

Masteroppgave for graden *Master i Farmasi*

Syntese og biologisk aktivitet av nye radikalhemmere



Ragnhild Enberget

Avdeling for farmasøytisk kjemi og avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk Institutt,

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

Universitetet i Oslo

Mai 2009

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk kjemi og avdeling for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk institutt. Oppgaven er en del av graden Master i farmasi ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil gjerne takke mine hovedveiledere, førsteamanuensis Trond Vidar Hansen og professor Ragnhild E. Paulsen, for hjelp, støtte og gode råd under arbeidet med masteroppgaven. En takk må også rettes til mine medveiledere, Kristin Odlo og Gro Mathiesen, for god opplæring og hjelp på laben. Takk også til alle andre ved avdelingene som har hjulpet til med små og store problemer.

Jeg må også sende en stor takk til familien min, kjæresten min og vennene mine, som alle har støttet meg og vært der for meg når ting ikke har gått helt som det skal. Jeg hadde ikke klart å komme i mål uten dere.

Ragnhild Enberget

Oslo, mai 2009

Sammendrag

Kreft er en gruppe sykdommer som kjennetegnes ved ukontrollert celledeling. Det finnes mange legemidler mot kreft på markedet i dag, og det forskes hele tiden på nye. Flere plantealkaloider har vist seg å være effektive i kreftbehandling, og derfor er mye av den nyere forskningen basert på disse.

Combretastatin A-4 (CA-4) er et slikt alkaloid. På grunn av dets effektivitet og enkle kjemiske struktur er det en god modell for utvikling av nye legemidler mot kreft. Tidligere studier har vist at deler av strukturen til CA-4 er viktig for stoffets aktivitet. I denne oppgaven ble cytotoxissiteten til CA-4 og noen av dets analoger testet i en PC12 cellelinje. Alle de testede stoffene hadde en viss cytotoxissitet, og resultatene kan bekrefte at deler av strukturen er viktig for aktivitet.

Et annet mål med oppgaven var å syntetisere nye stoffer med antioksidanteffekt. Det var også ønskelig at stoffene skulle ha fluoriserende og lipofile egenskaper.

Innhold

Forord.....	2
Sammendrag.....	3
1. Innledning.....	6
1.1 Naturprodukter som legemidler.....	6
1.2 Kreft.....	6
1.2.1 Kreft.....	6
1.2.2 Kreftutvikling.....	7
1.2.3 Angiogenese.....	7
1.3 Kreftbehandling i dag.....	8
1.3.1 Alkylerende midler.....	8
1.3.2 Antimetabolitter.....	9
1.3.3 Plantealkaloider.....	9
1.3.4 Antibiotika med cytostatisk effekt.....	10
1.3.5 Hormoner.....	11
1.3.6 Andre cytostatika.....	12
1.4 Mikrotubuli.....	12
1.5 Hemmere av mikrotubuli.....	13
1.5.1 Paklitaxel.....	13
1.5.2 Vinkaalkaloider.....	14
1.5.3 Kolkisin.....	15
1.6 Combretastatin.....	16
1.7 Apoptose.....	17
1.8 PC12 celler.....	18
1.9 Hensikt med oppgaven.....	19
2. Eksperimentelt.....	20
2.1 Kjemikalier.....	20
2.2 Utstyr.....	21
2.3 Synteser.....	22
2.3.1 Syntese av etynyl-4-metoksybenzen (RE 001).....	22
2.3.2 Syntese av 3-(azidometyl)-2,5,6-trimetylpyrazolo[1,2-a]pyrazol-1,7-dion (RE 002).....	23
2.3.3 Syntese av 3-((4-(4-metoksyfenyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)metyl)-2,5,6-trimetylpyrazolo[1,2-a]pyrazol-1,7-dion (RE 003).....	24
2.3.4 Syntese av metyl 4-((2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trienyloksy)benzoat (RE 004).....	25
2.3.5 Syntese av 1-brom-3,7,11-trimetyldodekan (RE 005).....	26

2.3.6 Syntese av (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1-iod-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trien (RE 006)	27
2.3.7 Syntese av 5-iod-2-((2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trienylloksy)benzaldehyd (RE 008).....	28
2.4 Deteksjon av celledød	29
2.4.1 Splitting av PC12- celler.....	29
2.4.2 Eksponering av stoffer	30
2.4.3 Farging og telling av celler	30
2.4.4 Stoffer som ble testet for cytotoxicitet	32
2.5 Resultater cytotoxicitet	33
2.5.1 Forsøk 1	33
2.5.2 Forsøk 2	34
2.5.3 Forsøk 3	35
3 Diskusjon.....	37
3.1 Synteser.....	37
3.2 Cytotoxicitetstesting	38
3.3.1 PC 12 celler	38
3.3.2 Deteksjon av celledød.....	38
3.3.3 Cytotoxicitet og struktur-aktivitetsforhold	39
4 Konklusjon	40
5 Referanser.....	41

1. Innledning

1.1 Naturprodukter som legemidler

Planter og andre naturprodukter har i flere tusen år blitt brukt i behandling av sykdommer og plager, og naturprodukter er svært viktige også i dagens medisinske verden. Av legemidlene som brukes i dag, er ca. 40 % av naturlig opprinnelse (Samuelsson 2004). Dette kan være legemidler som er isolert fra planter, isolerte stoffer som har blitt modifisert for å få ønskede egenskaper og stoffer som er fremstilt syntetisk med naturlige substanser som modell.

Å lete etter aktive stoffer i naturen med tanke på nye legemidler er fortsatt et viktig felt innen medisinsk forskning. Mange av produktene som brukes i for eksempel kreftbehandling i dag er basert på stoffer som finnes i naturen. En viktig del av forskningen på nye legemidler mot kreft er basert på modifisering av plantealkaloider, eller syntese av stoffer som ligner disse alkaloidene, for å gi en bedre farmakologisk profil. Eksempler på dette er Taxol™ (Ojima & Das 2009), og combretastatin A-4 (Ducki et al. 2005).

1.2 Kreft

1.2.1 Kreft

Kreft er en gruppe sykdommer som kjennetegnes ved ukontrollert celledeling. I friskt vev er forholdet mellom celledød og celleproliferasjon i likevekt, men mutasjoner av DNA kan føre til at en celle begynner å dele seg raskere enn cellene rundt. Det vil etter hvert dannes en celleklump, kalt tumor eller svulst. Hvis tumoren vokser uten å trenge inn i vevet rundt er den godartet eller *benign*.

Hvis den derimot vokser inn i vevet omkring og ødelegger dets struktur eller sprer seg til andre deler av kroppen, er den ondartet eller *malign*. Maligne svulster kalles cancer eller kreftsvulst. Celler fra kreftsvulster kan løsne og spres med blod eller lymfe til andre deler av kroppen. Der fortsetter celledelingen og det kan dannes sekundære kreftsvulster kalt *metastaser* (Alberts et al. 2002).

1.2.2 Kreftutvikling

Utviklingen av kreft er en komplisert prosess hvor mange faktorer og prosesser deltar. Alle normale celler kan transformeres til kreftceller ved at det skjer mutasjoner som forstyrrer reguleringen av cellevekst eller celledød og som kan arves ved celledeling. En rekke faktorer, kalt *karsinogener*, kan føre til en slik transformering. De viktigste er kjemikalier, stråling og virusinfeksjoner. En rekke gener er involvert i kreftutvikling, og de kan deles i tre hovedklasser: protoonkogener, tumor suppressorgener og gener involvert i DNA reparasjon (Alberts et al. 2002).

Protoonkogener er gener som stimulerer celledeling og differensiering. De kan muteres til en mer aktiv form, onkogener, som stimulerer til kreftutvikling. Tumor suppressorgener hemmer normalt celledeling og stimulerer apoptose (se avsnitt 1.7). Ved kreftutvikling mister disse sin funksjon, og celledelingen kan komme ut av kontroll. Det skjer kontinuerlig mutasjoner i alle cellers DNA, men cellenes egne reparasjonssystemer tar seg normalt av disse. Redusert funksjon av DNA reparasjonsgener fører til at mutasjonene ikke repareres og risikoen for kreftutvikling øker (Rang et al. 2003).

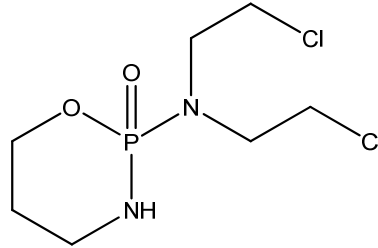
1.2.3 Angiogenese

I normalt vev er avstanden mellom to blodkar 0,33 mm. Bli avstanden større enn dette får cellene oksygenmangel og dør (Bjerkvig 2000). Cellene i en tumor trenger også tilgang på oksygen og næringsstoffer, og en tumor er derfor avhengig av tilvekst av nye blodårer (angiogenese) for å kunne vokse. Tumorcellene sender kontinuerlig ut proangiogene faktorer som fører til at endotelcellene i de omkringliggende blodkarene begynner å dele seg og danne nye blodkar, neovaskularisering (Salmon & Siemann 2007).

Ved utvikling av legemidler er det to mulige angrepspunkter på tumorens blodforsyning, ødeleggelse av eksisterende blodkar eller hemming av neovaskularisering. Blodkarene i tumorer er ofte skjøre og svakere enn resten av kroppens blodkar, og vaskulaturen i tumorvev uttrykker spesifikke proteiner som er godt egnede mål for behandling (Salmon & Siemann 2007; Tron et al. 2006). Kroppens normale blodkar fornyes sjelden. Derfor vil hemming av neovaskularisering kunne hemme tumorvekst uten å skade resten av kroppen.

1.3 Kreftbehandling i dag

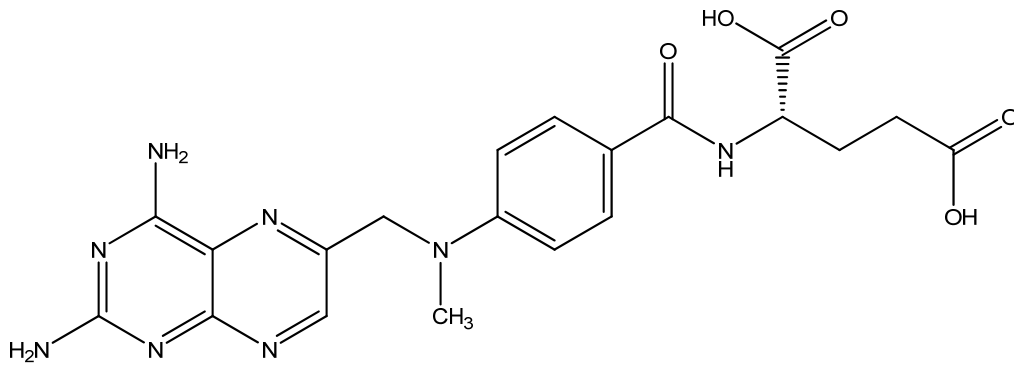
1.3.1 Alkylerende midler



Figur 1 - Cyklofosfamid (1) (sennepegassanalog)

Alkylerende midler har reaktive alkylgrupper som kovalent bindes til ulike cellulære makromolekyler, hvorav DNA er det viktigste. Ved alkylering av DNA dannes irreversibel celledskade, replikasjon og transkripsjon av DNA forstyrres og cellen dør ved apoptose. De alkylerende midlene kan plasseres i 5 kjemiske grupper: sennepegassderivater, etyleniminer, alkylsulfonater, nitrosoureaforbindelser og triazener (Dahl et al. 1999).

