

Étude de dérivés 5-arylidène-2-thiohydantoïnes à potentialité immunomodulatrice et anticancéreuse

V Chazeau¹, M Cussac^{1*}, A Boucherle²

¹Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Groupe de Pharmacochimie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, 38700 La Tronche;

²Laboratoire de Chimie Organique, Groupe de Pharmacochimie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, 38240 Meylan, France

(Reçu le 13 juillet 1990; accepté le 28 janvier 1992)

Résumé — Des 5-arylidène-2-thiohydantoïnes diverses, substituées ou non sur l'azote N3 et/ou sur le soufre, ont été préparées par une réaction d'aldolisation-crotonisation à partir d'aldéhydes aromatiques ou de cétones cycliques et de 2-thiohydantoïnes. Ces produits, originaux pour une grande part, préparés comme potentiellement actifs sur les phénomènes inflammatoires chroniques impliquant l'immunité à médiation cellulaire, développent une activité immunosuppressive qui reste cependant nettement inférieure à celle de la ciclosporine. L'activité anticancéreuse recherchée dans quelques cas n'a été détectée de façon manifeste pour aucun des produits essayés.

Summary — **Study of 5-arylidene-2-thiohydantoins with potential immunomodulating and anticancer activities.** Various 5-arylidene-2-thiohydantoins, N3-substituted and/or S-substituted or not, were synthesized by aldolisation-crotonisation reaction from aromatic aldehydes or cyclic ketones and 2-thiohydantoins. These products, largely original, prepared as potentially active on chronic inflammatory diseases involving cellular-mediated immunity, display immunosuppressive activity which, however, remains clearly lower than ciclosporine's one. Searched in a few cases, anticancer activity is not obviously detected for any of tested products.

2-thiohydantoïnes / immunomodulator / anticancer agents

Le lévamisole, de structure imidazothiazolique (schéma 1), est un médicament immunomodulateur [1–3] qui a été utilisé pour le traitement d'inflammations chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde mettant en jeu un processus immunitaire de type cellulaire proche de l'hypersensibilité retardée [4]. Nos recherches ont été orientées vers les composés imidazolés soufrés et plus particulièrement vers les 2-thiohydantoïnes [5], car le soufre et la structure imidazole sont souvent retrouvés dans les structures de médicaments actifs sur le système immunitaire et potentiellement utiles pour les maladies inflammatoires chroniques.

Ainsi, le métabolite principal du lévamisole, l'OMPI: (2-oxo-3-(2-mercaptoéthyl)-5-phénylimidazolidine, composé imidazolé substitué par un groupement porteur d'une fonction S-H libre, exalte le pouvoir de phagocytose des macrophages [6, 7] et interfère avec les microtubules dont il favorise la polymérisation [8].

Le méthimazole, médicament antithyroïdien de structure 2-mercapto imidazole, possède une activité secondaire immunodépressive qui a été utilisée en thé-

rapeutique [9]. La phénytoïne améliore le score clinique des rhumatisants atteints de polyarthrite rhumatoïde [10]. Une activité anticancéreuse intéressante a été trouvée pour la spiromustine, moutarde à l'azote de structure spirohydantoïne [11], et pour la merbarone, de structure 2-thiobarbiturique [12]. Des propriétés antivirales ont été relevées pour des 5-arylidènehydantoïnes (contre rhinovirus, echovirus) [13] et pour la métisazone, médicament de structure ouverte thiosemicarbazide [14].

L'examen de la structure de ces médicaments (schéma 1) nous a conduit à retenir pour notre étude le motif 2-thiohydantoïne, qui nous a semblé susceptible d'être un « dénominateur commun », pharmacophore potentiel d'une activité sur le système immunitaire. Nous avons conduit une étude similaire avec d'autres produits apparentés [15].

Chimie

Les 5-arylidène-2-thiohydantoïnes ont été préparées par une réaction de condensation d'aldéhydes aromatiques ou de cétones cycliques avec la 2-thiohydantoïne et son dérivé N-3-phényl (schémas 2 et 3).

*Correspondance et tirés à part

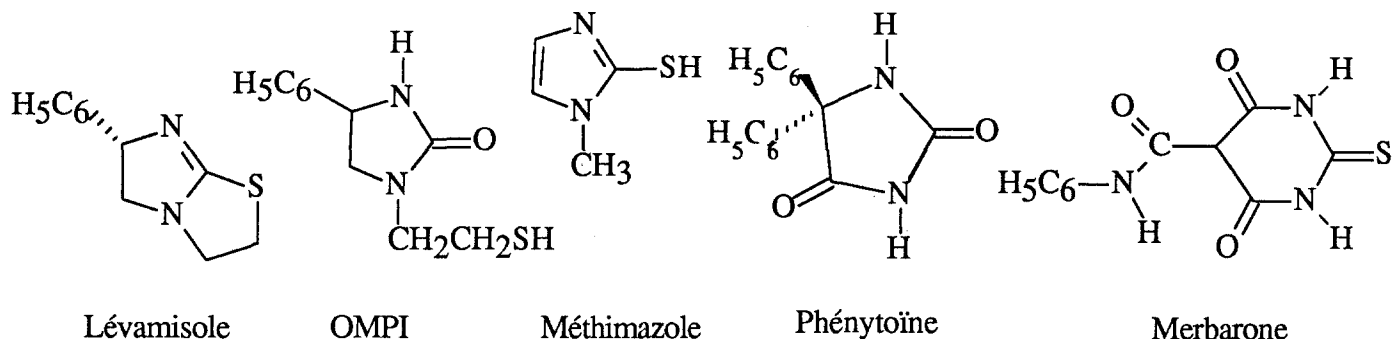


Schéma 1.

Cette réaction d'aldolisation-crotonisation, réalisée en milieu acide, permet d'obtenir assez facilement les produits attendus. Par contre, les aldéhydes et les cétones aliphatiques réagissent très mal ou pas du tout [16]. En effet la bonne réactivité, en série aromatique, est probablement liée, lors de la catalyse acide, à une stabilisation du carbocation d'aldéhyde ou de cétone intermédiaire, en raison d'une délocalisation électronique des doublets aromatiques vers le carbocation, ce qui est exclu en série aliphatique.

Les dérivés S-substitués (méthylthio; benzylthio; hydroxycarbonylméthylthio; éthoxycarbonylméthylthio et propyn-2-ylthio) sont préparés à partir des sels des 5-arylidène-2-thiohydantoïnes. La S-alkylation s'effectue en règle générale à température ordinaire en présence de méthylate ou d'éthylate de sodium en milieu alcoolique. Cependant, lors de l'action de l'acide chloroacétique, elle se fait à reflux en présence de potasse en milieu hydroalcoolique; dans ce dernier cas, la désulfuration du cycle 2-thiohydantoiné, qui requiert un milieu acide, n'est pas observée [17].

