

Design och syntes av potentiella inhibitorer för galektin-1

Victoria Ullbin

Kandidatuppsats i organisk kemi

Lunds Universitet

Januari 2022 - Juni 2022

Handledare: Fredrik Sjövall **Examinator:** Ulf Nilsson

Center för analys och syntes
Kemiska institutionen
SE-221 00 Lund, Sweden

Abstract

Galectin-1 is a member of the carbohydrate-binding protein family galectins. Galectins are involved in the immune system. However, in cancer growth, galectin-1 is overproduced to not make the immune system respond. Therefore, inhibitors of the protein were synthesized to make the immune system approach the cancer and respond. From previous studies and simulations on the computer program Maestro different inhibitors were designed to target tumor growth in the brain going through the blood-brain barrier. A difficulty was to design a molecule nonpolar enough to go through the barrier but still be soluble in the body. The common parts of the inhibitors were a triazole, thiophen, hydroxyl group toward the inner part of the binding site. The otherward part were different in form of variation of rings and functional groups trying to target different and specific aminoamides selective to galectin-1. The majority of the synthesized compounds were not binding to galectin-3 but were all binding to galectin-1, except one. The most promising compounds were VU33 and VU21. The sidechain of VU33 was composed of one five-ring with two nitrogen's and one benzene ring. According to modelling, the sidechain interacted well with Glu71 and Trp68 which probably is the reason for the good affinity. The sidechain of VU21 was partially composed of coumarin with a carbonyl carbon directed towards the end of the molecule which according to modelling interacted well with Glu71. To conclude, the study was a success in the means of synthesizing inhibitors for galectin-1 and concluding character trades for better and worse inhibitors.

Populärvetenskap sammanfattning

I merparten av alla djur och andra organismer med eukaryota celler finns det en grupp proteiner som benämns galektiner. Galektiner binder till kolhydrater som bland annat finns på cellernas yta på glykoproteiner, som har en kolhydrats ände. Galektiner använder glykoproteiner för att cellerna ska kommunicera med varandra om olika händelser inträffar exempelvis om en cell blir skadad.

Galektiner har även andra roller och funktioner i cellerna. Galektin-1 har antiinflammatoriska egenskaper. Den hjälper till att reglera immunförsvaret genom att respondera på olika signalmolekyler samt producera olika signalmolekyler från och till olika immunceller. Dock om galektin-1 kompromissas vid exempelvis cancer, kan de få motsatt effekt. Inom sjukdomar såsom COVID-19, fibros och cancer har det visats att galektiner spelat en nyckelroll eftersom den är inblandad i att immunförsvaret inte attackerar eller responderar till sjukdom.

Syftet med studien är att skapa ett potentiellt läkemedel som hämmar galektin-1 aktivitet i kroppen för att immunförsvaret bättre ska känna igen olika sjukdomar och motverka dem. Läkemedlet ska potentiellt verka på cancer i hjärnan, mer specifikt tumörväxt i hjärnan. Sjukdomar i hjärnan är svårare att hämma eftersom läkemedlet behöver ta sig genom en extra barriär, blod-hjärnbarriären.

Alla molekyler som syntetiserades band selektivt till galektin-1 förutom en. De mest lovande molekylerna som syntetiserades var VU33 eller VU21. Sidokedjan hos VU33 bestod av en femring med två innehållande kväven samt en bensenring vilka interagerade väl enligt till Glu71 samt Trp68 enligt molekylmodelleringar. Sidokedjan hos VU21 bestod delvis av två ringar med ett carbonyl kol riktat mot änden som, enligt molekylmodellering, band väl till Glu71 vilket troligtvis gav den bra affiniteten. De båda substanserna har gemensamt att deras bicykliska ringsystem innehåller av vätebindande atomer som möjliggör interaktioner med aminosyran Glu71. Detta kan spekuleras vara orsaken till deras goda affinitet. Summeringen av studien är att inhibitorer för galektin-1 kunde syntetiseras med metoden. Dock finns inget tydligt mönster om vilka ring-system som är allra mest lämpliga.

Erkännande

Jag vill uttrycka tacksamhet till Ulf Nilsson som välkomnade mig att genomföra mitt kandidat examensarbete om inhibitorer för galektin-1 i hans grupp och för allt stöd under projektet

Jag vill även rikta ett stort tack till min handledare, Fredrik Sjövall, för all insiktsfull hjälp under projektet. Samt hans generositet av tid och konstruktiv feedback. Sedan vill jag även tacka hela Ulf Nilssons grupp, BMC och CAS avdelningen på kem centrum i Lund för att ha tagit emot mig med öppna armar, det har varit en ära att träffa och lära känna er.

Sist vill jag tacka familj och vänner för allt stöd jag fått under min utbildning, evigt tacksam.

Innehållsförteckning

Design och syntes av potentiella inhibitorer för galektin-1	1
<i>Abstract</i>	<i>3</i>
<i>Populärvetenskap sammanfattning.....</i>	<i>4</i>
<i>Erkännande</i>	<i>5</i>
<i>Förkortningar och begreppslista.....</i>	<i>7</i>
Introduktion	8
<i>Cancer</i>	<i>8</i>
<i>Galektiner.....</i>	<i>9</i>
<i>Galektin-1 och cancer</i>	<i>10</i>
<i>Galektin-bindande ämnen.....</i>	<i>11</i>
<i>Reaktioner i detta arbete:</i>	<i>12</i>
<i>Analysmetoden fluorescens polarisation assay</i>	<i>13</i>
<i>Generell syntesplan</i>	<i>14</i>
Syfte:	14
<i>Hypotes.....</i>	<i>14</i>
Resultat och diskussion	14
<i>Affinitetsutvärdering.....</i>	<i>16</i>
Slutsatser	18
Metod och Material.....	18
<i>Generell utrustning och uppberedningsmetoder</i>	<i>18</i>
<i>Generell syntesmetod.....</i>	<i>19</i>
Appendix av metoder	20
Litteraturförteckning	23
NMR spektrum	25

Förkortningar och begreppslista

BMC	Biomedicinska fakulteten på Lunds universitet
HRMS	Högupplösande masspektrometri (high-resolution mass spectrometry)
HPLC	Högupplösande vätskekromatografi (high performance liquid chromatographic)
K_d	Dissociationskonstanten
LC-MS	Vätskekromatografi-Masspektrometri
MS	Masspektrometri
NMR	Kärnmagnetisk resonans (Nuclear magnetic resonance)
TLC	Tunnskiktskromatografi

Aminosyror, är en molekyl som innehåller en karboxylgrupp och en aminogrupp. Exempel på aminosyror som används i texten är glutaminsyra, förkortat Glu, och tryptofan, förkortat Trp.

Antiinflammatorisk, är ett ämnets förmåga att hjälpa immunförsvaret genom att dämpa inflammation vid en pågående infektion eller skada i kroppen.

B-celler, är en immuncell som skapar antikroppar vilket sedan binder till smittoämnen.

Beta-sandwich, är en typ av domän vanligtvis i protein, där sekundär strukturen beta-sheets är antipararella i motsatt riktning från varandra.

Cancerogen, innebär att molekylen i fråga framkallar cancer.

Celldifferentiering, cellernas förmåga att föröka sig och bli olika typer av celler exempelvis som muskelceller och hudceller.

CRD, kolhydrat igenkänningsdomän eller på engelska carbohydrate recognition domain. Ett område på galektin-1 som har fem pararella beta-sandwichs vilket är ett bevarat domän inom familjen galektiner.

Extracellulär mediet, är vätskan mellan alla celler.

Glykan, är kolhydrat delen av en molekyl som tex finns på bland annat glykoprotiner.

Homeostatiska mekanismer, innebär reglering av osmos, temperatur, pH och blodsocker i kroppen.

Immunceller, även kallade vita blodkroppar, befinner sig överallt i kroppen och finns olika typer bland annat T-celler och B-celler.

Immunförsvaret, är kroppens försvar mot främmande ämnen exempelvis immunceller.

Immunitet, kroppens utvecklade försvar mot en eller flera sjukdomar.

Immunsuppressiva, innebär att något hindrar eller dämpar immunförsvarets aktivitet.

Immuntolerans, innebär i texten att tumörbildning inte längre anses som något främmande utan som en del av kroppen. Exempelvis som ett organ som får tillförsel av homeostatiska mekanismer för att växa och frodas.

Inhibitor, är en molekyl som hämmar en reaktion från att ske genom att binda till ett av reagensen.

Kronisk inflammation, innebär att kroppens immunförsvar har kompromissats.

Makrofager, även kallade storätarna är en typ av vita blodkroppar som kan förstöra mikroorganismer och andra främmande ämnen.

Patogener, är ett samlings begrepp för olika typer av bakterier, virus och annat som orsakar sjukdom.

Proliferation, nybildning av likartade celler via celledning.

Proinflammatoriska, motsatsen till antiinflammatorisk.

Protein-protein interaktioner, PPI, ett samlingsnamn på ett antal olika bindningar som uppstår mellan olika proteiner som är stark interaktion.

Receptorer, finns på cellytan och tar emot olika signalmolekyler för att vidarebefordra signaler på olika sätt. Exempelvis kan de vidarebefordra signalen inom cellen eller till andra celler.

Resistens, förmågan att överleva fysiska påfrestningar i form av främmande molekyler i kroppen.

R-kedjan, en sidokedja som inte ingår i reaktionen men finns på molekylen.

T-celler, en immuncell som ingår i immunförsvaret och samarbetar med B-celler. T-cellernas uppgift är att känna igen främmande ämnen på cellers yta både nya och tidigare smittoämnen.

Tolerogena denetiska celler, hindrar aktivering av immunförsvaret att attackera våra egna celler.