1.3.2 Antimetabolitter



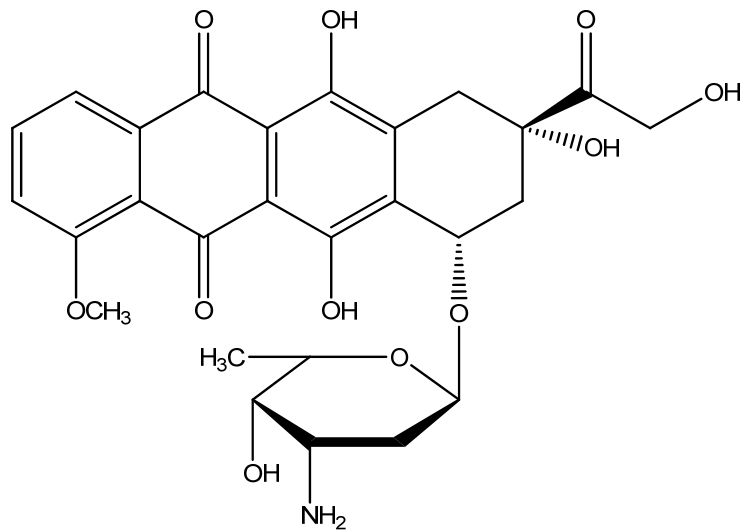
Figur 2 – Metotreksat (2) (folsyreanalog)

Antimetabolitter er strukturelle analoger til endogene substanser som deltar i celledyrking og reproduksjon. Slike midler kan hemme enzymaktivitet eller gi syntese av abnorme molekyler, noe som vil føre til at cellen dør ved apoptose. De tre hovedgruppene antimetabolitter er folsyreanaloger, purinantagonister og pyrimidinantagonister (Dahl et al. 1999).

1.3.3 Plantealkaloider

Flere plantealkaloider har vist seg effektive i behandling av kreft. Se avsnitt 1.5 og 1.6.

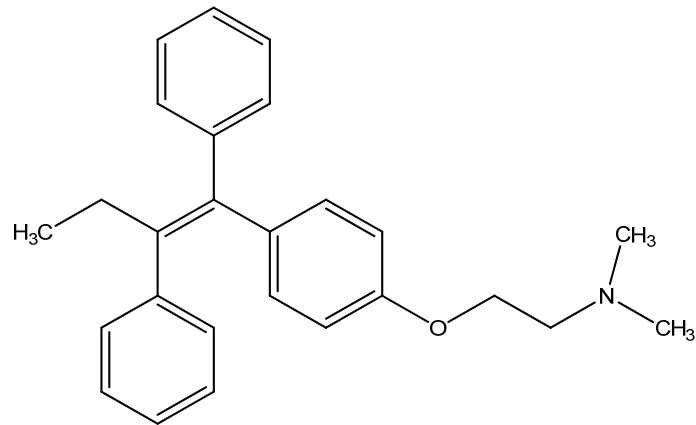
1.3.4 Antibiotika med cytostatisk effekt



Figur 3 – Doksorubicin (3) (antracyclin)

Noen typer antibiotika, blant andre visse typer antracykliner, har vist seg å ha en cytostatisk effekt, og har blitt tatt i bruk til behandling av ulike krefttyper. Disse stoffene har flere virkningsmekanismer, for eksempel dannelse av frie radikaler, binding til DNA, induksjon av DNA-fragmentering, hemming av topoisomerase II og påvirkning av cellemembraner (Dahl et al. 1999).

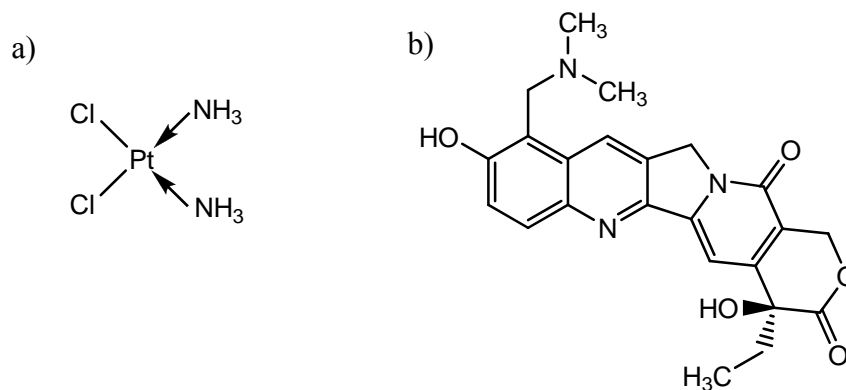
1.3.5 Hormoner



Figur 4 – Tamoksifen (4) (antiøstrogen)

Visse kreftformer har hormonavhengige tumorer som inneholder hormonreseptorer. I slike tilfeller kan hormonbehandling være effektivt. Det vil redusere tumorens vekst, og kunne indusere apoptose. Brystkreft (cancer mammae) er en hormonavhengig kreftform, og antiøstrogenterapi med tamoksifen (4) eller østrogenreduserende tiltak vil hindre at østrogenreseptorene stimuleres av sin naturlige ligand. Andre kreftformer hvor hormonbehandling er aktuelt er eggstokkreft og prostatakreft (Dahl et al. 1999).

1.3.6 Andre cytostatika



Figur 5 - a) Cisplatin (5), b) Topotekan (6)

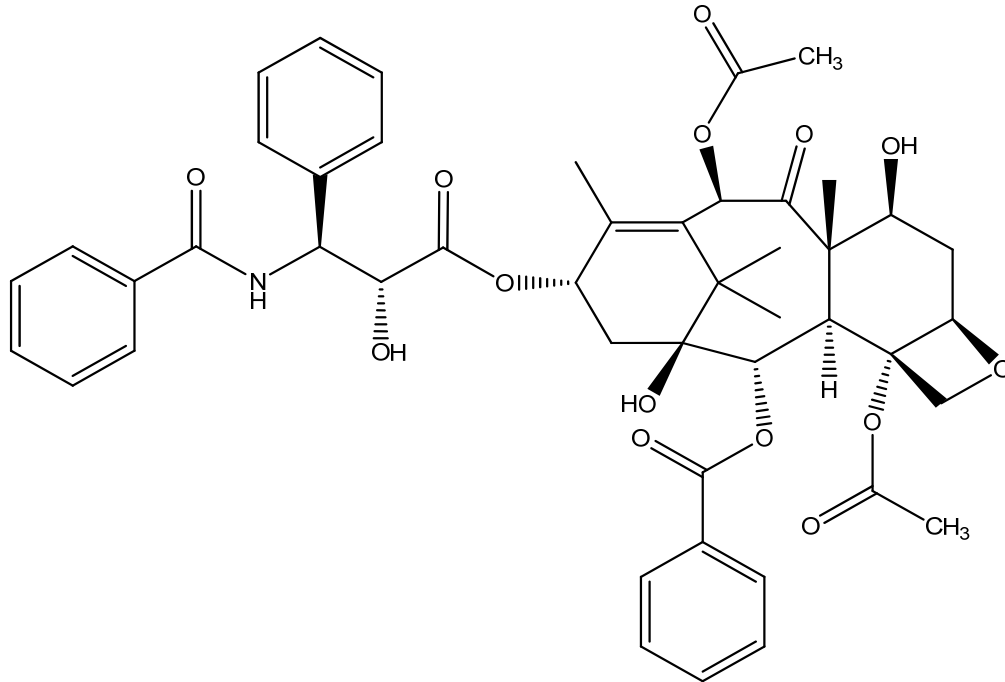
Platinaforbindelser (cisplatin (5), karboplatin) binder til DNA og fører til kryssbinding av DNA-molekyler. De har både cytotoxisk og antitumoreffekt. **Camptothecinanaloger** (topotekan (6), irinotekan) hemmer enzymet topoisomerase I, og induserer kjedebrudd i DNA. **Monoklonale antistoffer** har en spesifikk effekt og kan derfor være svært effektive. Slike legemidler tar lang tid å utvikle, men noen finnes på det norske markedet. Rituximab brukes i behandling av ulike typer lymfomer, og er rettet mot et antigen på B-cellene i immunsystemet. Det finnes også flere andre forbindelser med ulike strukturer og virkningsmekanismer som kan benyttes i kreftterapi (Dahl et al. 1999).

1.4 Mikrotubuli

Tubulin er et protein som finnes i alle eukaryote celler. Proteinet er en heterodimer bestående av to enheter: α -tubulin og β -tubulin. Tubulin polymeriserer og danner lange, rigide, hule rør kalt mikrotubuli. Mikrotubuli er en viktig del av cytoskjelettet i eukaryote celler. Det er ikke bare viktig for skjelettstrukturen, men deltar også i flere viktige prosesser i cellen: cellebevegelse, intracellulær transport, signaltransduksjon, kromosomsegregering ved mitose og bevegelse av eventuelle flageller og cilier. Mikrotubuli er essensielt for cellens overlevelse. Hvis man hemmer polymeriseringen av tubulin eller mikrotubuli på annen måte vil det føre til celledød (Alberts et al. 2002; Samuelsson 2004).

1.5 Hemmere av mikrotubuli

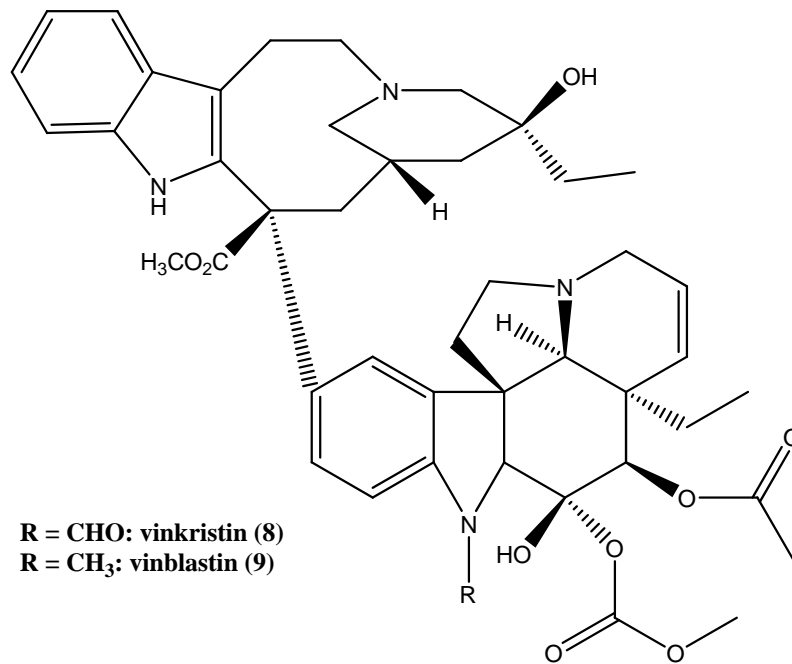
1.5.1 Paklitaxel



Figur 6 – Paklitaxel (7)

Paklitaxel (7) (Taxol™) er et legemiddel som ble isolert fra barken av barlinden *Taxus brevifolia* i USA på 1970-tallet. I dag fremstilles paklitaxel semisyntetisk fra 10-deacetyl-baccatin III som ekstraheres fra bladene på *Taxus bacata* og andre typer barlind. Paklitaxel brukes i Norge mot eggstokkreft og antracyclinresistent brystkreft. Legemiddelet er under utprøving mot flere tumorformer, og det endelige indikasjonsområdet er enda ikke klarlagt. Paklitaxel virker ved å binde seg til mikrotubuli og fikserer proteintrådene i ufunksjonelle posisjoner. Viktigst for effekten er imidlertid at mikrotubuli som er bundet til paklitaxel ikke separerer kromosomene under mitose, og celledelingen blokkeres (Samuelsson 2004).