Pharmacologie

L'impact de nos produits sur les processus immunitaires à médiation cellulaire proche de l'hypersensibi-

lité retardée a été l'objet principal de l'étude pharmacologique. Dans quelques cas, la détection d'une activité anticancéreuse éventuelle a été réalisée.

L'activité sur le système immunitaire a été évaluée, en faisant référence au méthimazole et à la ciclosporine, à l'aide de tests *in vivo* (test d'hypersensibilité retardée à l'albumine méthylée chez la souris) et *in vitro* (mesure de la stimulation lymphoblastique de splénocytes de souris en présence de lectines).

La réaction d'hypersensibilité retardée a été étudiée chez des souris préalablement sensibilisées à l'albumine bovine méthylée chez lesquelles on injectait l'antigène dans la patte arrière droite. L'influence des produits à essayer était appréciée par la variation du poids de la patte par rapport à celle d'animaux témoins. Un effet immunostimulant se traduit par une augmentation du poids de la patte tandis qu'une diminution de poids révèle un effet immunodépresseur.

La mesure de la stimulation lymphoblastique *in vitro* de splénocytes de souris au contact des produits

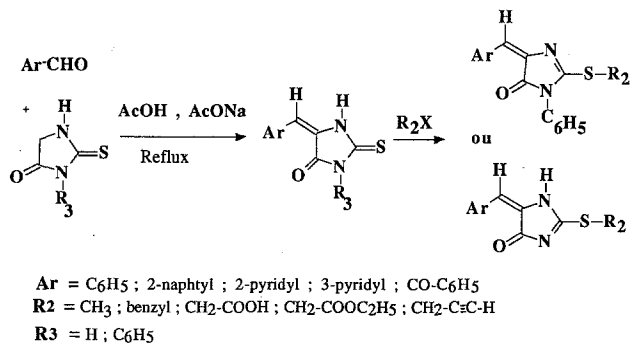


Schéma 2.

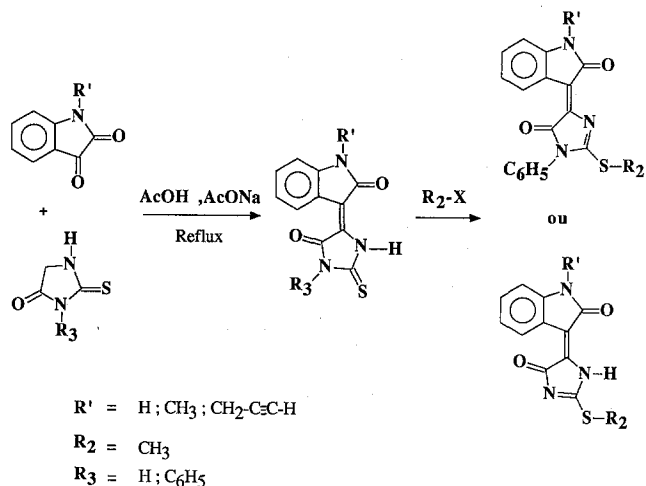


Schéma 3.

à étudier et en présence de lectines stimulantes (PHA: phytohémagglutinine qui stimule les lymphocytes T et LPS: lipopolysaccharides qui stimulent les lymphocytes B) se fait par l'appréciation de l'incorporation de ^3H thymidine dans l'ADN cellulaire ajoutée dans la dernière phase de la stimulation des cultures cellulaires. Le comptage de la radioactivité β incorporée permet de caractériser un effet stimulant lorsque cette incorporation de ^3H thymidine augmente et un effet immunodépresseur lorsqu'elle diminue. Les effets sur les lymphocytes T et sur les lymphocytes B peuvent être différenciés de par le choix de la lectine stimulante.

L'activité anticancéreuse directe a été évaluée *in vitro* par deux tests de détermination de cytotoxicité sur le mélanome B16 murin et sur les cellules leucémiques murines L1210.

Cette activité est comparée à celle de médicaments variés utilisés dans les mêmes conditions à des concentrations diverses.

Les méthodes biologiques utilisées sont décrites dans la partie expérimentale ainsi que, pour certaines, dans une étude similaire [15].

Résultats et discussion

Chimie

Les paramètres relatifs aux composés préparés et leurs caractéristiques physicochimiques (IR, RMN ^1H) sont décrits dans les tableaux I à IV.

La S-alkylation aurait pu être entreprise directement sur une 2-thiohydantoïne non substituée en 5. La 2-méthylthiohydantoïne a été ainsi préparée mais sa stabilité est très réduite [28]. Nous avons constaté la même instabilité dans la préparation de la 2-méthylthio-3-phénylhydantoïne.

Par contre, la S-alkylation des 5-arylidène-2-thiohydantoïnes est effectuée facilement et fournit des composés stables. Le substituant arylidène facilite le départ du proton situé sur l'azote N_3 (s'il n'est pas substitué) comme Ivin *et al* l'ont montré pour la 5-benzylidène-2-thiohydantoïne [29]. La charge négative résultante est délocalisée entre les atomes d'azote et de soufre: ce dernier, plus nucléophile, forme en premier le sel sodique réactif.

Dans le cas où aucun des deux atomes d'azote N_1 et N_3 n'est substitué, l'hydrogène le plus acide, porté par l'atome N_3 , est éliminé en priorité, ce qui conduit au dérivé S-alkylé tautomère 1-*H*. Ainsi Tarlton [30] a pu montrer que la 5-benzylidène-2-méthylthio imidazoline-4-one existe seulement sous la forme tautomère 1-*H* en solution dans le dioxanne, le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone, et sous forme de mélange des tautomères 1-*H* et 3-*H* dans la proportion 9/1 en solution dans l'acétone.

Les composés préparés **1**, **3**, **5**, **9**, **11** et **13** présentent la configuration *E* décrite précédemment pour le composé **1** [29]: la vibration ν N-H apparaît en général sous la forme d'une bande fine vers 3250–3400 cm^{-1} . A l'inverse, les composés **2**, **4**, **6**, **7**, **8**, **10**, **12**, **14** et **15**, dont le substituant arylidène est porteur d'un hétéroatome (O, N) susceptible de former une liaison hydrogène avec l'atome d'hydrogène porté par l'azote N_1 , présentent le plus souvent dans leur spectre IR une ou plusieurs bandes d'absorption larges dont le maximum est situé entre 3100 et 3400 cm^{-1} . Pour eux, la configuration *Z* est la plus probable.

Pharmacologie

Les résultats des essais pharmacologiques conduits dans le but de détecter une éventuelle activité sur le système immunitaire sont rapportés dans les tableaux V et VI.

