

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2023-132

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07H 19/056 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

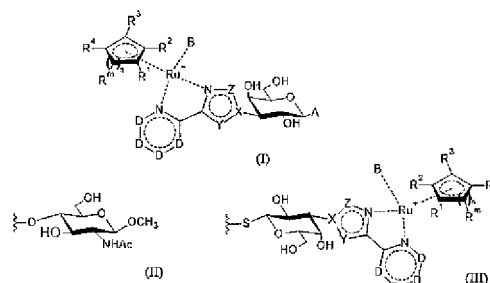
(22) Přihlášeno: **04.04.2023**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.10.2024**
(Věstník č. 42/2024)

(71) Přihlašovatel:
Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i., Praha 6,
Lysolaje, CZ
Masarykův onkologický ústav, Brno, Staré Brno,
CZ

(72) Původce:
doc. Mgr. Roman Hrstka, Ph.D., Bratčice, CZ
Mgr. Jitka Holčáková, Ph.D., Rosice, CZ
Mgr. Jindřich Karban, Ph.D., Roztoky, CZ
Ing. et Ing. Vojtěch Hamala, Praha 6, Dejvice, CZ
Ing. Martin Kurfířt, Pěňčín, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice



(54) Název přihlášky vynálezu:
**Komplexy ruthenia pro inhibici galektinů,
způsob jejich výroby a jejich použití**

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká sloučenin obecného vzorce (I), kde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m jsou nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující H a (C_1 až C_6)alkyl; n je 1 nebo 2; X je CH nebo N; D, Y a Z jsou nezávisle CH, N nebo O; B je vybrané ze skupiny zahrnující monovalentní záporně nabitě ligandy a neutrální ligandy; a A je vybrané ze skupiny zahrnující struktury (II) a (III).
Řešení se dále týká způsobu přípravy uvedených sloučenin a jejich použití.

Komplexy ruthenia pro inhibici galektinů, způsob jejich výroby a jejich použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká komplexů ruthenia, které vykazují významnou afinitu a selektivitu vůči lidskému galektinu 1 a mají tedy potenciál stát se aktivními látkami léčiv inhibujících galektin 1 pro použití například při léčbě nádorových onemocnění, fibrotických onemocnění, infekce HIV.

Dosavadní stav techniky

Galektiny jsou proteiny ze skupiny lektinů definované sekvenční homologií a schopností nekovalentně vázat β -galaktosidy. U savců je popsáno 16 druhů galektinů, přičemž 13 z nich se vyskytuje u člověka. Všechny typy galektinů mají evolučně konzervovanou doménu rozpoznávající sacharidy (tzv. carbohydrate recognition domain, CRD) složenou z přibližně 130 aminokyselin poskládaných do β -sendvičové struktury tvořené pěti- a šestičetnými antiparalelními strukturami β -skládaného listu.

Na základě typu kvartérní struktury se galektiny dělí do 3 skupin:

1. Prototypické galektiny: obsahují jednu CRD, která ve fyziologických podmínkách samovolně vytváří nekovalentní homodimer. Patří mezi ně galektiny 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15 a 16.
2. Tandemové galektiny: disponují dvěma CRD propojenými krátkou peptidovou spojkou. Do této skupiny patří galektiny 4, 6, 8, 9 a 12.
3. Chimerický galektin 3, který ve své struktuře obsahuje CRD a N-terminální polypeptidový řetězec tvořený asi 120 aminokyselinami, pomocí kterého je schopen vytvářet nekovalentně vázané oligomerní struktury.

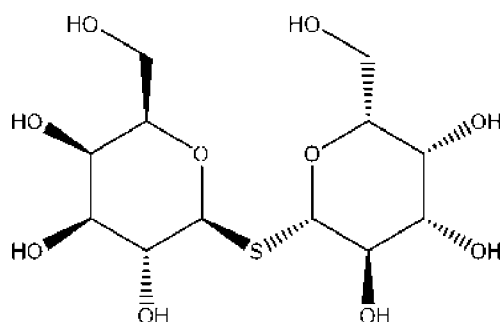
Typické endogenní ligandy jsou disacharidy *N*-acetylglukosamin ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$) a laktóza ($\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$). Vazba mezi galektinem a disacharidy probíhá v relativně mělkém vazebném místě na vysoce konzervovaných vazebných segmentech (anglicky subsites) C a D. Vlastní interakci zajišťuje 6 aminokyselin vazebné kavity, a to jak prostřednictvím vodíkových vazeb mezi těmito aminokyselinami (typicky histidinem, argininem a asparaginem) a hydroxylovými skupinami disacharidu, tak i $\text{CH}\text{-}\pi$ interakcí mezi nepolární α -stranou β -galaktosidu a aminokyselinou tryptofanem. V sousedství segmentů C a D se nachází méně konzervované segmenty A, B a E, které se ve větší míře než segmenty C a D liší v závislosti na typu galektinu a mohou se zapojovat do interakce s rozsáhlejšími ligandy, než jsou disacharidy.

Galektiny v organismu vykonávají řadu biologických funkcí, mimo jiné se podílí na udržování buněčné homeostázy, regulaci buněčné apoptózy nebo angiogenezi. Zároveň je změna exprese galektinů (velmi často jde o jejich nadprodukcí) spojena s mnoha patologickými stavy: rakovinou, HIV infekcí, plicní fibrózou, záněty či autoimunitními onemocněními. V nádorových buňkách a tkáních jsou galektiny spoluzodpovědné za buněčnou maligní transformaci a následně vymanění se nádorové tkáně imunitnímu dozoru (anglicky immune escape), což je spojeno s progresí nádorového onemocnění včetně zesílené invazivity, angiogeneze, migrace nádorových buněk a tvorbou metastáz. Proto jsou galektiny v současné době považovány za slibný terapeutický cíl.

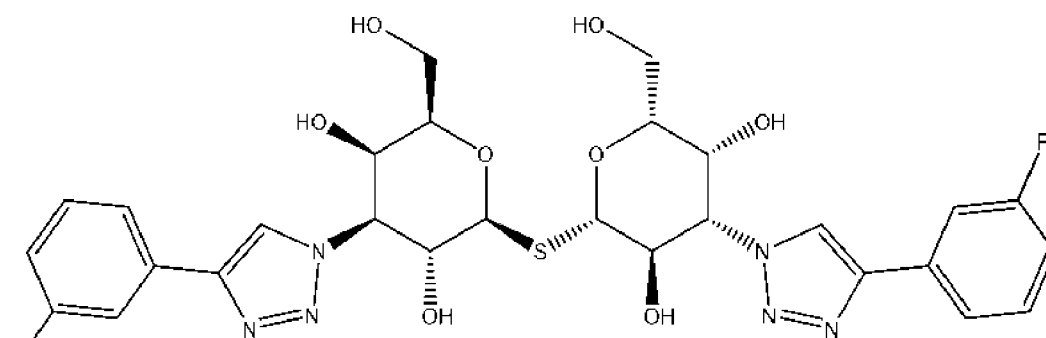
Přirozené a syntetické ligandy galektinů

Mezi přirozené (endogenní) ligandy galektinů patří kromě výše zmíněných disacharidů struktury vzniklé jejich další modifikací (např. Lewisovy antigeny) a oligomerizací (např. poly-*N*-

- acetylaktosamin). Mezi syntetické sacharidové ligandy s vazbou na galektiny patří např. α -thiogalaktosidy a thiodigalaktosidy (Cummings R. D.; Liu F. T.; Rabinovich G. A.; et al. Galectins. In: Varki A.; Cummings R. D.; Esko J. D.; et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; **2022**. Chapter 36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579987/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.36). Protože některé hydroxylové skupiny se neúčastní interakce s galektinem, mohou být modifikovány s cílem zvýšit afinitu nebo selektivitu interakce (Denavit, V.; Lainé, D.; Tremblay, T.; St-Gelais, J.; Giguère, D., Synthetic inhibitors of galectins: Structures and syntheses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **2018**, 30 (172), SE21-SE40; Kurfiřt, M.; Dračinský, M.; Červenková Šťastná, L.; Cuřínová, P.; Hamala, V.; Hovorková, M.; Bojarová, P.; Karban, J., Selectively Deoxyfluorinated *N*-Acetylactosamine Analogues as ^{19}F NMR Probes to Study Carbohydrate-Galectin Interactions. *Chemistry–A European Journal* **2021**, 27 (51), 13040-13051).
- Náhradou některých z těchto nevazebných hydroxylů arenovými strukturami nesoucími halogenové substituenty vznikají látky s výrazně vyšší afinitou ke galektinům, než mají jejich přirozené ligandy. Silnější afinita těchto inhibitorů ke galektinům je zapříčiněna jak π - π interakcemi mezi arenovými strukturami a aromatickými aminokyselinami galektinů, tak i dalšími interakcemi mezi halogeny a polárními skupinami aminokyselin. Většina syntetických inhibitorů s farmakologickým potenciálem má výrazně vyšší afinitu ke galektinu-3 než ke galektinu 1. Naopak vysoce afinitní a zároveň vysoce selektivní inhibitory galektinu 1 dosud nebyly připraveny. Mezi nejsilnější a klinicky nejslibnější inhibitory galektinů patří selektivní inhibitory galektinu-3: GB139 (Hirani, N.; MacKinnon, A. C.; Nicol, L.; Ford, P.; Schambye, H.; Pedersen, A.; Nilsson, U. J.; Leffler, H.; Sethi, T.; Tantawi, S., Target inhibition of galectin-3 by inhaled TD139 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **2021**, 57 (5)), nyní ve 2. fázi klinických testů pro léčbu plicní fibrózy, a GB1211 (Zetterberg, F. R.; MacKinnon, A.; Brimert, T.; Gravelle, L.; Johnsson, R. E.; Kahl-Knutson, B.; Leffler, H.; Nilsson, U. J.; Pedersen, A.; Peterson, K., Discovery and Optimization of the First Highly Effective and Orally Available Galectin-3 Inhibitors for Treatment of Fibrotic Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65 (19), 12626-12638), nyní ve 2. fázi klinických testů pro léčbu poškození jater a ve 2. fázi klinických testů pro léčbu nemalobunčného karcinomu plic. V přípravě jsou klinické studie pro léčbu myelofibrózy a spinocelulárního karcinomu hlavy a krku.
- Struktura látky GB139 a jejích analog vychází z thiodigalaktosidového skeletu modifikovaného na obou galakto jednotkách na uhlíku C3. Substituce C3 hydroxylů za arenové motivy výrazně navýší afinitu ke galektinům, obzvláště galektinu-3. Arenové motivy mohou být na thiodigalaktosidový skelet navázány pomocí éterické, esterové nebo amidické vazby, případně přes 1,2,3-triazol vytvořený azid-alkynovou cykloadiční reakcí, jak je tomu u GB139. Struktury thiodigalaktosidu a GB139 zobrazuje Schema 1 níže.



thiogalaktosa



GB139

Schema 1

Lidský Galektin 1

5

Galektin 1 je kódován genem *LGALS1* a vyskytuje se cytoplazmě, buněčném jádře i v extracelulárním prostoru. Jedná se o prototypický galektin, který se v extracelulárním prostoru vyskytuje převážně ve formě homodimeru. V této formě se může galektin 1 podílet na buněčné signalizaci, adhezi a dalších buněčných procesech. Galektin 1 hraje prominentní roli v řízení imunitního systému: reguluje proliferaci B-buněk a udržuje homeostázu T-buněk, přičemž vysoké koncentrace galektinu 1 mohou vyvolat apoptózu T-buněk. Zároveň hladina galektinu-1 ovlivňuje fagocytózu a aktivaci peritoneálních makrofágů.