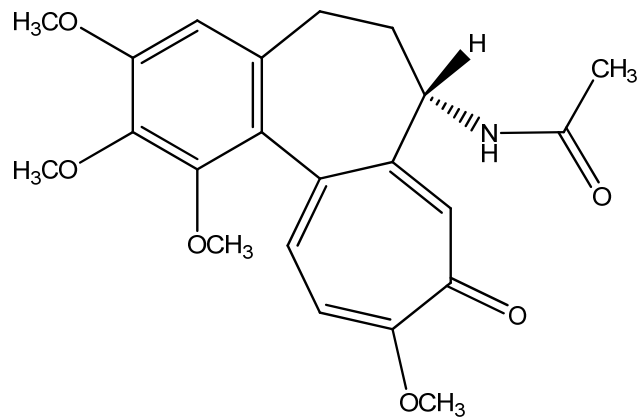
1.5.2 Vinkaalkaloider



Figur 7 – Vinkaalkaloider (8,9)

De viktigste vinkaalkaloidene er vinkristin (8), vinblastin (9) og vinorelbin. De kan isoleres fra plantene *Vinca rosea* og *Lochnera rosea*. Alkaloidene har vist å ha effekt ved flere kreftformer, men vinkristin er den mest bredspektrede av dem og brukes mot bl.a. akutt lymfatisk leukemi, maligne lymfomer, brystkreft og småcellet lungekarsinom. Den blir også brukt i behandling av akutt leukemi og andre tumorformer hos barn. Vinkaalkaloidene virker ved å binde seg til tubulinenhetene og forhindre polymerisering til mikrotubuli. Disse stoffene vil derfor i likhet med paklitaxel stanse celledeling ved mitose (Samuelsson 2004).

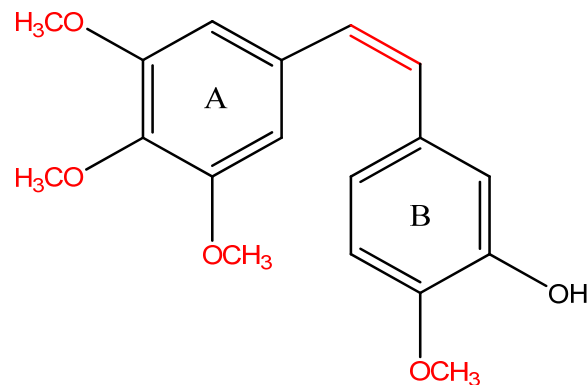
1.5.3 Kolkisin



Figur 8 – Kolkisin (10)

Kolkisin (10) er en substans som isoleres fra krokusartene *Colchicum autumnale* og *Gloriosa superba*. Kolkisin er et svært giftig naturprodukt, og bruken som legemiddel mot kreft er derfor lite utbredt. Det hemmer imidlertid migrering av inflammatoriske celler, og blir i Norge brukt mot urinsyregikt (Samuelsson 2004). Kolkisin virker ved å binde irreversibelt til frie tubulinheter og hemme polymerisering (Tron et al. 2006).

1.6 Combretastatin



Figur 9 - Combretastatin A-4 (**11**), områdene merket med rødt er viktige for struktur-aktivitetsforholdet

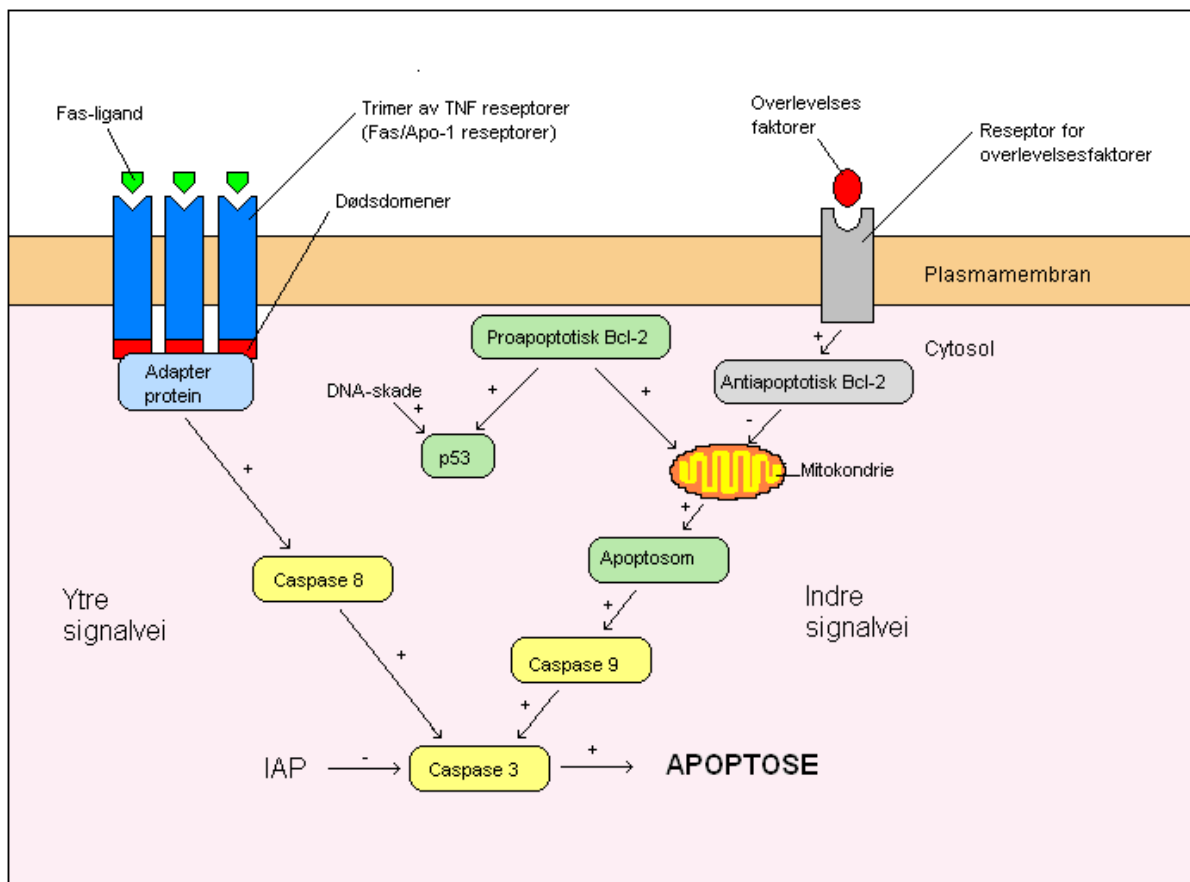
Combretastatin A-4 (CA-4, **11**) er et plantealkaloid fra det sørafrikanske treet *Combretum caffrum*. Stoffet ble isolert første gang i 1989, og har de siste årene blitt en attraktiv modell for forskning på nye legemidler mot kreft. CA-4 bindes til tubulinenhetene på samme sted som kolkisin, men med høyere affinitet (Petit et al. 2008). Stoffet hemmer derfor polymerisering til mikrotubuli. Denne hemmingen vil også forstyrre dannelse av nye blodkar i tumorer. Dette gjelder også for andre mikrotubulihemmere, men det er kun CA-4 som har en slik effekt ved konsentrasjoner lavere enn den høyeste tolererte dosen (Tron et al. 2006).

I tillegg til de tubulinhemmende egenskapene er CA-4 svært cytotoxisk mot flere humane krefttyper. Dette, sammen med stoffets enkle kjemiske struktur, gjør CA-4 til en godt egnet modell for videre forskning (Odlo & Hansen 2007).

Studier på struktur-aktivitetsforhold har vist at visse deler av den kjemiske strukturen til CA-4 er viktige for optimal cytotoxisk aktivitet (figur 9). Det må være en 3,4,5-trimetoksysubstituert A-ring og en 4-metoksysubstituert B-ring som er separert med en dobbeltbinding i *cis*-konfigurasjon. En av ulempene til CA-4 er at molekylet isomeriserer til *trans*-konfigurasjonen som er mindre aktiv (Odlo et al. 2008). De 3 delene av strukturen som er viktige for aktivitet er også de som er aktuelle for endringer ved syntese av CA-4 analoger (Tron et al. 2006).

1.7 Apoptose

Apoptose er en form for kontrollert, programmert celledød. Denne prosessen spiller en viktig rolle i utvikling og vedlikehold av vevshomeostase i friskt vev. Celler som er uønskede, skadede eller virusinfiserte begår selvmord ved aktivering av det intracellulære dødsprogrammet (Zimmermann et al. 2001). Apoptose spiller også en rolle i ulike sykdommer, for eksempel neurodegenerative (Alzheimers), autoimmune (multipel sklerose), virusinfeksjoner (AIDS) og hjerteinfarkt (Vermeulen et al. 2005).



Figur 10 - Signalveiene som fører til apoptose

De viktigste aktørene i apoptoseprosessen er caspasene, en familie av cysteinproteaser som eksisterer i inaktiv form i cellen. Det er to signalveier som kan føre til apoptose (figur 10). I den ytre signalveien er det stimulering av tumornekrosefaktorreseptorfamilien (TNFR), såkalte dødsreseptorer, som fører til celledød. Binding av ligand til reseptor fører til at

dødsdomenene aktiveres og binder adapterprotein. Dette proteinet aktiverer caspase 8, som igjen aktiverer caspase 3 (Rang et al. 2003).

I den indre signalveien er mitokondriene viktige. Ved for eksempel DNA-skade eller oksygenmangel vil de proapoptotiske medlemmene av Bcl-2 familien translokeres til mitokondriene og føre til frigjøring av cytokrom *c*. De antiapoptotiske medlemmene av Bcl-2 familien hemmer normalt cytokrom *c* frigjøringen når det er tilgang på overlevelsesfaktorer som for eksempel cytokiner og hormoner, men ved mangel på disse vil frigjøringen av cytokrom *c* øke (Zimmermann et al. 2001).

Apoptotisk proteaseaktiverende protein 1 (Apaf-1) binder seg til cytokrom *c* og danner et apoptosom. Dette aktiverer caspase 9, som igjen aktiverer caspase 3. Caspase 3 er en effektorcaspase som når den aktiveres setter i gang ødeleggelse av cellen ved blant annet fragmentering av DNA og inaktivering og kløyving av enzymer og andre viktige molekyler i cellen. Under denne prosessen sender cellen ut ulike signaler slik at restene av cellen tas opp av makrofager ved fagocytose (Rang et al. 2003).

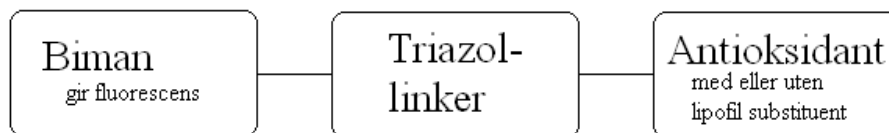
1.8 PC12 celler

PC12 celler er en cellelinje som ofte brukes i studier av apoptose og mekanismene som fører til celledød. PC12 celler er en sekundær neuronal cellelinje som opprinnelig kommer fra en svulst på binyrene, kalt feokromocytom, hos bestrålte rotter. Et feokromocytom er en neuroendokrin svulst som skiller ut store mengder katekolaminer, og PC12 cellene produserer og skiller ut katekolaminene dopamin og noradrenalin. PC12 celler som dyrkes med nervevekstfaktor (NGF) i mediet får egenskaper som ligner egenskapene til sympatiske nevroner. De brukes derfor som en modell for slike nerveceller i nevrobiologiske og nevrokjemiske forsøk (Greene 1976).