Vaskularisering, kärlbildning från redan existerade blodkärl.

Wetloading, är en metod för att packa kolonner inom kolonn kromatografi. Silica mäts upp i kolonnen för att sedan överförs till en annan bägare. Därefter löses silican upp med lösningsmedel tills det blir en grumlig lösning. Efter hålls blandningen tillbaka i kolonnen för att en del av lösningsmedlet ska rinner ut och packa silican.

Introduktion

Cancer

Cancer är en sjukdom då vissa av kroppens celler delar sig okontrollerat vilket kan uppstå av olika skäl som genetiska och miljömässiga faktorer. De kan leda till förlorad immuntolerans och felaktiga homeostatiska mekanismer (Lundh, u.d.). Kronisk inflammation kan också leda till tumörbildning då tillväxtfaktorer bland annat modulerats för att hjälpa cancers utveckling (Arnold, 2015). Cancer modulerar bland annat glykaner, som finns på alla eukaryota celler för

att modulera kommunikation, celldifferentiering, immunitet och vaskulärisering i tumören. Glykaner lagrar information från patogener och immunceller för att styra aktiveringen av immunförsvaret (Marth, 2006).

Galektiner

Galektiner är en grupp lösliga proteiner i kroppen och eukaryota celler som har olika funktioner. De kan släppas fria till de extracellulära mediet, se bild 1. De kan även aktivera celldöd, programmerad och oprogrammerad, på grund av inflammation (Russo, 2021).

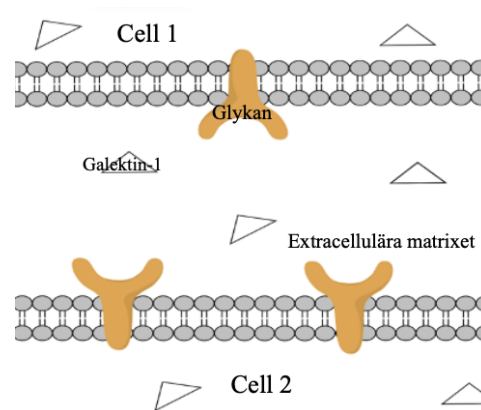


Bild 1 föreställer två cellmembran med tre stycken glykoproteiner (glykaner) samt trianglar. Trianglarna ska symbolisera galektin-1 mobilitet i det extracellulära mediet samt inom cellmembranet.

Det finns 16 olika galektiner i människan -1, -2, -3, -4, -5, -7, -7B, -8, -9, -9B, -9C, -10, -12, -13, -14 och -16. En egenskap som alla galektiner besitter är att de har hög affinitet till beta-galaktosider samt att de har en eller flera säten i proteinet som kallas CRDs, carbohydrate recognition domain. En CRD består av fem beta-sandwichs vilket representerar ett subsäte A-E. Beta-kedjorna C och D är kärnbindningssätena för beta-galaktosider men subsätena A, B och E interagerar också.

Det finns även tre typer av klassificeringar på galektiner som beror på antalet CRDs samt deras lokalisering i molekylen. De olika typerna är prototyp, tandem-repeat och chimera (Peterson, 2018). Galektin-1 är en monomer som klassificeras som en prototyp och molekylen dimeriseras vid höga koncentrationer. Galektin-1 har påvisats av tidigare studier kunna påverka immunförsvaret mot cancer. Enligt tidigare forskning (Toscano, 2009) kan galektiner binda till glykosylerade receptorer genom protein-protein och protein-glykan interaktioner i olika vävnader av många celltyper. Den kan bland annat binda en disackarid, β -D-galaktosyl-(1-4)-N-acetyl-D-glukosamin, som finns på cellytan glykoproteiner (Barondes, 1994).

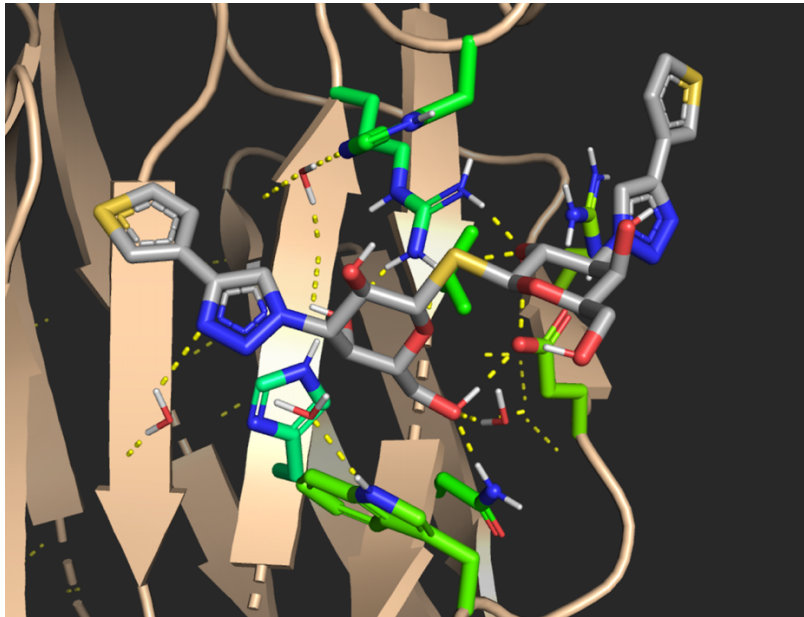


Bild 2. Illustrerar en syntetisk galectin-1-inhibitor med hög affinitet (PDB 6F83) (Peterson, 2018).

Den biologiska aktiviteten av galectiner kan även påverkas av flera faktorer såsom exponering till målceller, dimeriserings- eller oligomeriseringstillstånd och redoxförhållande i vävnader (Toscano, 2009).

Galectin-1 och cancer

Galectin-1 dimeriserar vid ökande koncentrationer vilket säkrar att den inte oxideras samt främjar ligandbindning (Camby, 2006) (Stowell, 2009). Galectin-1 visar främst på immunosuppressiva och antiinflammatoriska funktionaliteter. Men om galectin-1 receptorer moduleras kan den i vissa fall framkalla proinflammatoriska effekter. Galectin-1 produceras av många utav immunförsvarets celler såsom makrofager, T-celler och B-celler. Galectin-1 svarar på och producerar olika signalmolekyler från och till olika immuncelltyper för att hjälpa reglera produktionen vid inflammation.

När kroppen inte har en infektion eller annan skada, som t.ex. cancer, är immunförsvaret i ett ”normal tillstånd” även benämnt homeostatiskt tillstånd som den även återgå till efter varje infektion eller skada. Vid långvariga sjukdom som kvarstår efter immunförsvaret gjort allt den kan för att bekämpa infektionen kallas tillståndet kroniskt inflammationstillstånd. Det finns också "icke-inflammatoriska" tumörer som efter en lång tid kan använda immunceller för att skapa en gynnsam TME, tumörmikromiljö. Immunförsvarets respons gynnar tumörtillväxten genom att stimulera nya mutationer, proliferation och celldödsresistens (Grivennikov, 2019).

Enligt Pubmed är det 126 olika sjukdomar som överproducerar en eller flera galectiner. Galectin-1 och galectin-3 är observerade i de flesta cancerformer och tumörväxter. Galectin-1, -3 och -9 är viktiga för reglering av kronisk inflammation respons. De naturliga liganderna till galectin-1 är polära men ofördelaktiga eftersom de inte tas upp i större utsträckning i tarmsystemet eller är tillräckligt stabila i kroppen utan bryts ner och utsöndras snabbt. Galectin-1 spelar en viktig roll i de flesta cancersorter när de kommer till vad immunförsvarets ger för respons.

Galektin-bindande ämnen

De senaste åren har inhibitorer i form av glykomimetika varit en läkemedelsinriktning i utveckling av nya mediciner som ökat i popularitet. Molekyler som har liknande biologisk funktion och struktur som kolhydrater kallas Glycomimetics. "Mimic" eller härma innebär att inhibitorn i detta fall härmar den förväntade kolhydratens aktivitet. Strukturerna kan variera genom att byta ut enskilda atomer men också tillägg och borttagande av funktionella grupper. Modifieringen av kolhydratliganderna görs också i syfte att göra de metaboliskt stabila, mer biotillgängliga, ge högre affinitet och mer selektivitet.

Bindningsätet på galektiner är oftast stor, grund och väldigt exponerad. I tidigare studier är det specifika aminosyror som bevisats vara viktiga för bra affinitet exempel är Asn33 subsäte B, His44 subsäte C, Arg48 subsäte C, His52 subsäte D, Asn61 subsäte D, Glu71 subsäte E.

Från tidigare opublicerade studier har de visats att grupperna imidazoler, thiolter, pyridiner, pyrimidiner var lämpliga strukturelement att infoga i nya glykomimetika mot galektiner. Aromatiska grupper är önskvärda eftersom pi bindningarna kan binda till andra aromatiska grupper i galektin-1. Till exempel imidazoler har en femring som tidigare rapporterat ska ge betydande affinitet mot galektin-1 och har det bevisats att vara icke-cytotoxiska vid låga koncentrationer (Peterson, 2018). Vidare har imidazol kväve som kan protoneras vilket gör molekylerna mer polära och kan då potentiellt interagera bra med Glu71 i galektin-1. Andra funktionaliteter som ger affinitet hög till galektiner är galaktos HO4 och HO6 eller motsvarande hydroxyl-grupper i glykomimetiska molekyler. Således har en aromatisk fem-ring och galaktos HO4 och HO6 bevisats vara viktiga för bra affinitet i tidigare forskning (Delaine, 2016) vara med i en vätebindningskedja i bindnings fickan med bland annat aminosyror som Asn33, Arg48 och Asn61. R-grupper är också viktiga och används för att selektivt binda till olika galektiner. Ett exempel på en R-grupp är en amin eller aldehyd som kan binda till glutaminsyra och tryptofan.