10

Zvýšená koncentrace galektinu 1 byla pozorována u rakoviny prostaty, plic, mléčné žlázy, tlustého střeva, močových cest, ledvin, lymfatických uzlin, kůže, slinivky břišní, horních částí zažívacího traktu, štítné žlázy, žaludku, mozku, míchy, vaječníků, jater, bílých krvinek a dělohy. Nadprodukce galektinu-1 je asociována s nekontrolovaným růstem a tvorbou metastáz u nádorových onemocnění, podporuje angiogenezi v nádorových tkáních a zvyšuje odolnost nádoru vůči imunitnímu dozoru. Potlačení exprese galektinu 1 v nádorových buňkách v *in vitro* i *in vivo* experimentech včetně inhibice galektinu 1 pomocí syntetických inhibitorů snižuje schopnost nádorů metastázovat a zároveň zvyšuje účinnost další protinádorové léčby, jakou je radioterapie či chemoterapie (Astorgues-Xerri, L.; Riveiro, M. E.; Tijeras-Raballand, A.; Serova, M.; Neuzillet, C.; Albert, S.; Raymond, E.; Faivre, S., Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer treatment reviews* **2014**, 40 (2), 307-319), např. inhibice galektinu 1 zvýšila sensitivitu nádorových buněk karcinomu vaječníku vůči protinádorovému léčivu Paclitaxel (Shih, T.-C.; Liu, R.; Fung, G.; Bhardwaj, G.; Ghosh, P. M.; Lam, K. S., A Novel Galectin-1 Inhibitor Discovered through One-Bead Two-Compound Library Potentiates the Antitumor Effects of Paclitaxel in. *Molecular cancer therapeutics* **2017**, 16 (7), 1212-1223). Potlačení exprese galektinu 1 rovněž zvýšilo sensitivitu nádorových buněk rakoviny prsu vůči protinádorovým léčivům Paclitaxel a Adriamycin (Wang, F.; Lv, P.; Gu, Y.; Li, L.; Ge, X.; Guo, G., Galectin-1 knockdown

30

improves drug sensitivity of breast cancer by reducing P-glycoprotein expression through inhibiting the Raf-1/AP-1 signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, 8 (15), 25097). Inhibice galektinu 1 zvyšuje sensitivitu nádorových buněk při radioterapii a zároveň snižuje radiačně indukovanou lymfopenii (Welsh, J. W.; Seyedin, S. N.; Cortez, M. A.; Maity, A.; Hahn, S. M., Galectin-1 and Immune Suppression during Radiotherapy. *Clinical Cancer Research* **2014**, 20 (24), 6230-6232).

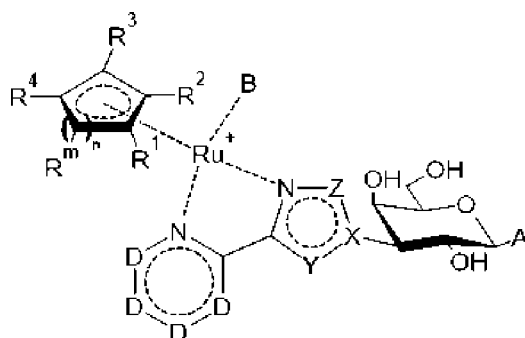
Přítomnost galektinu 1 také napomáhá adhezi viru lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1) na makrofágy, čímž výrazně zvyšuje riziko infekce a rychlost jejího šíření v napadeném organismu. Homodimer galektinu 1 může pomocí jedné ze svých dvou CRD vázat sacharidové struktury na povrchu makrofágu a druhou CRD vázat sacharidové struktury na povrchu HIV-1, čímž usnadní interakci mezi glykoproteinem CD4 napadené buňky a HIV glykoproteinem gp120 nutnou k fúzi viru s napadenou buňkou. Tento efekt byl prokázán pouze u galektinu 1, nikoliv u galektinu 3. U pacientů infikovaných HIV-1 dochází současně k dalšímu patologickému stavu spojenému s galektinem 1. Infekce HIV-1 u T-lymfocytů způsobí aberantní glykosylaci membránových proteinů vedoucí ke kumulaci (poly)laktosaminových struktur, které patří mezi přirozené ligandy galektinu 1. Interakce (poly)laktosaminových struktur napadených buněk s galektinem 1 následně indukuje apoptózu napadených i nenapadených T-lymfocytů a uvolnění virionů do okolního prostředí.

Potřeba nových a účinných inhibitorů galektinů, zejména se selektivitou vůči galektinu 1, tedy přetrvává.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká sloučenin (komplexů ruthenia), u kterých bylo zjištěno, že selektivně inhibují galektin 1, a jsou tedy významné jak pro farmaceutický průmysl a přípravu nových léčiv, tak pro studium funkce galektinů v základním i aplikovaném výzkumu, *in vitro* a *in vivo*. Na rozdíl od dosud známých inhibitorů galektinů jsou sloučeniny dle předkládaného vynálezu selektivní vůči galektinu 1, dokáží tedy inhibovat galektin 1 v přítomnosti ostatních galektinů. Na rozdíl od planárních arenů, které jsou součástí dosud známých inhibitorů galektinů (GB139 a jeho analoga), se organokovové komplexy vyznačují třírozměrnou strukturou, velmi obtížně dosažitelnou pomocí pouze organických (neorganometallických) struktur. Tyto 3D komplexy umožňují strukturálně daleko bohatší prostorovou organizaci substituentů a funkčních skupin, než dovolují čistě organické inhibitory, a tím i účinnější obsazení vazebné kavity a formování dalších interakcí inhibitoru ve vazebném místě cílového proteinu a tím jeho silnější inhibici. Kladně nabitý kation ruthenia může navíc vytvářet další elektrostatické interakce se záporně nabitými aminokyselinami proteinu.

Předmětem předkládaného vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce (I), které mají následující strukturu:



(I).

Jedná se o kladně nabitý komplex ruthenia, jehož kladný náboj je kompenzován v podstatě jakýmkoliv farmaceuticky akceptovatelným anionem, vhodnými aniony jsou například halogeny (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), PF_6^- , $Zn_2Cl_6^{2-}$, BF_4^- nebo BR_4^- , přičemž R je phenyl substituovaný elektronakceptorními skupinami jako jsou halogeny (F, Cl), CF_3 , CN nebo NO_2 .

Jedním z ligandů kationtu ruthenia je cyklopentadienylový anion ($n=1$) nebo benzen ($n=2$), které mohou být substituované či nesubstituované, a které jsou koordinované k ionu ruthenia pomocí ($\eta^5-C_5H_5$) nebo ($\eta^6-C_6H_6$) vazby. R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m tedy mohou být nezávisle vybrané ze skupiny, zahrnující H a (C_1 až C_6)alkyl.

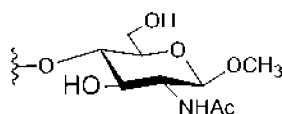
Dalším ligandem je B, vybrané ze skupiny zahrnující monovalentní záporně nabitě ligandy a neutrální ligandy, s výhodou je B vybrané ze skupiny zahrnující F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , pokud je prvním ligandem neutrální derivát benzenu, nebo je B vybrané ze skupiny zahrnující CO, CH_3CN , pokud je prvním ligandem záporně nabitý derivát cyklopentadienylu.

Třetí ligand obsahuje dva aromatické dusíkaté heterocykly, které se koordinují ke kationu ruthenia dusíkovými atomy. Kromě koordinujícího se atomu dusíku mohou tyto heterocykly dále obsahovat i další heteroatomy (N, O) nebo CH, popřípadě uhlík. V obecném vzorci (I) jsou možné následující kombinace:

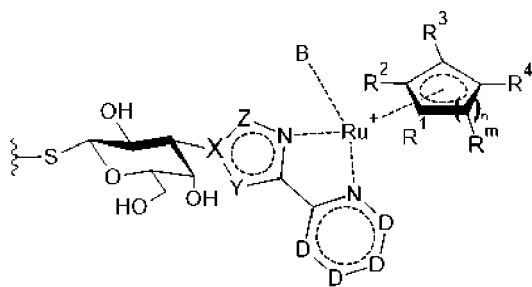
X je CH nebo N;

D, Y a Z jsou nezávisle CH, N nebo O, s výhodou jsou D, Y a Z nezávisle CH nebo N;

A je vybrané ze skupiny zahrnující struktury (II) a (III)



(II)



(III),

přičemž skupiny B, X, Z, Y, D, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m jsou definované výše, n je 1 nebo 2.

V jednom provedení platí, že alespoň jeden z X, Y, a Z je CH.

V jednom provedení alespoň dva z X, Y a Z jsou CH.

V jednom provedení X, Y a Z jsou CH.

V jednom provedení platí, že alespoň dvě D jsou CH.

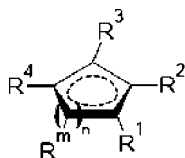
V jednom provedení alespoň tři D jsou CH.

V jednom provedení všechna D jsou CH, výsledným šestičlenným heterocyklem je tedy pyridinový heterocyklus.

V jednom provedení jsou R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m nezávisle vybrané ze skupiny, zahrnující H, $-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

Ve výhodném provedení je Y pětičlenným heterocyklem CH a současně X a Z jsou N, výsledným pětičlenným heterocyklem je tedy triazolový heterocyklus, výhodněji 1,2,3-triazolový heterocyklus.

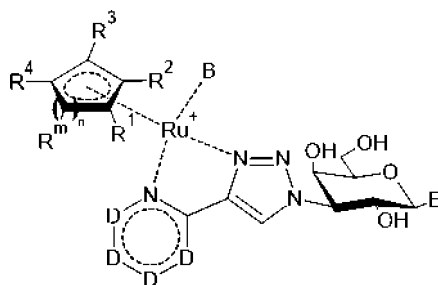
V jednom provedení je strukturní jednotka (IV)



(IV)

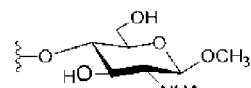
vybraná ze skupiny zahrnující cyklopentadien, pentamethylcyklopentadien, benzen, *p*-cymen, 1,3,5-trimethylbenzen, hexamethylbenzen. S výhodou je strukturní jednotkou (IV) *p*-cymen.

V jednom provedení je předmětem vynálezu sloučenina obecného vzorce (Ia)

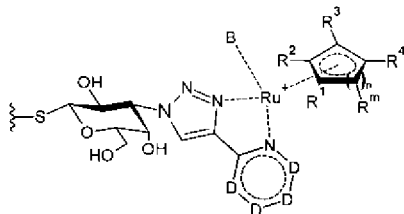


(Ia),

kde B, D, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m jsou definovány výše a E je

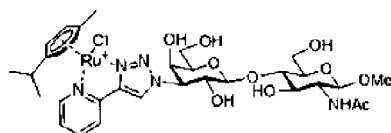


nebo

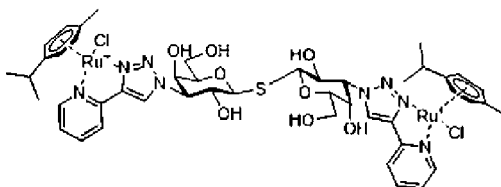


S výhodou D je CH. S výhodou strukturní jednotka (IV) je vybraná ze skupiny zahrnující cyklopentadien, pentamethylcyklopentadien, benzen, *p*-cymen, 1,3,5-trimethylbenzen, hexamethylbenzen. Výhodněji je strukturní jednotkou (IV) *p*-cymen.

Nejvýhodněji je sloučenina obecného vzorce (I) vybraná ze skupiny sestávající z:



a



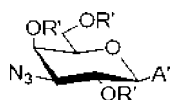
5

;

přičemž kladný náboj sloučeniny je kompenzován aniontem, vybraným z Cl^- a PF_6^- .

