

## Синтез изомерных 4-(*N*-метилтетразолиламино)-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегидов и 4-гидрокси-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегида на основе тандема тио-реакции Михаэля и реакции (аза)-Морита–Бейлиса–Хиллмана и *in vitro* исследование активности полученных соединений в отношении вируса гриппа

Андрей В. Храмчихин<sup>1</sup>, Мария А. Скрыльникова<sup>1</sup>, Юлия Н. Павлюкова<sup>1</sup>, Владимир В. Зарубаев<sup>2</sup>, Яна Л. Есаулкова<sup>2</sup>, Анна А. Мурылева<sup>2</sup>, Надежда Т. Шманёва<sup>1</sup>, Геворг Г. Данагулян<sup>3,4</sup>, Владимир А. Островский<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Московский пр., 26, Санкт-Петербург 190013, Россия; e-mail: va\_ostrovskii@mail.ru

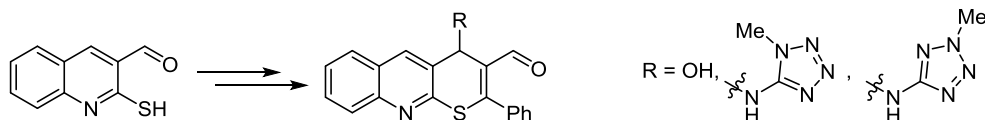
<sup>2</sup> Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, ул. Мира, 14, Санкт-Петербург 197101, Россия; e-mail: zarubaev@gmail.com

<sup>3</sup> Российско-Армянский (Славянский) университет, ул. Овсепя Эмина, 123, Ереван 0051, Армения; e-mail: gevorg.danagulyan@rau.am

<sup>4</sup> Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения, пр. Азатутян, 26а, Ереван 0014, Армения; e-mail: gdanag@email.com

Поступило 23.02.2022

Принято после доработки 1.04.2022



Синтезированы 3-{{(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}хинолин-2-тиол и 3-{{(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}хинолин-2-тиол. Последовательностью тио-реакции Михаэля и реакции (аза)-Морита–Бейлиса–Хиллмана получены 4-[(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)амино]-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид, 4-[(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)амино]-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид и 4-гидрокси-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид. Для полученных соединений определены цитотоксичность и противовирусная активность в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в культуре клеток MDCK. Исследование показало, что замена гидроксильной группы в 4-гидрокси-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегиде на 1-метил- или 5-амино-2-метилтетразолильный фрагмент снижает противовирусную активность. В то же время 3-{{(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}хинолин-2-тиол обладает более высокой активностью по сравнению с 3-{{(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}хинолин-2-тиолом. Этот факт указывает на возможную зависимость между расположением заместителей в тетразольном цикле и противовирусной активностью тестируемой гетероциклической системы.

**Ключевые слова:** 1-метил-1*H*-тетразол-5-амин, 2-метил-2*H*-тетразол-5-амин, тиопиранохинолин, биологическая активность, вирус гриппа А (H1N1), тандемная реакция.

В последние годы стремительно растет интерес к азотсодержащим полиядерным гетероциклам, проявляющим противовирусную активность. Внимание исследователей привлекают представители 1,2,4-триазольного и хинолинового рядов, среди которых найдены перспективные ингредиенты лекарственных средств, эффективных против возбудителей различных пандемически опасных вирусных инфекций: ВИЧ,

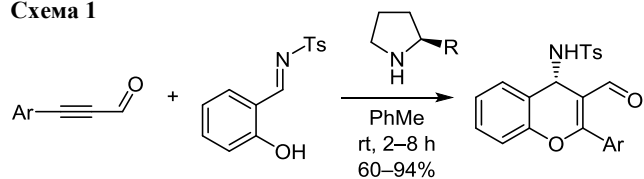
вируса Эбола, вируса Зика, а также нового коронавируса SARS-CoV-2.<sup>1,2</sup> Также известно, что тиопирано[2,3-*b*]хинолины проявляют себя как антагонисты метаболитных глутаматных рецепторов и сильные антиоксиданты, предотвращающие окислительное разрушение ДНК свободными радикалами.<sup>3–5</sup> Недавно показано, что некоторые неаннелированные полиядерные гетероциклические соединения, содержащие в

молекуле тетразол-2-ильный и пиримидиновый фрагменты, проявляют выраженную активность в отношении опасных разновидностей гриппа А.<sup>6</sup> Однако связь между химическим строением, в том числе региоизомерной природой *N*-замещенного тетразольного цикла, а также природой заместителя у эндоциклического атома углерода в должной мере не раскрыта. Недостаток знаний в этой области снижает эффективность компьютерного прогнозирования и экспериментального исследования биологической активности.