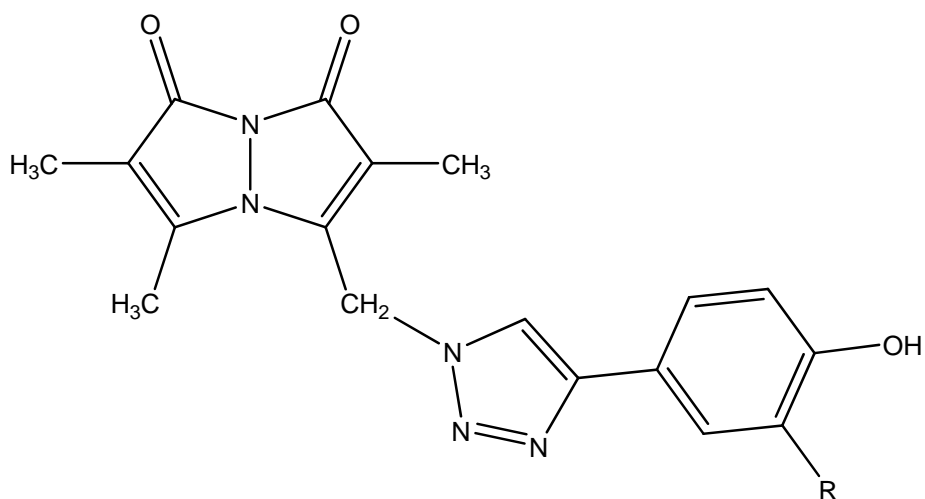
1.9 Hensikt med oppgaven

Målene med oppgaven har vært følgende:

- Syntetisere nye stoffer med 3 ønskede egenskaper (figur 11):
 1. Antioksidanteffekt – stoffene skal inneholde en fri OH-gruppe som kan fange opp radikaler i cellen (figur 12)
 2. Fluorescerende – stoffene skal ha en fluorescerende egenskap slik at deres posisjon og bevegelse i cellen kan detekteres med fluorescensmikroskopi (figur 12)
 3. Lipofilisitet – stoffene skal ha en lipofil sidekjede slik at de kan trenge gjennom cellemembranen (figur 12)
- Cytotoksisitetstesting av combretastatinanaloger i PC12-celler



Figur 11 – Oversikt over strukturinnhold i målstans



Figur 12 - Eksempel på målstans (12), R = lipofil substituent

2. Eksperimentelt

2.1 Kjemikalier

Produkt	Produsent
5-iodosalisylaldehyd	Sigma-Aldrich
Aceton	
Argon, Ar	AGA AS
Celitt	Fluka
Diklormetan	Sigma-Aldrich
Dimetylformamid tørr	
Etylacetat	Sigma-Aldrich
Farnesylbromid 95 %	Sigma-Aldrich
Heksan	Riedel-de Haën
Hydrogen, H ₂	
Kaliumkarbonat	Fluka
Kobbersulfat	
Litiumdiisopropylamid	
Magnesiumsulfat	Fluka
Metanol	Sigma-Aldrich
Metyl-4-hydroksybenzoat	
Monobromobiman	
Natriumascorbat	Fluka
Natriumazid	
Natriumiodid	
Natriumklorid	Fluka
Palladium på kull	
<i>Para</i> -metoksybenzaldehyd	
Sand	Fluka
Silika gel 60	Fluka
Tetrahydrofluoran tørr (THF)	

2.2 Utstyr

Automatpipetter

Cellekulturskåler, Nunclon strålesteriliserte

Digitalt termometer, IKA

Kolonner for flashkromatografi, Interflow

LAF-benk

Lysmikroskop, Nikon TMS type 104

Miniryster, IKA Works MS1 Minishaker

NMR spektrometer, Burker Spectrospin Avance DPX 300

Pipetter, Molecular BioProducts

Plateleser, HTS 700 Plus Bio-Assay reader, Perkin Elmer

Pumpe, Edwards

Rotavapor med vannbad, Büchi

Tellekammer, Burcker

TLC-plater

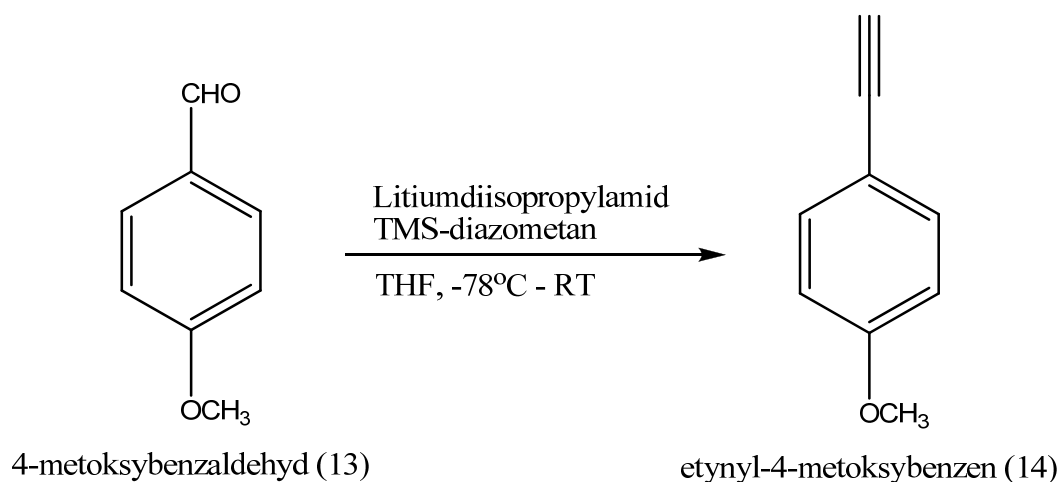
Varmeplate

Varmeskap Termaks

Vekt, Mettler toledo AG 204 Delta Range

2.3 Synteser

2.3.1 Syntese av etynyl-4-metoksybenzen (RE 001)



Skjema 1 - Syntese av etynyl-4-metoksybenzen (14)

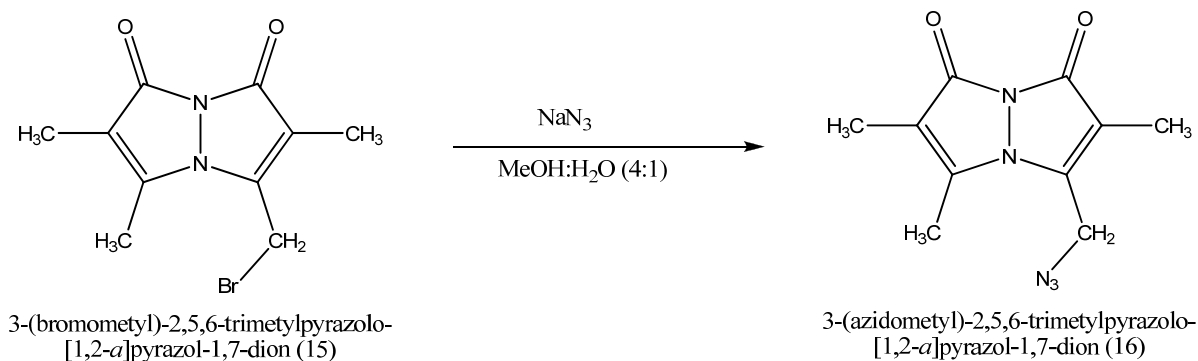
En 2.0 M løsning av TMS-diazometan (9.4 ml, 18.6 mmol) ble tilsatt dråpevis til en 1.8 M løsning av litiumdiisopropylamid (11.7 ml, 21.0 mmol) ved -78 °C (tørris/acetone).

Reaksjonsblandingen ble satt til røring i 3 timer før en løsning av *para*-metoksybenzaldehyd (2.042 g, 15 mmol) i tørr THF (30.0 ml) ble tilsatt. Den nye reaksjonsblandingen ble rørt i 44 timer mens tørris/acetone-badet gradvis ble fjernet. Brine (15.0 ml) ble tilsatt, og blandingen ble ekstrahert med etylacetat (60 ml × 3).

Den organiske fasen ble vasket med brine (60 ml × 3), tørket med MgSO₄ og dampet inn på rotavapor. Dette ga en brun væske. Det ble utført flash-kromatografi på silikagel med heksan:etylacetat (1:1) som eluent for de første 16 fraksjonene og heksan:etylacetat (2:1) for de resterende fraksjonene. Basert på TLC med heksan:etylacetat (2:1) som eluent ble fraksjonene 4-7 slått sammen og dampet inn på rotavapor. Dette ga en brun væske. Utbyttet var 2,135 g (107.8 %).

Det høye utbyttet skyldes mest sannsynlig at produktet ikke var tørket godt nok, og at det derfor fantes rester av løsningsmidler.

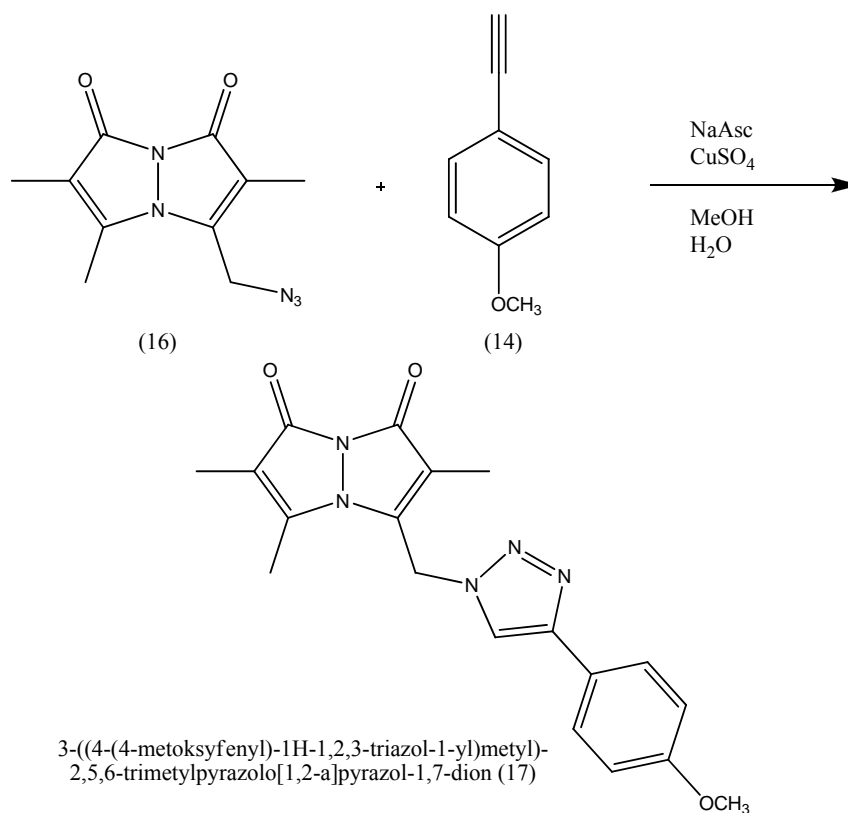
2.3.2 Syntese av 3-(azidometyl)-2,5,6-trimetylpyrazolo[1,2-a]pyrazol-1,7-dion (RE 002)



Skjema 2 - Syntese av bimanazid (16)

En løsning av natriumazid (89.9 mg, 1.383 mmol) i metanol:vann (4:1, 1.3 ml) ble tilsatt dråpevis til en løsning av monobromobiman (250 mg, 0.922 mmol) i THF (3.5 ml) over 25 minutter under røring ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter satt til røring i ytterligere 20 minutter. Den skiftet da farge fra gul til svak oransje. Blandingen ble dampet inn før vann (5 ml) ble tilsatt. Løsningen ble ekstrahert med diklormetan (10 ml × 5), og de samlede organiske fasene ble vasket med brine (10 ml), tørket med MgSO₄ og dampet inn på rotavapor. Dette ga et gult fast stoff. Utbyttet var 0.182 g (84.6 %).