Les 5-arylidène-2-thiohydantoïnes essayées ont manifesté pour la plupart une activité immunosuppressive.

Pour le test de l'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée, la diminution de l'œdème de la patte avoisine 10 à 25% (–49% pour la ciclosporine). Seuls les composés **6**, **11**, **15** et **24b** seraient plutôt légèrement stimulants.

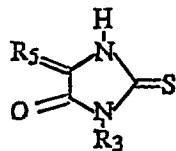
Pour l'étude *in vitro* de la stimulation lymphoblastique induite par la PHA, pour laquelle le méthimazole est faiblement inhibiteur mais à doses élevées (–40% à 876 μM) et la ciclosporine fortement inhibitrice à doses faibles (–80% à 1,6 μM), nos produits peuvent être rangés en deux groupes:

- les inhibiteurs: produits **6**, **7**, **14**, **15**, **16a**, **22b** et **24b** à des concentrations d'environ 20 à 50 μM . Le produit **13**, sans effet représentatif à 3–36 μM est fortement inhibiteur à 360 μM ;
- les stimulants à faibles doses, inhibiteurs à doses plus élevées: produit **3** stimulant à 2–10 μM , inhibiteur à 40 μM ; produit **11** stimulant à 3–30 μM , inhibiteur à 150 μM ; produit **25b** stimulant à 0,2–2 μM , inhibiteur à 20 μM . Le produit **18a** est pratiquement dénué d'effet sur ce test.

Pour l'étude de la stimulation lymphoblastique induite par le LPS, pour laquelle la ciclosporine est également inhibitrice (effet moindre qu'en présence de PHA) à la concentration de 1,6 μM , (l'effet inhibiteur de la ciclosporine est maximum à cette concentration mais apparaît à moindre concentration) nous trouvons aussi deux groupes de produits:

- les inhibiteurs: produits **7**, **14**, **15**, **16a**, **22b** et **24b** à des concentrations d'environ 20 à 50 μM . Le produit **13**, ici encore sans effet net à 4–43 μM , est fortement inhibiteur à 430 μM ;
- les stimulants à faibles doses, inhibiteurs à doses plus élevées: produits **3**, **6**, **11** et **25b**. Le composé **18a** apparaîtrait comme faiblement stimulant au premier

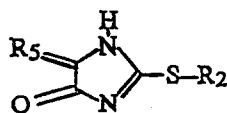
Tableau I. 5-arylidène-2-thio hydantoïnes.



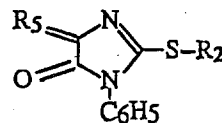
Composé	R ₃	R ₅	F (°C)	Rendement (solvant recrist)	Formule ^a	Littérature [réf]
1	H	=CH-C ₆ H ₅	270	32 (alcool 96°)	C ₁₀ H ₈ N ₂ OS	[18,19,20,21]
2	H	=CH-C(=O)-C ₆ H ₅	250	38 (alcool 96°)	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₂ S	
3	H		273	48 (éthanol/DMSO)	C ₁₄ H ₁₀ N ₂ OS	
4	H		264	8 (purification sur silice)	C ₉ H ₇ N ₃ OS	[22,23]
5	H		>300	1 (éthanol/DMSO)	C ₉ H ₇ N ₃ OS	
6	H		>300	44 (éthanol/DMSO)	C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₂ S	
7	H		>300	93	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₂ S	
8	H		>300	75 (éthanol/DMSO)	C ₁₄ H ₉ N ₃ O ₂ S	
9	C ₆ H ₅	=CH-C ₆ H ₅	208	39 (alcool 96°)	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ OS	[17,21,24]
10	C ₆ H ₅	=CH-C(=O)-C ₆ H ₅	182	66 (alcool 96°)	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	
11	C ₆ H ₅		240	60 (éthanol/DMSO)	C ₂₀ H ₁₄ N ₂ OS	[21]
12	C ₆ H ₅		243	10 (éthanol/DMSO)	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS	
13	C ₆ H ₅		286	73 (éthanol/DMSO)	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS	
14	C ₆ H ₅		>300	86	C ₁₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	[16]
15	C ₆ H ₅		>300	33 (éthanol/DMSO)	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	

^aL'analyse élémentaire a porté sur C, H, N, S et fournit des résultats conformes.

Tableau II. 5-arylidène-2-alkylthio hydantoïnes.



-a-



-b-

Composé	R2	R5	F (°C)	Rendement (solvant recrist)	Formule ^a	Littérature [réf]
16a	-CH ₃	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	209	65 (alcool 96°)	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ OS	[25,26]
17a	-CH ₂ -C ₆ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	189	23 (alcool 96°)	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ OS	
18a	-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	166	17	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	[27]
19a	-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	188	79 (éthanol)	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	
20a	-CH ₂ -COOH	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	244	32 (éthanol)	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	
21a	-CH ₂ -C≡CH	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	207	68 (éthanol)	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ OS	
22b	-CH ₃	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	149	61 (alcool 96°)	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ OS	[24]
23b	-CH ₂ -C ₆ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	177	89 (alcool 96°/DMSO)	C ₂₃ H ₁₈ N ₂ OS	[17,24]
24b	-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	149	40 (éthanol)	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	
25b	-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	166	86 (éthanol)	C ₂₄ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	
26b	-CH ₂ -C≡CH	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ =\text{C}-\text{C}_{10}\text{H}_7 \end{array}$	191	54 (éthanol)	C ₂₃ H ₁₆ N ₂ OS	

^aL'analyse élémentaire a porté sur C, H, N, S et fournit des résultats conformes.

abord, mais cette constatation ne peut étayer une véritable affirmation car l'effet observé n'est pas dose-dépendant.

L'effet immunomodulateur rencontré avec les produits **3**, **6**, **11**, **25b** se traduit plutôt par une stimulation de l'immunité générale tant celle à médiation cellu-

laire que l'immunité humorale et pour des doses toujours assez faibles (0,2 à 10 µM). Au-delà, jusqu'aux doses fortes, l'effet s'inverse pour devenir nettement immunodépresseur. Dans le cas du produit **11** l'effet stimulant observé sur les lymphocytes T persiste jusqu'à une concentration un peu plus élevée: 30 µM.

Tableau III. Fréquences d'absorption IR (cm⁻¹).