В настоящей работе представлены результаты синтеза 3-{{(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}-хинолин-2-тиола и 3-{{(2-метил-2*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}-хинолин-2-тиола, в молекулах которых распознаются региоизомерные 5-амино-1(2)-метилтетразолильные фрагменты, содержащие в качестве заместителей у атома азота аминогруппы объемный полиядерный аннелированный гетероциклический фрагмент.

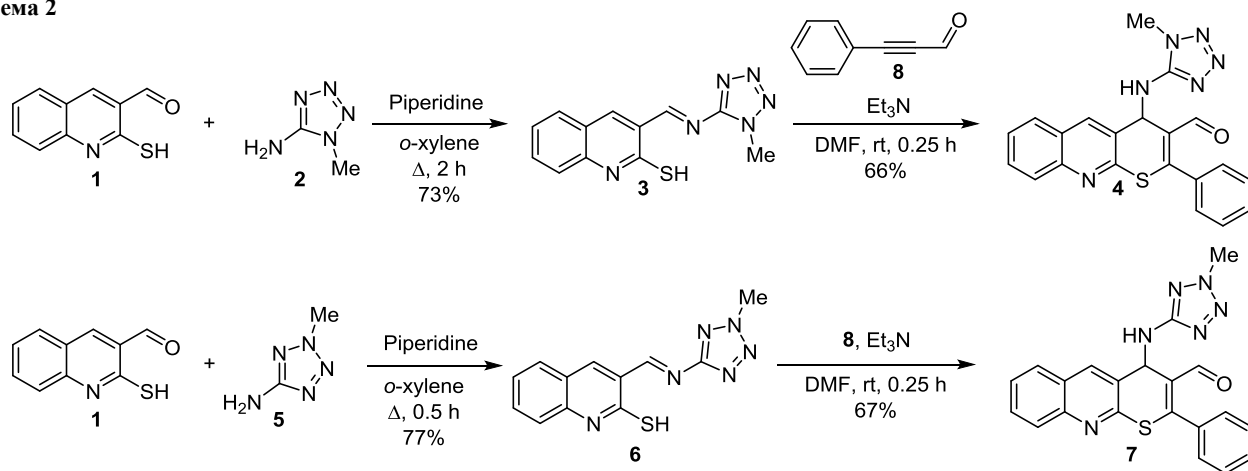
Для получения аннелированных полиядерных гетероциклических соединений ("гибридных систем") удобны тандемные превращения, которые в ряде случаев позволяют провести многостадийные синтезы активных ингредиентов противовирусных лекарственных средств в однократном режиме.<sup>7</sup> В литературе известен способ получения 4-амино-4*H*-хроменов тандемом оксо-реакции Михаэля и аза-реакции Бейлиса–Хиллмана салицилового *N*-тозилимины с 3-фенил-2-пропиналем (схема 1).<sup>8</sup> Реакцию проводят в присутствии пролина или его производных.

Схема 1



Нам удалось провести тио-реакцию Михаэля и аза-реакцию Морита–Бейлиса–Хиллмана с участием азометинов **3**, **6**, полученных из 2-сульфанилхинолин-3-карбальдегида (**1**) и региоизомерных 1-метил-1*H*-тетразол-5-амин (**2**) и 2-метил-2*H*-тетразол-5-амин (**5**), и

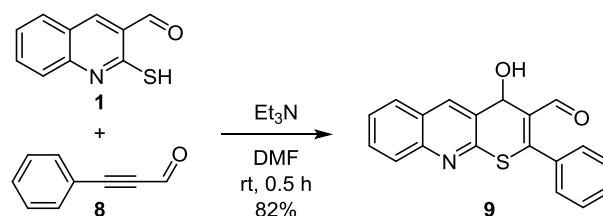
Схема 2



3-фенилпропин-2-оля (**8**). При этом в качестве катализатора использовали более доступный Et<sub>3</sub>N. В результате с выходами 66 и 67% соответственно были получены аннелированные гетероциклические соединения **4** и **7**, содержащие у атома азота аминогруппы региоизомерные N(1)- и N(2)-метилтетразолильные фрагменты (схема 2).