2.3.3 Syntese av 3-((4-(4-metoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)metyl)-2,5,6-trimetylpyrazolo[1,2-a]pyrazol-1,7-dion (RE 003)

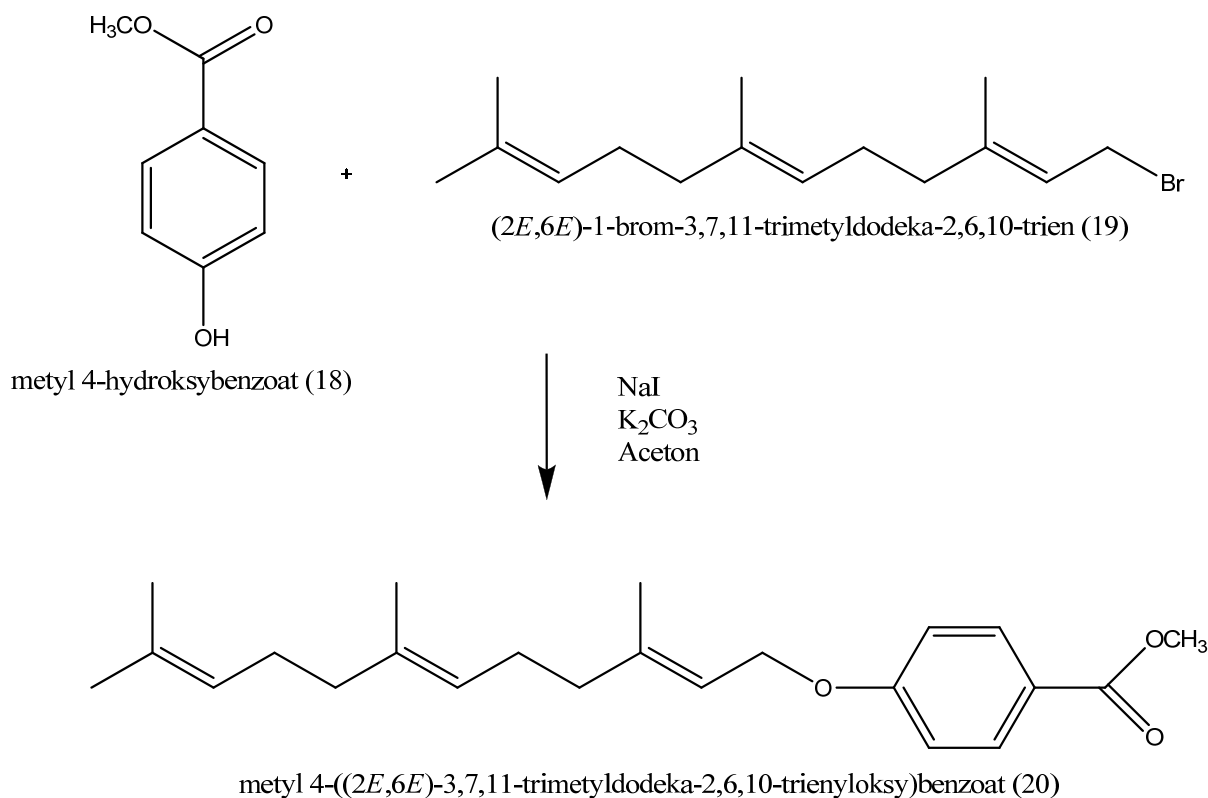


Skjema 3 - Syntese av 3-((4-(4-metoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)metyl)-2,5,6-trimetylpyrazolo[1,2-a]pyrazol-1,7-dion (17)

En 0.1 M løsning av bimanazid i metanol (1.0 ml) og en 0.1 M løsning av alkynet i metanol (1.0 ml) ble blandet i en vial under røring ved romtemperatur. Vann (1.0 ml) ble tilsatt, deretter natriumaskorbat (7.9 mg) og til slutt kobbersulfat (5.0 mg). Reaksjonsblandingen ble satt til omrøring i 5 timer før is ble tilsatt og blandingen ble satt i kjøleskap. Dette ga en finfordelt utfelling av et gult stoff.

Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat (15 ml × 4). De samlede organiske fasene ble vasket med NH₄Cl/NH₃-buffer pH 9 (15 ml × 3) og brine (15 ml), tørket med MgSO₄ og dampet inn på rotavapor. Dette ga klare, gule krystaller. Det ble utført flash-kromatografi på silikagel med diklormetan:etylacetat (1:10) som eluent for de første 47 fraksjonene og diklormetan:etylacetat (1:1) for de resterende fraksjonene. Basert på TLC med diklormetan:etylacetat (1:10) som eluent ble fraksjonene 11-51 slått sammen og dampet inn. Dette ga gulhvite krystaller. Produktet er fluoriserende i løsning. Utbyttet var 36 mg (98,6 %).

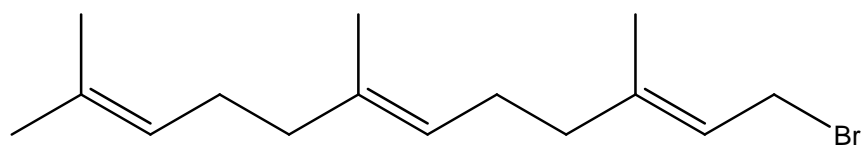
2.3.4 Syntese av metyl 4-((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trienyloksy)benzoat (RE 004)



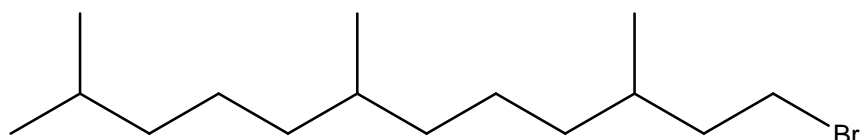
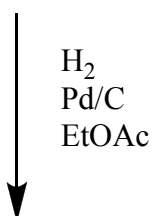
Skjema 4 - Syntese av metyl 4-((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trienyloksy)benzoat (20)

Farnesylbromid 95 % (2.0 g, 6.660 mmol) og natriumiodid (4.756 g) ble blandet med aceton (13 ml) i en tohalset rundkolbe (50 ml). Blandingen ble varmet til 60 °C med reflux. Reaksjonsblandingen ble mørk brun. Etter 45 minutter ble metyl-4-hydroksybenzoat (0.966 g, 6.343 mmol) og kaliumkarbonat (1.757 g) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble satt til røring ved 60 °C med reflux. Etter 1 time ble temperaturen redusert til 45 °C. Etter ytterligere 20 timer viste TLC at reaksjonen hadde stoppet opp. Det ble da tilsatt mer aceton (5 ml) og kaliumkarbonat (0.876 g) og temperaturen ble økt til 75 °C. Etter 1,5 timer viste TLC ingen endring, og det ble tilsatt tørr dimetylformamid (10 ml). Etter 24 timer viste TLC fremdeles ingen endring og reaksjonen ble avsluttet.

2.3.5 Syntese av 1-brom-3,7,11-trimetyldodekan (RE 005)



(2*E*,6*E*)-1-brom-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trien (19)

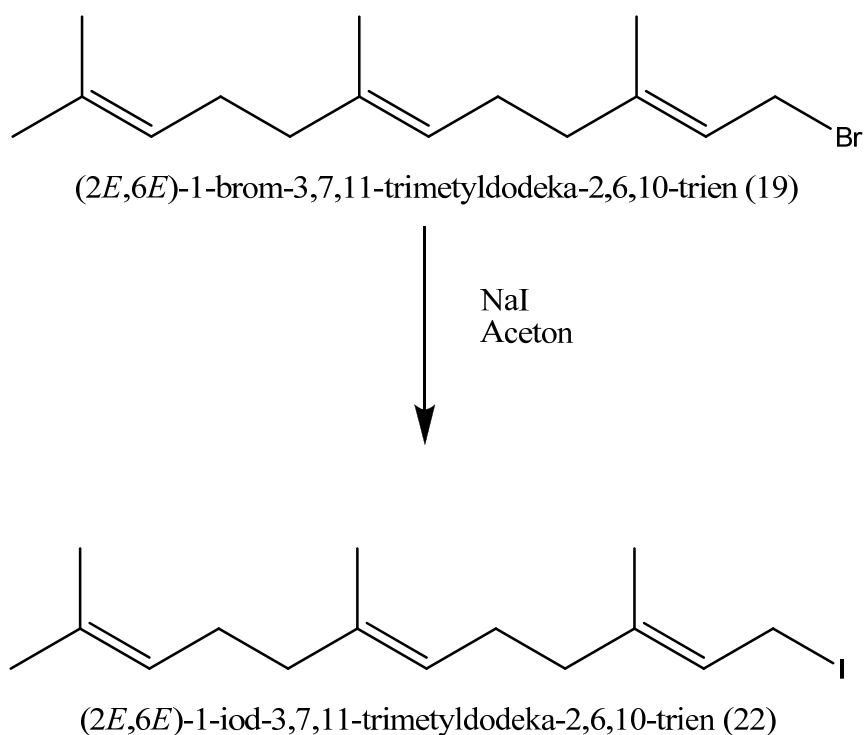


1-brom-3,7,11-trimetyldodekan (21)

Skjema 5 - Syntese av 1-brom-3,7,11-trimetyldodekan (21)

Palladium på kull (Pd/C, 190.5 mg) ble veid inn i en tohalset rundkolbe (100 ml). Under Ar-atmosfære ble etylacetat (20 ml) tilsatt med sprøyte slik at all Pd/C ble fuktet. Ar ble fjernet og farnesylbromid 95 % (500 µl, 1.665 mmol) ble tilsatt. Mer etylacetat (30 ml) ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble satt til røring ved romtemperatur under H₂-atmosfære. Etter 24 timer ble H₂-ballongen etterfylt og etter 48 timer ble reaksjonen avsluttet. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom celitt som var fuktet med etylacetat, vasket med etylacetat og dampet inn på rotavapor. Utbyttet var 498 mg (97,6 %).