Sloučeniny obecného vzorce (I), ve kterých je pětičlenným dusíkatým heterocyklem 1,2,3-triazolový heterocyklus, lze připravit z azidového precursoru obecného vzorce (V)

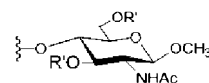
10



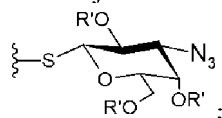
(V),

15

kde R' je H nebo Ac (Ac značí skupinu $\text{CH}_3\text{-C(=O)-}$); a kde A' je

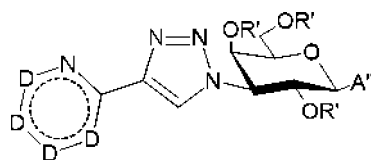


nebo



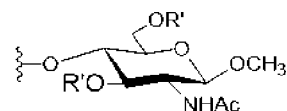
reakcí s ethynyl derivátem šestičlenného dusíkatého heterocyklu, například 2-ethynylpyridinem, při které dojde k Huisgenově cykloadici azidové skupiny na trojnou vazbu za vzniku triazolu. Typicky lze tuto reakci provést v přítomnosti modré skalice a kyseliny askorbové, jako rozpouštědlo může sloužit například dimethylformamid, dimethylsulfoxid, methanol či jiné alkoholy, tetrahydrofuran či jiné ethery, aceton, voda či jejich směsi. Reakce proběhne při teplotě v rozmezí od 20 do 50 °C, doba reakce je v rozmezí 0,5 až 5 hodin, za vzniku meziprojektu obecného vzorce (VIa)

25

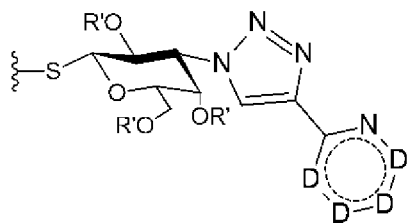


(VIa),

kde R' a D jsou definované výše a A'' je

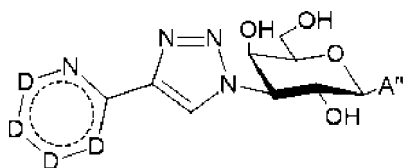


nebo

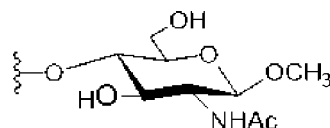


- Výchozí prekurzor obecného vzorce (V) je komerčně dostupný nebo jej lze získat standardními postupy dle Mandal, S.; Nilsson, U. J., Tri-isopropylsilyl thioglycosides as masked glycosyl thiol nucleophiles for the synthesis of S-linked glycosides and glyco-conjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (27), 4816-4819; WO 2013/110704 A1; Kurfířt, M.; Dračinský, M.; Červenková Šťastná, L.; Cuřínová, P.; Hamala, V.; Hovorková, M.; Bojarová, P.; Karban, J., Selectively Deoxyfluorinated N-Acetylactosamine Analogues as ^{19}F NMR Probes to Study Carbohydrate-Galectin Interactions. *Chemistry–A European Journal* **2021**, 27 (51), 13040-13051.

- Pokud R' je Ac, následuje v dalším kroku hydrolýza OAc skupin na skupiny OH. Tento krok lze provést například bazickou hydrolýzou pomocí methanolátu sodného v methanolu (například při pH 8 až 10 při laboratorní teplotě po dobu 10 až 24 hodin). Výsledkem tohoto kroku je sloučenina obecného vzorce (VIb)

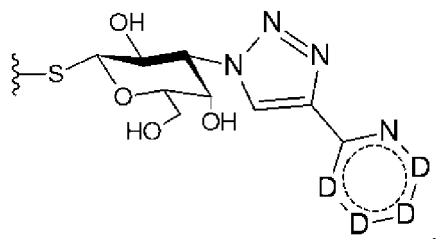


(VIb),



- kde D je definované výše a A''' je

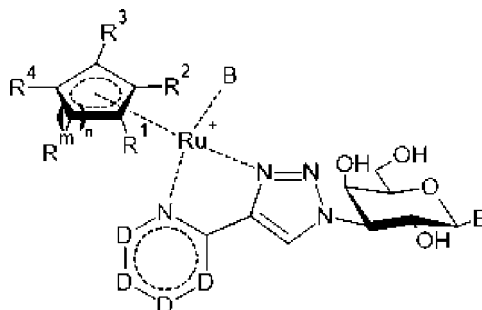
nebo



- Posledním krokem je reakce sloučeniny obecného vzorce (VIb) s komplexem ruthenia obecného vzorce $[\text{RuLB}_2]_2$, kde L je strukturální jednotka (IV), jak je definována výše, a B je definováno výše, za vzniku sloučeniny obecného vzorce (I). Komplexem ruthenia obecného vzorce $[\text{RuLB}_2]_2$ může být například $[\text{Ru}(p\text{-cymen})\text{Cl}_2]_2$. Tato reakce probíhá typicky při laboratorní teplotě, v organickém rozpouštědle, ve kterém je $[\text{RuLB}_2]_2$ rozpustný, například v dichlormethanu, chloroformu, methanolu či jiných alkoholů, acetonu, vodě, nebo jejich směsích. V provedení, kdy anion kompenzující kladně nabitý komplex ruthenia připravované sloučeniny obecného vzorce (I) má být jiný než Cl^- , potom se krok reakce sloučeniny obecného vzorce (VIb) s komplexem ruthenia

provede v přítomnosti tohoto aniontu, tedy například v přítomnosti KI, KPF₆, KBF₄, KBR₄, NaBR₄ nebo LiBR₄, přičemž R je fenyl substituovaný elektronakceptorními skupinami jako jsou halogeny (F, Cl), CF₃, CN nebo NO₂, a dalšími. Doba této reakce je řádově v jednotkách minut, s výhodou v rozmezí od 1 do 20 minut, výhodněji od 2 do 15 minut, ještě výhodněji od 5 do 10 minut.

Uvedeným způsobem lze připravit sloučeniny obecného vzorce (Ia)



(Ia),

kde B, D, E, R¹, R², R³, R⁴ a R^m jsou definovány výše.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití sloučenin obecného vzorce (I), definovaných výše. Uvedené sloučeniny lze použít jako součást analytické sondy pro stanovení afinit ligandů ke galektinům, zejména ke galektinu-1. Využití sloučenin (I) pro analytické účely buď využívá elektroaktivity atomu ruthenia při designu analytické metody, nebo se opírá o možnost kovalentně navázat na látku obecného vzorce (I) fluorescenčně aktivní substituent, například fluorescein. Látka obecného vzorce (I) nesoucí fluorescenčně aktivní substituent se využije jako kompetitivní fluorescenční sonda při stanovení afinit jiných látek ke galektinům metodou fluorescenční anisotropie.

Další použití sloučenin obecného vzorce (I) je v medicíně, zejména při léčení onemocnění spojených s nadprodukcí galektinů, zejména galektinu 1, s výhodou vybraných ze skupiny zahrnující nádorová onemocnění, fibrotická onemocnění, infekce HIV-1.

Další použití sloučenin obecného vzorce (I) je pro inhibici galektinů, *in vivo* nebo *in vitro*.

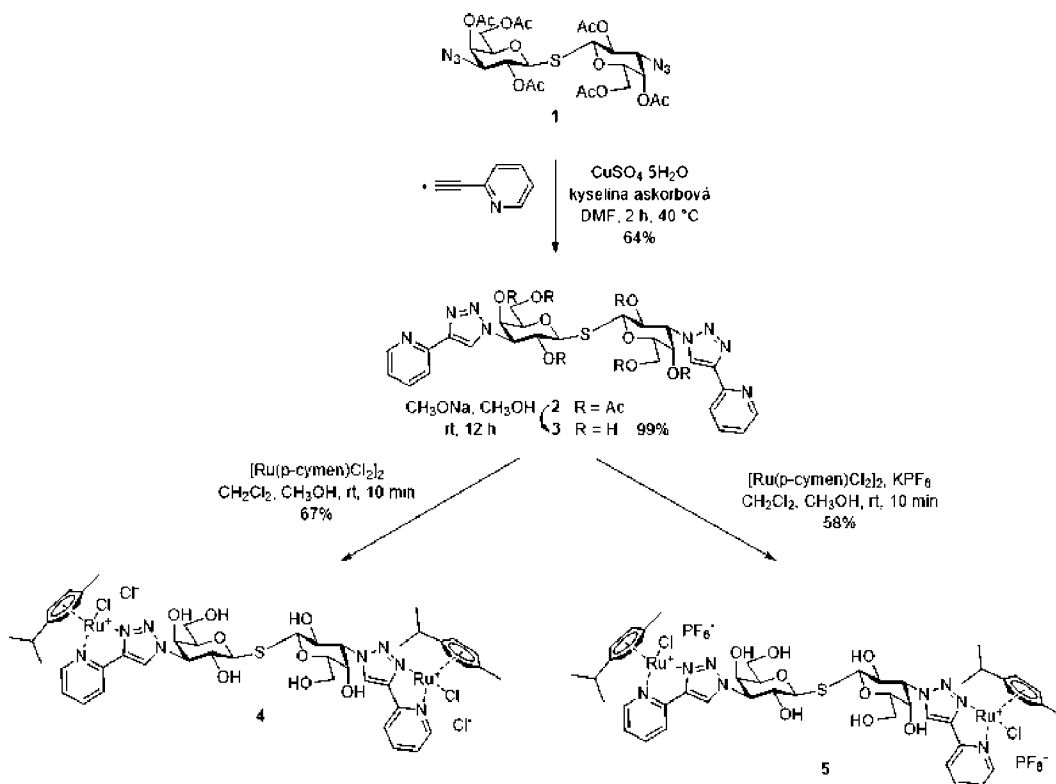
Příklady uskutečnění vynálezu

Materiály a metody

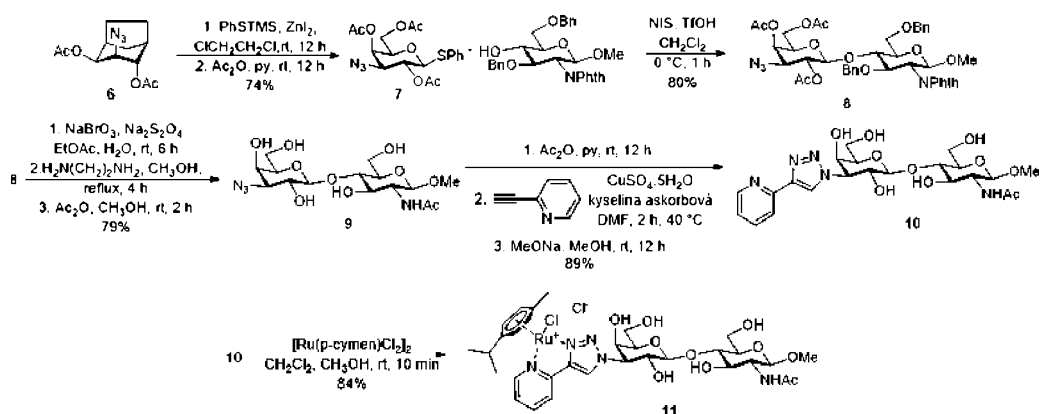
Chemikálie byly použity ve stavu, ve kterém byly dodány od dodavatelů Merck KGaA, Thermo Fisher Scientific a Fluorochem Ltd. Buněčné linie HEK-293, A2780, SK-OV-3, MDA-MB-231, MCF-7 a MCF-10A byly získány z ATCC sbírky. Dichlormethan byl sušen destilací s CaH₂ a stáním nad 3 Å molekulovými síty. Petrolether byl před použitím předestilován. TLC analýza byla prováděna pomocí TLC desek Sigma-Aldrich TLC Silica gel 60 F254 a látky byly detekovány pomocí UV lampy při 254 nm nebo obarvením pomocí roztoku anýzaldehydu (EtOH, AcOH, H₂SO₄). Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu 60 (70–230 mesh, Material Harvest). Roztoky byly koncentrovány na rotačních vakuových odparekách při teplotách nižších než 45 °C. NMR spektra byla pořízena na NMR spektrometru Bruker Avance 400 (¹H při 400,1 MHz, ¹⁹F při 376,4 MHz, ¹³C při 100,6 MHz, ³¹P při 162,0 MHz) při 25 °C. ¹H a ¹³C{¹H} NMR spektra byla referencována na použité rozpouštědlo (δ/ppm; δH/δC: CDCl₃, 7,26/77,16, MeOH-*d*₄, 3,31/49,00 DMSO-*d*₆, 2,50/39,52). ¹⁹F NMR spektra byla referencována na přidáný vnitřní standard hexafluorobenzen (−166,62 v MeOH-*d*₄). Kombinace 1D a 2D experimentů (¹H, ¹H-COSY, ¹H, ¹³C-HSQC a ¹H, ¹³C-HMBC) byla použita k přiřazení všech vodíkových a uhlíkových

signálů. HRMS analýza byla provedena pomocí Bruker MicroTOF-QIII, za použití APCI nebo ESI ionizace v pozitivním či negativním módu. EtOAc značí ethyl acetát, PE petrolether, DCM dichloromethan, MeOH methanol, EtOH ethanol, AcOH kyselinu octovou, Ac₂O acetanhydrid a DMF dimethylformamid. GB139 byla připravena podle známého postupu (*Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (27), 4816-4819).

