

Fig. 5. (a) Dopamine, (b) clozapine dihydrobromide and (c) overlap of dopamine onto clozapine.

tively. These values are similar to the 0.96 Å found for the structural isomer of clozapine, HF-2046 (Petcher & Weber, 1976) and the 1.18 and 1.21 Å found in loxapine succinate hydrate (Fillers & Hawkinson, in preparation) and loxapine free base (Cosulich & Lovell, 1977). Fig. 5(c) is an illustration showing the overlap of dopamine onto clozapine dihydrobromide.

A second possibility of overlap exists between dopamine and a portion of the clozapine molecule consisting of ring A, the heteroatom bridge and N(16). Derivatives of clozapine featuring the 1,5-benzodiazepine portion of this molecule have been prepared and evaluated for neuroleptic activity (Ellefson, Woo, Miller & Kehr, 1978; Kukla, 1977). It was found, however, that the 1,5-benzodiazepine portion of clozapine was not responsible for neuroleptic activity.

Data collection at Oak Ridge National Laboratory was sponsored by the Division of Basic Energy Sciences of the Department of Energy under contract with Union Carbide Corporation.

References

- BERGIN, R. & CARLSTRÖM, D. (1968). *Acta Cryst.* **B24**, 1506–1510.
- BURT, D. R., ENNA, S. J., CREESE, I. & SNYDER, S. H. (1975). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4655–4659.
- BUSING, W. R., ELLISON, R. D., LEVY, H. A., KING, S. P. & ROSEBERRY, R. T. (1968). Report ORNL-4143. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- BUSING, W. R. & LEVY, H. A. (1957). *Acta Cryst.* **10**, 180–182.
- COSULICH, D. B. & LOVELL, F. M. (1977). *Acta Cryst.* **B33**, 1147–1154.
- CROMER, D. T. (1965). *Acta Cryst.* **18**, 17–23.
- CROMER, D. T. & MANN, J. B. (1968). *Acta Cryst.* **A24**, 321–325.
- ELLEFSON, C. R., WOO, C. M., MILLER, A. & KEHR, J. R. (1978). *J. Med. Chem.* **21**, 952–957.
- GERMAIN, G., MAIN, P. & WOOLFSON, M. M. (1971). *Acta Cryst.* **A27**, 368–376.
- HORN, A. S. & SNYDER, S. H. (1971). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **68**, 2325–2328.
- KUKLA, M. J. (1977). *J. Heterocycl. Chem.* **14**, 933–935.
- LARSON, A. C. (1967). *Acta Cryst.* **23**, 664–665.
- NYBURG, S. C. (1974). *Acta Cryst.* **B30**, 251–253.
- PETCHER, T. J. & WEBER, H.-P. (1976). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, pp. 1415–1420.
- SEEMAN, P., CHAU-WONG, M., TEDESCO, J. & WONG, K. (1975). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4376–4380.
- STEWART, J. M., KRUGER, G. J., AMMON, H. L., DICKINSON, C. & HALL, S. R. (1972). The XRAY system. Tech. Rep. TR-192. Computer Science Center, Univ. of Maryland, College Park, Maryland.
- STEWART, R. F., DAVIDSON E. R. & SIMPSON, W. T. (1965). *J. Chem. Phys.* **42**, 3175–3187.

Acta Cryst. (1982). **B38**, 1753–1757

Structures de Dérivés de l'Amino-2 Thiazoline, Tautomérie et Courte Distance Intramolécule S...O: (Cyclohexanecarbonyl)amino-2 Δ-2-Thiazoline-1,3, Benzoylimino-2 Thiazolidine-1,3 et (p-Nitrobenzoyl)imino-2 Thiazolidine-1,3

PAR CLAUDINE COHEN-ADDAD

Laboratoire de Spectrométrie Physique, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Boîte postale n° 53, 38041 Grenoble CEDEX, France

(Reçu le 2 juin 1981, accepté le 22 décembre 1981)

Abstract

The crystal structures of three aminothiazoline derivatives, of pharmacological interest, have been determined by X-ray diffraction and compared to previous results: 2-(cyclohexanecarbonyl)amino-Δ²-1,3-thiazoline (I) (anti-inflammatory drug), 2-benzoylimino-