2.3.6 Syntese av (2E,6E)-1-iod-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trien (RE 006)

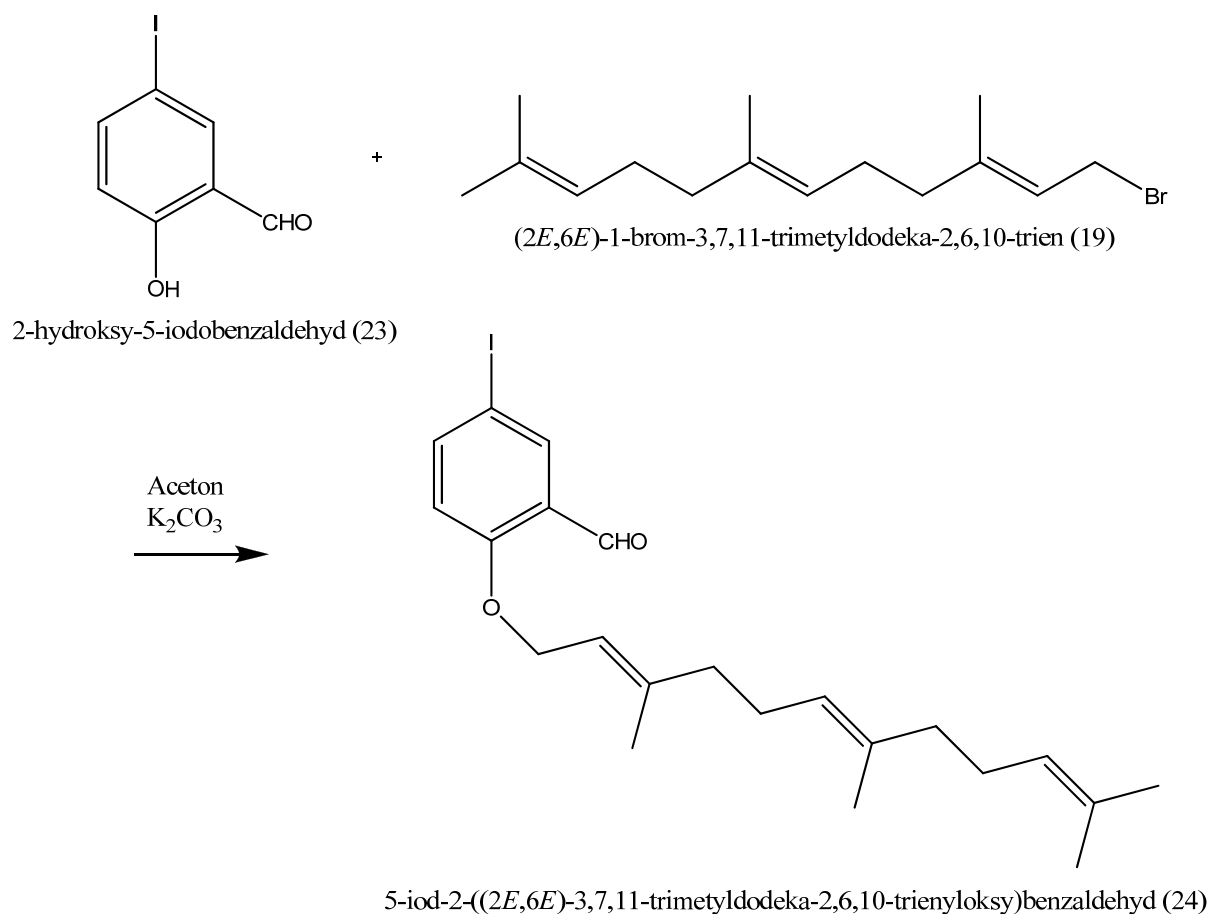


Skjema 6 - Syntese av farnesyliodid (22)

Farnesylobromid 95 % (500 μ l, 1.665 mmol), natriumiodid (1.3183 g, 8.795 mmol) og aceton (5 ml) ble blandet i en rundkolbe (25 ml). Reaksjonsblandingen ble satt til røring ved 60 °C med reflux. Etter 20 timer viste TLC, med etylacetat:heksan (1:10) som eluent, en viss endring, og reaksjonen ble avsluttet. Et bunnfall ble filtrert fra, og restene ble dampet inn på rotavapor. Dette ga gulsorte krystaller.

Det ble utført flash-kromatografi på silikagel med etylacetat:heksan (1:10) som eluent. Basert på TLC med etylacetat:heksan (1:10) som eluent ble fraksjonene som inneholdt produktet slått sammen og dampet inn. Dette ga en oransje olje. Utbyttet var 258 mg (44,3 %).

2.3.7 Syntese av 5-iod-2-((2E,6E)-3,7,11-trimetyldodeka-2,6,10-trienyloksy)benzaldehyd (RE 008)



Skjema 7 - Syntese av 5-iod-2-farnesylobenzaldehyd (24)

5-iodosalicylaldehyd (453 mg, 1.760 mmol) ble løst i aceton (6 ml) i en rundkolbe (25 ml). Farnesylobromid (500 µl, 1.665 mmol) ble tilsatt dråpevis under røring. Reaksjonsblandingen ble satt til røring ved 60 °C med reflux. Etter 1 time ble kaliumkarbonat (732 mg, 5.296 mmol) tilsatt, og reaksjonsblandingen ble satt til røring ved 60 °C i ytterligere 1,5 time. Vann (10 ml) ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat (10 ml × 2). De samlede organiske fasene ble vasket med brine (10 ml), tørket med MgSO₄, og dampet inn på rotavapor. Dette ga en gul olje. Utbyttet var 885 mg (111.2 %).

Det høye utbyttet skyldes trolig at produktet ikke ble tørket godt nok og derfor inneholdt rester av løsningsmidler.

2.4 Deteksjon av celledød

2.4.1 Splitting av PC12- celler

Tabell 1 - PC12 medium med serum

Føtalt kalveserum	50 ml
Hesteserum	25 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin-streptomycin	5 ml
Dulbeccos MEM	500 ml

Prosedyre:

1. Gammelt medium helles ut
2. 10 ml nytt PC12 medium tilsettes
3. Flasken bankes på siden til cellene løsner (kontroller i mikroskop at de er løse)
4. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger slik at eventuelle celleaggregater løses. Denne cellesuspensjonen brukes både til å lage nye flasker og til å lage skåler
5. Hvis man skal lage ny flaske tilsettes 2 ml av cellesuspensjonen og 20 ml nytt PC12 medium til hver flaske
6. Hvis man skal lage skåler er det nødvendig å vite tettheten til cellesuspensjonen. Denne finner man ved å ta ut en liten prøve og telle cellene i prøven i et tellekammer. Celletettheten i skålene skal være 7×10^4 celler/ml. For å finne ut hvor mye man skal ta ut av suspensjonen til et bestemt antall skåler brukes følgende formel:

$$\frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times 7 \times 10^4}{\text{antall celler i tellekammer} \times 10^4}$$

2.4.2 Eksponering av stoffer

Løsninger med ulike konsentrasjoner av de aktuelle stoffene løst i dimetylsulfoksid (DMSO) tilsettes skåler med celler i vekst og skåler med konfluente celler, det vil si at cellene har vokst tett og dekker hele skålens flate. Etter 48 timers eksponering farges cellene for deteksjon av eventuell celledød. Det gjøres 3 paralleller av alle forsøk, med DMSO som kontroll. Alle stoffene som ble testet (figur 13) er syntetisert av stipendiat Kristin Odlo ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo (Odlo et al. 2008).

2.4.3 Farging og telling av celler

Tabell 2 - Løsninger brukt til farging

2 % stamløsning trypanblå:	
Trypanblå	1,0 g
Destillert vann	50 ml
NaCl stamløsning (1,8 g/100 ml):	
Natriumklorid (NaCl)	1,8 g
Destillert vann	100 ml

Prosedyre for farging av cellene:

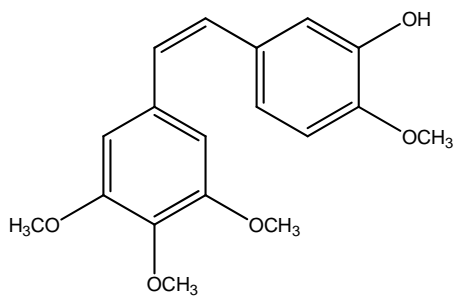
1. 1,0 g trypanblå og 50 ml destillert vann tilsettes i en 100 ml erlenmeyerkolbe. Løsningen varmes opp til kokepunktet under omrøsting og settes til avkjøling ved romtemperatur.
2. Løsningen filtreres og oppbevares i romtemperatur til senere bruk.
3. 1 del 2 % stamløsning trypanblå blandes med 1 del stamløsning NaCl (1,8 g/100 ml)
4. Fargeløsningen tilsettes skålene slik at forholdet mellom trypanblåløsning og cellekulturmedium blir 1:4, det vil si 250 µl trypanblåløsning per ml medium.
5. Skålene inkuberes ved 37 °C i 30 minutter.

Prosedyre for telling av cellene:

1. Medium og fargestoff helles av.
2. Skålene telles i mikroskop på 40× forstørrelse. Det telles antall blå celler (døde celler) og antall celler som ikke har tatt opp fargestoff (levende celler). Det telles i alt 100-200 celler per skål, tilfeldig fordelt 4-5 steder på skålen.

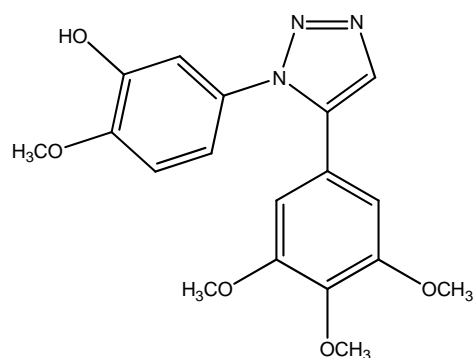
2.4.4 Stoffer som ble testet for cytotoksisitet

CA-4



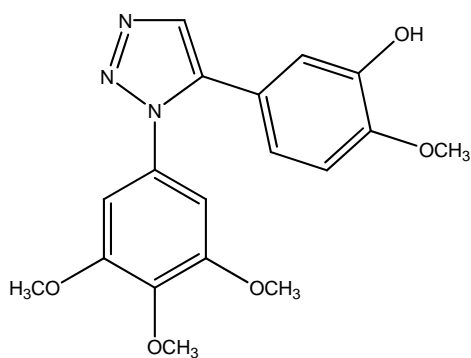
(Z)-2-metoksy-5-(3,4,5-trimetoksystryryl)fenol (11)

KO 124I



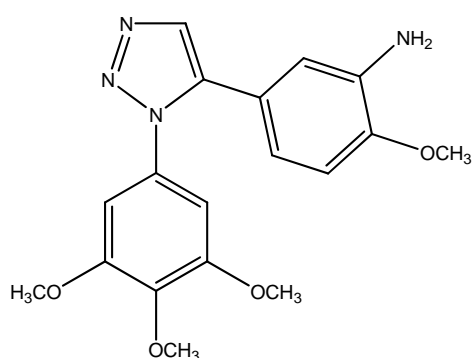
2-metoksy-5-(5-(3,4,5-trimetoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)fenol (25)

KO 122



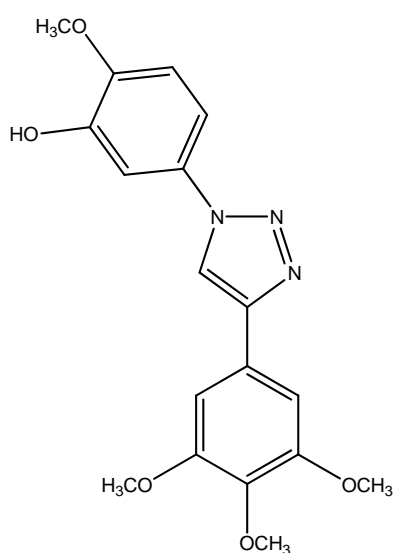
2-metoksy-5-(1-(3,4,5-trimetoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)fenol (26)

