳糖苷在相同范围内的有效性的抑制剂。这是预料不到的,因为现有技术O3-和O3'-连接的硫代二半乳糖苷远没有N-连接的衍生物有效。这种预料不到的效率明显地是由于从容易得到的携带O-炔丙基的前体分子获得的被取代的(杂)双环部分(香豆基甲基)的最佳性质所带来的。

具体实施方式

[0056] 根据本发明的一个方面,如上所述, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地选自由氢、可选取代的烷基、卤素、在至少1个碳上可选取代的烷氧基、羟基、取代的羰基、可选取代的酰氧基和可选取代的氨基所组成的组。

[0057] 在本发明中,术语“烷基”涉及含有1-7个碳原子的烷基,其可以包含一个或多个不饱和的碳原子。在一些实施方式中,烷基含有1-4个碳原子,其可以包含一个或多个不饱和的碳原子。烷基中的碳原子可以形成直链或支链。所述烷基中的碳原子也可以形成含有3、4、5、6或7个碳原子的环。因此,本文中使用的术语“烷基”涵盖甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和1-甲基环丙基。

[0058] 如上所述,如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个或多个是烷基,则该烷基可以被可选地取代。如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的几个是烷基,则它们彼此独立地可选地被取代。这种可选的取代是指可以用一个、两个或更多个在有机化学领域中众所周知的取代基取代烷基。可以用于本文中公开的可选地被取代的烷基的取代基的实例是卤素、烷氧基、硝基、磺基、氨基、羟基和羰基。

[0059] 在本发明中,术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘基。

[0060] 在本发明中,术语“烷氧基”涉及含有1-7个碳原子的烷氧基,其可以包括一个或多个不饱和的碳原子。在一些实施方式中,烷氧基含有1-4个碳原子,其可以包括一个或多个不饱和的碳原子。因此,术语“烷氧基”涵盖甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、异戊氧基、3-甲基丁氧基、2,2-二甲基丙氧基、正己氧基、2-甲基戊氧基、2,2-二甲基丁氧基、2,3-二甲基丁氧基、正庚氧基、2-甲基己氧基、2,2-二甲基戊氧基、2,3-二甲基戊氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基、环庚氧基和1-甲基环丙氧基。

[0061] 如上所述,如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个或多个是烷氧基,则该烷基可以可选地被取代。如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的几个是烷氧基,则它们彼此独立地可选地被取代。这种可选的取代是指可以用一个、两个或更多个在有机化学领域中众所周知的取代基取代烷氧基。可以用于本文中公开的可选地被取代的烷氧基的取代基的实例是卤素、烷氧基、氨基、羟基和羰基。

[0062] 如上所述, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个或多个可以是取代的羰基。可以用有机化学领域中众所周知的取代基取代每个羰基。可以用于本文中公开的取代的羰基的取代基的实例是氢、烷基、芳基、杂芳基、苯基、氨基、烷氧基和羟基。所述羰基也可以并入包含 9-14 个碳原子如 10 个碳原子的双环至多环结构。因此,根据本发明的表述“取代的羰基”涵盖任何苯甲酰基、萘甲酰基等。

[0063] 在本发明中,术语“酰氧基”涉及含有 1-7 个碳原子的基团,其可以包括一个或多个不饱和的碳原子。在一些实施方式中,酰氧基含有 1-4 个碳原子,其可以包括一个或多个不饱和的碳原子。因此,术语“酰氧基”涵盖乙酰氧基、丙酰氧基等。

[0064] 如上所述,如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个或多个是酰氧基,则该酰氧基可以可选地被取代。如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的几个是酰氧基,则它们彼此独立地可选地被取代。这种可选的取代是指可以用一个、两个或更多个有机化学领域中众所周知的取代基取代酰氧基。可以用于本文中公开的可选地取代的酰氧基的取代基的实例是卤素、烷氧基、氨基、羟基和羰基。卤素取代基是溴、氟、碘和氯。

[0065] 如上所述,如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个或多个是氨基,则该氨基可以可选地被取代。如果 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的几个是氨基,则它们彼此独立地可选地被取代。这种可选的取代是指可以用一个、两个或更多个有机化学领域中众所周知的取代基取代氨基。可以用于本文中公开的可选地被取代的氨基的取代基的实例是烷基、羰基、芳基、杂芳基和苯基。所述氨基也可以并入包含 9-14 个碳原子例如 10 个碳原子的双环至多环结构。因此,术语“取代的氨基”将指任何苯甲酰氨基、环己基氨基、苯基氨基等。

[0066] 另外,相邻位置的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的两个、三个、四个或五个可以连接以形成一个或多个环,其中其余的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地选自上述的组。这样的环可以是脂肪族或芳香族的并且可以含有杂原子。此种环的实例是苯、吡啶、环戊烷和萘环。在一些实施方式中, R^2 和 R^3 形成苯环。

[0067] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立于其他的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 是氢。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是氢。

[0068] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立地选自由卤素所组成的组。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是卤素。

[0069] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立地选自由可取代的烷氧基所组成的组。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是可取代的烷氧基。

[0070] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立地是羟基。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是羟基。

[0071] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立地选自由可选地被取代的羰基所组成的组。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是可选地

被取代的羰基。

[0072] 在一些实施方式中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的至少一个独立地选自自由可选地被取代的氨基所组成的组。因此, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 中的一个、两个、三个、四个或全部可以是可选地被取代的氨基。

[0073] 在一些实施方式中, 通式 (I) 的化合物具有小于 (即 <) $1 \mu M$ 的针对半乳糖凝集素 -3 的 K_d 。在此背景下, K_d 值是根据 Sörme et al, 2003a, 2004 中所描述的测试来测量的。

[0074] 在一些实施方式中, R^5 是氢。

[0075] 在一些实施方式中, R^2 是氟而 R^1 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0076] 在一些实施方式中, R^3 是氟而 R^1 、 R^2 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0077] 在一些实施方式中, R^3 是羟基而 R^1 、 R^2 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0078] 在一些实施方式中, R^4 是羟基而 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^5 的每一个是氢。

[0079] 在一些实施方式中, R^2 和 R^3 均是氟, 而 R^1 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0080] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 均是氟, 而 R^1 、 R^2 和 R^5 的每一个是氢。

[0081] 在一些实施方式中, R^2 是氟而 R^1 、 R^3 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0082] 在一些实施方式中, R^2 和 R^3 连接以形成苯环, 而 R^1 、 R^4 和 R^5 的每一个是氢。

[0083] 在一些实施方式中, 通式 (I) 中的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 均为氢。

[0084] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (bis-{3-O-[(2H-1-benzopyran-2-on-3-yl)-methyl]- β -D-galactopyranosyl} sulfan e) (20)。

[0085] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(7- 氯 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (21)。

[0086] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(7- 甲氧基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (22)。

[0087] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(7- 羟基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (23)。

[0088] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(6- 羟基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (24)。

[0089] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(3H- 萘并 [2, 1-b] 吡喃 -3- 酮 -2- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (25)。

[0090] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(6- 叔丁基 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (26)。

[0091] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(6- 氯 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (27)。

[0092] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(6- 氟 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (28)。

[0093] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(6, 7- 二氟 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (29)。

[0094] 在一些实施方式中, 化合物是双 -{3-O-[(5- 氯 -2H-1- 苯并吡喃 -2- 酮 -3- 基) - 甲基] - β -D- 吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (30)。

[0095] 在一些实施方式中,化合物是双-{3-O-[(5-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基}硫烷(31)。

[0096] 在一些实施方式中,化合物是双-{3-O-[(5,6-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基}硫烷(32)。

[0097] 在一些实施方式中,化合物是双-{3-O-[(6-三氟甲氧基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基}硫烷(33)。

[0098] 在一些实施方式中,化合物是双-{3-O-[(7-甲基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基}硫烷(34)。

[0099] 如上所述,除了本文中公开的化合物之外,本文中所公开的药物组合物进一步包含至少一种药用佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体。在一些实施方式中,药物组合物包含1-99重量%的所述至少一种药用佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体以及1-99重量%的本文所公开的化合物。活性成分与药用佐剂、稀释剂、赋形剂和/或载体的组合量不得构成多于药物组合物重量的100%。

[0100] 如上所述,本文所公开的化合物和药物组合物可以用于在哺乳动物中治疗与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症。