1,3-thiazolidine (II), and 2-(p-nitrobenzoyl)imino-1,3-thiazolidine (III). They crystallize with the following space groups and lattice parameters: (I) C₁₀H₁₆N₂OS, *M_r* = 212.32, *P*₂₁/*c*, *a* = 9.260 (4), *b* = 11.303 (5), *c* = 13.316 (5) Å, β = 128.15 (5)°, *Z* = 4, *d_x* = 1.28 Mg m⁻³; (II) C₁₀H₁₀N₂OS, *M_r* = 206.30, *P*₂₁, *a* = 10.858 (6), *b* = 7.236 (4), *c* = 6.207 (4) Å, β =

94.50 (5)°, $Z = 2$, $d_x = 1.41 \text{ Mg m}^{-3}$; (III) $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, $M_r = 251.30$, $P\bar{1}$, $a = 15.739$ (6), $b = 7.190$ (4), $c = 6.301$ (4) Å, $\alpha = 70.15$ (5), $\beta = 122.45$ (5), $\gamma = 117.45$ (5)°, $Z = 2$, $d_x = 1.60 \text{ Mg m}^{-3}$. The structures were refined to R values of 6.8 (I), 7.0 (II) and 6.6% (III) for 1217, 688 and 1540 intensities respectively. The conformations were found to be 'amino' for (I) and 'imino' for (II) and (III). These results are in agreement with previous NMR results. A short $\text{S} \cdots \text{O}$ intramolecular distance of about 2.70 Å is observed in the three compounds and could correspond to a very weak bond.

Introduction

Une série d'amides dérivées de l'amino-2 thiazoline, de formule générale représentée par l'équilibre tautomère suivant:



présente d'intéressantes activités anti-inflammatoires et immuno-dépressives variant très nettement avec le substituant R et en particulier dans le cas d'un noyau benzénique substitué avec la position du substituant (Viallet, 1979). Nous avons précédemment montré par la détermination des structures cristallines de trois composés (dérivés *ortho* substitués avec $R = \text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ et $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, dérivés *para* substitués avec $R = \text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$), et par des études spectroscopiques portant sur l'ensemble de la série de dérivés (infra-rouge, RMN du ^{13}C en solution) que la forme 'amino' (a) correspond à une bonne activité pharmacologique et que les composés de forme 'imino' (b) sont inactifs (Cohen-Addad & Viallet, 1978; Cohen-Addad, Viallet & Boucherle, 1979; Viallet, Boucherle & Cohen-Addad, 1979). Par ailleurs

la géométrie du groupement $\begin{matrix} \text{S} \\ \diagdown \\ \text{C}-\text{N} \\ \diagup \\ \text{N} \end{matrix}$ dans ces trois composés est en accord avec la classification proposée antérieurement en fonction de la forme tautomère du dérivé (Kálmán, Argay, Ribár & Toldy, 1977).

Il nous a paru intéressant de préciser ces premiers résultats par la détermination de structures cristallines d'autres composés de cette série. Le présent travail concerne les composés suivants:

– (Cyclohexanecarbonyl)amino-2 Δ -2-thiazoline-1,3 (I) doué d'une bonne activité pharmacologique dont le spectre RMN (^{13}C) correspond très nettement à une forme 'amino' (Viallet *et al.*, 1979).

– Benzoylimino-2 thiazolidine-1,3 (II), très peu actif, et (*p*-nitrobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 (III), inactif, correspondant tous les deux en solution à une forme 'imino'.

Détermination des structures cristallines

Les synthèses des composés ont été décrites précédemment (Viallet, 1979).

Partie expérimentale

Les composés cristallisent à 277 K par évaporation lente d'une solution dans l'éthanol pour (I) et (II), et dans le diméthylsulfoxyde pour (III). Les mesures ont été effectuées à l'aide de diffractomètres automatiques dans les conditions suivantes:*

– Composé (I), longueur d'onde $K\alpha$ du molybdène, diffractomètre Siemens, intensités diffractées mesurées avec un balayage de type θ scan par la méthode des cinq points (Troughton, 1969).