Schéma syntézy:



10



rt = laboratorní teplota

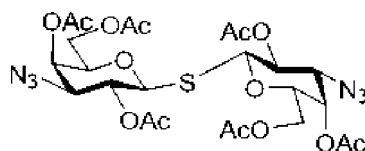
15

Příklad 1: Klonování a příprava galektinů 1 a 3

Kódující sekvence lidského galektinu 1 a 3 (NM_002305.4 a NM_002306) byly klonovány pomocí technologie Gateway rekombinace (Invitrogen) do vektoru pDEST15 obsahujícího N-koncovou His₆-GST značku štěpitelnou TEV proteázou (Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase). Oba klonované geny byly exprimovány v *E. coli* BL21 RILP. Bakterie byly kultivovány ve 100 ml LB média (10 g/l trypton, 5 g/l kvasinkový extrakt, 5 g/l NaCl) s ampicilinem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (30 µg/ml) přes noc při 37 °C, 220 ot./min. Kultura byla naředěna do celkového objemu 2,5 l v LB médiu (doplněno o ampicilin a chloramfenikol) na optickou hustotu A₆₀₀ = 0,1 a kultivována 2-3 hodiny. Po dosažení optické hustoty A₆₀₀ = 0,5 byla provedena indukce genové exprese přidáním isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu do kultury (konečná koncentrace, 1 mM). Bakteriální kultura byla kultivována další 4 hodiny při 30 °C, 140 ot./min. a poté peletována centrifugací (4000 g/4 °C/10 min). Bakteriální pelety byly resuspendovány ve vazebném pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl, 0,75% CHAPS). Buněčné suspenze byly následně obohaceny lysozymem (1 mg/ml), fenylnethylsulfonylfluoridem (1 mM), turbonukleázou (1:1000) a MgCl₂ (1mM) a poté sonikovány ultrazvukovým sonikátorem Sonoplus, sondou VS 70T, 15 cykly (10 s sonikace, 50 s pauza, 35W) při 4 °C. Bakteriální lyzáty byly získány centrifugací po dobu 30 minut při 10 000 g/ 4 °C. His₆-GST-značené proteiny byly zachyceny na GStap glutathionagarózní koloně (GE Healthcare), eluovány vazebným pufrem obohaceným o 20 mM glutathion a podrobeny štěpení TEV proteázou (1 mg proteázy na 10 mg purifikovaného proteinu) přes noc při 4 °C. Pro odstranění His₆-GST a His₆-TEV proteázy byly směsi proteinů aplikovány na kolonu HisTrap (GE Healthcare). Frakce obsahující purifikované proteiny byla sesbírána do 96 jamkové desky prostřednictvím frakcionátoru. Po zakoncentrování byly proteiny solubilizovány ve finálních testovacích pufrech (50 mM fosfát, 150 mM NaCl, 1mM TCEP) pomocí Zeba spin odsolovacích kolon oddělujících molekuly s hmotností do 10 kDa (Thermo Fisher Scientific). Čistota všech izolovaných proteinů byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a obarvením pomocí Coomassie Brilliant Blue. Proteáza TEV byla připravena v laboratoři podle modifikované metody Tropea et al. (Tropea, J. E., Cherry, S., and Waugh, D. S. (2009) Expression and purification of soluble His6-tagged TEV protease. *Methods Mol. Biol.* 498, 297–307).

30 Příklad 2: *Syntézy*

2,2',4,4',6,6'-tetra-*O*-acetyl-3,3'-diazido-3,3'-dideoxy-1,1'-sulfanediyl-di-β-D-galaktopyranosid (1)



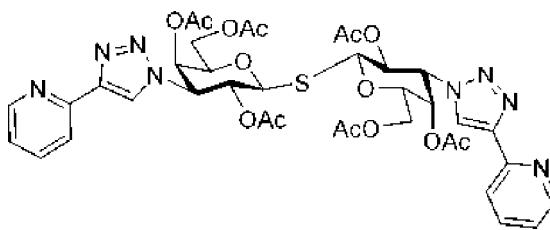
35

1

Látka 1 byla připravena dle postupu z lit. (Mandal, S.; Nilsson, U. J., Tri-isopropylsilyl thioglycosides as masked glycosyl thiol nucleophiles for the synthesis of S-linked glycosides and glyco-conjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12 (27), 4816-4819).

40

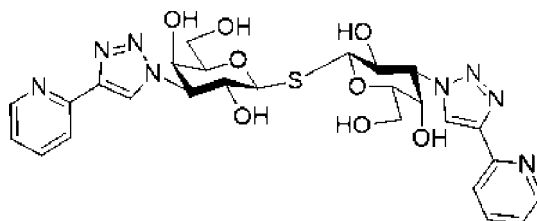
2,2',4,4',6,6'-tetra-*O*-acetyl-3,3'-dideoxy-3,3'-bis-[4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-1,1'-sulfanediyl-di-β-D-galaktopyranosid (2)



2

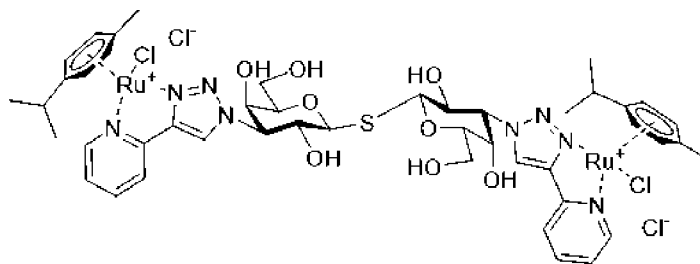
2-Ethynylpyridine (88 μ l, 0,87 mmol) byl přidán do směsi **1** (240 mg, 0,36 mmol), modré skalice (18 mg, 0,07 mmol) a kyseliny askorbové (13 mg, 0,07 mmol) v dimethylformamidu (3 ml) a reakční směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni při 40 °C po dobu 2 h. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla reakční směs zředěna 30 ml dichlormethanu a promyta vodou (30 ml), vodná fáze byla promyta 2 $\times$ 30 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 40 g silikagelu v gradientové směsi EtOAc až EtOAc/CH₃OH 10:1 poskytla **2** (203 mg, 64%) ve formě bílé amorfnní látky. *R_f* 0,30 (EtOAc). ¹H NMR (dmso-*d*₆, 400 MHz, ¹H-¹H COSY): δ 8,61 (ddd, 2H, *J* = 4,8, 1,8, 1,2 Hz, CH_{Py}), 8,61 (s, 2H, CH_{Tri}), 8,02 (dt, 2H, *J* = 7,9, 1,2 Hz, CH_{Py}), 7,90 (ddd, 2H, *J* = 7,9, 7,6, 1,8 Hz, CH_{Py}), 7,36 (ddd, 2H, *J* = 7,6, 4,8, 1,2 Hz, CH_{Py}), 5,75–5,67 (m, 4H, H-2, H-3), 5,52 (dd, 2H, *J* = 2,8, 1,2 Hz, H-4), 5,25 (d, 2H, *J* = 9,6 Hz, H-1), 4,34 (ddd, 2H, *J* = 6,7, 5,9, 1,2 Hz, H-5), 4,14 (dd, 2H, *J* = 11,4, 6,7 Hz, H-6), 4,08 (dd, 2H, *J* = 11,4, 5,9 Hz, H-6'), 2,05, 2,02, 1,87 (3 $\times$ s, 3 $\times$ 6H, Me). ¹³C{¹H} NMR (dmso-*d*₆, 101 MHz, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC): δ 170,0, 169,3, 169,0 (3 $\times$ CO), 149,7 (CH_{Py}), 149,5 (C_q(Py)), 147,3 (C_q(Tri)), 137,3, 123,3 (2 $\times$ CH_{Py}), 122,9 (CH_{Tri}), 119,6 (CH_{Py}), 81,6 (C-1), 74,6 (C-5), 68,8 (C-4), 66,8 (C-2), 61,6 (C-3), 61,4 (C-6), 20,6, 20,3, 20,2 (3 $\times$ Me). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na]⁺ vypočteno pro C₃₈H₄₂N₈O₁₄SNa, 889,2433; nalezeno 889,2437.

3,3'-dideoxy-3,3'-bis-[4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-1,1'-sulfanediyl-di-β-D-galaktopyranosid (**3**)



3

0,1 M roztok methanolátu sodného v methanolu byl přikapán do roztoku **2** (180 mg, 0,21 mmol) ve směsi methanolu (10 ml) a dichlormethanu (10 ml) až do dosažení pH = 9. Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána přes noc. Neutralizace kyselým iontoměničem DOVEX H⁺, filtrace a odpaření rozpouštědel poskytlo **3** (126 mg, 99%) jako bílou amorfnní látku bez nutnosti další purifikace. *R_f* 0,10 (CH₂Cl₂/CH₃OH 7:1). ¹H NMR (dmso-*d*₆, 400 MHz, ¹H-¹H COSY): δ 8,60 (dt, 2H, *J* = 4,8, 1,5 Hz, CH_{Py}), 8,47 (s, 2H, CH_{Tri}), 8,04 (dt, 2H, *J* = 8,0, 1,2 Hz, CH_{Py}), 7,90 (ddd, 2H, *J* = 8,0, 7,6, 1,5 Hz, CH_{Py}), 7,34 (ddd, 2H, *J* = 7,6, 4,8, 1,2 Hz, CH_{Py}), 5,53 (d, 2H, *J* = 6,9 Hz, OH-2), 5,32 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz, OH-4), 4,96 (d, 2H, *J* = 9,5 Hz, H-1), 4,92 (dd, 2H, *J* = 10,6, 3,1 Hz, H-3), 4,77 (br s, 2H, OH-6), 4,19 (ddd, 2H, *J* = 10,6, 9,5, 6,9 Hz, H-2), 3,99 (dd, 2H, *J* = 7,4, 3,1 Hz, H-4), 3,74 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, H-5), 3,56–3,54 (m, 4H, H-6). ¹³C{¹H} NMR (MeOH-*d*₄, 101 MHz, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC): δ 150,2 (C_q(Py)), 149,6 (CH_{Py}), 146,6 (C_q(Tri)), 137,2, 122,8 (2 $\times$ CH_{Py}), 122,5 (CH_{Tri}), 119,3 (CH_{Py}), 83,5 (C-1), 79,3 (C-5), 67,6 (C-4), 67,0 (C-3), 66,9 (C-2), 60,1 (C-6). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na]⁺ vypočteno pro C₂₆H₃₀N₈O₈SNa, 637,1800; nalezeno 637,1812.

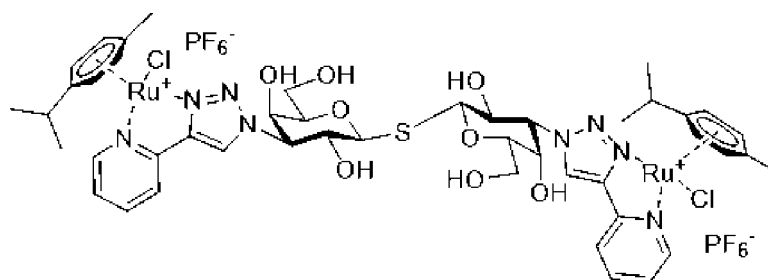
Komplex Ru s Cl⁻ (4)