En del av inhibitorn är redan bestämd genom tidigare studier där de förklarar hur olika funktionella grupper passar bra in i bindnings fickan. En tiofenring längst ut på ena sidan av molekylerna kommer vara placerade i subsätena A-B som nästa är en ideal-fit mellan aminosyror Ser29 och Asp123. Tiofenringen binder sedan väll till Val31 och Gly124 i subsäte A. (Peterson, 2018). Nästa funktionella grupp näst längst ut är en triazolring, som placeras i subsäte E för att förlänga inhibitorn samt bilda en interaktion till Asn33 från ett kväve på ringen. Mitten av molekylerna finns en hydroxylgrupp som tidigare dokumenterats ha nästan 100 % bindningsförmåga till Glu71 samt Asn61. Resterande del av molekylerna som kommer befinna sig utåt är en R-kedja som kommer skilja sig mellan inhibitorerna. Inhibitorns struktur illustreras i bild 3. I bild 4 visas även en jämförelse mellan substanserna i bild 2 och 3 för att illustrerar vilka grupper som härmar varandra.

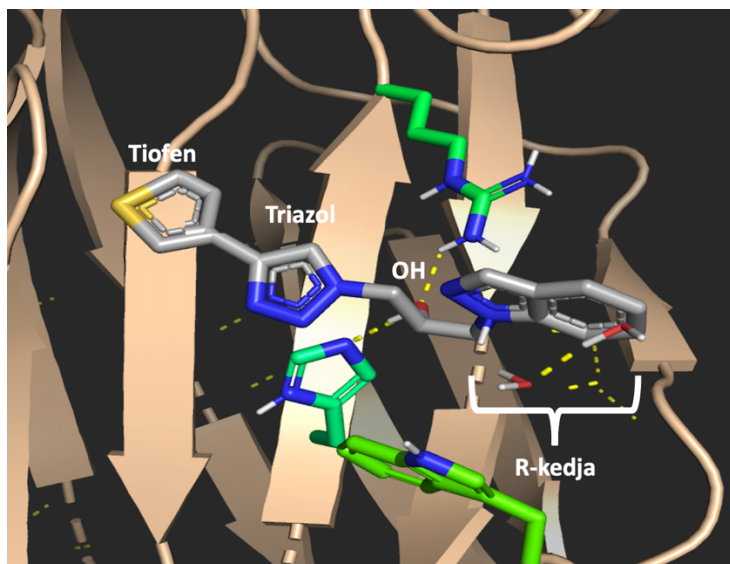


Bild 3 illustrerar en potentiell inhibitor av galectin-1 i dess bindningsäte. De olika bestämda grupperna tiofen, triazol, hydroxylgrupp och r-kedjan är också markerade. R-kedjan kommer vara olika från och med det tredje kolet från triazolen bevarat från den naturliga liganden.

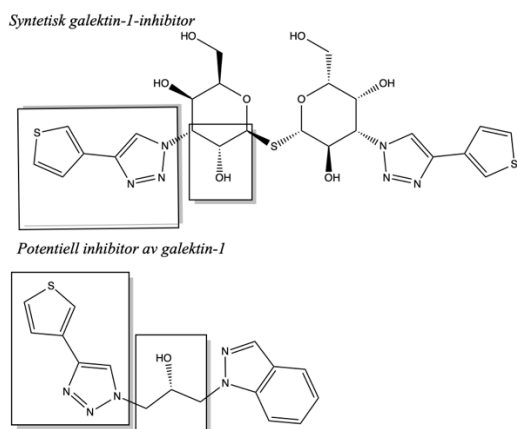


Bild 4 illustrerar galaktos och den potentiell inhibitor av galectin-1 med inramade grupper som härmar "mimic" varandra i struktur och bindning.

En inhibitor hade teoretiskt kunna binda till flera galectiner men i designen försöker de undvikas genom att tillsätta substituenten som binder till speciella grupper på galectin-1. Till exempel finns ett galectin som är mycket likt galectin-1 i både struktur och egenskaper, galectin-3. Det som skiljer de två åt är att galectin-3 har en extra histidin i bindningsätet His52 (Peterson, 2018) vilket försöker utnyttjas.

Reaktioner i detta arbete:

Sonogashira

En Sonogashira reaktion använder sig av en palladium-katalysator med kemisk stabilitet mot oxidation för att koppla en terminal alkyn med en halo-aryl eller halo-karbonylförening (Clayden, 2001). Kopparjodid används i reaktionen som co-katalysator och trietylamin används som en bas. Reaktionen kommer ske i vattenfria betingelser och i en mikrovågsreaktor (Lei, 2016). Se den generella reaktionen för Sonogashira i bild 4.

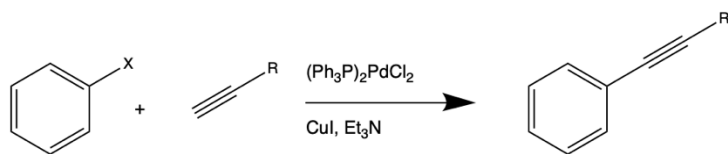


Bild 4, den generella reaktionsvägen för Sonogashira-reaktionen.

Klick reaktion

En klick reaktion katalyseras av koppar(I) och reagensen är en alkyne och en organisk azid som reagerar i en cykloaddition. Syftet med reaktionen är att skapa en hetero-femring, en 1,2,3-triazol, och reaktionen är en undergrupp till reaktionsgruppen cykloadditioner. Cu(I) aktiverar alkynten och koordinerar aziden för att sedan avlägsnas efter en sex stegs reaktion, se bild 5. Koppar binder först genom en sigmabindning till alkylen för att en annan koppar(I) sedan ska pi binda molekylen då aziden kommer. De andra koppar reagenset stabiliserar donatorliganden till triazolyl-kopparderivat vid ringkontraktionen i nästa steg. Efter sker en protolys som sluter den katalytiska cykeln (Clayden, 2001).

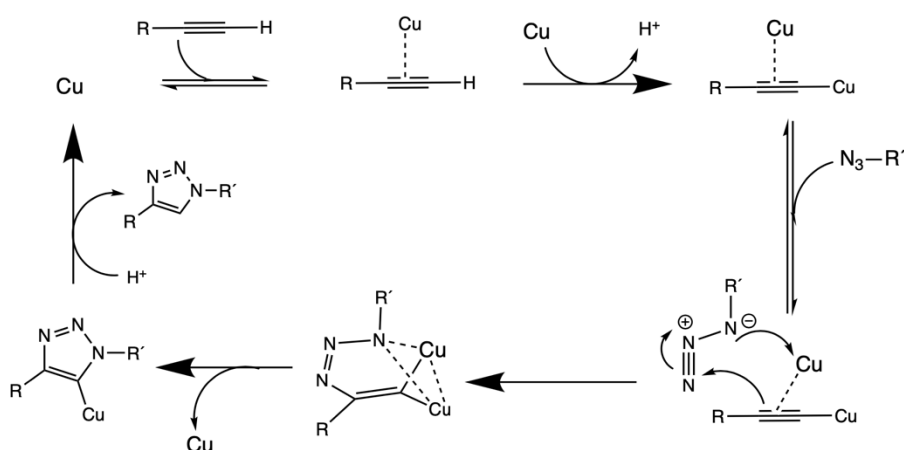


Bild 5, generella reaktionsmekanismen för en Cu(I)-katalyserad cykloaddition mellan en alkyne och en azid.

Analysmetoden fluorescens polarisation assay

Analysmetoden som kommer användas för att detektera om inhibitorerna binder till galektin-1 och galektin-3 är fluorescens polarisations assay. Det är en metod som analyserar och bekräftar protein-peptid interaktioner med hjälp av fluorescens. Polarisationen ändras under mätningen då proben tävlar mot den syntetiserade inhibitor. Proben är en referensmolekyl som har fluorescens tags och den binder även till galektin-1. Det är en indirekt mätning genom jämförelse mellan proben och inhibitorn.

Maskinen består utav olika delar i en mörk miljö inuti instrumentet. Första delen är en lampa som lyser starkt på provet med planpolariserat ljus. Efter den fluorescenta proben absorberat planpolariserat ljus kommer den emittera fluorescence som också är polariserat. Graden av polarisering hos fluorescensen beror på hur mycket proben rör sig i lösningen; mer rörelse ger lägre polarisation. Om proben är bunden till galektin-1, så blir den del av ett större komplex vilket leder till högre grad av polarisering. Därför används ett polarisationsfilter för detektorn,

så kan graden polarisering mätas. Om en inhibitor tillsätts, så kommer proben konkurreras ut och då kommer den vara fri i lösning och ge fluorescens med lägre grad av polarisation. Hur mycket polarisationen minskar när inhibitor tillsättes beror på inhibitors affinitet och K_d kan beräknas.

Generell syntesplan

I syntesplanen, illustrerade i bild 6, sker först en SN2 reaktion då en stor bra lämnande grupp avlägsnas, förkortade med ONs som har den kemiska beakningen $C_6H_4NO_5S$. Nukleofilen är tiolen som kan substitueras mot andra reagens som tidigare nämnts exempelvis pyridiner. I den andra steget sker yttligare en SN2 reaktion för att öppna epoxiden med azid. I den tredje steget sker Sonogoshira reaktion med palladium sedan en avskyddnings reaktion för att få fram reagensen till de sista steget. Till sist genomförs en klick reaktion med hjälp av en koppar katalysator (Lei, 2016) (Geronikaki, 2006).