– Composés (II) et (III), longueur d'onde $K\alpha$ du cuivre, diffractomètre Philips PW 1100, intensités diffractées mesurées avec un balayage $\theta-2\theta$. Les paramètres de maille ont été affinés à partir de ces mesures.

Détermination des structures

Les structures ont été résolues par méthode directe de multisolution (Germain, Main & Woolfson, 1971).†

Les paramètres cristallographiques ont été affinés par une méthode de moindres carrés (Busing & Levy, 1962) où la quantité $\sum w(F_o - F_c)^2$ est minimisée. Les positions des atomes d'hydrogène ont été calculées;

* Les mesures ont été effectuées avec un diffractomètre Siemens (Institut Laue-Langevin, Grenoble) et un diffractomètre Philips PW 1100 (Groupement Grenoblois de Diffractométrie, CNRS, Grenoble).

† Tous les calculs ont été effectués sur ordinateurs IRIS 80 et Honeywell-Bull HB 68.

Tableau 1. (Cyclohexanecarbonyl)amino-2 Δ -2-thiazoline-1,3 (I): coordonnées cristallographiques ($\times 10^4$) avec écarts standard entre parenthèses

$$B_{\text{éq}} = (U_1 U_2 U_3)^{1/3}$$

	x	y	z	$B_{\text{éq}}$ (Å ²)
C(1)	2754 (5)	1111 (4)	8675 (4)	2,6
C(2)	224 (8)	767 (5)	6343 (5)	4,6
C(3)	1325 (7)	-297 (4)	7142 (5)	4,0
C(4)	3997 (6)	2696 (4)	10262 (4)	3,2
C(5)	5666 (6)	3030 (4)	11581 (4)	3,1
C(6)	5981 (7)	4361 (4)	11705 (5)	4,0
C(7)	7597 (7)	4711 (4)	13054 (5)	4,4
C(8)	7355 (7)	4282 (5)	14016 (5)	4,5
C(9)	7072 (7)	2954 (5)	13920 (5)	4,4
C(10)	5427 (7)	2586 (4)	12561 (5)	4,0
O	2671 (5)	3342 (3)	9595 (4)	4,6
N(1)	4084 (5)	1608 (3)	9846 (3)	2,9
N(2)	2884 (5)	55 (3)	8428 (3)	3,3
S	847 (2)	1959 (1)	7449 (1)	3,3

Tableau 2. Benzoylimino-2 thiazolidine-1,3 (II): coordonnées cristallographiques ($\times 10^4$) avec écarts standard entre parenthèses

$$B_{\text{éq}} = (U_1 U_2 U_3)^{1/3}.$$

	x	y	z	$B_{\text{éq}}$ (Å ²)
C(1)	-184 (5)	4677	2233 (10)	3,5
C(2)	2155 (6)	4421 (15)	2905 (11)	4,0
C(3)	1520 (6)	5122 (21)	4835 (11)	4,8
C(4)	-1708 (6)	4523 (17)	-529 (10)	3,5
C(5)	-2998 (6)	3960 (16)	-1096 (11)	3,5
C(6)	-3497 (6)	4167 (16)	-3248 (11)	3,9
C(7)	-4681 (7)	3625 (17)	-3800 (13)	4,9
C(8)	-5395 (7)	2842 (18)	-2292 (14)	4,8
C(9)	-4907 (8)	2619 (18)	-161 (18)	4,5
C(10)	-3707 (6)	3185 (17)	401 (11)	3,9
O	-1027 (4)	4986 (17)	-1957 (7)	4,3
N(1)	-1356 (4)	4525 (17)	1627 (8)	3,5
N(2)	225 (4)	4755 (19)	4312 (7)	4,1
S	1061 (1)	4809 (14)	589 (2)	3,7