[0101] 当本文公开的化合物和药物组合物用于上述的治疗和/或抑制时,向需要所述治疗的哺乳动物给予治疗有效量的至少一种化合物。

[0102] 本文中使用的术语“治疗”涉及为了治愈或缓解疾病或病况的治疗,并且涉及为了防止疾病或病况的发展的治疗。治疗可以以迅速(急性, acute)或长期(慢性, chronic)的方式进行。

[0103] 术语“治疗有效量”涉及将带来所需的治疗效果的量。

[0104] 在一些实施方式中,哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是依赖于半乳糖凝集素的表达的病症。

[0105] 在本上下文中,术语“配体”涉及半乳糖凝集素与其结合的配体、受体和/或类似的结构。此种配体、受体和/或类似的结构可以例如是糖脂、糖蛋白或蛋白聚糖。

[0106] 在一些实施方式中,半乳糖凝集素是半乳糖凝集素-3。

[0107] 在一些实施方式中,以上提及的哺乳动物是人类。

[0108] 在一些实施方式中,哺乳动物是已经发现具有高水平的半乳糖凝集素-3的人类。这可能已经通过使用专有的或市售的测试(如ELISA或适合于测量来自所述哺乳动物的体液或组织中半乳糖凝集素-3的类似的基于抗体的检测系统)进行了检测。可以通过实施免疫测定法来定量半乳糖凝集素-3水平。半乳糖凝集素-3的免疫测定法包括在如果存在半乳糖凝集素-3时能够发生免疫特异性结合的条件下,将来自待测试的受试者的样品与适合的抗体接触,和检测或测量任何通过抗体的免疫特异性结合的量。可以使用任何合适的免疫测定法,包括但不限于使用如蛋白质印迹、放射免疫测定法、免疫组织化学、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定法、免疫沉淀测定法、免疫扩散测定法、凝集测定法、补体结合测定法、放射免疫检测法、荧光免疫测定法和蛋白质A免疫测试法等技术的竞争性和非竞争性测定系统。最常见的酶免疫测定法是“酶联免疫吸附测定(ELISA)”。ELISA是一种使用标记(例如酶连接的)形式的抗体用于检测和测量抗原的浓度的技术。存在不同形式的ELISA,它们是本领域技术人员众所周知的。标准的ELISA技术描述于“Methods

in Immunodiagnosis”,第2版,Rose和Bigazzi, eds. John Wiley&Sons, 1980 ;Campbell et al., “Methods and Immunology”, W. A. Benjamin, Inc., 1964 ;和 Oellerich, M. (1984), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22:895-904。优选的用于检测半乳糖凝集素-3的酶联免疫吸附测定试剂盒(ELISA)是市售的(BG Medicine, Waltham, Mass.)。

[0109] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是炎症性病症或疾病。可以根据本发明治疗或用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的此种炎症性病症或疾病的实例是IBD(炎症性肠病)、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、SLE(系统性红斑狼疮)、多发性硬化。

[0110] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是纤维变性,其也可以表示为纤维化疾病、病况或病症。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的纤维化疾病的实例是肺纤维化、肝纤维化和肾纤维化;心脏的纤维化和由纤维化引起的心力衰竭、眼纤维化(即眼部纤维化)、伤后纤维化、术后纤维化、辐射诱发的纤维化、与炎症性病况相关的纤维化、消化道纤维化、腹膜纤维化和在任何器官中损害所述器官的正常功能的纤维化。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的肺纤维化的一个实例是特发性肺纤维化。

[0111] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是脓毒性休克。

[0112] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是癌症,包括癌转移。

[0113] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是自身免疫性疾病。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的自身免疫性疾病的实例是类风湿关节炎和多发性硬化症。

[0114] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是代谢紊乱。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的代谢紊乱的一个实例是糖尿病。

[0115] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是心脏疾病或心力衰竭。

[0116] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是病理性血管生成。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的病理性血管生成的实例是眼部血管生成、与眼部血管生成相关的疾病或病况以及癌症。

[0117] 在一些实施方式中,在哺乳动物中与半乳糖凝集素和配体的结合相关的病症是眼疾病。可以根据本发明治疗或使用本发明所述的化合物或药物组合物治疗的眼疾病的实例是如上所述的眼部血管生成以及与眼部血管生成相关的疾病或病况以及相关黄斑变性和角膜新生血管。

[0118] 在一些实施方式中,只将一种本文公开的化合物用于上述的目的。

[0119] 在一些实施方式中,将两种或多种本文中公开的化合物组合使用以用于上述的目的。

[0120] 包含本发明的化合物的本发明所述的药物组合物可以适应于口服、静脉内、局部、腹膜内、经鼻、口腔、舌下或皮下给予,或者适应于例如气雾剂或空气悬浮细粉的形式经

呼吸道给予,或者适应于经眼、眼内、玻璃体内或角膜给予。因此,本发明的药物组合物可以是例如片剂、胶囊剂、粉剂、用于注射的溶液、用于喷雾的溶液、软膏剂、透皮贴剂或栓剂的形式。替代地,特别是用于治疗影响眼睛的不同疾病或病症,本发明的药物组合物可以是滴眼剂、眼胶、眼部喷雾或眼罩的形式。

[0121] 本发明的药物组合物可以可选地包含两种或多种本发明的化合物。组合物也可以与本领域中用于治疗相关疾病的其他药剂一起使用。

[0122] 本发明的化合物的典型剂量在宽的范围内变化并且取决于许多因素,例如给予途径、需要治疗的个体的需求、个体的体重、年龄以及一般的状况。

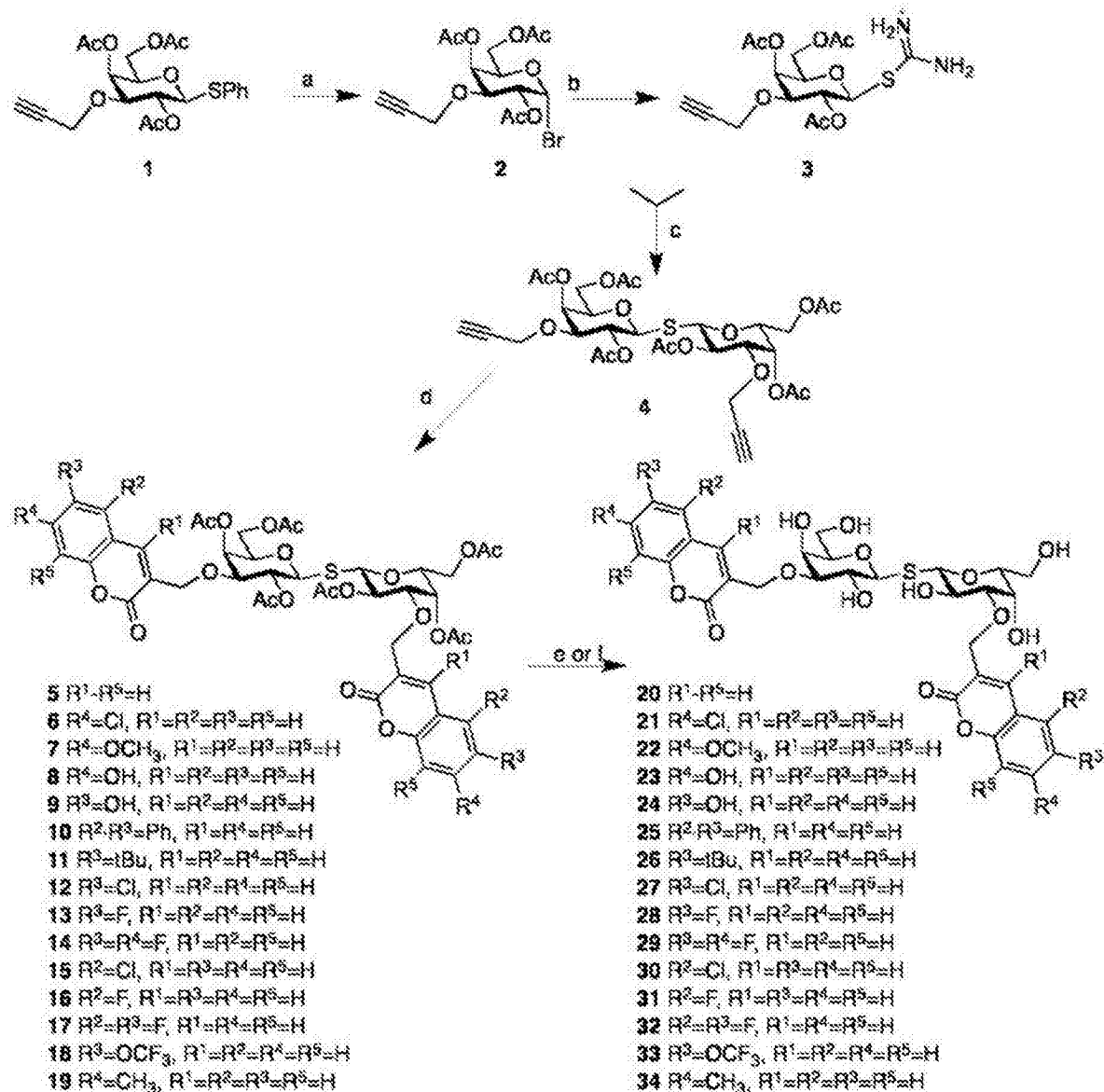
[0123] 可以在本发明的组合物中使用的佐剂、稀释剂、赋形剂和 / 或载体在与化合物和药物组合物的其他成分相容性的意义上必须是药用的,并且对接受者无毒害。优选地所述组合物不得含有可能引起不良反应(如致敏反应)的任何材料。可以在本发明的药物组合物中使用的佐剂、稀释剂、赋形剂和载体为本领域技术人员所众所周知。