KO 163



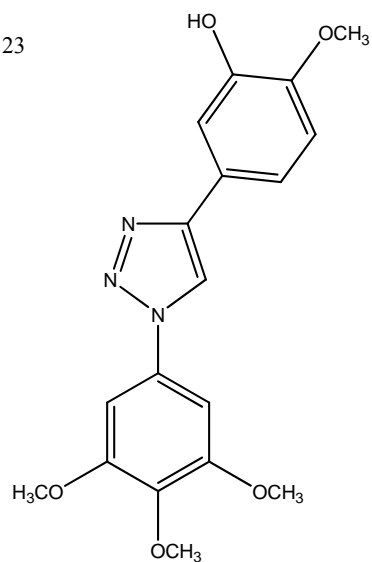
2-metoksy-5-(1-(3,4,5-trimetoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)anilin (27)

KO 114I



2-metoksy-5-(4-(3,4,5-trimetoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)fenol (28)

KO 123



2-metoksy-5-(1-(3,4,5-trimetoksyfenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)fenol (29)

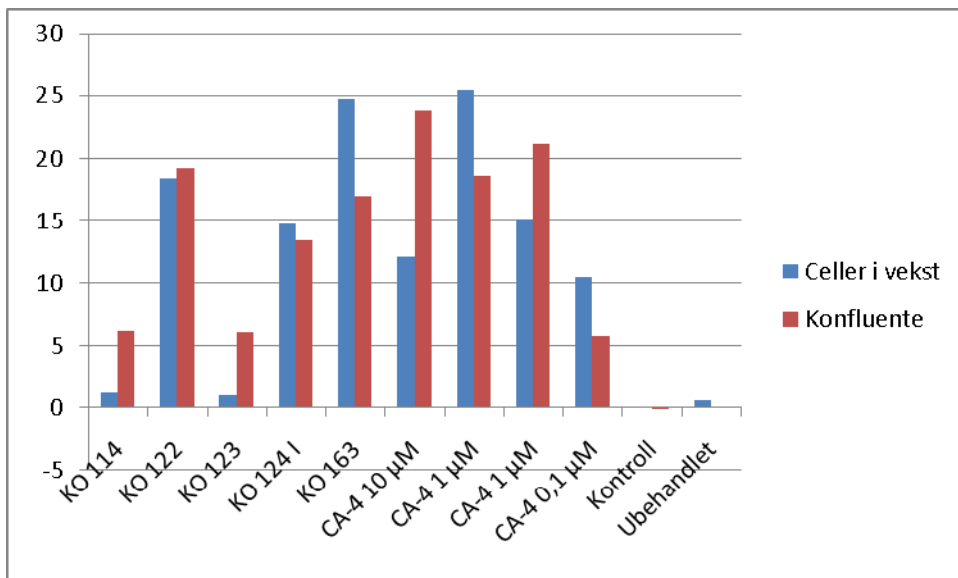
Figur 13 - Stoffer som ble testet for cytotoksisitet

2.5 Resultater cytotoksisitet

2.5.1 Forsøk 1

Stoffene ble testet med samme konsentrasjon, 10 μM , i alle skålene for å se om det er forskjell på cytotoksisiteten i konfluente celler og i celler i vekst. For CA-4 ble det testet 3 ulike konsentrasjoner: 0.1 μM , 1 μM og 10 μM .

Tabell 3 – Forsøk 1 – celler i vekst og konfluente

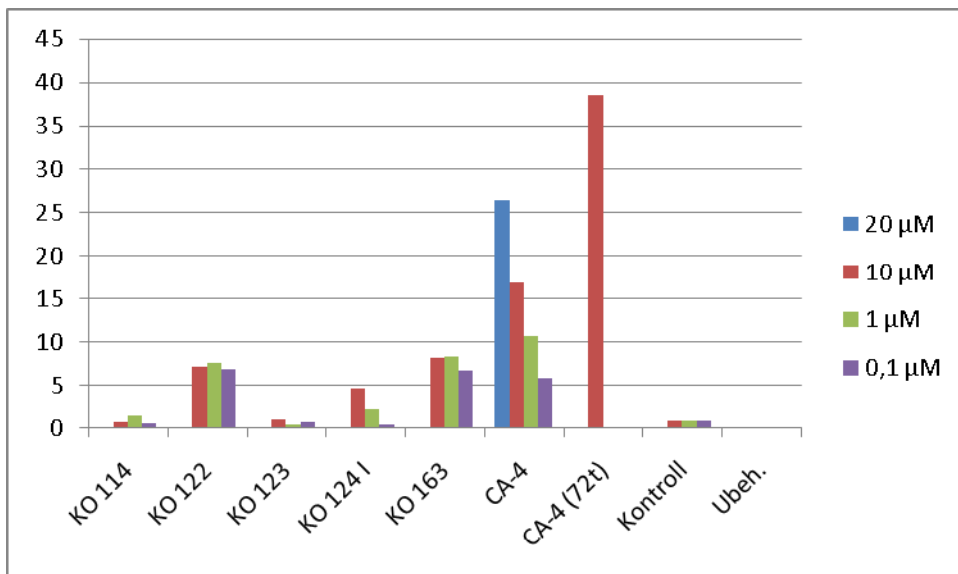


Stoffene viser en variert grad av celledød. Noen har høyest celledød i konfluente skåler, mens andre har høyest i skåler med celler i vekst. For CA-4 er det også forskjellig for de ulike konsentrasjonene. Stoffene KO 122, KO 163 og CA-4 viste høyest cytotoksisitet, mens KO 114 I og KO 123 viste lavest.

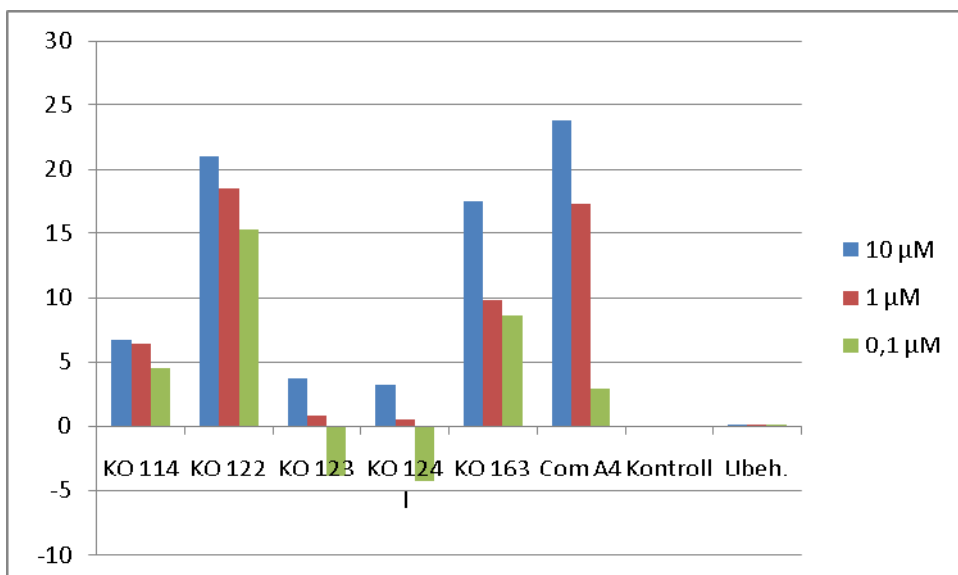
2.5.2 Forsøk 2

Alle stoffene ble testet med 3 ulike konsentrasjoner: 0.1 μM , 1 μM og 10 μM . I tillegg ble det utført målinger på CA-4 10 μM etter 72 timer og CA-4 20 μM etter 48 timer på celler i vekst.

Tabell 4 – Forsøk 2 - celler i vekst



Tabell 5 – Forsøk 2 - konfluente celler

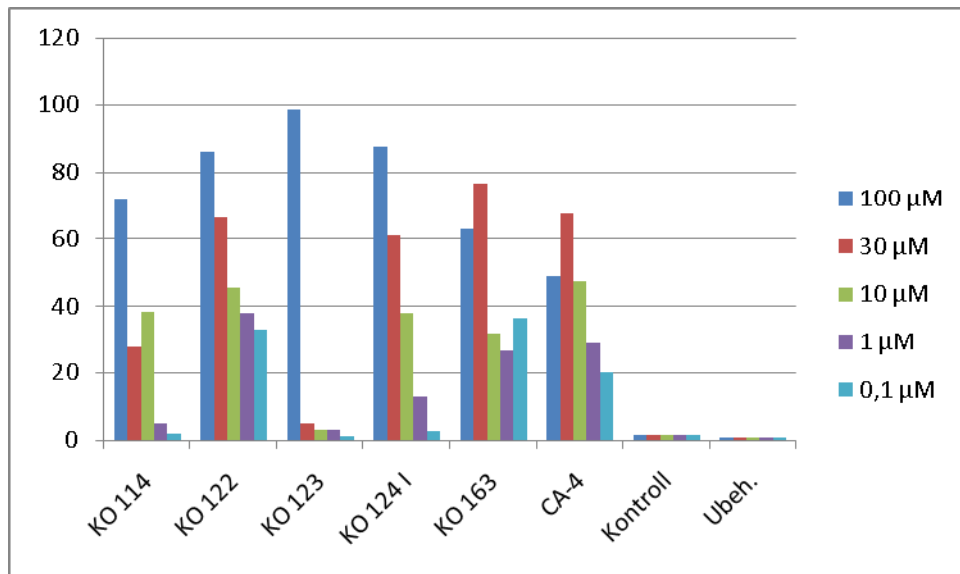


De fleste stoffene viser høyere cytotoxissitet ved økende konsentrasjoner. CA-4 etter 72 timer viser også en høyere cytotoxissitet enn samme konsentrasjon etter 48 timer. KO 122, KO163 og CA-4 ga høyest cytotoxissitet både i celler i vekst og i konfluente celler.

2.5.3 Forsøk 3

Celler i vekst: Alle stoffene ble testet med 5 ulike konsentrasjoner: 0.1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM og 100 μM . Det ble valgt høyere konsentrasjoner enn i de tidligere forsøkene for å se om noen av stoffene kunne gi 100 % celledød.

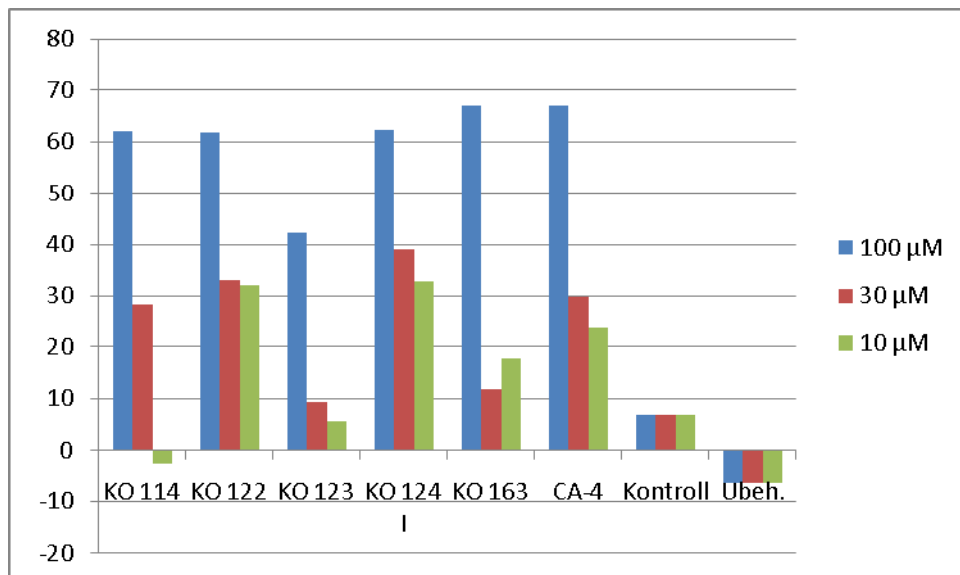
Tabell 6 – Forsøk 3 - celler i vekst



For alle stoffene er det tendenser til økende dødelighet ved økende konsentrasjoner. Ved de laveste konsentrasjonene gir KO 122, KO 163 og CA-4 en høyere celledød enn de andre stoffene. Ved 100 μM gir KO 114 I og KO 123 også en høy celledød, KO 123 på nesten 100 %.