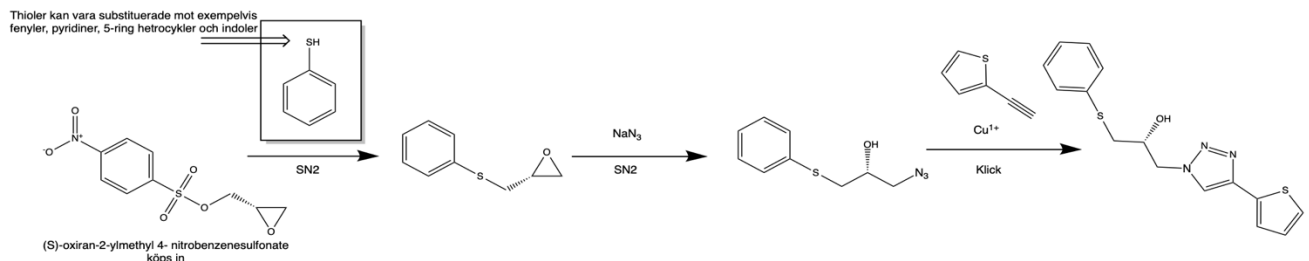


Bild 6, visar reaktions schema för att syntetisera potentiella inhibitorer för galektin-1.

Syfte:

Galektin-1 har visats vara involverat i cancer-växt och därför är syftet att skraddarsy en inhibitorer. Inhibitorerna ska hämma galektin-1 aktivitet eftersom de överproduceras av cellerna vid cancer. Molekyler har designats, stimulerats, framställts och testa för att skapa en inhibitor som har hög affinitet mot galektin-1.

Galektin-1 har som övriga galektiner en CRD som ligander binder till vilket även är målet för de syntetiserade inhibitorerna. Molekylens egenskaper hade som målsättning att vara generellt polära för att potentiellt kunna passera genom de blod-hjärnbarriären.

Hypotes

Hypotesen med studien är att syntetisera inhibitorer för galektin-1 enligt syntesplanen i bild 6. De naturliga ligandernas sackarid kedja ska bytas ut mot olika aromatiska grupper med eventuella substitutenter på för att göra de mer åtkomliga i hjärnan samt förbättra affinitet.

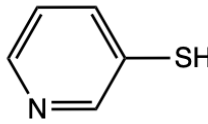
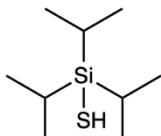
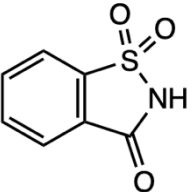
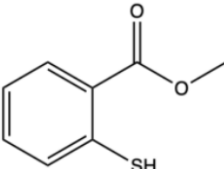
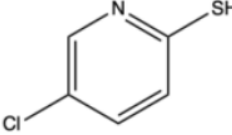
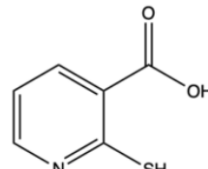
Resultat och diskussion

Den generella syntesplanen visas i bild 6. Vid varje nytt steg stod reaktionen över natten i cirka 12 timmar. Startmaterialet var 100 mg och i slutändan efter en trestegs reaktionen cirka 2-10 mg av produkt i de reaktionerna som var framgångsrika.

Det var också många experiment som inte fick den önskade reaktionsvägen som illustreras i figur 3. Dessa var VU6 (pyridin-2-thiol), VU8 (triisopropylsilanetiol), VU16 (sackarin), VU23

(metylthiosalicylat), VU24 (5-klorpyridin-2-tiol) och VU29 (2-merkaptopyridin-3-karboxylsyra). De illustreras i tabell 2.

Tabell 2, namn och bild på reagens som inte fick önskvärd reaktionsväg.

Namn	Molekyl
VU6	
VU8	
VU16	
VU23	
VU24	
VU29	

VU6 syntes gav ingen användbar produkt eftersom den dimeriserats vilket observerades i LC-MS. I ett senare experiment utfördes ett nytt försök med VU6 för att undersöka om kortare reaktionstid var fördelaktigt. Dock utan framgång då produkten dimeriserades återigen. Dimerisering kan bero på att reaktionen inte är tillräckligt selektiv. I ett annat experiment med VU23 skede dock motsatt företeelse då inte tiolen reagerade alls i SN2 reaktionen. Den tiolen misstänks dock att inte vara en tillräckligt bra nukleofil för reaktionsplanen då den massan gav stora utslag i LC-MS efter reaktionen.

I andra experiment med tiolerna VU16, VU24 och VU29 noterades det att mellan produkterna gav för lågt utbyte till att fortsätta nästa reaktionssteg klicka, vilket kan bero på en mängd faktorer. Det uppmärksammades även att detta var ett återkommande problem i alla experimentfall men mer signifikant vid användning av tiolerna VU16, VU24 och VU29. En felkälla kan vara att det bildats många eller stora mängder biprodukter vilket observerades i många experiment bland annat VU8 och VU16. I experimentet VU29 framträdde biprodukterna till och med mer än den önskade produkten enligt TLC och LC-MS. En annan faktor till de låga

utbytena kan vara att produkterna band hårt till silican vid kolonn-kromatografen efter första och andra reaktionssteget. Argumentet grundas i att utbytet sjönk drastiskt efter varje utförd kolonn. En annan faktor kan vara att produkterna var flyktiga då desto mindre molekyler och massa desto flyktigare egenskaper. Evaporering genomföres innan varje kolonn samt efter första reaktionen för att ta bort lösningsmedlet DMF. Det var besvärligt att evaporera bort DMF eftersom trycket inte gick tillräckligt lågt och därför behövde evaporeringen utföras under en längre tid på högre temperatur. Dock i ett försök att undvika tidfördröjet och högre temperaturer utfördes istället en separation med vatten och EtOAc innan evaporeringen efter första steget. Detta ledde dock inte till signifikant bättre utbyte. Därför valdes det att återgå med den tidigare använda metoden med direkt evaporering av DMF. Ett annat försök genomfördes även för att undvika DMF genom att byta lösningsmedel till aceton dock utan större förbättring av utbytet. En annan faktor till produkt förlusten kan vara diametern på kolonnen inte var rätt då produkten möjligtvis varit för utspädd och detekterades därför inte. Försöket utfördes ytterligare en gång med samma kolonn fast med insamling av mindre fraktioner och att lösningsmedlet i fraktionerna fick avdunsta i rumstemperatur över natten, men utan framgång. Mindre kolonner användes under senare experiment vilket gav en förbättring i detektionen, visuellt på TLC och högre utslag på LC-MS.

En annan metod-förändring var att separationen efter de andra reaktionssteget ändrades från att vara med brine, NH_4Cl och EtOAc till endast NH_4Cl och EtOAc. Detta med anledning att brine var överflödigt eftersom den fyller liknande funktion som magnesiumsulfat i att minska vattenmängden i EtOAc. Ett annat förslag på förbättring kan också vara att skala upp reaktionen för att kunna följa reaktionen mer tydligt i TLC och LC-MS samt att öka mängden lösningsmedel dioxan: H_2O , eftersom att reaktionerna under vissa tillfällen gick torra över natten. Det kan ha lett till att reaktionen inte skett i samma utsträckning som var möjligt. En annan återkommande företeelse var att produkterna fragmenterades under den andra reaktionssteget vilket kan bero på värmen den utsattes för, 70 grader exempelvis vid VU24. En metod förbättring hade förslagsvis varit att sänka temperaturen på reaktionen och försöka hitta optimum.

Ett annat återkommande problem var vågen, den visade under tillfällen en negativ massa på vissa produkter fast de tydligt var substans i provet. Dock löstes problemet efter en reparation på vågen efter experimentet VU34.

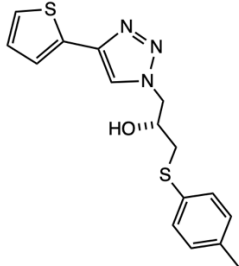
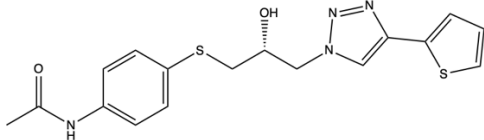
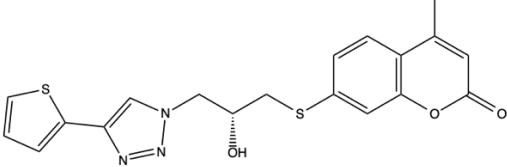
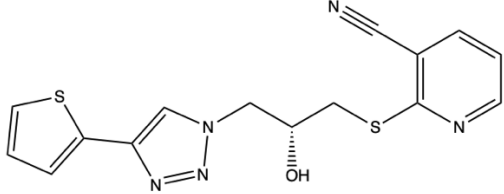
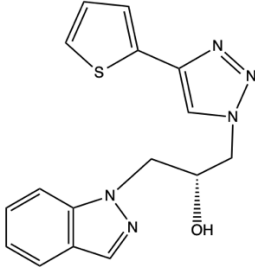
Vid utvärdering av det tredje steget, klick reaktionen metod var den mest pålitlig eftersom den alltid gav bäst utbytet samt renhet. HPLC var mycket pålitlig vilket bevisades av senare LC-MS-HRMS och NMR. Frystorkningen som följde efter HPLC gjorde att produkten blev ett vitt fast pulver. Dock var pulvret ibland för visköst för extrahera från bägaren och var ytterst flyktig i luft vilket gjorde den besvärlig att överförd för vidare analys.

Av de reagens som fungerade enligt reaktionsplanen finns det inget tydligt sammanband utöver att ökande molmassor gör de mer spårbara, speciellt VU21 med två bensen ringar. Dock gav de fungerade ett generellt utbyte på hela syntesschemat på 3 % med främst utbytes förlust på de två första stegen efter kolonnerna.