[0124] 实施例

[0125] 合成香豆基取代的硫代二半乳糖苷

[0126] 如方案 1 所示,由苯基 3-O- 炔丙基 -1- 硫代 - β -D- 吡喃半乳糖苷 (phenyl3-O-propargyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)1 (Giguere et al., 2006) 合成香豆基取代的硫代二半乳糖苷。

[0127]



[0128] 方案 1. a) Br_2 、 CH_2Cl_2 ; b) 硫脲、MeCN; c) Et_3N 、MeCN; d) TsN_3 、CuI、水杨醛和苯乙酮衍生物、THF; e) NaOMe、MeOH; f) AcCl、MeOH。

[0129] 评价针对半乳糖凝集素-3 的 Kd 值

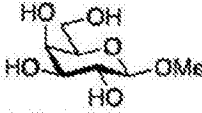
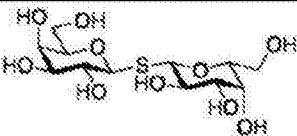
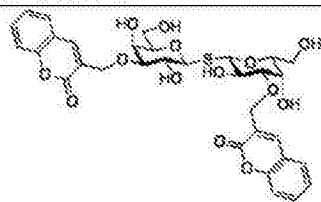
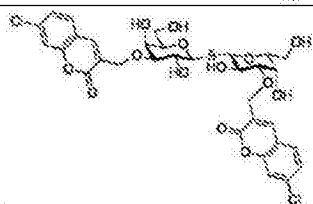
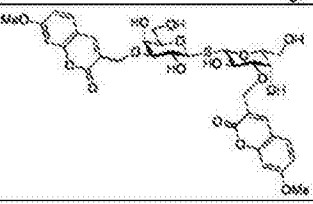
[0130] 以已知的基于荧光偏振的测定法 Sörme et al., 2003a, 2004) 评价化合物 20-34 抑制半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 的效力 (还参见如下表 1)。包括已知的半乳糖凝集素抑制剂甲基 β -D-半乳糖苷和硫代二半乳糖苷作为参考化合物。实际上,所有的化合物都是半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 的有效的抑制剂,具有在低的 μM 或 nM 范围内的解离常数。这证明,在硫代二半乳糖苷的 O3 或 O3' 上的合成简单的且适当结构化的香豆基取代基显示出在可比较的 3-N-取代的和合成地先前已知化合物 (3, 3'-酰胺基-硫代二半乳糖苷;如紧密相关的 36) 的范围内的抑制效力,并且当以相同的测定法进行评价时,比可比较的先前已知最佳 3-O-取代的化合物 (3, 3'-二酯硫代二半乳糖苷 35) 显著地更好。

[0131] 在最佳现有技术的范围内,20、23-24 和 28-32 的出乎意料的高抑制剂效力连同通过可容易得到的 3-O-炔丙基-半乳糖衍生物的显著简化的合成路线一起,使得 3-O-香豆

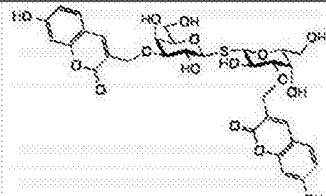
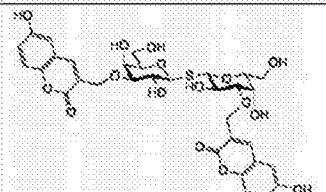
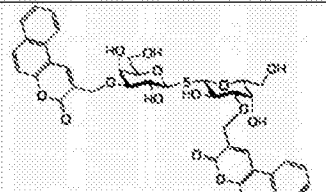
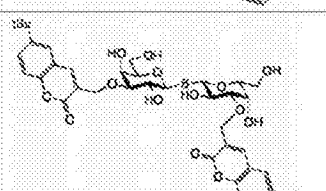
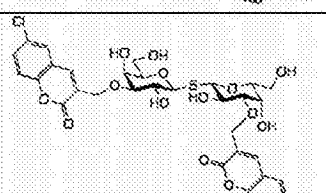
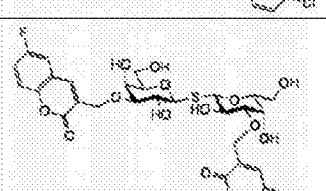
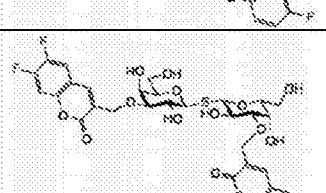
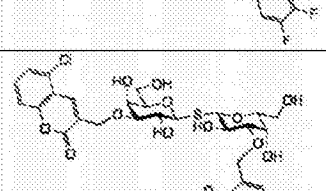
基取代的硫代二半乳糖苷适合于在靶向其中半乳糖凝集素-3起致病作用的病况的药物组合物中作为活性化合物。

[0132] 表 1. 化合物对半乳糖凝集素-1、3、7、8(N-末端结构域)和9(N-末端结构域)的亲合力

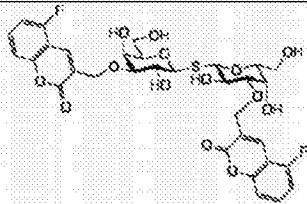
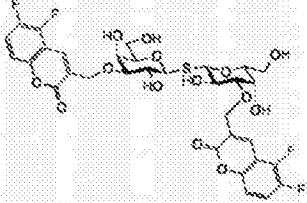
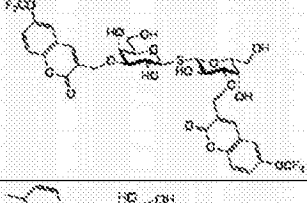
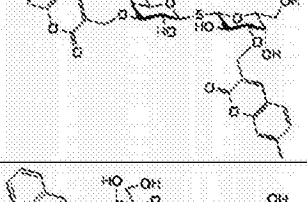
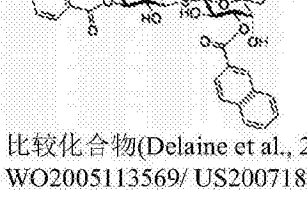
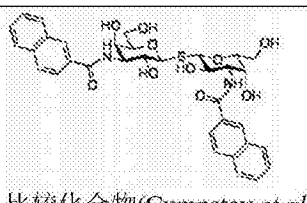
[0133]

Cpd #	结构	计算的 Kd(μM)半乳糖凝集素							
		1	3	4(N-末端结构域)	4(C-末端结构域)	7	8(N-末端结构域)	9(N-末端结构域)	9(C-末端结构域)
	 参考化合物	> 10000	4400	6600	> 10000	4800	5200	3400	5000
	 参考化合物	24	49	440	940	160	61	38	44
20		15.4	0.25	49	156	3.9	11	1.7	2.4
21		21	4.7	na*	na	61	74	140	Na
22		9.9	0.89	130	>500	37	85	13	≈4.0

[0134]

23		3.9	0.076	32	>300	na	40	1.5	na
24		20	0.15	180	>300	na	140	8.9	na
25		22	0.51	110	>300	na	>300	4.7	na
26		25	8.1	>1000	>>100 0	na	62	39	17
27		7.9	6.0	430	100	na	34	>200	86
28		3.4	0.097	180	>>100 0	na	47	3.5	7.9
29		1.6	0.11	44	220	na	19	3.0	2.3
30		25	0.17	55	>>100 0	na	28	54	16