<i>Composé</i>	$\nu_{C=O}$ <i>thiohydantoïne</i>	$\nu_{C=S}$ <i>thiohydantoïne</i>	ν_{N-H}	$\nu_{C=O}$ <i>substituant</i>	ν_{C-H} <i>acétylénique</i>
1	1725	1495	3260 (fine)	—	—
2	1745	1485	3370 (fine); 3180 (large)	1670	—
3	1720	1480	3300	—	—
4	1725	1480	3320 (fine)	—	—
5	1730	1480	3320 (fine); 3180 (large)	—	—
6	1735	1490	3400 (fine); 3000 (large)	1755	—
7	1725	1480	3350 (fine); 3180 (large)	1745	—
8	1740	1480	3500 (large)	1740	3305
9	1745	1500	3250 (fine)	1660	—
10	1740	1495	3280 (fine)	—	—
11	1745	1500	3280	—	—
12	1740	1500	3100 (fine)	—	—
13	1745	1500	3340	—	—
14	1730	1495	3350 (fine); 3250 (large)	1730	—
15	1740	1490	3320	1740	—

	$\nu_{C=O}$ <i>hydantoïne</i>	ν_{N-H}	$\nu_{C=O}$ <i>substituant</i>	ν_{CH_3} <i>substituant</i>	ν_{C-H} <i>acétylénique</i>
16a	1710	3160 (fine)	—	1445; 685	—
17a	1710	—	—	—	—
18a	1710	3170 (fine)	1730	1435; 675	—
19a	1715	3180 (fine)	1740	—	—
20a	1720	—	1735	—	—
21a	1700	—	—	—	3260
22b	1720	—	—	1445; 685	—
23b	1720	—	—	—	—
24b	1720	—	1735	1435; 675	—
25b	1715	—	1730	—; 690	—
26b	1750	—	—	—	3310

Tableau IV. Caractéristiques RMN ¹H δ (ppm).

<i>Composé</i>	<i>Déplacements chimiques des protons (ppm)</i>								
	<i>Cycle thiohydantoïne</i>		<i>Substituants</i>						
	<i>N1-H</i>	<i>N3-H</i>	<i>-C=C-H</i>	<i>Phényle</i>	<i>N-H</i>	<i>CH₃</i>	<i>CH₂</i>	<i>-C≡C-H</i>	<i>C-H Pyridine</i>
1	12,23 (s)	12,41 (s)	6,54 (s)	7,5–7,8 (m)	—	—	—	—	—
2	12,08 (s)	12,88 (s)	6,89 (s)	7,5–8,2 (m)	—	—	—	—	—
3	12,39 (s)	12,49 (s)	6,69 (s)	7,6–8,4 (m)	—	—	—	—	—
4	11,54 (s)	12,58 (s)	6,66 (s)	—	—	—	—	—	7,4–8,8 (m)
5	12,53 (s)	12,63 (s)	6,59 (s)	—	—	—	—	—	7,9–9,1 (m)
6	11,32 (s)	13,02 (s)	—	6,9–8,6 (m)	11,11 (s)	—	—	—	—
7	8,16 (s)	9,80 (s)	—	7,0–8,6 (m)	—	3,27 (s)	—	—	—
8	11,35 (s)	13,08 (s)	—	7,1–8,7 (m)	—	—	4,71 (d)	3,37 (t)	—
9	12,66 (s)	—	6,68 (s)	7,6–7,9 (m)	—	—	—	—	—
10	12,56 (s)	—	7,04 (s)	7,6–8,2 (m)	—	—	—	—	—
11	12,84 (s)	—	6,89 (s)	7,4–8,5 (m)	—	—	—	—	—
12	11,92 (s)	—	6,87 (s)	7,4–8,9 (m)	—	—	—	—	7,4–8,9 (m)
13	12,80 (s)	—	6,76 (s)	6,7–9,0 (m)	—	—	—	—	6,7–9,0 (m)
14	11,67 (s)	—	—	6,9–8,5 (m)	11,14 (s)	—	—	—	—
15	11,57 (s)	—	—	7,0–8,7 (m)	—	3,34 (s)	—	—	—

	<i>Hydantoïne</i>	<i>Substituants</i>			<i>Substituants</i>			
	<i>N1-H</i>	<i>-C=C-H</i>	<i>Phényle</i>	<i>CH₃</i>	<i>-S-CH₂-C-</i>	<i>-O-CH₂-C-</i>	<i>-O-H</i>	<i>-C≡C-H</i>
16a	9,32 (s)	6,79 (s)	7,4–8,3 (m)	2,72 (s)	—	—	—	—
17a	11,90 (s)	6,81 (s)	7,3–8,3 (m)	—	4,62 (s)	—	—	—
18a	11,97 (s)	6,82 (s)	7,5–8,3 (m)	1,25 (t)	4,24 (s)	4,20 (q)	—	—
19a	12,00 (s)	6,96 (s)	7,6–8,7 (m)	1,24 (t)	4,28 (s)	4,21 (q)	—	—
20a	11,98 (s)	6,96 (s)	7,6–8,8 (m)	—	4,20 (s)	—	13,12 (s)	—
21a	11,98 (s)	7,01 (s)	7,6–8,7 (m)	—	4,28 (d)	—	—	3,40 (t)
22b	—	7,03 (s)	7,4–8,4 (m)	2,75 (s)	—	—	—	—
23b	—	7,04 (s)	7,3–8,4 (m)	—	4,65 (s)	—	—	—
24b	—	7,05 (s)	7,4–8,4 (m)	1,28 (t)	4,26 (s)	4,22 (q)	—	—
25b	—	7,20 (s)	7,5–8,8 (m)	1,27 (t)	4,31 (s)	4,23 (q)	—	—
26b	—	7,24 (s)	7,5–8,8 (m)	—	4,30 (d)	—	—	3,40 (t)

Tableau V. Activité sur le système immunitaire. Test à l'albumine bovine méthylée. ↑: augmentation: action immunostimulante; ↓: diminution: action immunodépressive.