Affinitetsutvärdering

Affiniteten av alla syntetiserade molekyler utvärderades med fluorescens polarisations assay för galektin-1 och galektin-3. Resultatet visas i tabell 3 och ett lågt på K_d värde indikerar bättre bindningsstyrka och inhibering.

Tabell 3, K_d värden (μM) av potentiella galektin-1 inhibitorer som syntetiserats. NB = icke bindande.

Molekyl	Galektin-1	Galektin-3
<p>VU5</p> 	2020±370	NB
<p>VU15</p> 	1500±380	NB
<p>VU21</p> 	730±160	NB
<p>VU28</p> 	NB	NB
<p>VU33</p> 	670±70	990±910

I tabell 3 visas de syntetiserade och analyserade inhibitorerna. Som tidigare diskuterats är 2-hydroxypropylen, triazolen och tiofen-ringen gemensamt för alla inhibitorer. Föreningen med

bäst affinitet är VU33, jämfört med de andra substanserna har den ingen svavelbrygga. Benzopyrazolen är bunden direkt till propylkedjan vilket enligt stimuleringar gör att ett av kvävena på femringen kan interagera med Glu71 och Trp68, men samtidigt som bindningen till hydroxyl gruppen blir mindre uttalad jämfört med de andra inhibitorerna. Sedan är det även värt att notera att substansen även binder till galektin-3, vilket övriga inhibitorer inte gör. Den med näst längsta K_d värdet i tabellen uppvisas av VU21. En av anledningarna kan karbonylsyret i kumarinen. Vid jämförelse av de substanserna VU21 och VU33 har de gemensamt att de innehåller ett bicykliskt aromatsystem innehållande vätebindande syren eller kväven, samt att de interagerar med Glu71. Det finns ingen signifikant skillnad på affinitet mellan VU33 och VU21 om standardavvikelsen tas till hänsyn. Vid jämförelse av VU21 och VU15, har VU15 ett liknande karbonylkol men nästan ett dubbelt så högt K_d värde, vilket efter datoranalys kan bero på att VU15 karbonylkol inte når Glu71 på samma sätt som VU21. Den föreningen med högst K_d värde är VU5 vilket kan bero på att det är den mest opolära analogen. Den föreningen som inte band alls till galektin-1, VU28, förmodas inte binda bra på grund av nitrilgruppen som enligt datormodellering inte förmår interagera med någon specifik aminosyra utan blir ett sterisk hinder istället. Samtliga molekyler visade selektivet binder endast eller företrädesvis till galektin-1. Endast VU33 binder galektin-3 svagt, vilket möjligen beror på att det är den enda förening som saknar sulfid-brygga till propylkedjan.

Slutsatser

Syftet med studien var att analysera och syntetisera inhibitorer för galektin-1. Det kan summeras att metoden var användbar samt att molekylerna band till galektin-1 förutom en. Dock passade inte reaktionsschemat för alla reagens. De reagens som var mest lämpliga var i hög molekylvikt, starka nukleofiler, med elektrontäta atomer samt flera sammansatta bensenringar. Studiens hypotes kunde således verifieras.

Om vidare forskning initieras är förbättringsområden att skala upp reaktionen, testa reagens med högre molekylvikt, försöka optimera kolonn kromatografin alternativt hitta andra reaktionsvägar för att minska produkt förlust. Samt fokusera på ligander med två eller flera ringar i ett aromatiskt system helst med vätebindande atomer i dessa samt inkludera karbonyl kol.

Metod och Material

Programmet Desmond implementerat i Maestro version 2022-1 (Schrödinger, Inc) användes för att designa, stimulera och beräkna olika molekylers affinitet till galektin-1. Efter simulationerna genomfördes varianter av den generella syntesplanen.

Generell utrustning och uppberedningsmetoder

All TLC utfördes med silica gel 60 F₂₄ (Meck) och detekterades av UV absorption med ett önskat R_f värde på 0,2-0,3. Lösningsmedlet på samtliga analyser var på olika förhållanden av EtOAc:Heptan om inget annat anges. Alla separationer utfördes med vatten och EtOAc (1:3) samt torkning med MgSO₄. Kolonnkromatografer utfördes med olika förhållanden av lösningarna EtOAc och heptan om inget annat anges. Kolonnen packades enligt wetloading om inget annat anges. Ett passade eluentssystem bestämdes med TLC med ett R_f värde på 0,2-0,3. Fraktionerana med produkt bestämdes först med punkt TLC och sedan ”normal” TLC på de fraktioner som gav utslag i punkt TLC. All LC-MS utfördes på samma maskin med en kolonn på C-18 (1,8 μ m, 2,1x50 mm). MS var singel-quadropol av systemet Agilent Technologies

6120. LC hade systemet Agilent Technologies 1260 Infinity. Hela maskinen var en autosampler med en UV-vis och DAD detektor. DAD, diodarraydetektor med systemet HEWLETT PACKAD series 1100. Systemets standard inställning användes till alla analyser och hade en gradient på lösningarna A (myrsyra 0,1 %, vatten:ACN, 9:1) och B (myrsyra 0,1 %, ACN). Alla NMR analyser var ¹H-NMR med d-CHCl₃ eller d-MeOH på maskinen BRUKER 500 MHz med analysator Avance 111 HD eller maskinen BRUKER ULTRASHIELD 400 MHz PLUS med analysator Avance 11. HPLC analyserna utfördes på maskinen Agilent Technologies 1260 Infinity med en system prep C18 5 μM 19x250 mm kolonn med en vatten och ACN gradienter med 0,1 % MeOH. Programmet tog totalt 13 minuter och hade en UV/VIS absorbans på 254 nm. Mikro reaktorn som användes var av systemet Biotag initiator+. Frystorkning skedde i systemet Labconco. Analyserna om bindingsstyrka gjordes av BMC, biomedicinska centrumet i Lund. Där analyserades även alla molekylers affinitet mot andra galektiner.

Generell syntesmetod

Sn2 reaktion och epoxid öppning

Startmaterialet (S)-oxiran-2-ylmetyl 4-nitrobensensylfonat (100 mg, 385, 75 μmol, 1 eq) och K₂CO₃ (133,28 mg, 964,39 μmol, 2,5 eq) löses i torr DMF (3 ml). Sedan tillsätts önskat reagens (1,1 eq) för att omröras i rumstemperatur i cirka 24 h. Nästa dag analyserades reaktionsblandningen med TLC och LC-MS. Om reaktionen skett, koncentrerades lösningen för vidare analys i kolonn kromatografi. Fraktionerna med produkt identifierades med LC-MS och koncentrerades för att stå i vacuum över natten. Produkten tillsammans med NaN₃ (5 eq) och NH₄Cl (2 eq) löses upp i dioxane:vatten (1:1, 2 ml totalt) för att omröras i 70 grader och reflux över natten. Nästa dag analyserade reaktionsblandningen med LC-MS. Om produkten identifierats utfördes en separation, TLC och kolonn kromatografi. Fraktionerna med produkt koncentrerades, om produkten identifierades i LC-MS genomfördes ett ¹H-NMR. Sedan koncentrerades produkten. Produkten benämns senare i texten som produkt 1.

Alternativ metod för att skapa reagens för klick reaktion

Sonogashira procedur från (Lei, 2016). I en försluten kolv tillsattes 2-bromothiazol (135,18 μL, 0,2 eq, 1,5 μmol) och 2-metylbut-3-yn-2-ol (146,09 μL, 0,2 mol, 1,5 μmol), trietylamin (965,58 μL, 7,5 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (52,64 mg, 75 μmol, 0,01 eq), CuI (28,57 mg, 150 μmol, 0,02 eq) och acetonitril (307,09 mg, 7,5 μmol, 1 eq). Reaktionsblandningen placerades efter i mikrovågsreaktorn i 10 minuter, 120 grader och 150 W. Efter fick lösningen kylas till rumstemperatur för att genomföra TLC, separation och kolonn kromatografi. Analyserna LC-MS och ¹H-NMR utfördes sedan. Efter följde en avskyddnings reaktion procedur från (Geronikaki, 2006). Produkten (1 eq) från sonogashira reaktionen, NaOH (0,88 eq) och toluen (3 ml) hettades upp för att stå under argon i två timmar. Reaktionsblandningen kyldes till rumstemperatur för att filtreras genom Al₂O₃ (3 x 3 cm), utföra TLC och kolonn kromatografi. Efter genomfördes ytterligare TLC och LC-MS för att bekräfta produktens befinnande. Produkten benämns senare i texten som produkt 2.

Klick reaktion

Produkt 1(1 eq) löses upp i acetonitril (3 ml). Sedan tillsattes produkt 2 eller köpt reagens (2 eq), kopparjodid (0,2 eq) och Et₃N (2 eq) under mörkaförhållanden för att stå under omrörning och kvävgas över natten, cirka 12 h. Dagen efter utfördes en separation med EtOAc (10 ml). Organfasen tvättades sedan med vatten (10 ml), sat NH₄Cl och brine (10 ml). Sedan torkades lösningen med MgSO₄ och blev koncentreras i vacuum. Ytligare reningen utfördes sedan i HPLC för att sedan frystorkas.

Appendix av metoder

VU1 SN2 p-toluentiol

I en rundkolv löstes (S)-oxiran-2-ylmetyl 4-nitrobensenesulfonat (100 mg, 387,75 μmol , 1 eq) och K_2CO_3 (133,28 mg, 964,39 μmol , 2,5 eq) upp i torr DMF (3 ml) för att sist addera p-toluenetiol (43,3 ml, 424,33 μmol , 1,1 eq) för att omröras under natten. TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS utfördes dagen efter vilket indikerade att reaktionen skett. Lösningen koncentrerades och kolonn kromatografi (heptan och etylacetat 1:3) utfördes. TLC (1:3 heptan och EtOAc) och LC-MS visade sen produkten. Lösningen koncentrerades därefter samt torkades i vacuum under natten. Produkten användes i nästa steg VU2 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 20,3 %. m/z (M+H): 181. Hittad 181.