[0135]

31		8.7	0.061	46	540	na	28	7.0	5.5
32		3.9	0.032	22	>500	na	41	1.1	1.5
33		84	0.95	>500	>500	na	110	29	21
34		200	9.4	>500	>500	na	>700	>200	>500
35	 比较化合物(Delaine et al., 2008; WO2005113569/ US2007180541)	14.7	10.7	na	na	48	100	2.8	na
36	 比较化合物(Cumpstey et al., 2005b; Cumpstey et al., 2008; WO2005113569/US2007185041)	9.6	0.16	na	na	1.7	>100	0.73	na

[0136] *na = 不可用 ;> = 大于 ;>> = 远大于 ;≈ = 大约

[0137] 方法 / 实验

[0138] 一般合成步骤

[0139] 可以通过下述的一般方法和步骤来制备本文中公开的化合物。可以通过下述的一般方法和处理来实施本文中使用的半乳糖凝集素-1测定法、半乳糖凝集素-3测定法、半乳糖凝集素-7测定法、半乳糖凝集素-8测定法和半乳糖凝集素-9测定法。应当理解的是,在给出了典型或优选的处理条件(例如,反应温度、时间、反应物的摩尔比、溶剂、压力、pH等)的情况下,除非另有说明,还可使用其他处理条件。最佳反应条件可随所使用的特定的反应物、溶剂以及pH等而变化,但此种条件可以由本领域技术人员通过常规优化过程来确定。

[0140] 由HRMS(Micromass Q-tof micro)和NMR(Bruker Ultrashield400plus, 400MHz)

进行物质的鉴定。使用残留 CHD_2Cl (7.26ppm) 或 CHD_2OD (3.35ppm) 作为参照由 Me_4Si 的低场来报告化学位移。从 $^1\text{H-NMR}$ 获得化学位移和耦合常数并且由 COSY 实验分配质子共振。由 RF-HPLC (Beckman, system gold) 或使用硅胶 (Davisil35-70 μm , 60 $\text{\AA}$) 由快速色谱法来进行纯化。用 UV 光、 H_2SO_4 (水溶液) 或异-香草醛 / H_2SO_4 / EtOH 显影溶液可视化的 TLC (铝板, 硅胶 60F254) 来监测反应。经钠 / 苯甲酮无水 THF 和 Et_2O 并且蒸馏。通过分子筛 (4 $\text{\AA}$, 1.6mm) 干燥 CH_2Cl_2 。其他溶剂和试剂是市售的并且未经进一步纯化而使用。在 PolarStar 仪器 (BMG, Offenburg ;Germany) 上进行荧光偏振实验。如文献 Sörme et al., 2003a, 2004) 中所描述的, 使用荧光偏振对作为半乳糖凝集素的抑制剂的 20-34 进行评价。半乳糖凝集素浓度和荧光探针的选择和浓度如 Cumpstey et al. 2005a 中所描述, 但是半乳糖凝集素-3 除外, 用于半乳糖凝集素-3 的探针是描述于 Salomonsson et al. 2010 中的 tdga- 探针, 其以 20nM、连同 200nM 浓度的半乳糖凝集素-3 一起使用。每种抑制剂都是在 4-0.25 μM 之间的多个浓度下一式两份测试的。所有荧光偏振实验均在 20 $^\circ\text{C}$ 下进行, 但是半乳糖凝集素-7 除外, 其实验是在 0 $^\circ\text{C}$ 下进行的。

[0141] 合成双-(3-O-炔丙基- β -D-吡喃半乳糖酰基)-硫烷 (化合物 4)

[0142] 向化合物 1 (2.0g, 4.58mmol, Giguere et al. 2006) 的无水二氯甲烷 (20mL) 溶液中加入分子溴 (0.26mL, 5.04mmol) 并且在 0 $^\circ\text{C}$ 下将该溶液搅拌 15min, 此时 TLC 显示起始原料完全转化为稍快移动的组分。用环戊烯中和过量的溴并且在真空中蒸发溶剂。使用正己烷-EtOAc (2:1) 通过快速色谱法纯化残留物以得到纯的化合物 2 (1.52g, 82%), 为无色粘稠浆液。注意到化合物 2 的易受影响的稳定性, 认为在进一步反应中无需对其进行分析表征。在连续流动的氮气下, 向在无水乙腈 (15mL) 中的一半量 (0.76g, 1.87mmol) 的化合物 2 中加入硫脲 (0.14g, 1.86mmol), 并且使该混合物在 80 $^\circ\text{C}$ 下回流 4h, 此时使用正己烷-EtOAc (2:1) 流动相的 TLC 确认 2 完全消耗为较慢移动的点。使反应混合物冷却至室温并且随后在氮气气氛下将第二个半量化合物 2 (0.76g, 1.87mmol) 的无水乙腈溶液加入到该反应中, 随后加入催化量的 Et_3N , 并且将反应物搅拌过夜。TLC (流动相正己烷-EtOAc (1:1)) 确认反应完成。在真空中蒸发溶剂。通过快速色谱法使用正己烷-EtOAc (1:1) 纯化残留物得到纯的化合物 4 (0.92g, 72%), 为白色固体。

[0143] 用于合成香豆素类 20-34 的一般实验步骤

[0144] 在氮气下, 搅拌在 25mL 的圆底烧瓶中的 4 (1mmol)、甲苯磺酰叠氮化物 (Waser et al. 2006) (2mmol)、CuI (0.1mmol) 和水杨醛 (2.2mmol) 在无水 THF (5mL) 中的溶液 1 小时。然后通过注射器缓慢地加入 Et_3N (2mmol)。在室温下将所得到的溶液搅拌 12-24 小时, 直至 TLC 分析显示 4 完全转化 (正己烷-EtOAc)。在真空中蒸发溶剂并且将残留物溶解于 CH_2Cl_2 (10mL) 中, 并且用 NH_4Cl 水溶液 (2x10mL) 和盐水 (10mL) 连续地洗涤。分离有机层、干燥 (Na_2SO_4) 并且在真空中蒸发。通过用正己烷-EtOAc 作为洗脱剂的快速色谱法纯化残留物, 得到化合物 5-19。对于化合物 5-7 和 10-19, 将残留物溶解于甲醇 (50mL) 中并且加入甲醇钠甲醇盐 (methanolic sodium methoxide) (0.1mL, 1M)。(在一些情况下, 加入二氯甲烷 (10mL) 以获得的澄清反应溶液)。在 12-24 小时后加入水 (0.4mL), 并且在另一 12-24 小时后浓缩反应物。柱色谱法 (SiO_2 , 二氯甲烷 / 甲醇, 11:1) 得到 >95% 纯度的 20-22 和 25-34。对于化合物 8 和 9, 将残留物溶解于甲醇 / 二氧甲烷 (1:1, 50mL) 中, 并且缓慢地加

入 AcCl (5.5mL)。当 TLC 分析显示反应完成时 (2-6 天后), 浓缩反应物。柱色谱法 (SiO₂, 二氯甲烷 / 甲醇, 5:1) 得到 >95% 纯度的 23-24。

[0145] 选择的用于合成甲氧基衍生物双-{3-O-[(7-甲氧基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (22) 的具体实验步骤

[0146] 将化合物 4 (100mg, 0.14mmol) 溶解于无水 THF (5mL) 中。向上述溶液中加入 CuI (5.54mg, 0.029mmol)、4-甲氧基-水杨醛 (52.9mg, 0.35mmol)、TsN₃ (68.6mg, 0.35mmol) 并且在室温下在氮气下搅拌反应物。1h 后, 缓慢地注入 Et₃N (80 μL, 0.58mmol) 并且将所得到的溶液在室温下搅拌 12h, 此时 TLC 显示 4 完全转化 (正己烷-EtOAc, 1:3)。在真空中蒸发溶剂并且将残留物溶解于 CH₂Cl₂ (10mL) 中并且用 NH₄Cl 水溶液 (2×10mL) 和盐水 (10mL) 连续地洗涤。分离有机层、干燥 (Na₂SO₄) 并且在真空中蒸发。将残留物溶解于 MeOH 中并且加入 NaOMe, 并且加入几滴 CH₂Cl₂ 以得到澄清溶液。搅拌反应混合物 12h, 然后加入 0.4mL 的水并且再次在室温下搅拌反应混合物 12h。完成反应后, 用 DOWEX H⁺ 树脂中和。过滤反应混合物并且在真空中蒸发溶剂。通过快速色谱法 (SiO₂, 二氯甲烷 / 甲醇, 10:1) 纯化残留物以得到纯的化合物 22 (85mg, 83%)。