Также для сравнения влияния тетразольного цикла на биологическую активность соединений **4** и **7** по отношению к вирусу гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) был синтезирован и исследован 4-гидрокси-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин **9** (схема 3).

Схема 3



Строение и состав соединений **3**, **4**, **6**, **7** и **9** подтверждены с помощью ИК спектроскопии, спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, а также масс-спектрометрии высокого разрешения. Индивидуальность соединений подтверждали с помощью ТСХ.

Исследование *in vitro* биологической активности соединений **4**, **7** и **9** выполняли в лаборатории экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера с использованием культуры клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). В табл. 1 представлены значения 50% цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>), 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) и индекс селективности SI – отношение CC<sub>50</sub> к IC<sub>50</sub>. В качестве препарата сравнения использовали римантадин.

Как следует из данных табл. 1, соединение **4**, содержащее 1-метилтетразолильный фрагмент, и соединение **9**, в котором тетразолильный фрагмент заменен на гидроксильную группу, существенно превосходят по

**Таблица 1.** Противовирусные свойства соединений **4**, **7**, **9** в отношении вируса гриппа А (H1N1) в культуре клеток MDCK

Соединение	CC <sub>50</sub> , мкмоль	IC <sub>50</sub> , мкмоль	SI
<b>4</b>	>749	46	16
<b>7</b>	549	>249	2
<b>9</b>	>939	30	31
Римантадин	289	58	5

индексу селективности (SI) препарат сравнения римантадин. Ожидаемых преимуществ тетразольного цикла в данном случае выявить не удалось: соединение **4** оказалось почти в два раза менее активным, чем соединение **9**. Для объяснения этого феномена мы планируем провести детальное исследование структур обеих молекул с применением методов 3D-QSAR. Интересное заключение можно сделать при сравнении индексов селективности соединений **4** и **7**. Как видно, соединение **4**, содержащее N(1)-метилтетразолильный фрагмент, проявило существенно более высокую активность в сравнении с соединением **7**, в молекуле которого присутствует региоизомерный N(2)-метилтетразолильный фрагмент.

Важно, что изученные соединения проявляют активность против вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), устойчивого к римантадину – противовирусному соединению на основе адамантана, блокатору вирусного ионного канала M2. Это свидетельствует о том, что тетразольные производные имеют альтернативный механизм противогриппозной активности. По-видимому, их биологическая мишень отлична от белка M2 – традиционной мишени для производных адамантана римантадина и амантадина.

### Экспериментальная часть

ИК спектры записаны на фурье-спектрометре для исследования в области среднего ИК диапазона IR Affinity-1 в таблетках KBr. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (400 и 101 МГц соответственно) записаны на спектрометре Bruker Avance III HD 400 NanoBay в ДМСО-*d*<sub>6</sub>, внутренний стандарт – сигналы дейтерированного растворителя ДМСО-*d*<sub>6</sub> (2.50 м. д. для ядер <sup>1</sup>H, 39.5 м. д. для ядер <sup>13</sup>C). Масс-спектры высокого разрешения (ионизация электрораспылением) получены на жидкостном гибридном квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Shimadzu Nexera X2 LCMS-9030. Температуры плавления определены на приборе Büchi M-560 со скоростью нагрева 1°C/мин в интервале плавления. Контроль за ходом реакций осуществлен методом ТСХ на пластинах Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>.

Использованы растворители класса ЧДА без дополнительной очистки. 1-Метил-1*H*-тетразол-5-амин (**2**) и 2-метил-2*H*-тетразол-5-амин (**5**) получены и очищены известными методами. Свойства соединений **2** и **5** соответствуют литературным данным.<sup>9</sup> 2-Сульфанилхинолин-3-карбальдегид (**1**) получен по известной методике.<sup>10</sup>

**3-}{(1-Метил-1*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}-хинолин-2-тиол (**3**). В колбу, снабженную насадкой**