Tableau 3. (*p*-Nitrobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 (III): coordonnées cristallographiques ($\times 10^4$) avec écarts standard entre parenthèses

$$B_{\text{éq}} = (U_1 U_2 U_3)^{1/3}.$$

	x	y	z	$B_{\text{éq}}$ (Å ²)
C(1)	7745 (2)	5311 (5)	2072 (5)	2,8
C(2)	9729 (3)	7653 (6)	3426 (7)	3,9
C(3)	9194 (3)	6731 (6)	1021 (6)	3,6
C(4)	6452 (2)	3975 (5)	3388 (6)	2,9
C(5)	5287 (2)	2778 (4)	2739 (5)	2,8
C(6)	4924 (3)	2677 (5)	4366 (6)	3,3
C(7)	3860 (3)	1564 (6)	3834 (6)	3,6
C(8)	3178 (2)	531 (5)	1721 (6)	3,2
C(9)	3514 (3)	592 (5)	65 (6)	3,5
C(10)	4574 (3)	1748 (5)	581 (6)	3,3
N(1)	6729 (2)	4199 (4)	1601 (5)	2,9
N(2)	8063 (2)	5647 (5)	364 (5)	3,4
O(1)	7073 (2)	4635 (4)	5478 (4)	3,9
S	8809 (1)	6499 (1)	4786 (2)	3,1
N(3)	2054 (2)	-689 (5)	1210 (6)	4,2
O(2)	1785 (2)	-765 (5)	2750 (6)	5,6
O(3)	1444 (2)	-1585 (5)	-675 (6)	5,3

celle de l'atome d'hydrogène lié à l'atome d'azote a été déterminée à partir de sections de Fourier différence. Les affinements, portant sur les intensités telles que $I > 3\sigma(I)$, ont été réalisés dans les conditions suivantes: coordonnées et facteurs de température anisotropes de la forme $\exp[-(h^2\beta_{11} + k^2\beta_{22} + l^2\beta_{33} + 2hk\beta_{12} + 2hl\beta_{13} + 2kl\beta_{23})]$ variables pour les atomes C, O, N, S, coordonnées et facteurs de température isotropes de 3 à 5 Å² selon l'atome C ou N correspondant, maintenus fixes pour les atomes d'hydrogène. Une loi de pondération approximativement linéaire est obtenue empiriquement par le tracé de la courbe $w(F_o - F_c)^2$ en fonction de F_o (Rollett, 1965). Les valeurs de l'indice résiduel pondéré, $R = [\sum w(F_o - F_c)^2 / \sum wF_o^2]^{1/2}$, sont

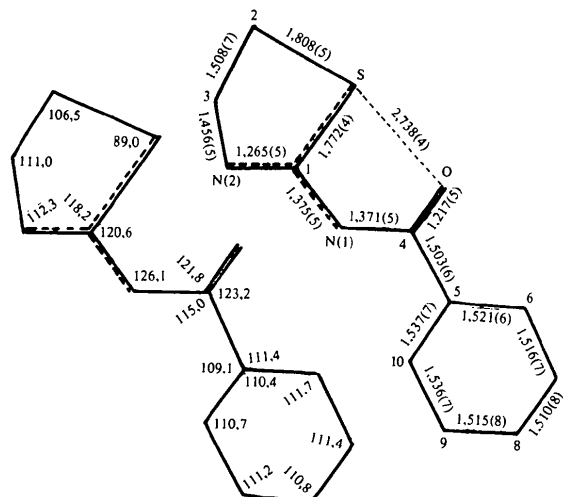


Fig. 1. (Cyclohexanecarbonyl)amino-2 Δ2 thiazoline-1,3 (I): distances interatomiques (Å) et angles de valence (°) (σ sur les angles: 0,2–0,4°).

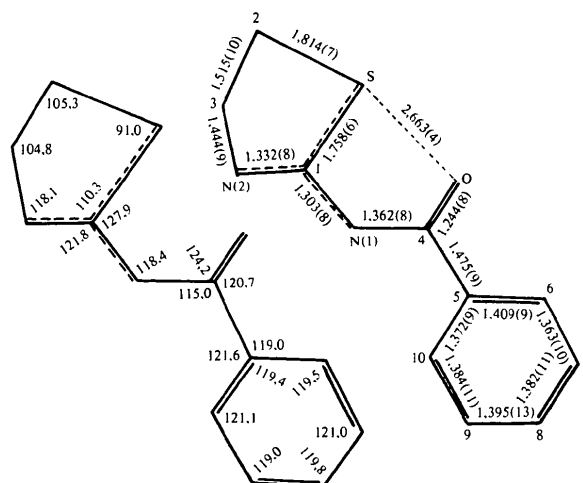


Fig. 2. Benzoylimino-2 thiazolidine-1,3 (II): distances interatomiques (Å) et angles de valence (°) (σ sur les angles = 0,3–0,8°).

les suivantes: composé (I), 1217 intensités, $R = 0,068$, composé (II), 688 intensités, $R = 0,070$, composé (III), 1540 intensités, $R = 0,066$.