[0147] 选择的用于合成甲氧基衍生物双-{3-O-[(5,6-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (32) 的具体实验步骤

[0148] 在氩气下在无水 THF (3mL) 中搅拌化合物 4 (300mg, 0.437mmol) 和 CuI (16.6mg, 0.087mmol)。加入 5,6-二氟-水杨醛 (166mg, 1.05mmol) 和 Et₃N (146 μL, 1.05mmol), 随后逐滴加入 TsN₃ (207mg, 1.05mmol)。在 20℃ 下 1.5h 后, 加入硅胶 (1.5g) 并且在真空中蒸发溶剂, 得到自由流动的固体。通过快速柱色谱法进行纯化, 将材料装填到硅胶柱 (25g) 上并且用 0 → 25% 在甲苯中的苯酮洗脱。获得的产物为灰白色粉末 (500mg)。将残留物 (500mg, 0.383mmol) 溶解于 CH₂Cl₂ (20mL) 和甲醇 (20mL) 中。逐滴加入 25wt% 甲醇钠的甲醇溶液至 pH11。在 20℃ 将混合物搅拌 18h。加入水 (80 μL) 并且将混合物再搅拌 24h。通过加入固体 CO₂ 粒料中和反应, 然后加入硅胶 (1.2g)。将混合物在真空中浓缩以得到自由流动的固体。通过快速柱色谱进行纯化, 将材料装填到硅胶柱 (25g) 上并且用 0 → 25% 在 CH₂Cl₂ 的甲醇洗脱。分离出产物 32, 为白色固体 (105mg, 29%)。

[0149] 获得的化合物的数据

[0150] 双-{3-O-[(2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (20)

[0151] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 8.21 (s, 2H, ArH), 7.68 (d, 2H, J7.6Hz, ArH), 7.59 (m, 2H, ArH), 7.39 (m, 4H, ArH), 4.61-4.54 (m, 6H, CH₂Ar, H-1), 4.02 (bs, 2H, H-4), 3.60 (t, 2H, J9.6Hz, H-2), 3.52 (m, 4H, H-6^a, H-6^b), 3.39 (m, 4H, H-3, H-5)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ : 159.7, 152.5, 138.6, 131.3, 128.1, 126.2, 124.7, 119.1, 116.1 (ArC) 83.2 (C-1), 82.6, 78.9, 69.2, 65.2, 65.0, 60.3。C₃₂H₃₄NaO₁₄S (M+Na)⁺ 的 HRMS 计算值 : 695.1567 ; 发现值 : 697.1582。

[0152] 双-{3-O-[(7-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (21)

[0153] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 8.20 (s, 2H, ArH), 7.77 (bs, 2H, ArH), 7.64 (m, 2H, ArH), 7.48 (d, 2H, J9.2Hz, ArH), 4.46-4.53 (m, 6H, CH₂Ar, H-1), 4.03 (bs, 2H, H-4), 3.64-3.35

(m, 8H, H-2, H-6^a, H-6^b, H-3, H-5)。¹³CNMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ : 159.7, 151.4, 137.7, 131.1, 128.7, 127.8, 127.4, 120.7, 118.4 (ArC) 83.4 (C-1), 82.6, 79.1, 69.4, 65.6, 65.3, 60.6。
C₃₂H₃₂Cl₂O₁₄SNa (M+Na)⁺ 的 HRMS 的计算值 : 765.0788 ; 发现值 : 765.0791。

[0154] 双 - {3-O-[(7-甲氧基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (22)

[0155] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 8.15 (s, 2H, ArH), 7.60 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 7.03 (d, 2H, J8.6Hz, ArH), 6.98 (dd, 4H, J2.5, 8.6Hz, ArH), 5.20 (brs, 2H, HO-2), 4.61 (d, 2H, J10Hz, H-1), 4.51 (bABq, 4H, J14.8Hz, CH₂Ar), 4.03 (bs, 2H, H-4), 3.84 (s, 6H, OCH₃), 3.63-3.48 (m, 6H, H-2, H-6^a, H-6^b), 3.36 (m, 4H, H-3, H-5)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 100MHz) δ : 162.2, 160.4, 154.6, 139.5, 129.3, 122.4, 112.8, 100.7 (ArC) 83.2 (C-1), 82.8, 79.0, 69.3, 65.4, 65.1, 60.4, 56.1 (OCH₃)。C₃₄H₃₈O₁₆SNa (M+Na)⁺ 的 HRMS 的计算值 : 757.1778 ; 发现值 : 757.1781。

[0156] 双 - {3-O-[(7-羟基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (23)

[0157] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 10.49 (s, 2H, HO-Ar), 8.11 (s, 2H, ArH), 7.50 (d, 2H, J8.0Hz, ArH), 6.82 (dd, 2H, J2.4Hz, 8.4Hz, ArH), 6.74 (d, 2H, J2.0Hz, ArH), 5.20 (d, 2H, J6.0Hz, HO-2), 4.62 (m, 6H, H-1, HO-4, HO-6), 4.54 (ABq, 4H, J14.4Hz, CH₂Ar), 4.02 (br s, 2H, H-4), 3.60 (m, 6H, H-2, H-6), 3.39 (m, 4H, H-3, H-5)。LRMS (ESI)m/z : 729.1 [M+Na]⁺。

[0158] 双 - {3-O-[(6-羟基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (24)

[0159] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 9.73 (s, 2H, HO-Ar), 8.14 (s, 2H, ArH), 7.27 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 7.02 (m, 4H, J2.8Hz, 8.8Hz, ArH), 5.26 (d, 2H, J5.6Hz, HO-2), 4.64 (m, 6H, H-1, HO-4, HO-6), 4.58 (ABq, 4H, J15.2Hz, CH₂Ar), 4.02 (br s, 2H, H-4), 3.65 (m, 2H, H-2), 3.52 (m, 4H, H-6), 3.39 (m, 4H, H-3, H-5)。LRMS (ESI)m/z : 729.2 [M+Na]⁺。

[0160] 双 - {3-O-[(3H-萘并[2,1-b]苯并吡喃-3-酮-2-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (25)

[0161] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) δ : 9.09 (s, 2H, ArH), 8.61 (d, 2H, J8Hz, ArH), 8.18 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 8.08 (d, 2H, J8.0Hz, ArH), 7.79 (m, 2H, J8.0Hz, ArH), 7.65 (m, 2H, J8.0Hz, ArH), 7.62 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 5.60 (d, 2H, J5.6Hz, HO-2), 4.79 (d, 2H, J4.8Hz, HO-4), 4.67 (m, 8H, H-1, CH₂Ar, HO-6), 4.09 (br s, 2H, H-4), 3.76 (m, 2H, H-2), 3.58 (m, 4H, H-6), 3.47 (m, 4H, H-3, H-5)。LRMS (ESI)m/z : 796.9 [M+Na]⁺。

[0162] 双 - {3-O-[(6-叔丁基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (26)

[0163] ¹H NMR (CD₃OD, 400MHz) δ : 8.08 (s, 2H, ArH), 7.55 (dd, 2H, J2.4, 7.2, Hz, ArH), 7.53 (s, 2H, ArH), 7.17 (m, 2H, ArH), 4.64 (d, 2H, J9.9Hz, H-1), 4.54 (dABq, 4H, J1.3, 14.3Hz, CH₂Ar), 4.10 (bd, 2H, J2.6Hz, H-4), 3.74 (dd, 4H, J4.2, 11.5Hz, H-6^a), 3.73 (dd, 2H, J9.4, 11.4Hz, H-2), 3.61 (dd, 2H, J4.7, 11.5Hz, H-6^b), 3.50 (brdd, 2H, J4.9, 6.1Hz, H-5), 3.41 (dd, 2H, J3.2, 9.2Hz, H-3) 1.26 (s, 18H, tBu)。C₄₀H₅₀NaO₁₄S (M+Na)⁺ 的 HRMS 的计算值 : 809.2819 ; 发现值 : 809.2839。

[0164] 双 - {3-O-[(6-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (27)

基} 硫烷 (27)