5

4

Tmavě červený roztok dichloro(*p*-cymene)ruthenatého dimeru (39 mg, 0,06 mmol) v dichlormethanu (1 ml) byl přidán k suspenzi **3** (39 mg, 0,06 mmol) ve směsi methanol/dichlormethan 1:1 (2 ml). Skoro okamžitě bylo možné pozorovat změnu barvy z červené do žluto-oranžové a kompletní rozpuštění výchozího materiálu. Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce, surová směs byla rozpuštěna v minimálním množství metanolu a produkt byl vysrážen pomalým přidávkem methyl(*tert*.butyl)etheru ve formě žluté pevné látky (52 mg, 67%) jako směs 4 diastereomerů v poměru 1:1:1:1. Pro získání analytického vzorku beze stop zbytkových rozpouštědel byl produkt rozpuštěn v malém množství methanolu a 3× kodedilován s chloroformem. R_f 0,05 (CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1). ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 400 MHz, ¹H-¹H COSY): δ 9,42–9,41 (m, 4×1H, CH_{Py}), 9,15 (s, 1H, CH_{Tria}), 9,14 (s, 2×1H, CH_{Tria}), 9,12 (s, 1H, CH_{Tria}), 8,17–8,09 (m, 4×2H, CH_{Py}), 7,67–7,64 (m, 4×1H, CH_{Py}), 6,14–6,12, 6,08–6,03, 5,94–5,90, 5,85–5,81 (4×m, 4×4×1H, CH_{*p*-cym}), 5,23, 5,22 (2×dd, 2×1H, $J = 10,6, 2,9$ Hz, H-3), 5,17 (dd, 2×1H, $J = 10,6, 2,9$ Hz, H-3), 5,02 (4×d, 4×1H, $J = 9,6$ Hz, H-1), 4,78–4,68 (m, 4×1H, H-2), 4,33, 4,32, 4,27, 4,26 (4×d, 4×1H, $J = 2,9$ Hz, H-4), 3,96–3,93 (m, 4×1H, H-5), 3,87–3,70 (m, 4×2H, H-6a/b), 2,76 (hept, 4×1H, $J = 6,9$ Hz, CH_{*i*-Pr}), 2,24 (s, 2×3H, Me_{*p*-cym}), 2,22, 2,21 (2×s, 2×3H, Me_{*p*-cym}), 1,17, 1,16 (2×d, 4×3H, $J = 6,9$ Hz, Me_{*i*-Pr}), 1,11, 1,10 (2×d, 2×3H, $J = 6,9$ Hz, Me_{*i*-Pr}), 1,07 (d, 2×3H, $J = 6,9$ Hz, Me_{*i*-Pr}). ¹³C{¹H} NMR (MeOH-*d*₄, 101 MHz, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC): δ 156,8, 156,74, 156,71 (4×CH_{Py}), 150,0, 149,92, 149,91 (4×C_{q(Py)}), 147,73, 147,71, 147,6 (4×C_{q(Tria)}), 141,5, 141,41, 141,40, 141,37 (4×CH_{Py}), 127,39, 127,36, 127,3 (4×CH_{Py}), 126,0, 125,8, 125,7 (4×CH_{Tria}), 123,51, 123,48, 123,4, 123,3 (4×CH_{Py}), 106,51, 106,47, 106,45 (4×C_{q(CH_{*i*-Pr})}), 103,9, 103,72, 103,67 (4×C_{q(Me)}), 87,4, 87,3 (4×CH_{*p*-cym}), 86,32, 86,30, 86,25 (4×C-1), 86,0, 85,9 (4×CH_{*p*-cym}), 85,6, 85,4 (4×CH_{*p*-cym}), 84,8, 84,7, 84,6 (4×CH_{*p*-cym}), 81,12, 81,07, 81,0 (4×C-5), 71,1, 70,9, 70,8 (4×C-3), 69,6, 69,4 (4×C-4), 68,43, 68,41, 68,2 (4×C-2), 62,53, 62,51, 62,48 (4×C-6), 32,33, 32,26 (4×CH_{*i*-Pr}), 22,7, 22,64, 22,61 (4×Me_{*i*-Pr}), 21,96, 21,95, 21,84 (4×Me_{*i*-Pr}), 18,80, 18,78, 18,75 (4×Me_{*p*-cym}). HRMS-APCI (m/z): [M – Cl₂]²⁺ vypočteno pro C₄₆H₅₈Cl₂N₈O₈Ru₂S, 578,0781; nalezeno 578,0781.

35

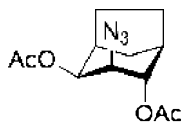
Komplex Ru s PF₆⁻ (5)

5

Tmavě červený roztok dichloro(*p*-cymene)ruthenatého dimeru (33 mg, 0,05 mmol) v dichlormethanu (1 ml) byl přidán k suspenzi **3** (33 mg, 0,05 mmol) a KPF₆ (20 mg, 0,10 mmol) ve směsi methanol/dichlormethan 1:1 (2 ml). Skoro okamžitě bylo možné pozorovat změnu barvy z červené do žluto-oranžové, kompletní rozpuštění výchozího materiálu a vysrážení krystalků KCl.

Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min a zfiltrována. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vaukové odparce, surová směs byla rozpuštěna v minimálním množství metanolu a produkt **5** byl vysrážen pomalým přidávkem methyl(*tert*.butyl)etheru ve formě žluté pevné látky (45 mg, 58%) jako směs 4 diastereomerů v poměru 1:1:1:1. Pro získání analytického vzorku beze stop zbytkových rozpouštěděl byl produkt rozpuštěn v malém množství metanolu a 3× kodestilován s chloroformem. *R*_f 0,15 (CH₂Cl₂/CH₃OH 3:1). ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 400 MHz, ¹H-¹H COSY): δ 9,42–9,40 (m, 4×1H, CH_{Py}), 9,13, 9,12 (2×s, 2×1H, CH_{Tria}), 9,10 (2×s, 2×1H, CH_{Tria}), 8,18–8,14 (m, 2×2H, CH_{Py}), 8,10–8,08 (m, 2×2H, CH_{Py}), 7,67–7,64 (m, 4×1H, CH_{Py}), 6,14–6,11, 6,07–6,03, 5,93–5,89, 5,85–5,81 (4×m, 4×4×1H, CH_{*p*-cym}), 5,22, 5,21 (2×dd, 2×1H, *J* = 10,7, 2,9 Hz, H-3), 5,16 (dd, 2×1H, *J* = 10,6, 2,9 Hz, H-3), 5,02 (d, 2×1H, *J* = 9,5 Hz, H-1), 5,01 (2×d, 2×1H, *J* = 9,5 Hz, H-1), 4,78–4,67 (m, 4×1H, H-2), 4,32, 4,31, 4,27, 4,26 (4×d, 4×1H, *J* = 2,9 Hz, H-4), 3,97–3,92 (m, 4×1H, H-5), 3,89–3,72 (m, 4×2H, H-6a/b), 2,76 (hept, 4×1H, *J* = 6,9 Hz, CH_{*i*-Pr}), 2,23 (s, 2×3H, Me_{*p*-cym}), 2,22, 2,21 (2×s, 2×3H, Me_{*p*-cym}), 1,17, 1,16 (2×d, 2×6H, *J* = 6,9 Hz, Me_{*i*-Pr}), 1,11, 1,07 (2×d, 2×6H, *J* = 6,9 Hz, Me_{*i*-Pr}). ¹³C {¹H} NMR (MeOH-*d*₄, 101 MHz, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC): δ 156,79, 156,76, 156,7 (4×CH_{Py}), 150,0, 149,91, 149,89 (4×C_{q(Py)}), 147,74, 147,72, 147,6 (4×C_{q(Tria)}), 141,5 141,41, 141,37 (4×CH_{Py}), 127,40, 127,35 (4×CH_{Py}), 126,0, 125,9, 125,7, 125,6 (CH_{Tria}), 123,49, 123,45, 123,3 (4×CH_{Py}), 106,50, 106,49, 106,47 (4×C_qCH_{*i*-Pr}), 103,91, 103,90, 103,7 (4×C_qMe), 87,5, 87,3 (4×CH_{*p*-cym}), 86,33, 86,31, 86,25 (4×C-1), 86,04, 86,03, 85,9 (4×CH_{*p*-cym}), 85,6, 85,4 (4×CH_{*p*-cym}), 84,8, 84,6 (4×CH_{*p*-cym}), 81,13, 81,08, 81,07, 81,06 (4×C-5), 71,1, 70,9, 70,8 (4×C-3), 69,63, 69,60, 69,4 (4×C-4), 68,41, 68,38, 68,23, 68,20 (4×C-2), 62,5 (4×C-6), 32,32, 32,26 (4×CH_{*i*-Pr}), 22,64, 22,62, 22,60 (4×Me_{*i*-Pr}), 22,0, 21,9, 21,8 (4×Me_{*i*-Pr}), 18,77, 18,75, 18,7 (4×Me_{*p*-cym}). HRMS-APCI (*m/z*): [M – Cl₂]²⁺ vypočteno pro C₄₆H₅₈Cl₂N₈O₈Ru₂S, 578,0781; nalezeno 578,0787.

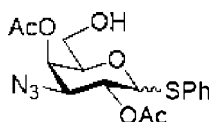
1,6-anhydro-2,4-di-*O*-acetyl-3-azido-3-deoxy-β-D-galaktopyranos (**6**)



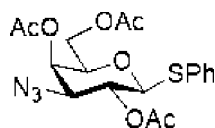
6

Látka **6** byla připravena dle postupu z lit. (Mandal, S.; Nilsson, U. J., Tri-isopropylsilyl thioglycosides as masked glycosyl thiol nucleophiles for the synthesis of S-linked glycosides and glyco-conjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (27), 4816-4819).

Fenyl 2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-azido-1-thio-β-D-galaktopyranosid (**7**)



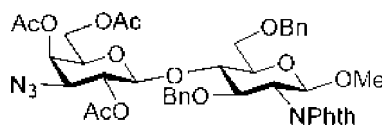
S1



7

Trimethylsilyl thiofenol (1,4 ml, 7,14 mmol) a jodid zinečnatý (1,27 g, 4,48 mmol) byly postupně
 5 přidány do roztoku **6** (600 mg, 2,24 mmol) v dichlorethanu (20 ml) a reakční směs byla míchána
 za rt přes noc. Reakční směs byla zředěna 60 ml dichlormethanu a promyta vodou (80 ml). Vodná
 fáze byla 2× promyta 50 ml dichlormethanu. Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým
 síranem sodným, surová směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce, rozpuštěna v 50 ml
 10 methanolu, okyselena 5 kapkami kyseliny octové a ponechána míchat 20 minut. Rozpouštědla byla
 odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 100 g silikagelu ve směsi
 EtOAc/PE 2:3 první poskytla fenyl 2,4-di-O-acetyl-3-azido-1-thio- α -D-galaktopyranosidu **α -S1**
 (130 mg, 15%) následované fenyl 2,4-di-O-acetyl-3-azido-1-thio- β -D-galaktopyranosidu **β -S1**
 (630 mg, 74%). K **β -S1** rozpuštěném v 40 ml pyridine byl přidán Ac₂O (30 ml, 0,27 mol) a směs
 byla ponechána míchat přes noc. Odpaření rozpouštědel a kódestilace s toluenem (3×) poskytla **7**
 15 (700 mg, 100% pouze acetylační krok, 74% oba kroky dohromady) jako bílou krystalickou látku,
 mp 105–106 °C (EtOAc/PE), *R_f* 0.50 (EtOAc/PE 1:1). NMR spektra jsou v souladu s lit. (WO
 2013/110704 A1).

Methyl 4-O-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-azido-3-deoxy- β -D-galaktopyranosyl)-3,6-di-O-benzyl-2-
 20 **deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranosid (**8**)**

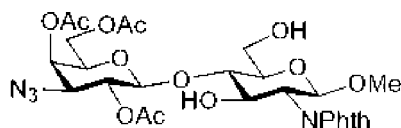


8

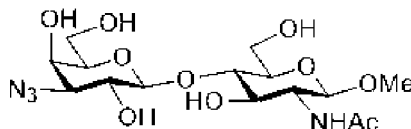
Methyl 3,6-di-O-benzyl-2-deoxy-2-ftalimido- β -D-glukopyranoside (připraven dle: Kurfiřt, M.;
 25 Dračinský, M.; Červenková Šťastná, L.; Cuřínová, P.; Hamala, V.; Hovorková, M.; Bojarová, P.;
 Karban, J., Selectively Deoxyfluorinated N-Acetylactosamine Analogues as ¹⁹F NMR Probes to
 Study Carbohydrate-Galectin Interactions. *Chemistry—A European Journal* **2021**, 27 (51), 13040-
 13051) (150 mg, 0,30 mmol) byl spolu s glykosyl donorem **7** (170 mg, 0,40 mmol) kódestilován s
 30 toluenem (3×) a sušen na vakuové olejové pumpě po dobu 15 min. Pod ochrannou atmosférou
 argonu byl přidán destilovaný dichlormethan (10 ml) a 3 Å molekulová síta (1 g) a směs byla
 míchána za laboratorní teploty po dobu 1h. Do reakční směsi ochlazené na 0 °C byl přidán *N*-
 jodsukcinimid (134 mg, 0,60 mmol), přikapána trifluormethansulfonová kyselina (20 μ l) a směs
 byla ponechána míchat při 0 °C po dobu 1h. Reakční směs byla zředěna 30 ml dichlormethanu,
 35 nasyceným roztokem NaHCO₃ do neutrálního pH a 10% roztokem Na₂S₂O₃ do odbarvení;
 zfiltrována, převedena do děličky a promyta vodou (30 ml). Vodná fáze byla extrahována 2× 30
 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným a
 rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 30 g
 silikagelu ve směsi EtOAc/PE 2:3 poskytla **8** (220 mg, 80%) ve formě bezbarvého gelu. *R_f* 0.50
 40 (EtOAc/PE 1:1). NMR spektra jsou v souladu s lit. (Helland, A.-C.; Hindsgaul, O.; Palcic, M. M.;
 Stults, C. L.; Macher, B. A., Methyl 3-amino-3-deoxy- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-
 2-deoxy- β -D-glucopyranoside: An inhibitor of UDP-D-galactose: β -D-galactopyranosyl-(1→4)-2-
 acetamido-2-deoxy-D-glucose (1→3)- α -D-galactopyranosyltransferase. *Carbohydrate research*
 1995, 276 (1), 91-98.).