Composé	Dose administrée mg/kg (per os)	Augmentation du poids de la patte (mg) $m \pm \text{esm} (nb)^*$	Résultat par rapport aux témoins	
			mg	%
Ciclosporine	2 x 100	Témoins: 118,2 ± 6,9 (29) 59,8 ± 5,4 (28)	-58,4	↓49
3	2 x 200	Témoins: 74,5 ± 10,1 (8) 66,9 ± 9,2 (8)	-7,6	↓10
6	2 x 100	Témoins: 71,9 ± 7,1 (10) 81,1 ± 13,0 (10)	9,2	↑13
7	2 x 100	Témoins: 128,8 ± 13,0 (8) 108,8 ± 11,9 (8)	-20,0	↓15
11	2 x 100	Témoins: 71,9 ± 7,1 (10) 86,8 ± 5,3 (10)	14,9	↑21
13	2 x 100	Témoins: 89,2 ± 14,5 (8) 84,4 ± 10,9 (9)	-4,8	↓5
14	2 x 100	Témoins: 87,0 ± 5,6 (8) 80,9 ± 7,2 (9)	-6,1	↓7
15	2 x 100	Témoins: 87,0 ± 5,6 (8) 95,4 ± 10,6 (9)	8,4	↑10
16a	2 x 100	Témoins: 108,9 ± 12,9 (7) 87,1 ± 12,1 (7)	-21,8	↓20
18a	2 x 100	Témoins: 108,2 ± 11,5 (9) 101,8 ± 10,0 (9)	-6,4	↓6
20a	2 x 200	Témoins: 91,8 ± 11,1 (9) 69,3 ± 7,0 (9)	-22,5	↓25
21a	2 x 200	Témoins: 91,8 ± 11,1 (9) 72,4 ± 12,1 (9)	-19,4	↓21
22b	2 x 100	Témoins: 108,9 ± 12,9 (7) 88,9 ± 14,0 (6)	-20,0	↓18
24b	2 x 100	Témoins: 87,0 ± 5,6 (8) 94,5 ± 10,4 (9)	7,5	↑9
25b	2 x 100	Témoins: 56,6 ± 5,3 (9) 55,0 ± 5,6 (9)	-1,6	↓3
26b	2 x 200	Témoins: 91,8 ± 11,1 (9) 71,9 ± 11,9 (9)	-19,9	↓22

*Nombre de souris du lot.

Il faut noter que les significations exprimées par les tests d'activité sur le système immunitaire (test *in vivo* d'hypersensibilité à l'albumine bovine méthylée et test *in vitro* de stimulation lymphoblastique des splénocytes), quand leurs résultats sont manifestes, semblent corrélées de façon assez satisfaisante: ainsi l'activité immunomodulatrice manifestée dans le test de stimulation lymphoblastique par les produits **3**, **6**, **11** et **25b** est retrouvée sous la forme d'une activité plutôt stimulante dans le test d'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée avec une seule exception: celle du produit **3** qui se révèle déprimeur dans ce dernier test. L'activité immunodépressive *in vivo* du produit **25b** paraît trop faible pour le ranger aussi dans ce cas d'exception.

Nos produits 5-arylidène-2-thiohydantoïnes, corroborant l'hypothèse de travail, développent bien une

activité sur le système immunitaire, plutôt dépressive mais avec des modalités variant avec les concentrations de produit utilisées lors des tests, témoignant de la complexité de cette action.

La substitution 5-isatylidène semble favorable à l'activité immunosuppressive (produits **6**, **7**, **14** et **15**) alors que la substitution 5-naphtylméthylène orienterait plutôt vers une activité immunomodulatrice (produits **3**, **11** et **25b**). Les substitutions 5-benzylidène et 5-pyridylméthylène sont moins intéressantes. La substitution de l'azote N₃ ne paraît pas influencer l'activité (comparer **6** et **14**; **7** et **15**; **3** et **11** par exemple).

La substitution du soufre par un groupe alkyle n'a pas d'influence très marquée: elle conserve une activité plutôt immunodépressive (comparer **3** et **11** à **25**).

Le nombre réduit de composés essayés ne nous permet pas d'établir de véritables relations structure-activité.

Tableau VI. Activité sur le système immunitaire. Stimulation lymphoblastique induite par les lectines (PHA et LPS). ↑: augmentation: activité immunostimulante; ↓: diminution: activité immunodépressive.

Composé	En présence de PHA		En présence de LPS	
	Concentration (μM)	Résultat (%)	Concentration (μM)	Résultat (%)
Méthimazole	876	↓40	—	—
Ciclosporine	1,6	↓80	1,6	↓50
3	2	↑32	2	↑35
	4	↑36	10	↑62
	10	↑26	20	↑15
	40	↓70	40	↓80
6	—	—	0,31	↑15
	—	—	3,1	↑57
	31	↓50	31	↓46
7	78	↓95	77	↓93
	19	↓15	19	↓22
	38	↓40	38	↓54
11	—	—	1,5	↑41
	3	↑42	7,5	↑30
	30	↑78	30	0
13	150	↓32	150	↓79
	3,6	↑5	4,3	↑5
	36	0	43	↓5
14	360	↓50	430	↓66
	30	↓75	30	↓75
	150	↓100	150	↓100
15	28,8	↓70	28,8	↓70
	144	↓80	144	↓80
16a	46	↓28	46	↓20
	115	↓66	115	↓74
18a	—	—	3,4	↑10
	34	↑3	34	↑20
	340	↑4	340	↑15
22b	17	↓67	17	↓60
	34	↓84	34	↓80
	85	↓94	85	↓90
24b	27	↓50	27	↓50
	136	↓100	136	↓100
25b	0,24	↑28	0,24	0
	2,4	↑26	2,4	↑35
	12	0	12	↓30
	24	↓56	24	↓68

Les résultats observés *in vivo* et *in vitro*, bien qu'imparfaitement superposables, attestent d'une activité qui semble plutôt inhibitrice sur le système immunitaire, plus rarement immunomodulatrice. Enfin les concentrations nécessaires, trop élevées par rapport à celles des médicaments de référence, ne permettent pas d'envisager pour ces produits un développement plus approfondi.

Aucun des produits essayés (**3**, **6**, **11**, **13**, **14**, **15**, **18a**, **19a**, **24b** et **25b**) sur le mélanome B16 murin n'a manifesté d'activité anticancéreuse potentielle. Leurs CI_{50} sont toujours supérieures à la concentration

« seuil » de détection d'activité estimée à 30 μM alors que les médicaments témoins sont actifs pour des CI_{50} de 4 nM pour la vincristine, de 9 nM pour la navelbine, de 45 nM pour l'adriamycine, de 3 μM pour le cisplatine et de 24 μM pour le thiotepa.

Les mêmes produits essayés sur les cellules leucémiques L1210 n'ont manifesté aucune activité cytotoxique: leurs CI_{50} , sur ce test, sont toujours > 30 μM alors que les médicaments témoins sont actifs pour des CI_{50} de 3 nM pour la vincristine, de 4 nM pour la doxorubicine, de 8 nM pour la navelbine et de 30 μM pour le thiotepa.

Protocoles expérimentaux

Chimie

La pureté des produits est contrôlée par chromatographie sur couche mince; les plaques, en plastique, sont recouvertes de silice Merck 60 F²⁵⁴; les systèmes d'éluants généralement utilisés sont méthanol/chloroforme 1/9 et benzène/acétate d'éthyle 7/3; la révélation se fait sous une lampe UV à 254 nm.

Les points de fusion sont déterminés sur un banc de Kofler et ne sont pas corrigés. Les spectres IR sont effectués à l'aide d'un appareil Pye-Unicam SP 1100. Les solides sont analysés par pastillage en présence de KBr (1 mg de produit pour 100 mg de KBr) et les liquides en film sur des fenêtres de KBr.