VU2 epoxid öppning av VU1

(S)-2-((p-tolyltio)metyl)oxiran, VU1, (20,30 mg, 112,61 μmol , 1 eq) tillsammans med NaN_3 (36,6 mg, 563,06 μmol , 5 eq) och NH_4Cl (12,05 mg, 225,22 μmol , 2 eq) adderades till rundkolven och löstes sedan upp av dioxane: H_2O (1:1, 2 ml totalt). Blandningen lämnades under omrörning, 70 °C och reflux över natten. Nästa dag indikerade LC-MS att produkten inte var ren. NMR utfördes som visade att epoxiden iallafall hade öppnats. En separation (30 ml EtOAc och vatten 10 ml), TLC (1:5 EtOAc: heptan) och kolonn kromatografi (1:3 EtOAc : heptan) utfördes. TLC visade sedan produkten i de slutgiltiga fragmenten. Ett NMR utfördes också som indikerade att epoxiden öppnat sig. Lösningen koncentrerades och torkades i vacuum. Produkten användes i nästa steg VU5 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 100 %. m/z (M+H): 224. Hittad 224.

VU3 sonogashira (Lei, 2016)

I ett 10 ml vial tillsattes 2-bromotiazol (135,18 μL , 1,5 mmol, 0,2 eq), 2-metylbut-3-yn-2-ol (149,09 μL , 1,5 mmol, 0,2 eq), trietylamin (965,58 μL , 7,5 mmol, 1 eq), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (52,64 mg, 5 mol %), CuI (28,57 mg, 10 mol %), och acetonitril (1 mL) för att reagera i mikrovågsugnen under omrörning i 10 minuter vid 120 °C och 150 W. När reaktionen var klar kylades blandningen till 46 °C och TLC (1:1 EtOAc och heptan) utfördes. Reaktionsblandningen kombinerades med diklorometan (30 ml) och vatten (30 ml X 3) för separation. Efter torkades lösningen från vatten med natriumsulfat som filtrerades bort samt koncentrerades i evaporatorn. Sist utfördes kolonn kromatografi med heptan och gav 2-metyl-4-(thiazol-2-yl)but-3-yn-2-ol. Produkten karaktiserades av NMR och LC-MS. Produkten användes i nästa steg VU4 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 18,2 %. m/z (M+H): 181. Hittad 181.

VU4 avskydds reaktion på VU3 (Lei, 2016)

2-ethynylthiazole var syntetiserat av 2-metyl-4-(thiazol-2-yl)but-3-yn-2-ol (138,20 mg, 826,43 μmol , 1 eq) som värmdes med NaOH (28,92 mg, 723,12 μmol , 0,88 eq) i toluen (3 ml) under argon i 2 timmar. Efter kylning filtrerades lösningen med Al_2O_3 (3 \times 3 cm) och ett brunt pulver framkom. Produkten analyserades i kolonn kromatografi (heptan:EtOAc 5:1). Produkten användes i nästa steg VU5 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 14,2 %. m/z (M+H): 168. Hittad 168.

VU5 klick på VU4 och VU2

I rundkolven som innehåller 1-azido-3-(p-tolyltio)propan-2-ol, VU2, (20,3 mg, 90,91 μmol , 1 eq) tillsattes ACN (3 ml), 2-etynyltiophen, VU4, (18,21 mmol 181,82 μmol , 2 eq), CuI (0,0041 mg, 18,18 μmol , 0,2 eq) och Et_3N (25,20 μL , 181,81 μmol , 2 eq) under omrörning samt kvävegas. Dagen efter koncentrerades lösningen under tryck som sedan späddes ut med EtOAc

(10 ml) för uppberedning. Den organiska fasen tvättades med EtOAc(10 ml), mättad NH₄Cl (10 ml) och brine (10 ml) för att torkas med MgSO₄. Lösningen koncentrades i vacuum och renades av HPLC. Produkten visade i HPLC och fraktionerna frystorkades med flyttande kväve vilket blev ett vitt pulver (cirka 1 mg). Pulvret analyserade i NMR vilket visade att de fortfarande fanns smuts i provet men lösningen förbereddes för BMC analys. HRMS analysen visade att produkten fanns samt med över 95 % renhet. Utbyte 4,93%. m/z (M+H): 332. Hittad 332.

VU13 SN2 pyridin tiol

I en rundkolv löstes (S)-oxiran-2-ylmetyl 4- nitrobensensulfonat(100 mg, 387,75 µmol, 1 eq) och K₂CO₃ (133,28 mg, 964,39 µmol, 2,5 eq) upp i torr DMF(3 ml) för att sedan addera 4-acetamidotiolfenol (70,96 mg, 424,33 µmol, 1,1 eq). Lösningen stod under omrörning över natten. Sedan utfördes TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS nästa dag vilket indikerade att reaktionen skett. Lösningen koncentrerades genom evaporering för att sedan analyseras visare med kolonn kromatografi (heptan och EtOAc 1,5:1 sedan 100 % etylacetat). TLC (1:3 heptan och EtOAc) och LC-MS utfördes vilket visade produkten. Lösningen evaporerades därefter samt torkades i vacuum under natten. Produkten användes i nästa steg VU14 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 78,5 %. m/z (M+H): 224. Hittad 224.

VU14 epoxid öppning av VU13

Produkten (S)-N-(4-((oxiran-2-ylmetyl)tio)fenyl)acetamide, VU13, (0,0785 g, 351,56 µmol, 1 eq) tillsammans med NaN₃ (114,28 mg, 1,76 mmol, 5 eq) och NH₄Cl (37,61 mg, 703,12 µmol, 2 eq) adderades till rundkolven och löstes sedan upp av dioxane:H₂O (1:1, 2 ml totalt). Blandningen lämnades under omrörning och reflux över natten. LC-MS, separation (3:1 EtOAc 30 ml och vatten 10 ml), TLC (1:2 EtOAc: heptan) och kolonn kromatografi(1:3 EtOAc: heptan) utfördes. TLC visade sedan produkten i den slutgiltiga lösningen. Ett NMR utfördes också som indikerade att epoxiden öppnat sig. Sedan koncentrerades lösningen samt stod i vacuum över natten. Produkten användes i nästa steg VU15 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 32,5 %. m/z (M+H): 227. Hittad 227.

VU15 klick på VU14

I rundkolven som innehåller N-(4-((3-azido-3-hydroxypropyl)tio)fenyl)acetamide, VU14, (25,5 mg, 95,75 µmol, 1 eq) tillsattes ACN (3ml), 2-etylnyltiophen (19,18 mmol, 191,50 µmol, 2 eq), CuI (3,65 mg, 19,15 µmol, 0,2 eq) och Et₃N (26,69 µL, 191,5 µmol, 2 eq). Lösningen sattes under omrörning och kvävgas under natten i mörker. Sedan genomfördes LC-MS. Dagen efter koncentrerades lösningen som sedan späddes ut med EtOAc (10 ml) +sat NH₄Cl (10 ml), vattenfasen tvättas två gånger med EtOAc (20 ml) för uppberedning. Lösningen koncentrades i vacuum och renades av HPLC. Produkten visade i HPLC och fraktionerna frystorkades med flyttande kväve vilket blev ett vitt pulver (2,5 mg). Pulvret analyserade i NMR vilket visade att de fortfarande fanns smuts i provet men lösningen förbereddes för BMC och HRMS analys. HRMS analysen visade att produkten fanns samt med över 95 % renhet. Utbyte 9,8 %. m/z (M+H): 375. Hittad 375.

VU18 SN2 7-mercapto-4-metyl-2H-chromen-2-on

I en rundkolv löstes (S)-oxiran-2-ylmetyl 4- nitrobensensulfonat(100 mg, 387,75 µmol, 1 eq) och K₂CO₃ (133,28 mg, 964,39 µmol, 2,5 eq) upp i torr DMF(3 ml) för att sedan addera 4-acetamidothiolfenol (70,96 mg, 424,33 µmol, 1,1 eq). Sedan utfördes TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS nästa dag vilket indikerade att reaktionen skett. Lösningen koncentrerades genom evaporering för att sedan analyseras visare med kolonn kromatografi (heptan och EtOAc 1:1). TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS utfördes vilket visade produkten. Lösningen

evaporerades därefter samt torkades i vacuum under natten. Produkten användes i nästa steg VU20 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 116,5 %. m/z (M+H): 249. Hittad 249.

VU19 epoxid öppning på VU19

Produkten (S)-4-metyl-7-((oxiran-2-ylmetyl)thio)-2H-chromen-2-on, VU19, (116,50 mg, 469,20 µmol, 1 eq) tillsammans med NaN₃ (152,51 mg, 2,35 mmol, 5 eq) och NH₄Cl (50,19 mg, 938,40 µmol, 2 eq) adderades till rundkolven och löstes sedan upp av dioxane:H₂O (1:1, 2 ml totalt). Blandningen lämnades under omrörning och reflux över natten. LC-MS, separation (3:1 EtOAc 30 ml och vatten 10 ml), TLC (1:3 EtOAc: heptan) och kolonn kromatografi(1:3 EtOAc: heptan) utfördes. TLC visade sedan produkten i den slutgiltiga lösningen. Ett NMR utfördes också som indikerade att epoxiden öppnat sig. Sedan koncentrerades lösningen samt stod i vacuum över natten. Produkten användes i nästa steg VU21 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 5,15 %. m/z (M+H): 292. Hittad 292.