45

Methyl 4-O-(3-azido-3-deoxy- β -D-galaktopyranosyl)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-
glukopyranosid (9**)**



S2



9

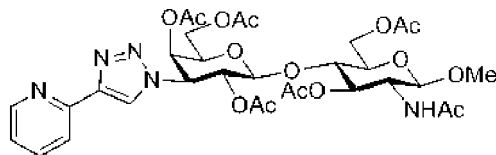
5

Roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (226 mg, 1,29 mmol) ve vodě (8 ml) byl pomalu přikapán ke směsi **8** (210 mg, 0,26 mmol) a NaBrO_3 (196 mg, 1,29 mmol) v EtOAc (5 ml) a vodě (4 ml). Směs byla intenzivně
 10 míchána po dobu 6h, přičemž reakční směs změnila barvu z bezbarvé na oranžovo-červenou a zpátky na bezbarvou, což indikovalo konec reakce. Směs byla zředěna 40 ml dichlormethanu, převedena do děličky a promyta vodou (30 ml). Vodná fáze byla extrahována 4× 30 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 30 g silikagelu ve směsi
 15 EtOAc/PE 2:1 poskytla meziprodukt **S2** (145 mg, 89%) ve formě bezbarvého gelu. R_f 0,10 (EtOAc/PE 1:1). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ^1H - ^1H COSY): δ 7,84, 7,72 (2×dd, 2×2H, J = 5,3, 3,1 Hz, CH_{Ph}), 5,37 (d, 1H, J = 3,4 Hz, H-4'), 5,21 (dd, 1H, J = 10,6, 8,0 Hz, H-2'), 5,19 (d, 1H, J = 8,6 Hz, H-1), 4,64 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H-1'), 4,42 (dd, 1H, J = 10,8, 8,4 Hz, H-3), 4,15–4,11 (m, 1H, H-6'a), 4,09 (dd, 1H, J = 10,8, 8,6 Hz, H-2), 3,99–3,94 (m, 2H, H-5', H-6'b), 3,91 (dd, 1H, J = 12,2, 2,1 Hz, H-6a), 3,72 (dd, 1H, J = 9,5, 8,4 Hz, H-4), 3,69 (dd, 1H, J = 12,2, 3,1 Hz, H-6b),
 20 3,61 (dd, 1H, J = 10,6, 3,4 Hz, H-3'), 3,56 (ddd, 1H, J = 9,5, 3,1, 2,1 Hz, H-5), 3,44 (s, 3H, OMe), 2,20, 2,15, 1,85 (3×s, 3×3H, Me_{Ac}). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 101 MHz, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC): δ 170,6, 170,0, 169,5 (3×CO), from HMBC 168,1 (2CO), 134,2 (2 CH_{Ph}), 131,9 (2 C_q), 123,5 (2 CH_{Ph}), 101,2 (C-1'), 99,5 (C-1), 82,2 (C-4), 74,2 (C-5), 72,5 (C-5'), 69,8 (C-3, C-2'), 67,7
 25 (C-4'), 61,9 (C-6'), 61,8 (C-3'), 60,9 (C-6), 57,3 (OMe), 56,0 (C-2), 20,9, 20,7, 20,3 (3× Me_{Ac}).

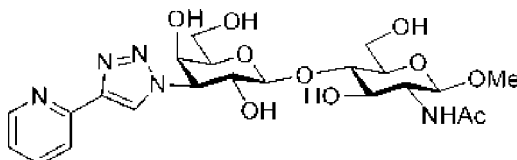
Ethylendiamin (1,5 ml, 22,46 mmol) byl přidán ke roztoku **S2** (300 mg, 0,47 mmol) v methanolu (5 ml) a směs byla míchána za refluxu po dobu 4h. Rozpouštědla byla odpařena, surová směs byla
 30 kodedistilována s toluenem (3×), rozpuštěna v 20 ml methanolu a po přidání Ac_2O (5 ml, 52,94 mmol) míchána další 2h. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 25 g silikagelu ve směsi dichlormethan/methanol 6:1 poskytla **9** (178 mg, 89%
 35 tyto 2 kroky, 79% všechny 3 kroky dohromady) ve formě bílých krystalků. R_f 0,05 (DCM/MeOH 10:1), mp 254–256 °C (decomp., EtOAc/MeOH), ^1H NMR ($\text{MeOH}-d_4$, 400 MHz, ^1H - ^1H COSY): δ 4,45 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H-1'), 4,32 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H-1), 3,93 (dd, 1H, J = 12,2, 2,5 Hz, H-6a), 3,90 (dd, 1H, J = 3,1, 0,9 Hz, H-4'), 3,87 (dd, 1H, J = 12,2, 4,3 Hz, H-6b), 3,73 (dd, 1H, J = 11,5, 7,4 Hz, H-6'a), 3,75–3,61 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-2', H-5', H-6'b), 3,46 (s, 3H, OMe), 3,40 (ddd, 1H, J = 9,2, 4,3, 2,5 Hz, H-5), 3,33 (dd, 1H, J = 10,6, 3,1 Hz, H-3'), 1,97 (s, 3H, Me_{Ac}).
 40 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR ($\text{MeOH}-d_4$, 101 MHz, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC): δ 173,6 (CO), 105,1 (C-1'), 103,6 (C-1), 80,7 (C-4), 77,8 (C-3), 76,6 (C-5), 74,3 (C-5'), 70,7 (C-2'), 69,4 (C-4'), 66,7 (C-3'), 62,4 (C-6'), 61,8 (C-6), 57,0 (OMe), 56,6 (C-2), 22,9 (Me_{Ac}). HRMS-APCI (m/z): $[\text{M} - \text{N}_2 + \text{H}]^+$ vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{10}$, 395,1660; nalezeno 395,1656.

Methyl 4-O-{3-[4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3-deoxy-β-D-galaktopyranosyl}-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosid (10)

45



S3



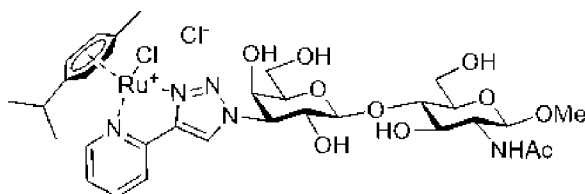
10

5

Ac₂O (5 ml, 52,94 mmol) byl přidán k roztoku **9** (135 mg, 0,32 mmol) v pyridinu (7 ml) a směs byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce, surová směs byla kodestilována s toluenem (3×) a znovu rozpuštěna v dimethylformamidu (2 ml). Postupně byla přidána modrá skalice (16 mg, 0,06 mmol), kyselina askorbová (11 mg, 0,06 mmol), 2-ethynylpyridine (39 μl, 0,38 mmol) a reakční směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni při 40 °C po dobu 2 h. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla reakční směs zředěna 30 ml dichlormethanu a promyta vodou (30 ml), vodná fáze byla promyta 2× 30 ml dichlormethanu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie na 25 g siligalu v EtOAc poskytla **S3** (209 mg, 89%) ve formě bílé amorfni látky.

0,1 M roztok methanolátu sodného v methanolu byl přikapán do roztoku **S3** (209 mg, 0,28 mmol) v methanolu (10 ml) až do dosažení pH = 9. Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána přes noc. Neutralizace kyselým iontoměničem DOVEX H⁺, filtrace a odpaření rozpouštědel poskytlo **10** (149 mg, 100% tento krok, 89% všechny kroky dohromady) jako nažloutlou amorfni látku bez nutnosti další purifikace. *R_f* 0,35 (DCM/MeOH 3:1), ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 400 MHz, ¹H-¹H COSY): δ 8,56 (br s, 2H, CH_{Py}, CH_{Tri}), 8,10 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz, CH_{Py}), 7,93 (dd, 1H, *J* = 6,0, 8,4 Hz, CH_{Py}), 7,38 (br s, 1H, CH_{Py}), 4,90 (dd, 1H, *J* = 11,1, 3,2 Hz, H-3'), 4,68 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz, H-1'), 4,35 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-1), 4,22 (dd, 1H, *J* = 11,1, 7,5 Hz, H-2'), 4,09 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H-4'), 3,95 (dd, 1H, *J* = 12,2, 2,5 Hz, H-6a), 3,91–3,87 (m, 2H, H-6b, H-5'), 3,80 (dd, 1H, *J* = 11,4, 7,1 Hz, H-6'a), 3,76 (dd, 1H, *J* = 10,4, 8,2 Hz, H-2), 3,75–3,64 (m, 3H, H-3, H-4, H-6'b), 3,47 (s, 3H, OMe), 3,43 (ddd, 1H, *J* = 9,4, 4,2, 2,5 Hz, H-5), 1,98 (s, 3H, Me_{Ac}). ¹³C{¹H} NMR (MeOH-*d*₄, 101 MHz, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC): δ 173,6 (CO), from HMBC 151,3 (C_{q(Py)}), 150,4 (CH_{Py}), from HMBC 148,1 (C_{q(Tria)}), 139,0 (CH_{Py}), from HSQC 124,4 (CH_{Py}), 123,8 (CH_{Tri}), from HSQC 121,7 (CH_{Py}), 105,3 (C-1'), 103,6 (C-1), 80,7 (C-4), 77,9 (C-5'), 76,6 (C-5), 74,4 (C-3), 69,5/69,4 (C-2'/4'), 67,7 (C-3'), 62,3 (C-6'), 61,7 (C-6), 57,1 (OMe), 56,6 (C-2), 22,9 (Me_{Ac}). HRMS-ESI (*m/z*): [M + Na]⁺ vypočteno pro C₂₂H₃₁N₅O₁₀Na, 548,1963; nalezeno 548,1971.

35 LacNAc komplex s Ru (11)



11

Tmavě červený roztok dichloro(*p*-cymene)ruthenátého dimeru (18 mg, 0,03 mmol) v dichlormethanu (1 ml) byl přidán k roztoku **10** (31 mg, 0,06 mmol) ve směsi methanol/dichlormethan 1:1 (2 ml). Skoro okamžitě bylo možné pozorovat změnu barvy z červené do žluto-oranžové. Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 10 min. Rozpouštědla byla
 5 odpařena na rotační vaukové odparce, surová směs byla rozpuštěna v minimálním množství metanolu a produkt byl vysrážen pomalým přidavkem methyl(*tert*.butyl)etheru ve formě žluté pevné látky (42 mg, 86%) jako směs dvou diastereomerů v poměru 1:0,6. Pro získání analytického vzorku beze stop zbytkových rozpouštědel byl produkt rozpuštěn v malém množství methanolu a 3× kodestilován s chloroformem. R_f 0,25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 3:1). Hlavní diastereomer: ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz, ^1H - ^1H COSY): δ 9,42–9,40 (m, 1H, CH_{Py}), 9,13 (s, 1H, CH_{Tria}), 8,20–8,14 (m, 2H, CH_{Py}), 7,68–7,64 (m, 1H, CH_{Py}), 6,12 (dd, 1H, $J = 6,3, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 6,03, 5,92 (2×dd, 2×1H, $J = 6,1, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 5,81 (dd, 1H, $J = 6,3, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 5,16 (dd, 1H, $J = 11,1, 3,1$ Hz, H-3'), 4,74 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-1'), 4,38 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,27 (dd, 1H, $J = 11,1, 7,6$ Hz, H-2'), 4,15 (dd, 1H, $J = 3,1, 1,1$ Hz, H-4'), 3,97–3,88 (m, 3H, H-6a/b, H-5'), 3,85–3,65 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-6'a/b), 3,47 (s, 3H, OMe), 3,45 (dt, 1H, $J = 9,6, 3,3$ Hz, H-5), 2,78–2,71 (m, 1H, $\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 2,23 (s, 3H, $\text{Me}_{p\text{-cym}}$), 1,16, 1,06 (2×d, 2×3H, $J = 6,9$ Hz, $\text{Me}_{i\text{-Pr}}$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (MeOH- d_4 , 101 MHz, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQCTOCSY): δ 172,3 (CO), 155,3 (CH_{Py}), 148,6 ($\text{C}_{\text{q}}(\text{Py})$), 146,3 ($\text{C}_{\text{q}}(\text{Tria})$), 140,0, 125,9 (2× CH_{Py}), 124,5 (CH_{Tria}), 122,0 (CH_{Py}), 105,0 ($\text{C}_{\text{q}}\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 103,7 (C-1'), 102,5 ($\text{C}_{\text{q}}\text{Me}$), 102,2 (C-1), 85,9, 84,5, 84,1, 83,3 (4× $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 79,3 (C-4), 76,4 (C-5'), 75,2 (C-5), 72,9 (C-3), 68,2 (C-3'), 67,9 (C-2'), 67,7 (C-4'), 60,7 (C-6'), 60,4 (C-6), 55,7 (OMe), 55,5 (C-2), 30,8 ($\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 21,5, 21,2 (2× $\text{Me}_{i\text{-Pr}}$), 17,3 ($\text{Me}_{p\text{-cym}}$).