Les spectres de RMN du proton sont réalisés sur un appareil Bruker 200. L'analyse élémentaire a porté sur C, H, N et S. Elle est réalisée au service Central d'analyse du CNRS de Vernaison (Rhône). Les résultats expérimentaux sont conformes aux calculs théoriques.

Préparation des 5-arylidène-2-thiohydantoïnes

La condensation de l'aldéhyde et de la 2-thiohydantoïne est réalisée au reflux durant 1 à 2 h au sein d'acide acétique glacial en présence d'acétate de sodium. Le précipité obtenu après refroidissement est lavé avec le minimum d'eau, éventuellement avec un peu d'éther. Sa purification est réalisée par cristallisation fractionnée dans de l'alcool à 96° ou dans le mélange éthanol/DMSO quand le produit est trop peu soluble dans l'alcool. Dans un seul cas, **4**, une purification par chromatographie sur colonne s'est avérée indispensable. Nous rapportons ci-après le mode opératoire général, en prenant l'exemple du composé **1**, ainsi que la préparation ayant nécessité une purification approfondie et celle d'un produit intermédiaire. Les modalités de préparation (rendement, solvant de recristallisation) ainsi que les caractéristiques physicochimiques ($F^{\circ}C$, analyse centésimale) de toutes les 5-arylidène-2-thiohydantoïnes préparées, sont rassemblées dans le tableau I.

5-benzylidène-2-thiohydantoïne **1**

6,12 g de 2-thiohydantoïne (0,052 mol), 6 g de benzaldéhyde (0,056 mol), 20 g d'acétate de sodium sont portés à reflux pendant 2 h dans 114,5 ml d'acide acétique glacial. La solution, jaune au début du reflux, devient rouge, limpide. Après refroidissement, des cristaux apparaissent. Ils sont filtrés, rincés à l'eau (6,1 g de produit brut) et recristallisés dans l'alcool à 96°. 3,5 g de produit pur sont obtenus (cristaux jaune d'or; $F = 262^{\circ}C$ (instantanée) et $270^{\circ}C$ (lente); rendement = 32,5%) (littérature: $F = 258^{\circ}C$ [18, 19, 21]; $F = 280$ et $300^{\circ}C$ [20]).

5-(2-pyridyl)méthylène-2-thiohydantoïne 4

2,8 g de 2-thiohydantoïne (0,024 mol) est dissous dans 20 ml de soude 0,4 M; 2,6 g de 2-pyridine-aldéhyde (0,024 mol) dans 20 ml d'éthanol sont ajoutés. 5 ml d'acide acétique sont versés lentement dans ce mélange. Un précipité apparaît. Après chauffage 5 min à 60°C, puis refroidissement, les cristaux sont filtrés (1,6 g). Ils sont dissous dans un peu de DMSO et déposés sur une colonne de silice (gel de silice 60 pour chromatographie sur colonne; 70-230 mesh; Merck 7734). L'éluant est un mélange de chloroforme et de méthanol dans les proportions 9/1. La 5-(2-pyridyl)méthylène-2-thiohydantoïne est recueillie en début d'élution. Les fractions pures sont jointes, évaporées à sec et recristallisées dans l'éthanol pour donner 0,4 g de produit pur (cristaux jaunes; F = 264°C; rendement = 8%) (littérature: F = 262°C [22]; F = 276°C [23]).

Synthèse de la 1-(2-propyn-yl)-isatine

0,72 g d'hydruure de sodium (suspension 55–60%) sont mis en suspension dans 50 ml de DMF. 1,47 g d'isatine (0,01 mol) sont ajoutés. La solution devient violette foncée. Après quelques minutes d'agitation, 1,8 ml de bromure de propargyle (0,02 mol) sont ajoutés. La solution devient rapidement marron foncé. Après 7 jours à température ambiante, le milieu réactionnel est distillé sous pression réduite. Le résidu solide, rouge, est repris dans l'acétone, filtré et évaporé à sec, puis recristallisé dans l'alcool à 96° pour donner 1,05 g de produit pur (cristaux oranges; F = 151 °C; rendement = 56,7%).

Préparation des 5-arylidène-2-alkylthiohydantoïnes

Le sel sodique de la 5-arylidène-2-thiohydantoïne, préparé extemporanément à l'aide de méthylate de sodium ou d'éthylate de sodium est soumis à l'action du dérivé halogéné adéquat à température ambiante durant 20 min à 2 h. Le précipité qui apparaît est lavé avec le minimum d'eau et éventuellement avec un peu d'éther ou est rincé avec de l'éthanol. Sa purification est obtenue par recristallisation dans de l'éthanol ou dans de l'alcool à 96° ou un mélange alcool à 96°/DMSO.

Le composé **20a** est préparé à chaud par alkylation du sel potassique de la 2-thiohydantoïne correspondante (obtenu en présence de potasse alcoolique) par le dérivé halogéné adéquat.

Nous rapportons ci-après à titre d'exemples deux modes opératoires généraux (composés **16a** et **23b**) ainsi que la synthèse particulière d'un dérivé de caractère acide (composé **20c**). Les modalités de préparation (rendement, solvant de recristallisation) ainsi que les caractéristiques physico-chimiques (F°C, analyse centésimale) de toutes les 5-arylidène-2-alkylthiohydantoïnes obtenues sont rassemblées dans le tableau II.

5-benzylidène-2-méthylthiohydantoïne **16a**

0,32 g de sodium métal (0,0137 mol) sont dissous dans 55 ml de méthanol. 2,8 g de 5-benzylidène-2-thiohydantoïne (0,0137 mol) sont ajoutés (solution rouge foncé, limpide), puis 1,3 ml d'iodure de méthyle (0,0137 x 1,5 mol). Le tout est laissé sous agitation à température ambiante. Un précipité clair apparaît rapidement; après 20 min, il y a prise en masse. Le précipité est filtré et rincé à l'eau (2,4 g), puis recristallisé dans l'alcool à 96° pour donner 1,95 g de cristaux beige-rosé (rendement = 65,3%; F = 209°C) (littérature: F = 202°C [25,26]).

5-benzylidène-2-benzylthio-3-phényl hydantoïne **23b**

2,5 g de 5-benzylidène-3-phényl-2-thiohydantoïne (0,009 mol) sont dissous dans une solution d'éthylate de sodium préparée à partir de 0,3 g de sodium métal (0,013 mol) dans 15 ml d'éthanol; la solution est rouge, limpide. 2,3 ml de chlorure de benzyle (0,02 mol) sont ajoutés lentement. Avant la fin de l'addi-

tion, le milieu réactionnel précipite; il est laissé 2 h à température ambiante, sous agitation. Le précipité est ensuite filtré, rincé à l'eau puis à l'éther anhydre (3,15 g) puis recristallisé dans un mélange alcool 96°/DMSO pour donner 2,95 g d'aiguilles jaune-pâle (F = 177°C; rendement = 88,6%) (littérature: F = 178°C [17]; F = 178–179°C [24]).