Дина–Старка, добавляют 40 мл *o*-ксилола, 1.00 г (5.3 ммоль) 2-сульфанилхинолин-3-карбальдегида (**1**), 0.52 г (5.3 ммоль) 1-метил-1*H*-тетразол-5-амина (**2**) и 3 капли пиперидина. Реакционную смесь кипятят в течение 2 ч с одновременной отгонкой H<sub>2</sub>O в насадку. По ходу реакции наблюдают растворение исходного соединения **1** и выпадение продукта реакции **3**. Осадок отфильтровывают и промывают петролейным эфиром (40–70°C), высушивают на воздухе. Дальнейшая очистка соединения не требуется. Выход 1.04 г (73%), красный порошок, т. пл. 287–288°C (с разл.). R<sub>f</sub> 0.29 (EtOAc–гексан, 1:2). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д. (*J*, Гц): 4.11 (3H, с, CH<sub>3</sub>); 7.44 (1H, т, *J* = 7.5, H Ar); 7.68 (1H, д, *J* = 8.4, H Ar); 7.73–7.84 (1H, м, H Ar); 8.03 (1H, д, *J* = 7.6, H Ar); 8.85 (1H, с, H Ar); 10.03 (1H, с, CH=N); 14.09 (1H, уш. с, SH). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 33.2 (CH<sub>3</sub>); 116.8 (C Ar); 122.4 (C Ar); 125.6 (C Ar); 130.7 (C Ar); 132.2 (C Ar); 134.7 (C Ar); 137.3 (C Ar); 141.4; 158.8; 167.9; 181.5. Найдено, *m/z*: 271.0763 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>6</sub>S. Вычислено, *m/z*: 271.0760.

**4-}{(1-Метил-1*H*-тетразол-5-ил)амино}-2-фенил-4*H*-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид (**4**). В плоскодонной колбе растворяют 0.50 г (1.8 ммоль) 3-}{(1-метил-1*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}хинолин-2-тиола (**3**), 0.24 г (1.8 ммоль) свежеперегнанного 3-фенилпропин-2-оля (**8**) и 0.56 г (5.5 ммоль) Et<sub>3</sub>N в 30 мл ДМФА. Ход реакции контролируют методом ТСХ (элюент EtOAc–гексан, 1:2). Продукт реакции **4** выпадает в осадок. Реакция проходит за 15 мин. Реакционную смесь охлаждают в морозильной камере в течение 10 ч. Выпавший осадок отфильтровывают, дважды промывают холодным MeOH, высушивают на воздухе. Дальнейшая очистка соединения не требуется. Выход 0.49 г (66%), бесцветные кристаллы, т. пл. 258–259°C. R<sub>f</sub> 0.2 (EtOAc–гексан, 1:2). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д. (*J*, Гц): 3.67 (3H, с, CH<sub>3</sub>); 6.46 (1H, д, *J* = 6.4, CHNH); 7.48 (1H, д, *J* = 6.4, CHNH); 7.64 (4H, уш. с, H Ar); 7.74 (2H, д, *J* = 6.2, H Ar); 7.83 (1H, т, *J* = 7.5, H Ar); 7.99 (1H, д, *J* = 8.3, H Ar); 8.10 (1H, д, *J* = 8.1, H Ar); 8.87 (1H, с, H Ar); 9.35 (1H, с, CH=O). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 32.5 (CH<sub>3</sub>); 49.2 (CHNH); 126.6; 127.4 (C Ar); 127.5 (C Ar); 127.7 (C Ar); 128.0 (C Ar); 129.0; 129.5 (C Ar); 130.9 (C Ar); 131.6 (C Ar); 131.7; 133.4; 138.5 (C Ar); 147.0; 153.9; 155.2; 159.7; 186.6 (CH=O). Найдено, *m/z*: 401.1183 [M+H]<sup>+</sup>. C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>OS. Вычислено, *m/z*: 401.1179.**