Minor diastereomere: ^1H NMR (MeOH- d_4 , 400 MHz, ^1H - ^1H COSY): δ 9,42–9,40 (m, 1H, CH_{Py}), 9,09 (s, 1H, CH_{Tria}), 8,20–8,14 (m, 2H, CH_{Py}), 7,68–7,64 (m, 1H, CH_{Py}), 6,11 (dd, 1H, $J = 6,3, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 6,06, 5,89 (2×dd, 2×1H, $J = 6,1, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 5,83 (dd, 1H, $J = 6,3, 1,2$ Hz, $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 5,09 (dd, 1H, $J = 11,0, 2,9$ Hz, H-3'), 4,73 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 4,37 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-1), 4,34 (dd, 1H, $J = 11,0, 7,5$ Hz, H-2'), 4,20 (dd, 1H, $J = 2,9, 1,1$ Hz, H-4'), 3,97–3,88 (m, 3H, H-6a/b, H-5'), 3,85–3,65 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-6'a/b), 3,47 (s, 3H, OMe), 3,44 (dt, 1H, $J = 9,6, 3,3$ Hz, H-5), 2,78–2,71 (m, 1H, $\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 2,22 (s, 3H, $\text{Me}_{p\text{-cym}}$), 1,15, 1,09 (2×d, 2×3H, $J = 6,9$ Hz, $\text{Me}_{i\text{-Pr}}$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (MeOH- d_4 , 101 MHz, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQCTOCSY): δ 172,3 (CO), 155,3 (CH_{Py}), 148,6 ($\text{C}_{\text{q}}(\text{Py})$), 146,2 ($\text{C}_{\text{q}}(\text{Tria})$), 140,0, 125,9 (2× CH_{Py}), 124,8 (CH_{Tria}), 122,0 (CH_{Py}), 105,0 ($\text{C}_{\text{q}}\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 103,7 (C-1'), 102,5 ($\text{C}_{\text{q}}\text{Me}$), 102,2 (C-1), 86,0, 84,6, 84,0, 83,2 (4× $\text{CH}_{p\text{-cym}}$), 79,2 (C-4), 76,2 (C-5'), 75,2 (C-5), 73,0 (C-3), 68,5 (C-3'), 68,0 (C-4'), 67,5 (C-2'), 60,7 (C-6'), 60,3 (C-6), 55,7 (OMe), 55,4 (C-2), 30,9 ($\text{CH}_{i\text{-Pr}}$), 20,5, 20,4 (2× $\text{Me}_{i\text{-Pr}}$), 17,4 ($\text{Me}_{p\text{-cym}}$). HRMS-APCI (m/z): $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{ClN}_5\text{O}_{10}\text{Ru}$, 796,1899; nalezeno 796,1904.

Příklad 3: Stanovení afinit látek **4**, **5** a **11** k lidským galektinům 1 a 3

Inhibiční potenciál připravených látek **4**, **5**, **11** a standardu GB139 byl stanoven pomocí fluorescenční anisotropie podle Sörme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H., Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin–ligand interactions. *Analytical Biochemistry* **2004**, 334 (1), 36–47, strana 39, odstavec „Fluorescence polarization“. Jako kompetitivní fluorescenční sonda byla při měření použita látka 3,3'-dideoxy-3-[4-(fluorescein-5-yl-karbonylaminomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3'-[4-(3-fluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-1,1'-sulfanediyl-di- β -D-galaktopyranosid. Fluorescenční anisotropie byla měřena pomocí přístroje Tecan Spark multimode microplate reader vybaveného vybaveného flitry pro fluorescenční polarizaci av mikrotitračních destičkách (Corning®, 384 jamek z černého polystyrenu s kulatým dnem) ve vzorcích o finálním objemu 200 μM . Vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě před měřením. Disociační konstanta (K_d) fluorescenční sondy byla stanovena pomocí série měření s konstantní koncentrací sondy (50 nM při měření s galektinem 1 a 5 nM při měření s galektinem 3) a narůstající koncentrací galektinu (6 nM–60000 nM pro galektin 1 a 0,3 nM–3000 nM pro galektin 3).

Hodnota K_d byla získána pomocí nelineární regrese provedené pomocí software Prism 9.3.0 (GraphPad, San Diego, CA) pro přímou interakci ligand-protein s využitím vzorce: $A = A_0 + (A_{\max} - A_0) \times ([G]/(K_d + [G]))$, přičemž A_0 je anisotropie sondy bez přítomnosti galektinu, $A_{\max}$ je maximální dosažená anisotropie sondy se zvyšující se koncentrací galektinu, $[G]$ je celková koncentrace galektinu v konkrétním vzorku a A je naměřená anisotropie konkrétního vzorku. Inhibiční eseje připravených látek ke galektinu 1 byly provedeny s konstantní koncentrací proteinu 500 nM, konstantní koncentrací sondy 100 nM a vzrůstající koncentrací připraveného inhibitoru (1 nM–10000 nM pro látky **4**, **5** a GB139, 10 nM–100000 nM pro látku **11**). Inhibiční eseje připravených látek ke galektinu 3 byly provedeny s konstantní koncentrací proteinu 50 nM, konstantní koncentrací sondy 5 nM a vzrůstající koncentrací připraveného inhibitoru (0,1 μ M–2500 μ M pro látky **4**, **5** a **11**, 1 nM–10000 nM pro látku GB139). Hodnoty IC_{50} pro jednotlivá měření byly získány pomocí nelineární regrese provedené softwarem Prism 9.3.0 (GraphPad, San Diego, CA) pro kompetitivní interakci dvou ligandů a jednoho vazebného místa proteinu s využitím předdefinovaného modelu: čtyřparametrová závislost odpovědi na logaritmu koncentrace inhibitoru (logI vs. response—Variable slope, four parameters). Model využívá rovnici: $A = A_{\min} + (A_{\max} - A_{\min}) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - \log I) * \text{HillSlope}))})$, přičemž A je hodnota anisotropie naměřená v daném titračním kroku, $A_{\min}$ je minimální hodnota anisotropie (Anisotropie naměřená při kompletním vytěsnění sondy inhibitorem) a $A_{\max}$ je hodnota maximální anisotropie (Anisotropie sondy v přítomnosti galektinu a bez přítomnosti inhibitoru), $\log I$ je dekadický logaritmu celkové koncentrace inhibitoru v daném titračním kroku a HillSlope je bezrozměrný parametr Hillovi směrnice. Závislost A na $\log I$ byla fitována pomocí metody nejmenších čtverců, což poskytlo hodnoty čtyřech parametrů: $\log IC_{50}$, $A_{\min}$, $A_{\max}$ HillSlope.

Z takto získaných hodnot IC_{50} byly vypočteny hodnoty inhibičních konstant K_i dle online dostupného modelu: http://websites.umich.edu/~shaomengwanglab/software/calc_ki/index.html. Model je popsán v následující publikaci: Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization, *Analytical Biochemistry*, **2004**, 332 (2), 261–273. Naměřená data v porovnání se známým inhibitorem galektinů GB139 jsou zobrazena v Tabulce 1. Látka **5** má výrazně lepší afinitu ke galektinu-1 než použitá fluorescenční sonda a touto metodou není možné přesnou hodnotu K_i stanovit a je proto uvedena pouze jako možný rozsah hodnot.

Tabulka 1: Hodnoty K_i připravených látek a standardu GB139 vůči lidským galektinům 1 a 3 stanovené pomocí fluorescenční anisotropie. Uvedené hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky ze čtyř nezávislých měření.

Látka	K_i vůči lidskému galektinu 1 (μ M)	K_i vůči lidskému galektinu 3 (μ M)
GB139	$0,077 \pm 0,027$	$0,0090 \pm 0,001$
4	$0,018 \pm 0,011$	$21,2 \pm 2,7$
5	$<0,005$	$15,2 \pm 0,2$
11	$1,17 \pm 0,16$	$167,2 \pm 4,2$

Inhibiční potenciál připravených látek **4**, **5** a standardu GB139 vůči lidským galektinům 1 a 3 byl zároveň stanoven pomocí kompetitivní enzymové imunanalýzy (ELISA). Jako imobilizovaný kompetitivní ligand byl použit asialofetuin (ASF), glykoprotein zakončený zbytky LacNAc, který interaguje s galektiny. Jamky mikrotitrační destičky (96-w BRAND plates-F-pureGrade, BRAND, Germany) byly potaženy ASF (5 mg/ml v pufru 0,1M $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ pH 9-9,8; 50 μ l na jamku) a inkubovány přes noc ve vlhké komůrce při 40 °C. Poté byly jamky promyty 1 x 200 μ l PBS. Po každém z dalších kroků následovalo promytí PBS-Tween 3 x 5 min. Jamky byly blokovány 3% BSA v PBS (200 μ l na jamku) a inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Zvyšující se koncentrace inhibitorů v pufru PBS byly smíchány s His₆-GST-Gal-3 nebo His₆-GST-Gal-1 (cílová

koncentrace 5 nebo 10 μM) a inkubovány v jamkách s ASF po dobu 1 hodiny. Anti-GST-protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (připravená v laboratoři) zředěná 1:1000 v 1% BSA v PBS byla použita pro značení N-terminálního GST-tag galektinů a následnou kolorimetrickou imunodetekci. Jako substrát pro peroxidázovou reakci byl použit TMB (0,1mg/ml TMB v citrát fosfátovém pufru pH 6,0: 75mM Na_2HPO_4 , 25 mM kyselina citrónová; 50 μl na jamku), a inkubován do viditelné modré zbarvení (20 min). Reakce byla zastavena přidáním 1M roztoku H_2SO_4 (50 μl na jamku) a barevným posunem do žluté. Intenzita signálu byla měřena spektrofotometricky pomocí Multidetekčního readeru Infinitte M1000 PRO (Tecan Group Ltd, CH) při 450 nm a odpovídá množství navázaného galektinu. Příslušná inhibiční konstanta (IC_{50}) byla vypočtena z nelineární regrese (směrnice inhibice odezvy na dávku) sigmoidálních křivek pomocí GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). Naměřená data v porovnání se známým inhibitem galektinů GB139 jsou zobrazena v Tabulce 2.

Tabulka 2: Hodnoty IC_{50} látek 4, 5 a standardu GB139 vůči lidským galektinům 1 a 3 stanovené pomocí imunoanalytické metody ELISA. Uvedené hodnoty jsou průměry a směrodatné odchylky ze 3 nezávislých měření.

Látka	IC_{50} vůči lidskému galektinu 1 (μM)	IC_{50} vůči lidskému galektinu 3 (μM)
GB139	$0,148 \pm 0,059$	$0,028 \pm 0,016$
4	$0,026 \pm 0,004$	$87,2 \pm 4,4$
5	$0,006 \pm 0,0008$	$103,8 \pm 38$

Příklad 4: Stanovení cytotoxických vlastností připravených látek

Pomocí MMT esej byly stanoveny cytotoxické vlastnosti připravených látek vůči nádorovým a nenádorovým buněčným liniím a vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} . Tato esej je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Následně se formazan rozpustí přidáním silného detergentu (DMSO) a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570-595 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých resp. metabolicky aktivních buněk).