2-hydroxycarbonylméthylthio-5-(2-naphtyl)méthylènehydantoïne **20a**

Dans un mélange de 28 ml de potasse à 2% et 20 ml d'éthanol, 1,27 g de 5-(2-naphtyl)méthylène-2-thiohydantoïne (0,005 mol) sont dissous; 0,47 g d'acide chloroacétique (0,005 mol) sont ajoutés. Un précipité apparaît; le tout est laissé 3 h au bain-marie, puis une nuit au froid. Le milieu est acidifié, par de l'acide chlorhydrique dilué au demi, jusqu'à pH = 1. Le précipité est filtré et rincé à l'eau (1,65 g), puis recristallisé dans l'éthanol pour donner 0,5 g de poudre jaune (F = 244°C; rendement = 32,1%).

Pharmacologie

Activité sur le système immunitaire

Test d'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée selon Crowle et al [31]. Des souris Swiss mâles (25 g environ) sont sensibilisées par injection intradermique, en trois endroits, de 0,1 ml d'un mélange à 50% d'adjuvant complet de Freund et à 50% d'une solution d'albumine bovine méthylée à 5 mg/ml dans du NaCl à 0,9%. 0,025 ml de solution d'albumine bovine méthylée (à 1% dans NaCl à 0,9%) sont injectés 7 jours plus tard dans la patte arrière droite. 24 h après le challenge, les animaux sont sacrifiés et les deux pattes arrières prélevées et pesées. La réaction d'hypersensibilité retardée est quantifiée par la différence de poids entre les deux pattes. Cette différence varie de 40 à 170 mg chez les animaux témoins selon les expériences. Les produits à essayer sont administrés *per os*, 24 h et 2 h avant le challenge, dans une suspension dans l'eau, à raison de 100 mg/kg. Les valeurs moyennes des différences de poids des pattes arrières des lots traités sont comparées (en %) à celles de lots témoins de l'expérience (6 à 10 souris par lot). Les valeurs trouvées pour ces variations sont rapportées dans le tableau V.

Mesure de la stimulation lymphoblastique induite par les lectines sur splénocytes murins selon Dziarski [32]. Les splénocytes prélevés sur des lots de 4 souris femelles B₆D₂F₁ de 7 à 12 semaines sont isolés (Potter-filtration sur gaze) et placés dans du milieu RPMI [33] sans sérum. Les cellules vivantes sont décomptées en présence de colorant vital. Elles sont mises en culture (plaques de 96 puits) à raison de 5 x 10⁵ cellules dans 200 µl de RPMI supplémenté avec 10% de sérum de cheval. Les lectines stimulantes sont mises en contact (10 µl d'une solution aqueuse à 0,2 mg/ml pour PHA et à 1 mg/ml pour LPS) durant 48 h. Les produits à étudier dissous dans de l'eau ou dans le mélange: eau +0,1 à 0,5% de DMSO sont ajoutés en même temps que les lectines. Les splénocytes sont marqués 6 h avant la fin de la stimulation par l'addition de 1 µCi de ³H thymidine (10 µl). Les cellules marquées sont récoltées (cell harvester) sur des filtres GFA et lavées 20 fois à l'eau distillée. Les filtres séchés sont ensuite placés dans 6 ml de liquide pour scintillation et leur radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur β (en cpm).

Les écarts de radioactivité entre splénocytes traités *in vitro* et splénocytes témoins rapportés à la radioactivité des témoins sont exprimés en pourcentage et traduisent la variation d'incorporation de la thymidine dans l'ADN sous l'influence de produit essayé.

Huit mesures de radioactivité (8 puits) sont réalisées pour chaque résultat, pour chaque concentration de produit essayé. La dispersion des comptages de radioactivité (cpm) conduit à un écart standard de la moyenne (esm) < 5% des cpm moyens à l'intérieur d'une même manipulation (avec les mêmes splénocytes). Quand il s'agit de splénocytes différents, la dispersion pour une même concentration de produit est naturellement plus forte. La fluctuation autour de la valeur moyenne de comptage est alors de 12% pour les essais de produit en présence de PHA et de 16% pour les essais de produit en présence de LPS tandis que les témoins sont plus stables (5 à 8%).

Avec la pratique des essais sur les divers produits, il paraît raisonnable aux expérimentateurs de considérer qu'une variation de +25% (stimulation) ou de -25% (inhibition) par rapport à la radioactivité des splénocytes témoins traduit un effet biologiquement significatif.

Activité anticancéreuse

Cytotoxicité sur mélanome B16 murin in vitro selon Bradner et al [34]. Au début de l'expérience (J_0) les cellules cancéreuses sont placées sur une plaque à 24 puits à raison de 1 ml de suspension cellulaire (10^4 cellules) dans le milieu de culture (RPMI + 10% de sérum de veau fœtal). Leur temps de doublement avoisine alors 18 h. Après 24 h (J_1) le milieu de culture est retiré et remplacé par un milieu de culture additionné d'une solution du produit à étudier à raison de 10 μ l de solution aqueuse ou de 5 μ l de solution dans le DMSO pour 1 ml de milieu de culture. Après 3 jours de traitement (J_4) la cytotoxicité est évaluée: le milieu est enlevé, les plaques sont lavées deux fois avec un tampon PBS, les cellules sont décrochées du support plastique par 200 μ l d'une solution de trypsine à 0,05% et d'EDTA à 0,01% dans du PBS et sont comptées au compteur Coulter.

L'activité inhibitrice cytotoxique sur la prolifération cellulaire est mesurée à raison de 3 essais (3 puits) par concentration de produit étudié par rapport à la prolifération de cultures cellulaires témoins non traitées pour lesquelles on dénombre 2 à 5 10^5 cellules par puits. La dispersion des comptages cellulaires (écart standard de la moyenne des 3 essais) est < 5% tant pour les cultures témoins que pour les cultures traitées. Quatre concentrations du produit sont utilisées.

On détermine la concentration du produit nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire par régression linéaire par rapport à la prolifération de cultures témoins en tenant compte des valeurs comprises entre 20 et 80% d'inhibition.

La concentration inhibitrice CI_{50} de 30 μ M est considérée par les expérimentateurs comme un seuil de détection d'une activité cytotoxique. Ainsi pour une $CI_{50} > 30 \mu$ M le produit est considéré comme dépourvu d'activité cytotoxique tandis qu'une $CI_{50} < 30 \mu$ M atteste d'une activité cytotoxique d'autant plus nette que cette CI_{50} est plus faible.