[0165] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.20 (s, 2H, ArH), 7.78 (d, 2H, J2.5Hz, ArH), 7.64 (dd, 2H, J2.5, 8.8, Hz, ArH), 7.48 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 5.21 (d, 2H, J5.8Hz, HO-2), 4.62 (m, 6H, H-1, HO-4, HO-6), 4.54 (dABq, 4H, J1.3, 14.6Hz, CH_2Ar), 4.03 (br s, 2H, H-4), 3.64-3.36 (m, 8H, H-2, H-3, H-5, H-6)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 的计算值: 765.0788; 发现值: 765.0807。

[0166] 双-{3-O-[(6-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (28)

[0167] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.20 (brs, 2H, ArH), 7.50 (m, 6H, ArH), 7.64 (dd, 2H, J2.5, 8.8, Hz, ArH), 7.48 (d, 2H, J8.8Hz, ArH), 5.21 (brs, 2H, HO-2), 4.60 (m, 10H, H-1, HO-4, HO-6, CH_2Ar), 4.03 (br s, 2H, H-4), 3.69-3.25 (m, 8H, H-2, H-3, H-5, H-6)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 的计算值: 733.1379; 发现值: 733.1411。

[0168] 双-{3-O-[(6,7-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (29)

[0169] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.17 (s, 2H, ArH), 7.80 (dd, 2H, J8.8, 10.3Hz, ArH), 7.73 (dd, 2H, J6.8, 11.1Hz, ArH), 4.60 (d, 2H, J9.8Hz, H-1), 4.53 (ABq, 4H, J1.3, 14.9Hz, CH_2Ar), 4.02 (br d, J2.4Hz, 2H, H-4), 3.62 (t, 2H, J9.8Hz, H-2), 3.54, 3.38 (2m, 8H, H-2, H-3, H-5, H-6)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 的计算值: 769.1190; 发现值: 769.1222。

[0170] 双-{3-O-[(5-氯-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (30)

[0171] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.41 (brs, 2H, ArH), 7.60 (brt, 2H, J8.2Hz, ArH), 7.51 (dd, 2H, J1.1, 8.0, Hz, ArH), 7.44 (brd, 2H, J8.2Hz, ArH), 4.62 (d, 2H, J9.7Hz, H-1), 4.58 (dABq, 4H, J1.7, 15.9Hz, CH_2Ar), 4.05 (br d, 2H, J2.7Hz, H-4), 3.64 (t, 2H, J9.4Hz, H-2), 3.55 (dd, 2H, J6.5, 11.5Hz, H-6a), 3.50 (dd, 2H, J6.1, 11.5Hz, H-6b), 3.40 (dd, 2H, J3.1, 9.2Hz, H-3)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 的计算值: 765.0788; 发现值: 765.0793。

[0172] 双-{3-O-[(5-氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (31)

[0173] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.32 (brs, 2H, ArH), 7.62 (m, 2H, ArH), 7.27 (m, 4H, ArH), 5.31 (brs, 2H, HO-2), 4.61 (m, 10H, H-1, HO-4, HO-6, CH_2Ar), 4.03 (br s, 2H, H-4), 3.68-3.35 (m, 10H, H-2, H-3, H-5, H-6)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 计算值: 733.1379; 发现值: 733.1407。

[0174] 双-{3-O-[(5,6-二氟-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (32)

[0175] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.35 (brs, 2H, ArH), 7.70 (brq, 2H, J5.4Hz, ArH), 7.34 (brd, 4H, J4.4Hz, ArH), 5.35 (brd, 2H, J5.6Hz, HO-2), 4.61 (m, 10H, H-1, HO-4, HO-6, CH_2Ar), 4.04 (br s, 2H, H-4), 3.69-3.36 (m, 10H, H-2, H-3, H-5, H-6)。 $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{NaO}_{14}\text{S}(\text{M}+\text{Na})^+$ 的 HRMS 的计算值: 769.1190; 发现值: 769.1220。

[0176] 双-{3-O-[(6-三氟甲氧基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖酰基} 硫烷 (33)

[0177] ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz) δ : 8.27 (brs, 2H, ArH), 7.73 (brs, 2H, ArH), 7.61 (

brdd, 2H, J2. 3, 8. 6Hz, ArH), 7. 57 (d, 2H, J9. 0Hz, ArH), 5. 21 (brs, 2H, H0-2), 4. 62 (m, 4H, H0-4, H0-6), 4. 62 (d, 2H, J9. 7Hz, H-1), 4. 56 (bABq, 4H, J11. 8Hz, CH₂Ar), 4. 04 (brs, 2H, H-4), 3. 64-3. 50 和 3. 43-3. 35 (2m, 10H, H-2, H-3, H-5, H-6)。C₃₄H₃₂F₆NaO₁₆S(M+Na)⁺的 HRMS 计算值 :865. 1213 ;发现值 :865. 1247。

[0178] 双-[3-0-[(7-甲基-2H-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]-β-D-吡喃半乳糖酰基]硫烷(34)

[0179] ¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ :8. 20 (s, 2H, ArH), 7. 56 (d, 2H, J7. 9Hz, ArH), 7. 26 (s, 2H, ArH), 7. 20 (brd, 2H, J6. 9Hz, ArH), 4. 61 (d, 2H, J9. 8Hz, H-1), 4. 53 (dABq, 4H, J15. 2Hz, CH₂Ar), 4. 03 (brs, 2H, H-4), 3. 63 (t, 2H, J9. 4Hz, H-2), 3. 55 (m, 4H, H-6), 3. 58-3. 48 (dd, 2H, J6. 1, 11. 5Hz, H-6^b), 3. 43-3. 38 (m, 4H, H-3, H-5)。C₃₄H₃₈NaO₁₄S(M+Na)⁺的 HRMS 的计算值 :725. 1880 ;发现值 :725. 1904。

[0180] 半乳糖凝集素体内抑制纤维化、炎症和癌症的效力的实例

[0181] 炎症

[0182] 如上所述,许多研究表明半乳糖凝集素在增强炎症反应方面的作用。例如,将半乳糖凝集素-3 添加至来自炎症部分的或通过暴露于 LPS 引发(primed)的嗜中性白细胞中,导致有毒氧自由基生成增加。乳糖能抑制这种响应(Almquist et al., 2001)。最近,关键的重要的观察是半乳糖凝集素-3 在巨噬细胞分化和肌纤维母细胞活化中的速率限制(Mackinnon et al., 2008, Mackinnon et al., 2011),这反过来启动纤维化的进程。证明半乳糖凝集素-3 在这些模型中的抑制作用阻断巨噬细胞分化和肌纤维母细胞活化,并由此的纤维化,这的确验证了半乳糖凝集素-3 作为炎症/纤维化进程中的治疗性干预的靶。在本发明中所描述的物质作为上述响应的抑制剂会远比乳糖更加有效,因为它们是更有效的半乳糖凝集素-3 抑制剂。它们在体内也将远比乳糖和半乳糖凝集素-3C 更加有用,因为它们是小分子、更疏水且可能对降解更稳定。

[0183] 对炎症性肠病的作用

[0184] 本研究的目的是论证本发明的半乳糖凝集素-3 抑制剂在肠道炎症的模型中减少或消除炎症和/或纤维化的能力。

[0185] 雌性 8-12 周龄 CBA/J 小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 接受在 0. 1M 汉克氏 (Hank's) 缓冲盐溶液 (HBSS) 中的 20mg 链霉素以根除共生菌群,24 小时之后,通过口服强饲 (gavage) 用在 100k0. 1M HEPES 缓冲液 (pH8. 0) 中的 3 个 10⁶ 集落形成单位 (cfu) 鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 菌株 SL1344 感染。对照小鼠通过口服强饲接受 100k0. 1M HEPES。

[0186] 在开始第 8 天所有组均用 0. 5mg/ml 左氧氟沙星治疗,感染后留出时间以允许炎症和纤维化发展,但是根除对鼠伤寒沙门氏菌的炎症反应。

[0187] 从第 1、8、9 或 12 天开始用不同剂量的半乳糖凝集素-3 抑制剂对来自选择的组的小鼠治疗并且继续直到研究终止。所采用的给予途径包括口服、皮下、腹膜内和静脉内。

[0188] 鼠伤寒沙门氏菌感染后的第 21 天将动物安乐死。对盲肠和远端结肠解剖、测量、称重并拍照。将盲肠和远端结肠速冻在液氮中并且存储在 -80℃ 以用于分子分析,并且采集两个组织的切片并在福尔马林中保存以用于组织学分析。