VU21 klick på VU20

I rundkolven som innehåller 7-((3-hydroxy-3-(4-(tiofen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)thio)-4-metyl-2H-chromen-2-on, VU19, (6 mg, 20,60 µmol, 1 eq) tillsattes ACN (3ml), 2-ethynylthiophene (4,13 mml, 41,19 µmol, 2 eq), CuI (784,49 mg, 4,12 µmol, 0,2 eq) och Et₃N (5,74 µL, 41,19 µmol, 2 eq) för att sättas under omrörning med kvävgas under natten och mörker. Sedan genomfördes LC-MS. Dagen efter koncentrerades lösningen under tryck som sedan späddes ut med EtOAc (10 ml) +sat NH₄Cl (10 ml), vattenfas tvättas två gånger med EtOAc för upparbetning. Lösningen koncentrerades i vacuum och renades av HPLC. Produkten visade i HPLC och fraktionerna frystorkades med flyttande kväve vilket blev ett vitt pulver (2,4 mg). Pulvret analyserade i NMR vilket visade att de fortfarande fanns smuts i provet men lösningen förberedes för BMC och HRMS analys. HRMS analysen visade att produkten fanns samt med över 95 % renhet. Utbyte 40 %. m/z (M+H): 400. Hittad 400.

VU26 SN2 2-mercaptopyridin-3-carbonitril

I en rundkolv löstes (S)-oxiran-2-ylmetyl 4- nitrobensensulfonat(100 mg, 387,75 µmol, 1 eq) och K₂CO₃ (133,28 mg, 964,39 µmol, 2,5 eq) upp i torr DMF(3 ml) för att sedan addera 2-mercaptopyridine-3-carbonitrile (57,78 mg, 424,33 µmol, 1,1 eq) under omrörning. Sedan dagen efter utfördes TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS nästa dag vilket indikerade att reaktionen skett. Lösningen koncentrerades genom evaporering för att sedan analyseras visare med kolonn kromatografi (heptan och EtOAc 70:30). TLC (70:30 heptan och EtOAc) och LC-MS utfördes vilket visade produkten. Lösningen evaporerades samt torkades i vacuum. Produkten användes i nästa steg VU27 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 35,1 %. m/z (M+H): 193. Hittad 193.

VU27 epoxid öppning av VU26

(S)-2-((oxiran-2-ylmetyl)thio)nicotinonitril, VU26, (35,10 mg, 182,59 µmol, 1eq) tillsammans med NaN₃ (59,35 mg, 912,94 µmol, 5 eq) och NH₄Cl (19,53 mg, 365,18 µmol, 2 eq) adderades till rundkolven och löstes sedan upp av dioxane:H₂O (1:1, 2 ml totalt). Blandningen lämnades under omrörning, 70 °C och reflux över natten. Nästa dag indikerade LC-MS att produkten inte var ren. En separation (3:1 EtOAc 30 mloch vatten 10 ml), TLC (1:5 EtOAc: heptan) och kolonn kromatografi (1:3 EtOAc : heptan) utfördes. TLC och LC-MS visade sedan produkten i de slutgiltiga fragmenten. Produkten användes i nästa steg VU28 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 59,5 %. m/z (M+H): 236. Hittad 236.

VU28 klick på VU27

I rundkolven som innehåller (*S*)-2-((3-azido-2-hydroxypropyl)tio)nicotinonitril, VU28, (20,90 mg, 88,84 µmol, 1 eq) tillsattes ACN (3ml), 2-etynyltiofen (19,22 mml, 177,67 µmol, 2 eq), CuI (3,38 mg, 17,77 µmol, 0,2 eq) och Et₃N (17,98 µL, 177,67 µmol, 2 eq). Lösningen sattes under omrörning med kvävgas under natten och mörker. Dagen genomfördes LC-MS samt koncentrerades lösningen under tryck som sedan späddes ut med EtOAc (10 ml) +sat NH₄Cl (10 ml), vattenfasen tvättas två gånger med EtOAc för upparbetning. Lösningen koncentrerades i vacuum och renades av HPLC. Produkten visades i HPLC och fraktionerna frystorkades med flyttande kväve vilket blev ett vitt pulver (1,9 mg). HRMS analysen visade att produkten fanns samt med över 95 % renhet. Utbyte 9,09 %. m/z (M+H): 344. Hittad 344.

VU31 SN2 indazol

I en rundkolv löstes (*S*)-oxiran-2-ylmetyl 4- nitrobensensulfonat(100 mg, 387,75 µmol, 1 eq) och K₂CO₃ (133,28 mg, 964,39 µmol, 2,5 eq) upp i torr DMF(3 ml) för att sedan addera indazol (50,13 mg, 424,33 µmol, 1,1 eq) under omrörning över natten. Sedan utfördes TLC (1:1 heptan och EtOAc) och LC-MS nästa dag vilket indikerade att reaktionen skett. Lösningen koncentrerades genom evaporering för att sedan analyseras vidare med kolonn kromatografi (heptan och EtOAc 70:30). TLC (70:30 heptan och EtOAc) och LC-MS utfördes vilket visade produkten. Lösningen evaporerades samt torkades i vacuum. Produkten användes i nästa steg VU32 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 149 %. m/z (M+H): 175. Hittad 175.

VU32 epoxid öppning VU31

(*R*)-1-(oxiran-2-ylmetyl)-1*H*-indazole, VU31, (149,00 mg, 855,32 µmol, 1 eq) tillsammans med NaN₃ (111,21 mg, 1,71 mmol, 5 eq) och NH₄Cl (228,75 mg, 4,28 mmol, 2 eq) adderades till rundkolven och löstes sedan upp av dioxane:H₂O (1:1, 2 ml totalt). Blandningen lämnades under omrörning, 70 °C och reflux över natten. Nästa dag indikerade LC-MS att produkten inte var ren. En separation (3:1 EtOAc 30 ml och vatten 10 ml), TLC (1:5 EtOAc: heptan) och kolonn kromatografi (1:3 EtOAc : heptan) utfördes. TLC och LC-MS visade sedan produkten. Produkten användes i nästa steg VU33 utan att isoleras ytterligare. Utbyte 3,35 %. m/z (M+H): 218. Hittad 218.

VU33 klick på VU32

I rundkolven som innehåller (*R*)-1-(1*H*-indazol-1-yl)-3-(4-(tiofen-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propan-2-ol, VU32, (5 mg, 23,02 µmol, 1 eq) tillsattes ACN (3ml), 2-etynyltiofen (4,61 mml, 46,03 µmol, 2 eq), CuI (876,71 µg, 4,60 µmol, 0,2 eq) och Et₃N (6,42 µL, 46,03 µmol, 2 eq). Lösningen sattes under omrörning med kvävgas under natten och mörker. Sedan genomfördes LC-MS. Dagen efter koncentrerades lösningen som sedan späddes ut med EtOAc (10 ml) +sat NH₄Cl (10 ml), vattenfasen tvättas två gånger med EtOAc för upparbetning. Lösningen koncentrerades i vacuum och renades av HPLC. Produkten visades i HPLC och fraktionerna frystorkades med flyttande kväve vilket blev ett vitt pulver (1,9 mg). Pulvret analyserades i NMR, HRMS och BMC. Utbyte 38,0 %. m/z (M+H): 326. Hittad 326.

Litteraturförteckning

Geronikaki, Vasilevsky, Hadjipavlou-Litina, Lagunin & Poroikov, 2006. SYNTHESIS AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHYNYLTHIAZOLES. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 01 05, pp. 769-774.

doi: 10.1111/cbdd.13576

Arnold, Opendaker, Flynn & Sims-Mourtada, 2015. Wound Healing and Cancer Stem Cells: Inflammation as a Driver of Treatment Resistance in Breast Cancer. *Libertas Academica*, 29 01, p. 13.

doi: [10.4137/CGM.S11286](https://doi.org/10.4137/CGM.S11286)

Astorgues-Xerri, Riveiro, Tijeras-Raballand, Serova, Neuzillet, Albert, Raymond & Faivre, 2013. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *ELSEVIER*, 24 Juli, p. 13.

doi: [10.1016/j.ctrv.2013.07.007](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.07.007)

Barondes, Castronovo, Cooper, Cummings, Drickamer, Feizi, Gitt, Hirabayashi, Hughes, Kasai, et al, 1994. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, pp. 597-598.

doi: [10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7)

Baum & Thiemann, 2016. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do?. *Annu Rev Immunol*, 20 05, pp. 243-264.

doi: [10.1146/annurev-immunol-041015-055402](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055402)

Camby, Mercier, Lefranc & Kiss, 2006. Galectin-1: A small protein with major functions. *Glycobiology*, 16 11, p. 137-157.

doi: [10.1093/glycob/cwl025](https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025)

Clayden, Greeves & Warren, 2001. *ORGANIC CHEMISTRY*. 1 red. OXFORD: OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Croci & Rabinovich, 2012. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. *Cell PRESS*, 04 03, p. 14.

doi: [10.1016/j.immuni.2012.03.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.004)

Delaine, Collins, MacKinnon, Sharma, Stegmayr, Rajput, Mandal, Cumpstey, Larumbe, Salameh, Knutsson, Hattum & van Scherpenzeel, 2016. Galectin-3-Binding Glycomimetics that Strongly Reduce Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Modulate Intracellular Glycan Recognition. *Chembiochem*, 15 09, pp. 1759-1770.

doi: [10.1002/cbic.201600285](https://doi.org/10.1002/cbic.201600285)

Grivennikov & Greten, 2019. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*, 16 07, p. 27-41.

doi: [10.1016/j.immuni.2019.06.025](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025)

Peterson, Collins, Huang, Kahl-Knutsson, Essén, Zetterberg, Oredsson, Leffler, Blanchard & Nilsson, 2018. Aromatic heterocycle galectin-1 interactions for selective single-digit nM affinity ligands. *RSC Advances*, 21 06, p. 24913-24922.