Les coordonnées cristallographiques des atomes sont données dans les Tableaux 1, 2 et 3. Les Figs. 1, 2 et 3 comportent les distances interatomiques et les angles de valence; la Fig. 4 représente les projections des molécules selon le plan C(1)–N(2)–S (Johnson, 1965) et les principaux angles de torsion.*

* Les listes des facteurs de structure, des facteurs d'agitation thermique anisotropes des coordonnées des atomes d'hydrogène non affinés et des plans moyens des molécules ont été déposées au dépôt d'archives de la British Library Lending Division (Supplementary Publication No. SUP 36691: 29 pp.). On peut en obtenir des copies en s'adressant à: The Executive Secretary International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, Angleterre.

Description des structures – discussion

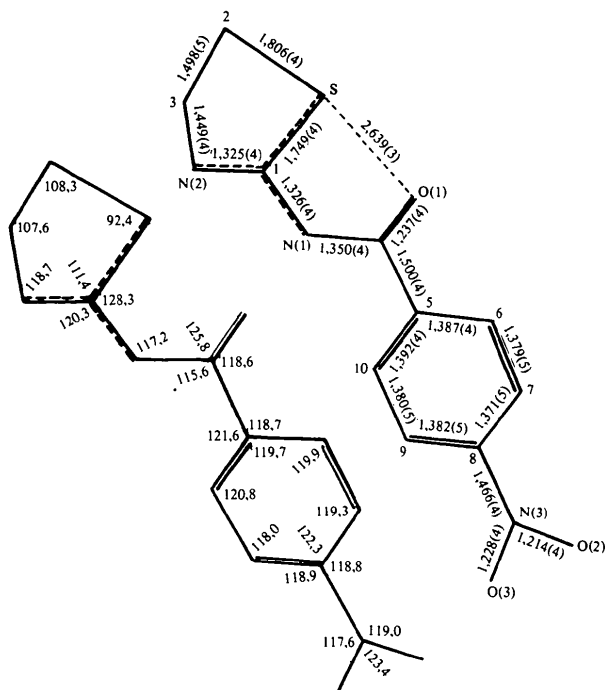


Fig. 3. (*p*-Nitrobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 (III): distances interatomiques (Å) et angles de valence (°) (σ sur les angles: 0,2–0,3).

Conformations moléculaires

Dans les trois molécules, le cycle thiazoline n'est pas plan, comme le montrent les angles de torsion de la Fig. 4. Il peut être décrit par le plan moyen P_1 des atomes C(1), S, N(2), C(3), la distance de C(2) à ce plan valant respectivement pour (I), (II) et (III) 0,28, 0,49 et 0,18 Å. Dans les trois cas, ce cycle a une conformation proche de la forme demi-chaîsse comme le montrent les valeurs suivantes du paramètre d'asymétrie, ΔC_2 (C1) (Duax, Weeks & Rohrer, 1976): ΔC_2 (C1) = 3,3, 4,4 et 2,1° pour (I), (II) et (III) respectivement. Cette conformation est différente de celle observée de type enveloppe dans une molécule proche de ces composés, la benzoylimino-2 méthyl-3 thiazolidine-1,3 (Kálmán & Párkányi, 1980).

Dans les composés (II) et (III) les molécules décrites par les trois plans P_1 , P_2 (groupement amide) et P_3 (cycle benzénique) sont proches d'un plan unique avec les faibles valeurs des angles dièdres suivantes: (P_1, P_2) = 13,2 et 1,1°, (P_2, P_3) = 7,3 et 8,2° pour (II) et (III) respectivement. Le composé (III) a une structure très voisine de celle de la (*p*-bromobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 que nous avons étudiée précédemment (Viallet *et al.*, 1979).