[0189] 同时使用 RT-PCR、免疫组织化学和 ELISA 技术测定切片的纤维化和炎症标志物的

表达,包括 TNF- α 、IL-1、TGF- β 、IL-12、IL-6、半乳糖凝集素-3、IGF-1 和 CTGF。由独立的病理学家对切片进行检查,并且使用标准化的量表(scale)对炎症和纤维化的程度进行评分。

[0190] 癌症

[0191] 如上所述,在小鼠中的人类癌症模型的几项研究表明,半乳糖凝集素-3 的增强表达导致更快的肿瘤生长和更多转移 (Leffler, 2001 和 Takenaka et al 在 Leffler (编者), 2004b 中综述)。报道,假设用来抑制半乳糖凝集素-3 (但也许还有其他的蛋白质) 而注射的修饰多糖 (柑橘果胶) 减少了大鼠中的前列腺癌 (Pienta et al., 1995)。证明,乳糖基化的 (lactosylated) 类固醇在淋巴瘤和胶质母细胞瘤模型中具有治疗有益效果 (Ingrassia et al., 2006)。已经证实提议用来抑制半乳糖凝集素-3 的 lactosyl-亮氨酸衍生物在体内增强肿瘤细胞对紫杉醇诱导的细胞凋亡的敏感性 (Glinsky et al., 2009)。因此,预期半乳糖凝集素-3 的有效小分子抑制剂具有类似于半乳糖凝集素-3C 的抗癌效果 (John et al., 2003)。

[0192] 癌症模型

[0193] 用来自人肿瘤细胞系的细胞对 CD-1 裸鼠群体经皮下注射进行异种移植。当肿瘤生长达到约 130mm³时开始治疗。将小鼠分成多组并且从这个时间开始以不同的频率和剂量给予治疗,并且包括载体 (vehicle) 和活性对照物质以及本发明的半乳糖凝集素-3 抑制剂。对肿瘤生长和体重变化监测 28 天。

[0194] 肺部炎症和纤维化模型

[0195] 使用氟烷麻醉雌性 C57/B16 小鼠 (10-14 周龄), 并且气管内给予博莱霉素或生理盐水 (33g 在 50 μ l 的生理盐水中) 并且在第 26 天收获肺。在博莱霉素诱导肺损伤的第 18、20、22 和 24 天后,将不同剂量的一种或多种本发明所述的半乳糖凝集素-3 抑制剂灌输给小鼠的肺中。通过胶原蛋白染色的肺切片的组织学评分并通过 MacKinnon et al. 2012 中所述的 Sircol 测定的总胶原蛋白含量来评价纤维化。

[0196] 对肺泡上皮细胞的影响

[0197] 接种来自 WT 小鼠的原发性肺泡上皮细胞并且在存在或不存在半乳糖凝集素-3 抑制剂的条件下用 TGF- β 1 治疗。将细胞裂解并且通过蛋白质印迹来分析活性 β -连环蛋白、总 β -连环蛋白和 β -肌动蛋白。

[0198] 免疫组织化学

[0199] 按照制造商的说明使用马松 (Masson) 三色和苏木精和曙红 (H&E) 染色小鼠组织的石蜡包埋切片。处理切片以用于免疫组织化学并且使用了如下一级抗体:鼠抗活性 (ABC) β -连环蛋白 (Millipore), 并且可视化和量化切片。

[0200] 确定肺纤维化和炎症

[0201] 在马松三色染色切片中进行组织学肺炎症和纤维化评分。使用下列体系 (细支气管周围及血管周围, 1 = 无细胞, 2 = <20 个细胞, 3 = 20-100 个细胞, 4 = >100 个细胞; 肺泡壁的厚度, 1 = 无细胞, 2 = 2-3 个细胞厚, 3 = 4-5 个细胞厚, 4 = >5 个细胞厚), 在放大倍率 $\times 630$ 下在 >5 个随机场中对炎症 (细支气管周围、血管周围、肺泡壁的厚度) 进行评分。合并的炎症分数是这些分数的总和。将纤维化分数评价为胶原蛋白阳性染色的切片面积 (1 = 无, 2 = <10%, 3 = <50%, 4 = >50%)。仅对其中大多数场由肺泡构成的场进行评

分。

[0202] 通过 sircol 测定确定肺胶原蛋白

[0203] 按照制造商的说明通过 sircol 测定来确定左肺叶中胶原蛋白的含量。在 5ml 的 3mg/ml 在 0.5M 乙酸中的胃蛋白酶中切碎左叶,并且在 4℃ 下振摇孵育 24 小时。在室温下用 0.8ml sircol 试剂孵育澄清的肺提取物 (0.2ml) 1 小时,并且在 4℃ 在 10,000g 下离心沉淀的胶原蛋白 5 分钟。将沉淀物溶解于 1ml 的 1M NaOH 中并且在 570nm 下 (alongside) 胶原蛋白标准测量吸光度。

[0204] 分离原代 II 型肺泡上皮细胞 (Primary Type II alveolar epithelial cell)

[0205] 按照标准方法提取经治疗的和对照小鼠 II 型肺泡上皮细胞 (ACE)。简略地,将 1ml 的 50U/ml 分散酶 (BD Biosciences) 气管内给予至灌注的肺中,随后滴注 0.5ml 的 1% 低熔点琼脂糖。将上呼吸道内的琼脂糖在冰上放置 2 分钟并且将在室温下将肺置于 4ml 50U/ml 分散酶中 45 分钟。将减去了上呼吸道的肺叶分散在含有 50g/ml DNase I (Sigma-Aldrich, UK) 的 DMEM 中。使细胞悬浮液通过 100- μ m 细胞过滤器,并且在 DMEM 中洗涤细胞,随后再悬浮在含有 10% FCS 的 DMEM 中。将细胞悬浮液放置在组织培养塑料上 1 小时,以允许粘附任何污染的成纤维细胞和巨噬细胞。计数非粘附上皮细胞并且在预涂有 5 μ g/ml 胶原蛋白 (AMS Biotechnology) 和 10 μ g/ml 纤连蛋白 (Sigma-Aldrich) 的组织培养塑料或盖玻片上培养 2 天,在治疗之前在 PBS 中洗涤细胞三次。将上皮细胞培养在含有 10% FCS、50U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素和 5 μ g/ml L-谷氨酰胺的 DMEM 中或者转移至完全小鼠培养基 (含有 0.25% BSA、10nM 氢化可的松、5 μ g/ml 胰岛素-转铁蛋白-硒酸钠 (ITS) 并且补充有 0.1mg/ml 琥珀酸钠、75 μ g/ml 琥珀酸和 1.8 μ g/ml 酒石酸氢胆碱的 DMEM/F-12) 中。

[0206] 蛋白质印迹法

[0207] 在 25mM HEPES pH7.4、0.3M NaCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、0.5% 曲通 X-100、0.5mM 二硫苏糖醇、1mM 原钒酸钠和蛋白酶抑制剂 (Boehringer Mannheim, Sussex, UK; 按照制造商的说明进行制备) 中将细胞裂解。使用 Pierce BCA 蛋白测定试剂 (Pierce) 平衡裂解物获得蛋白质并且在 12% SDS-PAGE 凝胶上解析。使用下列一级抗体进行蛋白质印迹分析:兔抗 β -连环蛋白 (BD Biosciences)、兔多克隆抗- β -肌动蛋白抗体 (Sigma, UK)、小鼠抗-活性 (ABC) β -连环蛋白 (Millipore)。

[0208] 抑制新血管形成

[0209] 通过 VEGF 受体-2 (VEGFR2) 的血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路是主要的血管生成通路,其中半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 蛋白质是重要的调节剂。

[0210] 在眼睛中的新血管形成是在小鼠角膜中通过使用硝酸银烧灼诱导的。每隔一天,用在含有 0.5% DMSO 的 PBS 中的一种或多种本发明所述的半乳糖凝集素-3-抑制剂结膜下注射一组受试者。对照受试者仅在结膜下注射载体 (只含有 0.5% DMSO 的 PBS)。向另一组受试者每天一次给予 10 μ l 单独的载体的滴眼剂或 50 μ M 半乳糖凝集素-3 抑制剂在载体中的滴眼剂。