**3-}{(2-Метил-2*H*-тетразол-5-ил)имино}метил}-хинолин-2-тиол (**6**) получают по методике синтеза соединения **3** из 2-сульфанилхинолин-3-карбальдегида (**1**) и 2-метил-2*H*-тетразол-5-амина (**5**). Согласно спектру ЯМР <sup>1</sup>H, получают смесь стереоизомеров в соотношении 1:1.5. Разделение изомеров не проводят, смесь используют для дальнейших превращений. Общий выход 1.10 г (77%), оранжевый порошок. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д.: 4.08 и 4.40 (3H, оба с, CH<sub>3</sub>); 5.97 (1H, уш. с, H Ar); 7.28–7.52 (1H, м, H Ar); 7.61–7.82 (1H, м, H Ar); 7.97–8.14 (1H, м, H Ar); 8.37 и 8.80 (1H, с, H Ar); 10.03 и 10.72 (1H, с, CH=N); 13.96 (1H, уш. с, SH). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 40.5; 116.7; 122.1; 122.5; 125.5 (2C);**

130.6; 131.2; 132.3; 132.5; 134.2; 134.8; 136.2; 137.5; 141.1; 141.5; 165.7; 167.6; 169.6; 181.4; 192.3. Найдено,  $m/z$ : 271.0763  $[M+H]^+$ .  $C_{12}H_{11}N_6S$ . Вычислено,  $m/z$ : 271.0760.

**4-[(2-Метил-2H-тетразол-5-ил)амино]-2-фенил-4H-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид (7)** получают по методике синтеза соединения **4** из 3-[[2-метил-2H-тетразол-5-ил]имино]метил}хинолин-2-тиола (**6**) и 3-фенилпропин-2-аля (**8**). Выход 0.50 г (67%), желтые кристаллы, т. пл. 267–268°C (с разл.).  $R_f$  0.43 (EtOAc–гексан, 1:2). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 4.16 (3H, с,  $CH_3$ ); 6.24 (1H, д,  $J = 6.0$ ,  $CHNH$ ); 7.51 (1H, д,  $J = 6.0$ ,  $CHNH$ ); 7.57–7.69 (4H, м, H Ar); 7.72–7.78 (2H, м, H Ar); 7.82 (1H, т,  $J = 7.3$ , H Ar); 7.94–8.01 (1H, м, H Ar); 8.09 (1H, д,  $J = 8.1$ , H Ar); 8.76 (1H, с, H Ar); 9.32 (1H, с,  $CH=O$ ). Спектр ЯМР  $^{13}C$ ,  $\delta$ , м. д.: 39.7 ( $CH_3$ ); 48.6 ( $CHNH$ ); 127.1 (C Ar); 127.3; 127.4 (C Ar); 128.0 (C Ar); 128.3; 129.0 (C Ar); 129.3 (C Ar); 130.9 (C Ar); 131.4 (C Ar); 131.5; 133.6; 138.1 (C Ar); 146.8; 154.2; 159.6; 166.8; 186.5 ( $CH=O$ ). Найдено,  $m/z$ : 401.1184  $[M+H]^+$ .  $C_{21}H_{17}N_6OS$ . Вычислено,  $m/z$ : 401.1179.

**4-Гидрокси-2-фенил-4H-тиопирано[2,3-*b*]хинолин-3-карбальдегид (9)**. В плоскодонную колбу вносят 1.00 г (5.3 ммоль) 2-сульфанилхинолин-3-карбальдегида (**1**), 0.69 г (5.3 ммоль) свежеперегнанного 3-фенилпропин-2-аля (**8**) и 1.60 г (15.8 ммоль)  $Et_3N$  в 50 мл ДМФА. По ходу реакции наблюдают выпадение осадка продукта **9**. Согласно данным тонкослойной хроматографии (EtOAc–гексан, 1:2), реакция проходит за 30 мин. Реакционную смесь охлаждают в морозильной камере в течение 10 ч. Выпавший осадок отфильтровывают, дважды промывают холодным MeOH, высушивают на воздухе. Дальнейшая очистка соединения не требуется. Выход 1.40 г (82%), бесцветные кристаллы, т. пл. 178–180°C.  $R_f$  0.41 (EtOAc–гексан, 1:2). Спектр ЯМР  $^1H$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 5.69–5.79 (1H, м, OH); 6.00–6.10 (1H, м,  $CHON$ ); 7.56–7.70 (6H, м, H Ar); 7.85 (1H, т,  $J = 7.2$ , H Ar); 8.02 (1H, д,  $J = 8.2$ , H Ar); 8.09 (1H, д,  $J = 8.0$ , H Ar); 8.64 (1H, уш. с, H Ar); 9.36 (1H, с,  $CH=O$ ). Спектр ЯМР  $^{13}C$ ,  $\delta$ , м. д.: 62.5 (COH); 127.3 (C Ar); 127.8; 128.1 (C Ar); 128.8 (C Ar); 128.9 (C Ar); 129.5 (C Ar); 130.7 (C Ar); 131.5 (C Ar); 133.7; 138.5 (C Ar); 147.1; 154.2; 158.6; 187.0 ( $CH=O$ ). Найдено,  $m/z$ : 320.0739  $[M+H]^+$ .  $C_{19}H_{14}NO_2S$ . Вычислено,  $m/z$ : 320.0740.