Tableau 4. Distances (Å) et angles (°) caractéristiques des deux formes tautomères du cycle thiazoline et comparaison avec les trois composés étudiés

	Composé (I)	Composé (II)	Composé (III)	Forme 'amino'	Forme 'imino'
C(1)–N(1)	1,375 (5)	1,303 (8)	1,326 (4)	1,30–1,34	1,25–1,29
C(1)–N(2)	1,265 (5)	1,332 (8)	1,325 (4)	1,31–1,34	1,33–1,39
C(1)–S	1,772 (4)	1,758 (6)	1,749 (4)	1,75–1,77	1,76–1,77
S–C(1)–N(1)	120,6 (3)	127,9 (5)	128,3 (2)	116–121	125–128
S–C(1)–N(2)	118,2 (3)	110,3 (4)	111,4 (2)	118–119	110–111
C(1)–N(2)–C(3)	112,3 (3)	118,1 (5)	118,7 (3)	110–112	114–114

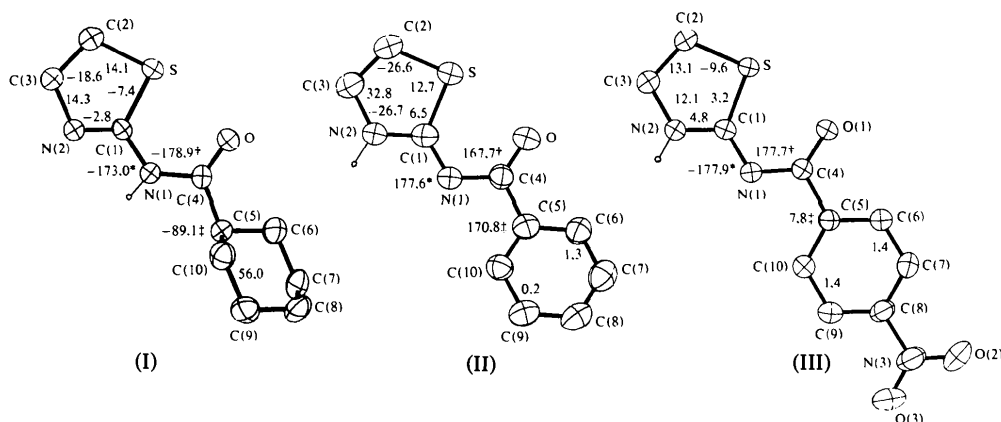


Fig. 4. Conformation des composés (I), (II) et (III): projection des molécules selon le plan C(1)–N(2)–S et principaux angles de torsion (°). [σ sur les angles 0,4–0,6° (I), 0,7–1,3° (II), 0,3–0,5° (III)]. *N(2)–C(1)–N(1)–C(4), †C(1)–N(1)–C(4)–C(5), ‡N(1)–C(4)–C(5)–C(10).

La localisation sur des sections de Fourier différence de l'atome d'hydrogène lié à l'atome d'azote montre que (I) est une forme 'amino', (II) et (III) étant des formes 'imino'. Le Tableau 4 permet de comparer la géométrie du groupement $\begin{matrix} \text{S} \\ \diagup \\ \text{C}-\text{N} \\ \diagdown \\ \text{N} \end{matrix}$ et la forme tautomère de chaque composé avec la classification proposée précédemment (Kálmán *et al.*, 1977; Argay, Kálmán, Lazar, Ribár & Tóth, 1977). Un bon accord est observé: la géométrie de (I) correspond tout à fait à une forme 'amino', ce qui confirme les résultats obtenus par RMN. Pour (II) et (III), comme précédemment, les longueurs des liaisons C-N paraissent moins significatives que les valeurs des angles et pourraient être liées à un phénomène de mésomérie comme dans la (*o*-chlorobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 précédemment étudiée par diffraction des neutrons (Cohen-Addad, Savariault & Lehmann, 1981).

Il n'y a pas dans ces composés, équilibre entre les deux formes tautomères, une seule forme étant observée dans le cristal. Les résultats sont en accord avec les conformations prévues en solution par RMN et montrent donc que la forme tautomère de ces composés est la même en solide et en solution. La comparaison avec les études de l'activité pharmacologique met en évidence la relation entre la forme 'amino' et une bonne activité pharmacologique, alors que les formes 'imino' sont en général inactives.