Les médicaments témoins sont actifs aux concentrations suivantes: thiotepea $CI_{50} = 24 \mu$ M; adriamycine $CI_{50} = 45$ nM; navelbine $CI_{50} = 9$ nM; vincristine $CI_{50} = 4$ nM.

Cytotoxicité sur cellules leucémiques L1210 in vitro selon Zee-Cheng [35]. Au début de l'expérience (J_0) les cellules leucémiques sont repiquées en flacon Falcon au sein du milieu de culture RPMI + 20% de sérum de cheval pour qu'elles croissent en phase exponentielle. Leur temps de doublement avoisine alors 10 h. Après 24 h (J_1) la suspension de culture cellulaire est prélevée et répartie sur une plaque à 24 puits à raison de 1,5 ml de suspension à 0,8 10^5 cellules/ml. dans chaque puits. Les produits essayés sont alors ajoutés (15 μ l de solution aqueuse du produit ou 7,5 μ l de solution du produit dans le DMSO s'il est insoluble dans l'eau). Trois essais sont réalisés

pour chaque concentration de produit et quatre concentrations sont utilisées pour chaque produit à étudier. Après 48 h de traitement (J_3) la cytotoxicité est évaluée par comptage au compteur Coulter des cellules leucémiques resuspendues dans le milieu. La dispersion des comptages cellulaires (écart standard de la moyenne des 3 essais) est < 5% tant pour les cultures témoins pour lesquelles on compte 1 à 2 10^6 cellules par ml que pour les cultures traitées.

On détermine par régression linéaire, comme dans le cas de la cytotoxicité sur mélanome B16, la concentration de produit nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire. La concentration inhibitrice CI_{50} de 30 μ M est considérée ici encore par les expérimentateurs comme un seuil de détection d'une activité cytotoxique.

Les médicaments témoins sont actifs aux concentrations suivantes: thiotepea $CI_{50} = 30 \mu$ M; navelbine $CI_{50} = 8$ nM; doxorubicine $CI_{50} = 4$ nM; vincristine $CI_{50} = 3$ nM.

Remerciements

Nous remercions les laboratoires Pierre Fabre Médicament pour la bourse offerte et le soutien financier apporté à notre laboratoire dans le cadre d'un contrat Université-Industrie et pour la réalisation des essais pharmacologiques. Nos remerciements s'adressent en particulier à Messieurs JP Couzinier, P Lenoble, à D Bigg pour les discussions concernant la partie chimique et à MM JP Tarayre, J Tisne Versailles, M^{me} C Étievant qui ont dirigé les expérimentations pharmacologiques, ainsi que leurs collaboratrices techniciennes C Cathala et M Barbara.

Références

- 1 Renoux G (1980) *Drugs* 20, 89-99
- 2 Hopkins SC (1979) *Drugs Future* 4(6), 420-426
- 3 Janssen PAJ (1976) *Progr Drug Res* 20, 347
- 4 Smith HR, Steinberg AD (1983) *Annu Rev Immunol* 1, 175-210
- 5 Chazeau V (1989) *Étude de quelques dérivés de la thio-2-hydantoïne, synthèse et résultats pharmacologiques*. Thèse Doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble I
- 6 Van Ginckel R, De Brabander M (1979) *J Reticuloendot Soc* 25(2), 125-131
- 7 Hadden JW, Hadden EM, Spira T, Settineri R, Simon L, Giner-Sorolla A (1982) *Int J Immunopharmacol* 4, 235-242
- 8 De Brabander M (1978) *Chem Biol Interact* 23, 45-63
- 9 Totterman TH, Karlsson FA, Bengtsson M, Mendel-Hartvig I (1987) *N Eng J Med* 313(1), 15-22
- 10 Strecker VJ, Carlson JA (1983) *Ann Rep Med Chem* 18, 177
- 11 Eastland G Jr (1986) *Drugs Future*, 11(9), 773-776
- 12 Cheng BKY, Cheng CC (1987) *Drugs Future* 12(3), 217-219
- 13 Swallow DL (1978) *Drug Res* 22, 267-326
- 14 Kelley JL, Beauchamp L (1983) *Ann Rep Med Chem* 18, 139-148
- 15 Blanc M, Cussac M, Boucherle A, Leclerc G (1991) *Eur J Med Chem* 27, 267-275
- 16 Hill AJ, Henze HR (1924) *J Am Chem Soc* 46, 2806-2810
- 17 Johnson TB, Hill AJ, Kelsey EB (1920) *J Am Chem Soc* 42, 1711-1720
- 18 Wheeler HL, Nicolet BH, Johnson TB (1911) *Am Chem J* 46, 456-474

- 19 Johnson TB, Nicolet BH (1911) *J Am Chem Soc* 33, 1973–1978
- 20 Ruhemann S, Stapleton HE (1900) *J Chem Soc* 77, 239–251
- 21 Zubenko VG (1957) *Trudy L'vov Med Inst* 12, 83–87 in CA (1960) 54, 21059h
- 22 Thielemann H (1971) *Sci Pharm* 39(1), 8–15
- 23 Montana Gonzalez MT, Gomez Ariza JL, Pino F (1978) *Talanta* 25(6), 331–337
- 24 Wheeler HL, Brautlecht CA (1911) *Am Chem Soc* 45, 446–458
- 25 Johnson TB, Nicolet BH (1912) *J Am Chem Soc* 34, 1048–1054
- 26 Hideazi S, Tamotsu Y (1959) *Nagoya Shiritsu Daigaku Yakugakubu Kiyo* 7, 44–48
- 27 Shalaby AFA, Daboun HA, Abdel-Aziz MA (1976) *Z Naturforsch* 31B, 111–114
- 28 Komatsu S (1911) *Chemisches Zentralblatt* 82(2a), 537
- 29 Ivin BA, Rutkovski NA, Smorygo AI, D'Yachkov GM, Frolova GM, Sochilin EG (1973) *Zh Org Khim* 9(11), 2405–2412 in CA (1974) 80, 47279q
- 30 Tarlton EJ, McKay AF (1958) *Can J Chem* 36, 496–506
- 31 Crowle AJ, Hu CC, Patrucco A (1968) *J Allergy* 42, 140–156
- 32 Dziarski R (1985) *J Clin Lab Immunol* 16, 93–109
- 33 Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) *JAMA* 199, 519–524
- 34 Bradner WT, Claridge CA (1984) Screening systems, In: *Antineoplastic agents* (Remers WA, ed) Wiley Interscience 41–82
- 35 Zee-Cheng RKY, Cheng CC (1988) *Meth Exp Clin Pharmacol* 10(2), 67–101