**Исследование биологической активности соединений 4, 7, 9**. В отдельной серии экспериментов исследуют цитотоксические свойства соединений. Из исследуемых соединений готовят серию трехкратных разведений (300–3.7 мкг/мл), после чего вносят их в лунки планшетов с монослоем клеток MDCK (ATCC CCL-34). Планшеты инкубируют в течение 72 ч при 36°C. Анализ выживаемости клеток проводят при помощи метилтетразолиевого теста: в лунки вносят раствор бромида метилтетразолия, который под действием митохондриальных ферментов переходит в нерастворимое фиолетовое производное формазана.<sup>11</sup> Планшеты с клетками выдерживают в течение 2 ч. Осадок растворяют в 0.1 мл на лунку ДМСО. Оптическую плотность в лунках измеряют на планшетном

фотометре Thermo Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 540 нм. На основании полученных данных рассчитывают значения  $CC_{50}$ , то есть концентрацию соединения, приводящую к снижению оптической плотности вдвое по сравнению с лунками без добавления соединений.

**Исследование противовирусной активности соединений 4, 7, 9** проводят при помощи теста на снижение степени цитопатического действия. В опытах используют вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) из коллекции вирусных штаммов Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Изучаемые соединения в диапазоне концентраций вносят к клеткам в лунках планшета, инкубируют в течение 1 ч, затем клетки заражают вирусом в дозе 0.01 TCID<sub>50</sub> на клетку. Клетки инкубируют в течение 72 ч, после чего проводят анализ выживаемости клеток при помощи метилтетразолиевого теста, как описано выше. На основании полученных данных рассчитывают 50% ингибирующую концентрацию для каждого соединения (IC<sub>50</sub>), то есть концентрацию, которая на 50% снижает степень вирусной деструкции клеток, и индекс селективности (SI) – отношение  $CC_{50}$  к IC<sub>50</sub>. Активными считаются соединения, у которых SI был 10 и выше.

Файл сопроводительных материалов, содержащий спектры ЯМР  $^1H$ ,  $^{13}C$  и масс-спектры высокого разрешения всех синтезированных соединений, доступен на сайте журнала <http://hgs.osi.lv>.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Комитета по науке Республики Армения в рамках научного проекта № 20-53-05010 Arm\_a/20RF-138.*

#### Список литературы

- De, A.; Sarkar, S.; Majee, A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2021**, *57*, 410.
- Ostrovskii, V. A.; Popova, E. A.; Trifonov, R. E. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*; Elsevier: Oxford, 2022, vol. 6, p. 182.
- Alizadeh, A.; Rezaiyehraad, R.; Roosta, A.; Halvagar, M. R. *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 12049.
- Kumar, S.; Muthusubramanian, S.; Perumal, S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30826.
- Hepworth, J. D.; Heron, B. M. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Katritzky, A.; Ramsden, Ch.; Scriven, E.; Taylor, R., Eds.; Elsevier: Oxford, 2008, vol. 7, p. 727.
- Ostrovskii, V. A.; Danagulyan, G. G.; Nesterova, O. M.; Pavlyukova, Yu. N.; Tolstyakov, V. V.; Zarubina, O. S.; Slepukhin, P. A.; Esaulkova, Ya. L.; Muryleva, A. A.; Zarubaev, V. V.; Trifonov R. E. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2021**, *57*, 448.
- Ishikawa, H.; Suzuki, T.; Hayashi, Y. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1304.
- Alemán, J.; Núñez, A.; Marzo, L.; Marcos, V.; Alvarado, C.; García Ruano, J. L. *Chem.–Eur. J.* **2010**, *16*, 9453.
- Henry, R. A.; Finnegan, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 923.
- Mistry, B. M.; Jauhari, S. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 635.
- Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *16*, 55.