[0211] 结膜下注射治疗或滴眼剂治疗的 5 天后,处死受试者,并且切除角膜扁平底座 (flat mount)、拍照并且用抗-CD31 染色以可视化血管。

[0212] 通过 ImageJ 将覆盖整个角膜的血管的密度量化并且使用学生 t 检验进行分析。

[0213] 参考文献

- [0214] Almkvist, J., Fäldt, J., Dahlgren, C, Leffler, H. 和 Karlsson, A. (2001) Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and f-Met-Leu-Phe. *Infect. Immun.* Vol. 69:832-837.
- [0215] Barondes, S. H., Cooper, D. N. W., Gitt, M. A., and Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269:20807-20810.
- [0216] Blois, S. M., Ibarregui, J. M., Tometten, M., Garcia, M., Orsal, A. S., Cordo-Russo, R., Toscano, M. A., Bianco, G. A., Kobelt, P., Handjiski, B., et al. (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13:1450-1457.
- [0217] Chen, W.-S., Leffler H., Nilsson, U. J., Panjwani, N. (2012). Targeting Galectin-1 and Galectin-3 Attenuates VEGF-A-induced Angiogenesis; *Mol. Biol. Cell* (suppl), 摘要号 2695.
- [0218] Cumpstey, I., Carlsson, S., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2005) Synthesis of a phenyl thio- β -D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7. *Org. Biomol. Chem.* 3:1922-1932.
- [0219] Cumpstey, I., Sundin, A., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2005) C_2 -Symmetrical thiodigalactoside bis-benzamidoderivatives as high-affinity inhibitors of galectin-3: Efficient lectin inhibition through double arginine-arene interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:5110-5112.
- [0220] Cumpstey, I., Salomonsson, E., Sundin, A., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2008) Double affinity amplification of galectin-ligand interactions through arginine-arene interactions: Synthetic, thermodynamic, and computational studies with aromatic diamido-thiodigalactosides. *Chem. Eur. J.* 14:4233-4245.
- [0221] Dam, T. K., and Brewer, C. F. (2008). Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry* 47:8470-8476.
- [0222] Delacour, D., Greb, C, Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., and Jacob, R. (2007). Apical Sorting by Galectin-3-Dependent Glycoprotein Clustering. *Traffic* 8:379-388.
- [0223] Delaine, T., Cumpstey, I., Ingrassia, L., Le Mercier, M., Okechukwu, P., Leffler, H., Kiss, R., and Nilsson, U. J. (2008). Galectin-Inhibitory Thiodigalactoside Ester Derivatives Have Anti-Migratory Effects in Cultured Lung and Prostate Cancer Cells. *J Med Chem* 51:8109-8114.
- [0224] Garner, O. B., and Baum, L. G. (2008). Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans* 36:1472-1477.
- [0225] Giguere, D., Patnam, R., Bellefleur, M.-A., St.-Pierre, C, Sato, S., a

nd Roy, R. (2006). Carbohydrate triazoles and isoxazoles as inhibitors of galectins-1 and -3. *Chem Commun*:2379-2381.

[0226] Glinsky, G. V., Price, J. E., Glinsky, V. V., Mossine, V. V., Kiriakova, G., and Metcalf, J. B. (1996). *Cancer Res* 56:5319-5324.

[0227] Glinsky, V. V., Kiriakova, G., Glinskii, O. V., Mossine, V. V., Mawhinney, T. P., Turk, J. R., Glinskii, A. B., Huxley, V. H., Price, J. E., and Glinsky, G. V. (2009). Synthetic Galectin-3 Inhibitor Increases Metastatic Cancer Cell Sensitivity to Taxol-Induced Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* 11:901-909.

[0228] Huflejt, M. E., and Leffler, H. (2004) Galectin-4 in normal tissues and cancer. *Glycoconj. J.* 20:247-255.

[0229] Ingrassia et al. (2006) A Lactosylated Steroid Contributes in Vivo Therapeutic Benefits in Experimental Models of Mouse Lymphoma and Human Glioblastoma. *J. Med. Chem.* 49:1800-1807.

[0230] John, C. M., Leffler, H., Kahl-Knutsson, B., Svensson, I., and Jarvis, G. A. (2003) Truncated Galectin-3 Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Orthotopic Nude Mouse Model of Human Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 9:2374-2383.

[0231] Lau, K. S., and Dennis, J. W. (2008). N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* 18:750-760.

[0232] Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Silvescu, C. I., Reinhold, V. N., Demetriou, M., and Dennis, J. W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129:123-134.

[0233] Leffler, H., and Barondes, S. H. (1986) Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J. Biol. Chem.* 261:10119-10126.

[0234] Leffler, H. Galectins Structure and Function--A Synopsis in Mammalian Carbohydrate Recognition Systems (Crocker, P. ed.) Springer Verlag, Heidelberg, 2001, pp. 57-83.

[0235] Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., and Poirier, F. (2004) Introduction to galectins. *Glycoconj. J.* 19:433-440.

[0236] Leffler, H., 编者, (2004b) Special Issue on Galectins. *Glycoconj. J.* 19:433-638.

[0237] Lin, C.-I., Whang, E. E., Donner, D. B., Jiang, X., Price, B. D., Carothers, A. M., Delaine, T., Leffler, H., Nilsson, U. J., Nose, V., et al. (2009). Galectin-3 Targeted Therapy with a Small Molecule Inhibitor Activates Apoptosis and Enhances Both Chemosensitivity and Radiosensitivity in Papillary Thyroid Cancer. *Mol Cancer Res* 7:1655-1662.

[0238] MacKinnon, A. C., Farnworth, S. L., Henderson, N. C., Hodgkinson, P. S., Kipari, T., Leffler, H., Nilsson, U. J., Haslett, C., Hughes, J., and Sethi T. (2008). Regulation of

alternative macrophage activation by Galectin-3. *J. Immun.* 180 ;2650-2658.

[0239] Mackinnon, A., Gibbons, M., Farnworth, S., Leffler, H., Nilsson, U. J., Delaine, T., Simpson, A., Forbes, S., Hirani, N., Gauldie, J., and Sethi T. (2012). Regulation of TGF- β 1 driven lung fibrosis by Galectin-3. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 在印.

[0240] Massa, S. M., Cooper, D. N. W., Leffler, H., Barondes, S. H. (1993) L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* 32:260-267.

[0241] Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., and Dennis, J. W. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306:120-124.

[0242] Perone, M. J., Bertera, S., Shufesky, W. J., Divito, S. J., Montecalvo, A., Mathers, A. R., Larregina, A. T., Pang, M., Seth, N., Wucherpfennig, K. W., et al. (2009). Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol* 182:2641-2653.

[0243] Pienta, K. J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Reploge, T. S., Lehr, J., Donat, T. L., Tait, L., Hogan, V., and Raz, A. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst* 87, 348-353.

[0244] Saegusa, J., Hsu, D. K., Chen, H. Y., Yu, L., Fermin, A., Fung, M. A., and Liu, FT. (2009). Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am J Pathol* 174:922-931.

[0245] Salameh, B. A., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:3344-3346.

[0246] Salameh, B. A., Cumpstey, I., Sundin, A., Leffler, H., and Nilsson, U. J. (2010). 1H-1, 2, 3-Triazol-1-yl thiodigalactoside derivatives as high affinity galectin-3 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 18:5367-5378.

[0247] Salomonsson, E., Larumbe, A., Tejler, J., Tullberg, E., Rydberg, H., Sundin, A., Khabut, A., Frejd, T., Lobsanov, Y. D., Rini, J. M., Nilsson, U. J., and Leffler, H. (2010). Monovalent interactions of galectin-1. *Biochemistry* 49:9518-9532.

[0248] Sörme, P., Qian, Y., Nyholm, P.-G., Leffler, H., Nilsson, U. J. (2002) Low micromolar inhibitors of galectin-3 based on 3'-derivatization of N-acetyllactosamine. *ChemBioChem* 3:183-189.

[0249] Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Wellmar, U., Nilsson, U. J., and Leffler H. (2003a) Fluorescence polarization to study galectin-ligand interactions. *Meth. Enzymol.* 362:504-512.

[0250] Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Wellmar, U., Magnusson, B.-G., Leffler H., and Nilsson, U. J. (2003b) Design and synthesis of galectin inhibitors. *Meth. Enzymol.* 363:157-169.

- [0251] Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Huflejt, M., Nilsson, U. J., and Leffler H. (2004) Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Anal. Biochem.* 334:36-47.
- [0252] Thijssen, V. L., Poirer, F., Baum, L. G., and Griffioen, A. W. (2007). Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 110:2819-2827.
- [0253] Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ibarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., et al. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8:825-834.