K testu toxicity byly použity lidské buněčné linie odvozené od karcinomu vaječníků (A2780, SK-OV-3), karcinomu prsu (MDA-MB-231, MCF-7), jako kontrolní byla použita nenádorová epiteliální linie MCF-10A a buněčná linie odvozená z embryonálních buněk ledvin HEK293. Buňky A2780 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), které obsahovalo 10% fetální bovinní sérum (Biochrom AG), 2 mM L-glutamin (Gibco) a 100 U/ml penicilin/streptomycin (Biosera). Buňky SK-OV-3 byly kultivovány v médiu McCoy's (Sigma-Aldrich) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Biochrom AG) a 100 U/ml penicilin/streptomycin (Biosera).

Buněčné linie MDA-MB-231, MCF-7 a HEK293 byly kultivovány v médiu HG-DMEM (Sigma-Aldrich), které obsahovalo 10% fetální bovinní sérum (Biochrom AG), 100 U/ml penicilin/streptomycin (Biosera) a 100 mg/L pyruvát (Invitrogen). Buněčná linie MCF-10A byla kultivována v médiu D-MEM F12 (Gibco) obsahujícím 5% koňské sérum (Gibco), 20 ng/ml EGF (Sigma), 100 $\mu\text{g/ml}$ hydrokortizon (UVAB Pharma), 10 $\mu\text{g/ml}$ inzulin (Eli Lilly) a 100 U/ml penicilin/streptomycin (Biosera).

Test probíhá podle následujícího postupu:

1. Buňky byly nasazeny do jamek 96 jamkové desky v suspenzi 5000 buněk / 100 μ l (MDA-MB-231, MCF-7, SK-OV-3, HEK293), 8000 buněk / 100 μ l (A2780, MCF-10A) kultivačního média a inkubovány přes noc v termostatu při 37 °C, 5% CO₂.
- 5 2. Druhý den byla do jamek přidána testovaná látka v objemu 50 μ l (koncentrační řada látky: 300 μ M, 75 μ M, 30 μ M, 15 μ M, 7,5 μ M, 3 μ M, 0,6 μ M, 0,15 μ M) a buňky byly inkubovány v termostatu 72 hodin.
- 10 3. Do jamek bylo přidáno 20 μ l roztoku MTT (2,5 mg/1 ml PBS) a buňky inkubovány 3 h v termostatu při 37 °C, 5% CO₂.
4. Po inkubaci bylo odstraněno médium a přidáno 50 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid).
- 15 5. Po rozpuštění modrých krystalků byla měřena absorbance v jamkách desky na ELISA Readeru při vlnové délce 570-595 nm.
6. Vyhodnocení IC_{50} (přežití 50 % buněk) jako inflexní bod křivky naměřených hodnot absorbance pomocí programu Graphpad Prism.
- 20 Stanovené hodnoty IC_{50} jsou zobrazeny v Tabulce 3.

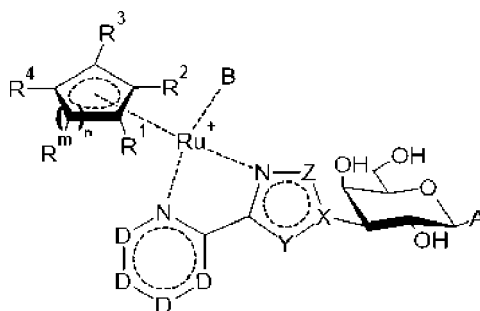
Tabulka 3: Cytotoxické působení připravených látek vyjádřené jako hodnoty IC_{50} vůči vybraným nádorovým i nenádorovým buněčným liniím stanoveným pomocí MMT eseje.

Látka	IC_{50} vůči HEK-293 (μ M)	IC_{50} vůči A2780 (μ M)	IC_{50} vůči SK-OV-3 (μ M)	IC_{50} vůči MDA-MB-231 (μ M)	IC_{50} vůči MCF-7 (μ M)	IC_{50} vůči MCF-10A (μ M)
4	158 $\pm$ 42	>200	>200	>200	>200	>200
5	174 $\pm$ 28	n.d.	>200	141 $\pm$ 8	n.d.	n.d.
11	>200	>200	n.d.	>200	n.d.	n.d.

25

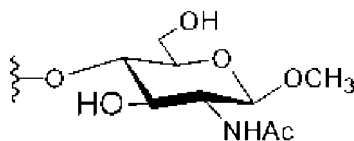
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina obecného vzorce (I)

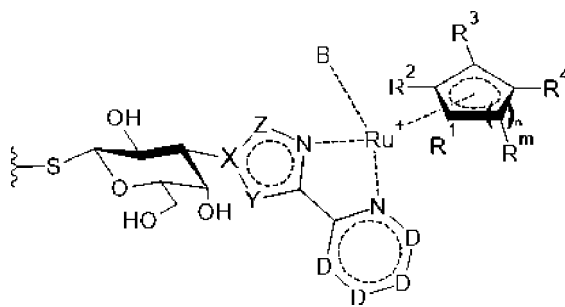


(I)

kde

 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m jsou nezávisle vybrané ze skupiny, zahrnující H a (C_1 až C_6)alkyl; n je 1 nebo 2; X je CH nebo N; D , Y a Z jsou nezávisle CH, N nebo O; A je vybrané ze skupiny zahrnující struktury (II) a (III)

(II)



(III)

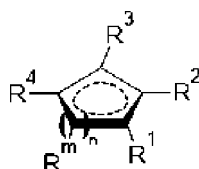
 B je vybrané ze skupiny zahrnující monovalentní záporně nabité ligandy a neutrální ligandy, s výhodou je B vybrané ze skupiny zahrnující F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , CO , CH_3CN ;a přičemž kladný náboj sloučeniny obecného vzorce (I) je kompenzován aniontem, s výhodou vybraným ze skupiny zahrnující F^- , Cl^- , Br^- , I^- , PF_6^- , $Zn_2Cl_6^{2-}$, BF_4^- a BR_4^- , kde R je fenylyl, který může být dále nezávisle substituován jednou až pěti elektronakceptorními skupinami, s výhodou vybranými z F , Cl , CF_3 , CN a/nebo NO_2 .2. Sloučenina obecného vzorce (I) podle nároku 1, kde alespoň jeden z X , Y a Z je CH; a/nebo alespoň dvě D jsou CH.

3. Sloučenina obecného vzorce (I) podle nároku 1 nebo 2, kde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a R^m jsou nezávisle vybrané ze skupiny, zahrnující H, $-\text{CH}_3$ nebo $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

4. Sloučenina obecného vzorce (I) podle nároku 1, 2 nebo 3, kde všechna D jsou CH.

5. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde Y je CH a současně X a Z jsou N.

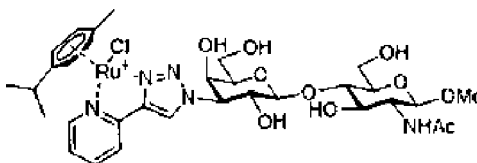
6. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde strukturální jednotka (IV)



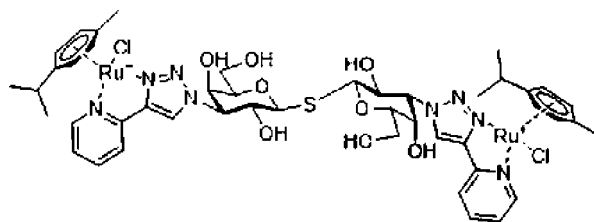
(IV)

je vybraná ze skupiny zahrnující cyklopentadien, pentamethylcyklopentadien, benzen, *p*-cymen, 1,3,5-trimethylbenzen a hexamethylbenzen.

7. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vybraná ze skupiny sestávající z:



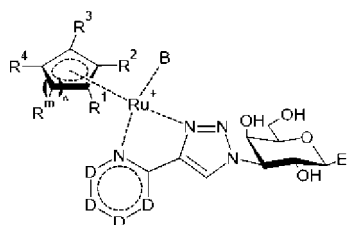
a



;

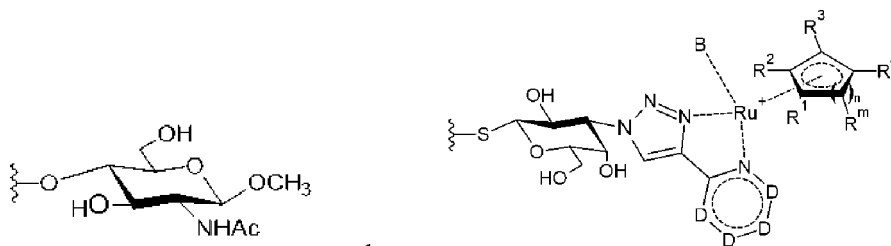
přičemž kladný náboj sloučeniny je kompenzován aniontem, vybraným z Cl^- a PF_6^- .

8. Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce (Ia)



(Ia)

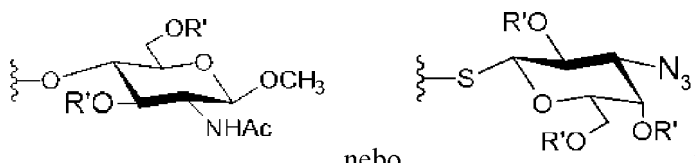
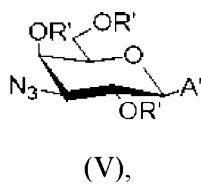
kde B, D, R¹, R², R³, R⁴ a R^m jsou definovány v nároku 1;



a kde E je nebo

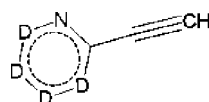
vyznačený tím, že zahrnuje následující kroky:

(a) Huisgenova cykloadice azidového precursoru obecného vzorce (V)

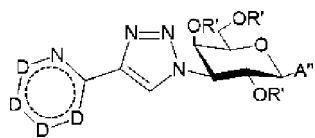


kde R' je H nebo Ac; a kde A' je nebo

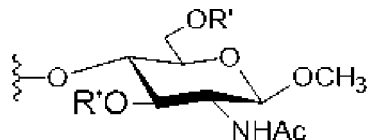
a ethynyl derivátu šestičlenného dusíkatého heterocyklu obecného vzorce (VII)



(VII), kde D je definováno v nároku 1, za vzniku meziproductu obecného vzorce (VIa)

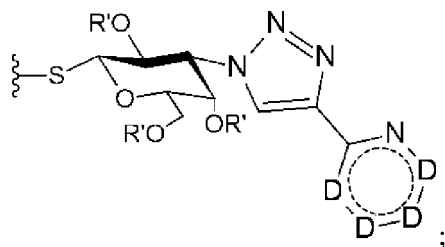


(VIa),



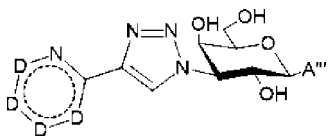
kde R' a D jsou definované výše a A'' je

nebo

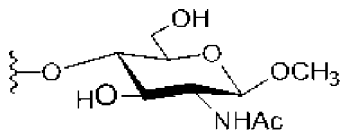


5

(b) pokud R' je Ac, potom bazická hydrolyza skupin OR' za vzniku meziprojektu obecného vzorce (VIb)



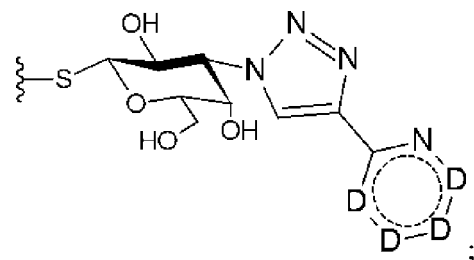
(VIb),



10

kde D jsou definované výše; a A''' je

nebo



15

(c) reakce sloučeniny obecného vzorce (VIb) s komplexem ruthenia obecného vzorce $[\text{RuLB}_2]_2$, kde L je strukturální jednotka (IV), jak je definována v nároku 6, a B je definováno v nároku 1, za vzniku sloučeniny obecného vzorce (Ia).

9. Použití sloučeniny obecného vzorce (I) jako analytické sondy pro stanovení afinit ligandů ke galektinům, zejména ke galektinu-1.

20

10. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7 pro použití jako léčivo.

11. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7 pro použití při léčení onemocnění spojených s nadprodukcí galektinů, zejména galektinu 1, s výhodou vybraných ze skupiny zahrnující nádorová onemocnění, fibrotická onemocnění, infekce HIV-1.

5 12. Sloučenina obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7 pro použití k inhibici galektinů *in vivo*.

13. Použití sloučeniny obecného vzorce (I) podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7 pro inhibici galektinů *in vitro*, zejména pro inhibici galektinu-1.