Enchaînement intermoléculaire

Comme dans les composés étudiés antérieurement (Cohen-Addad & Viallet, 1978; Viallet *et al.*, 1979), le composé (I), 'amino', forme des dimères par l'intermédiaire de liaisons hydrogène N(1)-H...N(2) de longueur 2,953 (5) Å autour d'un centre de symétrie. Dans les composés (II) et (III) de forme 'imino', les molécules s'enchaînent par des liaisons N(2)-H...O de longueur 2,780 (6) et 2,776 (4) Å respectivement, le long de l'axe *c*. Les deux types d'enchaînement ont déjà été décrits et présentés précédemment (Viallet *et al.*, 1979).

Courte distance intramoléculaire S...O

On observe pour les trois composés une courte distance intramoléculaire S...O très inférieure à la somme des rayons de van der Waals, 3,3 Å: 2,74 (I), 2,66 (II), 2,64 (III). L'angle C(2)-S...O est proche de 180° [163,0 (I), 162,2 (II), 164,3° (III)] et il y a formation d'un pseudo-cycle S-C(1)-N(1)-C(4)-O pratiquement plan, l'écart au plan moyen de ce cycle ne dépassant pas 0,1 Å. Un tel phénomène a déjà été

observé dans les autres composés de la série précédemment étudiée, et également dans la benzoylimino-2 méthyl-3 thiazolidine-1,3 (Kálmán & Párkányi, 1980) et pourrait correspondre selon ces auteurs à une interaction faible avec une participation possible des orbitales *p* et *d* de l'atome de soufre. Par ailleurs dans la (*o*-chlorobenzoyl)imino-2 thiazolidine-1,3 (Cohen-Addad *et al.*, 1981), l'examen de la densité de déformation (*X-N*) ne révèle pas de densité électronique notable le long de la liaison S...O, de 2,68 Å dans le composé. Cette interaction si elle existe doit donc être très faible.

L'étude par diffraction des neutrons de composés présentant une très courte distance S...O est en projet et devrait apporter des informations complémentaires sur ce problème.

Tous nos remerciements vont à Mme le Professeur J. Lajzéro-wicz pour ses judicieux conseils, à Mme M. P. Viallet et M le Professeur A. Boucherle qui ont synthétisé les composés, à G. d'Assenza pour son assistance technique. Nous remercions également M A. Durif pour son aide lors de certaines mesures.

Références

- ARGAY, GY., KÁLMÁN, A., LAZAR, D., RIBÁR, B. & TÓTH, G. (1977). *Acta Cryst.* B33, 99-105.
- BUSING, W. R. & LEVY, H. A. (1962). *ORXFLS* 3. Report ORNL-TM-271. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- COHEN-ADDAD, C., SAVARIAULT, J. M. & LEHMANN, M. S. (1981). *Acta Cryst.* B37, 1703-1706.
- COHEN-ADDAD, C. & VIALLET, M. P. (1978). *Cryst. Struct. Commun.* 7, 341-345.
- COHEN-ADDAD, C., VIALLET, M. P. & BOUCHERLE, A. (1979). *Acta Cryst.* B35, 2109-2112.
- DUAX, W. L., WEEKS, C. M. & ROHRER, D. C. (1976). *Top. Stereochem.* 9, 271-383.
- GERMAIN, G., MAIN, P. & WOOLFSON, M. M. (1971). *Acta Cryst.* A27, 368-376.
- JOHNSON, C. K. (1965). *ORTEP*. Report ORNL-3794. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- KÁLMÁN, A., ARGAY, GY., RIBÁR, B. & TOLDY, L. (1977). *Tetrahedron Lett.* 48, 4241-4244.
- KÁLMÁN, A. & PÁRKÁNYI, L. (1980). *Acta Cryst.* B36, 2372-2378.
- ROLLETT, J. S. (1965). *Computing Methods in Crystallography*, p. 114. Oxford: Pergamon Press.
- TROUGHTON, P. G. H. (1969). PhD Thesis, Chemical Crystallography Laboratory, Imperial College, London.
- VIALLET, M. P. (1979). Thèse d'Etat en Pharmacie, Grenoble.
- VIALLET, M. P., BOUCHERLE, A. & COHEN-ADDAD, C. (1979). *Eur. J. Med. Chem.* 14, 553-559.