<https://doi.org/10.1039/C8RA04389B>

Lei, Hu, Wu, Wu, Xiang, Sun, You & Zhang, 2016. Microwave-assisted copper- and palladium-catalyzed sonogashira-type coupling of aryl bromides and iodides with trimethylsilylacetylene. *ELSEVIER*, 9 03, pp. 1100-1103.

doi: [10.1016/j.tetlet.2016.01.088](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.088)

Marth & Ohtsubo, 2006. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Leading Edge Review*, 19 08, p. 13.

doi: [10.1016/j.cell.2006.08.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019)

Rabinovich & Toscano, 2009. Turning “sweet” on immunity: Galectin- glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*, p. 338-352.

Russo, Vasudevan, Méndez-Huergo, Kumari, Menoret, et al, 2021. Intracellular immune sensing promotes inflammation via gasdermin D-driven release of a lectin alarmin. *Nat Immunol*, 04 01, pp. 154-165.

doi.org/[10.1038/s41590-020-00844-7](https://doi.org/10.1038/s41590-020-00844-7)

Rydén & Lundh, u.d. *NE*. [Online]

Available at: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/homeostas>

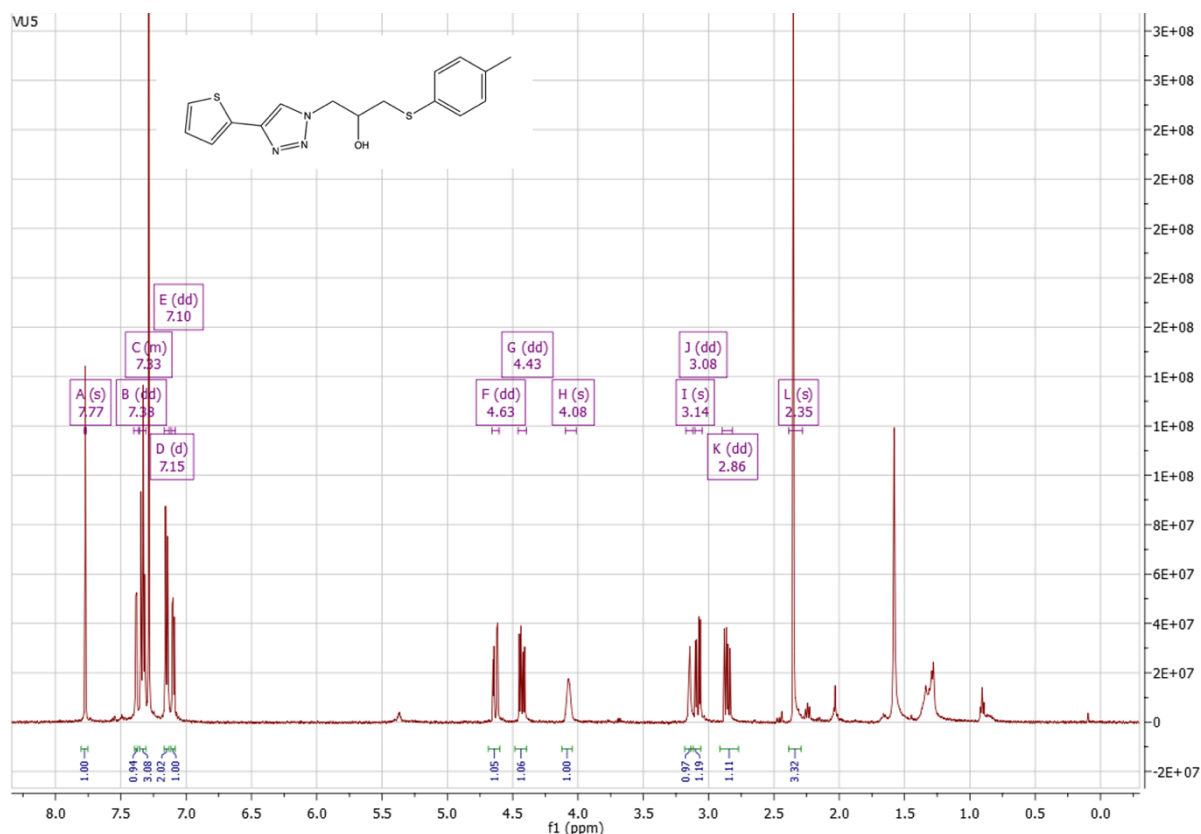
[Använd 06 02 2022].

Stowell, Cho, Feasley, Arthur, Song, Colucci, Karmakar, Mehta, Dias-Baruffi, McEver, et al, 2009. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *J Biol Chem*, 20 02, p. 4989–4999.

doi: 10.1074/jbc.M808925200

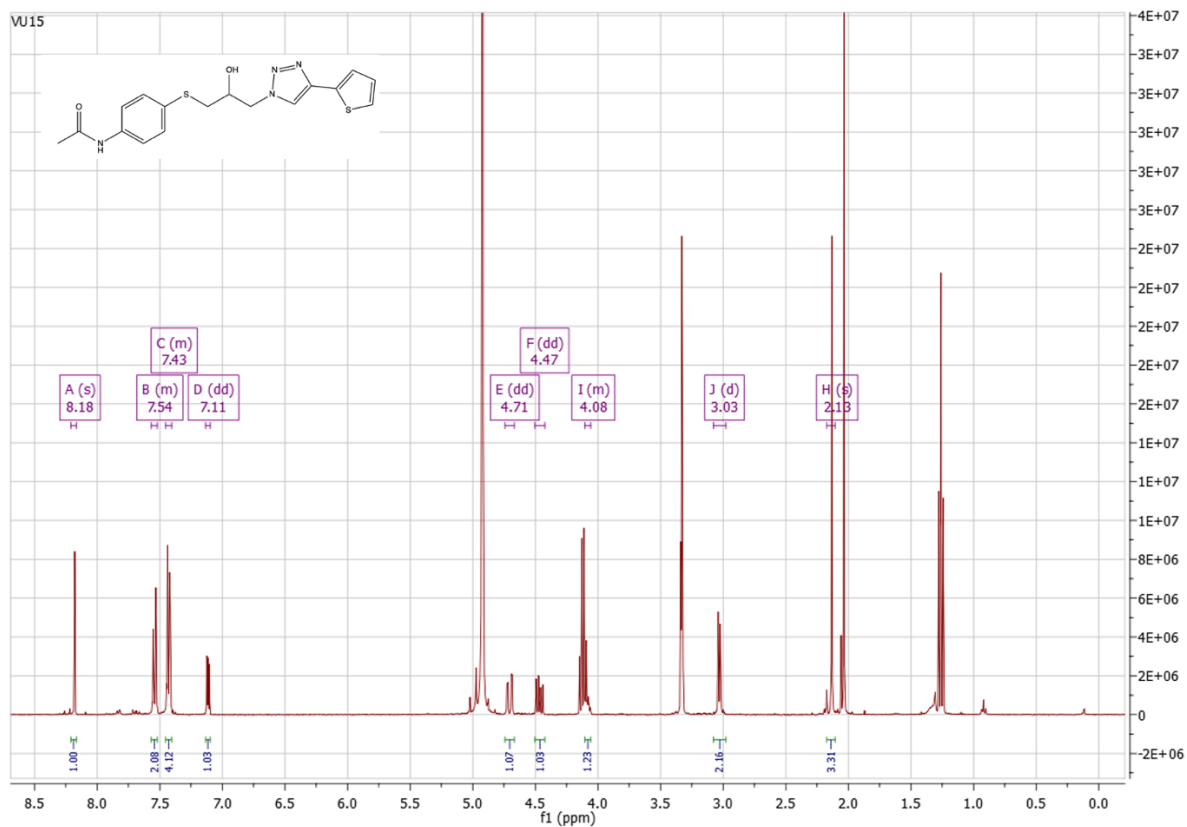
Verteramo, 2019. *Design, Synthesis and Thermodynamic Studies of Galactin Ligands*. 1 red. Lund: Lunds University.

NMR spektrum



Analys med NMR av VU5

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s, 1H, triazol), 7.35 – 7.31 (m, 3H, tiofen och Ph), 7.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ph), 7.10 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H, tiofen), 4.63 (dd, $J = 14.1, 3.1$ Hz, 1H, väte bredvid triazol på kolkedjan), 4.43 (dd, $J = 14.1, 6.6$ Hz, 1H, väte bredvid triazol på kolkedjan), 4.08 (s, $J = 2.9$ Hz, 1H, väte mitt emot OH gruppen), 3.14 (s, 1H, väte bredvid S på kolkedjan eller OH), 3.08 (dd, $J = 14.1, 4.9$ Hz, 1H, väte bredvid S på kolkedjan eller OH), 2.86 (dd, $J = 14.1, 8.1$ Hz, 1H, väte bredvid S på kolkedjan eller OH), 2.35 (s, 4H, PhCH_3).



Analys med NMR av VU15

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.18 (s, 1H, triazol), 7.57 – 7.52 (m, 2H, Ph), 7.45 – 7.40 (m, 4H, Ph och tiofen), 7.11 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H, tiofen), 4.71 (dd, $J = 14.0, 3.6$ Hz, 1H, väte bredvid tiofen), 4.47 (dd, $J = 14.0, 7.5$ Hz, 1H, väte bredvid thiofen), 4.10 – 4.06 (m, 1H, väte mitt emot OH), 3.03 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, väte bredvid svavel), 2.13 (s, 3H, CH_3).