Konfluente celler: Alle stoffene ble testet med 3 ulike konsentrasjoner: 10 μM , 30 μM og 100 μM .

Tabell 7 – Forsøk 3 - konfluente celler



Ved de laveste konsentrasjonene er det KO 122, KO 124 og CA-4 som gir høyest celledød, men ved 100 μM gir alle stoffene bortsett fra KO 123 en celledød på over 60 %.

3 Diskusjon

3.1 Synteser

I den første reaksjonen (skjema 1) var målet å syntetisere alkynet **14** fra aldehydet **13** med en Colvin reaksjon (Miwa et al. 1993). Reaksjonen gikk som forventet. Den andre reaksjonen (skjema 2) var syntese av bimanazidet **16** fra bimanbromid **15**. Dette var en enkel og rask reaksjon, og utbyttet ble relativt høyt.

Den neste syntesen var en klikkreaksjon, det vil si en reaksjon som er enkel å gjennomføre og hvor det kun benyttes godt kjente metoder og materialer (Kolb & Sharpless 2003). Målet med reaksjonen var å koble sammen **14** og **16** ved en sykloaddisjonsreaksjon mellom azidet og alkynet under dannelse av en 1,4-disubstituert 1,2,3-triazol (skjema 3). Den nye substansen **17** hadde fluorescerende egenskaper, men molekylet hadde ingen lipofile eller radikalfangende grupper. De første forsøkene viste at reaksjonen mellom azid og alkyn fungerte greit, og det var da aktuelt å prøve å koble bimanazidet til alkyner med andre substituenten for å få et molekyl med ønskede egenskaper.

Målet med den neste reaksjonen (skjema 4) var å koble en lipofil kjede **19** til et benzaldehyd **18**, som senere kunne konverteres til et alkyn ved Colvin reaksjon. Reaksjonen måtte avsluttes uten at ønsket produkt ble dannet. Neste trinn i studien ble å fjerne dobbeltbindingene i farnesylbromid **19** med hydrogenering (skjema 5). Det ble et høyt utbytte, men NMR-analyser viste at produktet inneholdt flere forurensninger og løsningsmiddelrester. Det ble derfor valgt å ikke gå videre med dette produktet.

En mulig årsak til at reaksjonene med **19** ikke gikk som forventet kan være at det hadde skjedd en polymerisering av farnesylbromid. Det ble derfor valgt å gjøre en Finkelstein reaksjon (Finkelstein 1910) med nukleofil substitusjon av bromid (Br) med jod (I) (skjema 6). Jod er mindre reaktivt enn brom, og dette produktet **22** kunne være mer stabilt under reaksjonene. Denne reaksjonen gikk heller ikke som forventet.

Den siste syntesen som ble utført i denne studien var en kobling av **19** til et hydroksyiodobenzaldehyd **23** (skjema 7). Produktet fra denne reaksjonen kunne brukes videre i en reaksjon hvor aldehydet kunne reduseres til en hydroksylgruppe og iodidet omdannes til et alkyn. Dette kunne så blitt koblet til bimanazidet **16** ved en klikkreaksjon som i skjema 3.

3.2 Cytotoksisitetstesting

3.3.1 PC 12 celler

Det er to typer cellekulturer som benyttes i studier, primærkulturer og cellelinjer.

Primærkulturer er celler som høstes direkte fra dyr og sås ut i skåler. Slike kulturer har kort varighet og de vil være mindre homogene enn cellelinjer. I en cellelinje stammer alle cellene fra en enkelt celle, og homogeniteten og reproduserbarheten blir derfor bedre enn for primærkulturer. De er tilpasset å vokse i kultur og kan fortsette å dele seg uendelig hvis de riktige betingelsene legges til rette.

Når en cellelinje får vokse tilnærmet uendelig i en kultur vil den få færre differensierende egenskaper, og den vil ligne mer på kreftceller. PC12 celler er derfor en god modell for studier på nye mulige legemidler mot kreft. PC12 celler er en god modell for å studere apoptose og mekanismene som er involvert i programmert celledød. I denne studien ble apoptose induisert ved å tilsette combretastatin A-4 og CA-4 analoger.

3.3.2 Deteksjon av celledød

I denne studien ble farging med trypanblå valgt som metode for deteksjon av celledød. Da de eksponerte cellene ble farget med trypanblå var det flere celler som løsnet, hovedsakelig fra skålene med konfluente celler. Cellene ble telt på gjenværende konfluente områder, men dette gir en usikkerhet i resultatene. Det er sannsynlig at de døde cellene løsner lettere enn de levende, og resultatene kan derfor ha vært høyere enn det som ble registrert. Det bør gjøres flere studier, eventuelt med andre metoder for deteksjon av celledød, før eventuelle konklusjoner kan trekkes.

Celledød ble detektert etter 48 timers eksponering av de aktuelle stoffene. Tidligere studier har vist at det er lite eller ingen celledød etter 24 timer, men høy celledød etter 48 timer (Tran 2007). At det tar så lang tid betyr at celledøden er avhengig av at cellene må gjennom en cellesyklus, noe som kan bekrefte at cellene dør ved apoptose. I et av forsøkene ble cellene eksponert for CA-4 i 72 timer (tabell 4), noe som ga en andel døde celler dobbelt så stor som ved 48 timers eksponering med samme konsentrasjon. Det kan derfor være aktuelt å gjøre studier med lengre eksponeringstid for flere av stoffene.

3.3.3 Cytotoksisitet og struktur-aktivitetsforhold

Tidligere studier har vist at CA-4 har høy cytotoxiskitet for ulike celletyper (Nabha et al. 2000). Det ble derfor ventet å finne en viss cytotoxiskitet også i denne studien. Forsøkene viste at man må opp i høye konsentrasjoner av de aktuelle substansene for å få nærmere 100 % celledød (tabell 6). Man kan også se at andelen av cellene som dør ved apoptose øker ved økende konsentrasjoner.

Substansene som ble testet i denne studien, ved siden av CA-4 (**11**), var analoger hvor *cis*-dobbeltbindingen er erstattet med en 1,2,3-triazol (figur 11). Resten av molekylet, det vil si de aromatiske ringene og deres substituenten er beholdt, bortsett fra i **27**, hvor OH-gruppen er erstattet med en NH₂-gruppe. Fra resultatene i denne studien er det ikke mulig å si om denne substituenten er viktig for substansenes cytotoxiskitet.

Substansene **11**, **26** og **27** ga en høyere celledød enn de andre stoffene. **26** og **27** har nesten samme kjemiske struktur. Den eneste forskjellen er en av substituentene på ring B. Disse stoffene har samme avstand mellom de to aromatiske ringene som **11**. Det har også **25**, men plasseringen av de aromatiske ringene på triazolen er motsatt fra **26** og **27**. **25** gir en lavere celledød enn de to andre stoffene, men likevel høyere enn **28** og **29**. Disse to stoffene har en lengre avstand mellom de to aromatiske ringene enn de andre stoffene. Tidligere studier har vist at avstanden mellom ringene er viktig for effekten (Hsieh et al. 2005).

4 Konklusjon

Denne studien har vist at strukturforholdene i CA-4 analoger har betydning for stoffenes cytotoxiske egenskaper. Avstanden mellom de aromatiske ringene i molekylet er viktig for effekt, noe også tidligere studier kan bekrefte. Plasseringen av ringene på triazolen synes også å påvirke stoffets cytotoxisitet. Denne studien er ikke stor nok til at endelige konklusjoner kan trekkes, men den gir en god indikasjon på hva man bør legge vekt på i videre studier.

5 Referanser

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): *The Molecular Biology of the Cell*. USA, Garland Science (New York), 4. utgave
- Bjerkvig R (2000): *Angiogene mekanismer ved kreft*. Tidsskrift for Den norske legeforening 29, s. 3501
- Dahl O (red.), Christoffersen T (red.), Kvaløy S (red.), Baksaas I (red.) (1999): *Elektronisk utgave av cytostatikaboken*. URL: <http://www.med.uio.no/rh/farmakoterapi/cytostatika>. [Lesedato: 19.01.2009]
- Ducki S, Mackenzie G, Lawrence NJ, Snyder JP (2005): *Quantitative Structure–Activity Relationship (5D-QSAR) Study of Combretastatin-like Analogues as Inhibitors of Tubulin Assembly*. Journal of Medicinal Chemistry 48, 457-465
- Finkelstein H (1910): *Chemische Berichte* 43, s. 1528
- Greene LA, Tischler AS (1976): *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells that respond to nerve growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 7, s. 2424-2428
- Hsieh HP, Liou JP, Mahindroo N (2005): *Pharmaceutical Design of Antimitotic Agents Based on Combretastatins*. Current Pharmaceutical Design, 13, s. 1655-1677
- Kolb HC, Sharpless KB (2003): *The growing impact of click chemistry on drug discovery*. Drug Discovery Today 24, s. 1128-1137
- Miwa K, Aoyama T, Shioiri T (1994): *Extension of the Colvin Rearrangement Using Trimethylsilyldiazomethane. A New Synthesis of Alkynes*. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Japan
- Nabha SM, Wall NR, Mohammad RM, Pettit GR, Al-Katib AM (2000): *Effects of combretastatin A-4 prodrug against a panel of malignant human B-lymphoid cell lines*. Anticancer Drugs 11, s. 385-392
- Odlo K, Hansen TV (2007): *Forskning på tubulinhemmere som potensielt nye anticancer-legemidler*. Norsk Farmasøytisk Tidsskrift 7-8, s. 12
- Odlo K, Henzen J, Chabert JF, Ducki S, Gani O, Sylte I, Skrede M, Flørenes VA, Hansen TV (2008): *1,5-Disubstituted 1,2,3-triazols as cis-restricted analogues of combretastatin A-4: Synthesis molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, s. 4829-4838
- Ojima I, Das M (2009): *Recent Advances in the Chemistry and Biology of New Generation Taxoids*. Journal of Natural Products 72, s. 554-565

- Petit I, Karajannis MA, Vincent L, Young L, Butler J, Hooper AT, Shido K, Steller H, Chaplin DJ, Feldman E, Rafii S (2008): *The microtubule-targeting agent CA4P regresses leukemic xenografts by disrupting interaction with vascular cells and mitochondrial-dependent cell death*. Blood 111, s. 1951-1961
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2003): *Pharmacology*. Storbritannia, Elsevier Science, 4. Utgave
- Salmon BA, Siemann DW (2007): *Characterizing the Tumor Response to CA4P Treatment*. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 68, s. 211-217
- Samuelsson G (2004): *Drugs of Natural Origin*. Sverige, Kristianstads boktryckeri, 5. Utgave
- Tran DBT (2007): *Syntese og biologisk testing av tubulinhemmere og antioksidanter*. Hovedoppgave i farmasi (Cand.pharm.), Universitetet i Oslo
- Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA (2006): *Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions* 11, s. 3033-3044
- Vermeulen K, Bockstaele DRV, Berneman ZN (2005): *Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer*. Annals of Hematology 84, s. 627-639
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001): *The machinery of programmed cell death*. Pharmacology & Therapeutics 92, s. 57-70