

SYNTHÈSE DE L'ACIDE [PYRIDINYL-2-( $^{14}\text{C}$ -2,6) DITHIO]-3 PROPANOÏQUE  
 REACTIF DE COUPLAGE COVALENT.

J.P. NOEL, L. PICHAT\*

SERVICE DES MOLECULES MARQUEES  
 CEN-SACLAY - 91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX

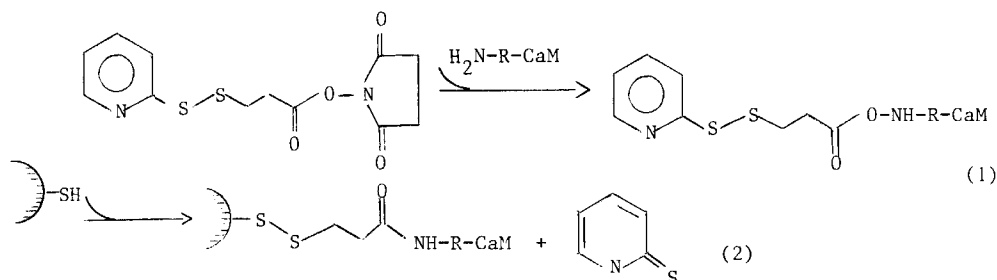
SUMMARY

3-( [2,6- $^{14}\text{C}$  ] 2-pyridinyldithio) propanoic acid, a disulphide covalent coupling reagent was synthesized in 12 steps from sodium [  $^{14}\text{C}$  ] cyanide. Condensation of sodium [  $^{14}\text{C}$  ] cyanide with 1,3-dibromopropane gave, after hydrolysis [1,5- $^{14}\text{C}$  ] glutaric acid: 4 which was converted into [1,5- $^{14}\text{C}$  ] glutarimide : 5 by heating at 280°C with anhydrous ammonia. The imide : 5 was then converted into [2,6- $^{14}\text{C}$  ] 2,6-dichloropyridine : 6 by treatment with phosphorous penta and trichlorides. Chlorine removal from 6 by hydrogen (Raney Nickel) gave [2,6- $^{14}\text{C}$  ] pyridine : 7 which was isolated as the hydrochloride. The latter was transformed into [2,6- $^{14}\text{C}$  ] pyridine-N-oxide : 11 by hydrogen peroxide treatment. 11 treated by acetic anhydride (15 hours - 130°C) rearranged into 2-acetyloxy [2,6- $^{14}\text{C}$  ] pyridine : 12 which was hydrolysed into [2,6- $^{14}\text{C}$  ] 2-pyridone : 13. Thiation of the latter by  $\text{P}_2\text{S}_5$  in xylene gave 2-mercapto [2,6- $^{14}\text{C}$  ] pyridine : 10 which was then oxidized into [2,6- $^{14}\text{C}$  ] 2-dipyridinyldisulphide : 14 the chlorination of which lead to [2,6- $^{14}\text{C}$  ] 2-pyridinylsulfenyl chloride : 15 which was not isolated. It was condensed with 3-mercapto propanoic acid to give 1 with an overall yield of 4% based on sodium cyanide - Specific activity was 55 mCi/mMol. The radiochemical purity checked by TLC and HPLC was 98.7%.

\* Address any correspondence to this author.

L'acide (pyridinyl-2 dithio)-3 propanoïque : 1 et certains de ses dérivés ont été utilisés comme agent de couplages covalents avec les polypeptides, les protéines (13) (18) pour l'obtention de polymères modifiés pour la chromatographie d'affinité (14).

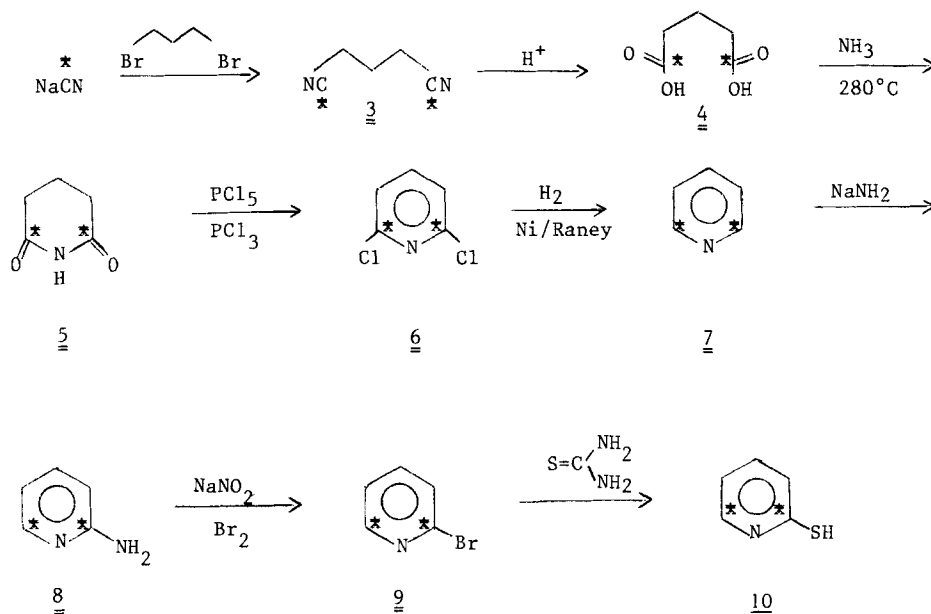
Récemment (19), l'ester N-hydroxysuccinimidyl de 1 a permis la synthèse du dérivé thiol correspondant de la calmoduline (équation 1) lequel a ensuite été couplé de manière covalente aux groupes thiol libres de Sépharose 4B, avec formation d'une liaison disulfure mixte pour utilisation en chromatographie d'affinité (équation 2).



D'une façon plus générale, l'acide (pyridinyl-2 dithio)-3 propanoïque 1 et certains de ses dérivés constituent des agents de couplage hétérobifonctionnels très utilisés pour la préparation de protéines hybrides, selon une stratégie séquentielle évitant l'obtention d'homopolymères des protéines à coupler ou de produits de réticulation anarchique. Sous sa forme d'acide carboxylique, après activation à l'aide d'un carbodiimide hydrosoluble, le réactif 1 a ainsi été utilisé pour la préparation de conjugués dénommés Immunotoxines comportant un bras de couplage disulfure entre un anticorps et la chaîne A de la ricine (15-17,20-24). De même, l'ester N-hydroxy succinimidyl de 1 a été employé dans la préparation de nombreux hybrides protéiques (13,18,25-29). Dans les conditions usuelles d'emploi du réactif 1, celui-ci est tout d'abord fixé sur l'une des protéines à coupler en créant une liaison amide entre son extrémité carboxylique et un groupement amino de la protéine. Les disulfures mixtes portés par la protéine ainsi dérivatisée sont alors soumis à l'attaque d'un groupement thiol appartenant à l'autre entité à coupler, ce qui se traduit par la libération de thio-2-pyridone dont l'absorption à 343 nm permet habituellement un excellent suivi spectrophotométrique de la réaction de couplage. Néanmoins, si une telle opération doit être effectuée sur de très petites quantités de protéines la sensibilité de la mesure spectrophotométrique devient alors insuffisante et le recours à une molécule radioactive est la seule façon pratique de régler ce problème analytique. C'est la raison pour laquelle nous décrivons dans cet article le détail de la synthèse de 1 marqué au  $^{14}C$  dans le noyau pyridine sur les positions 2 et 6.

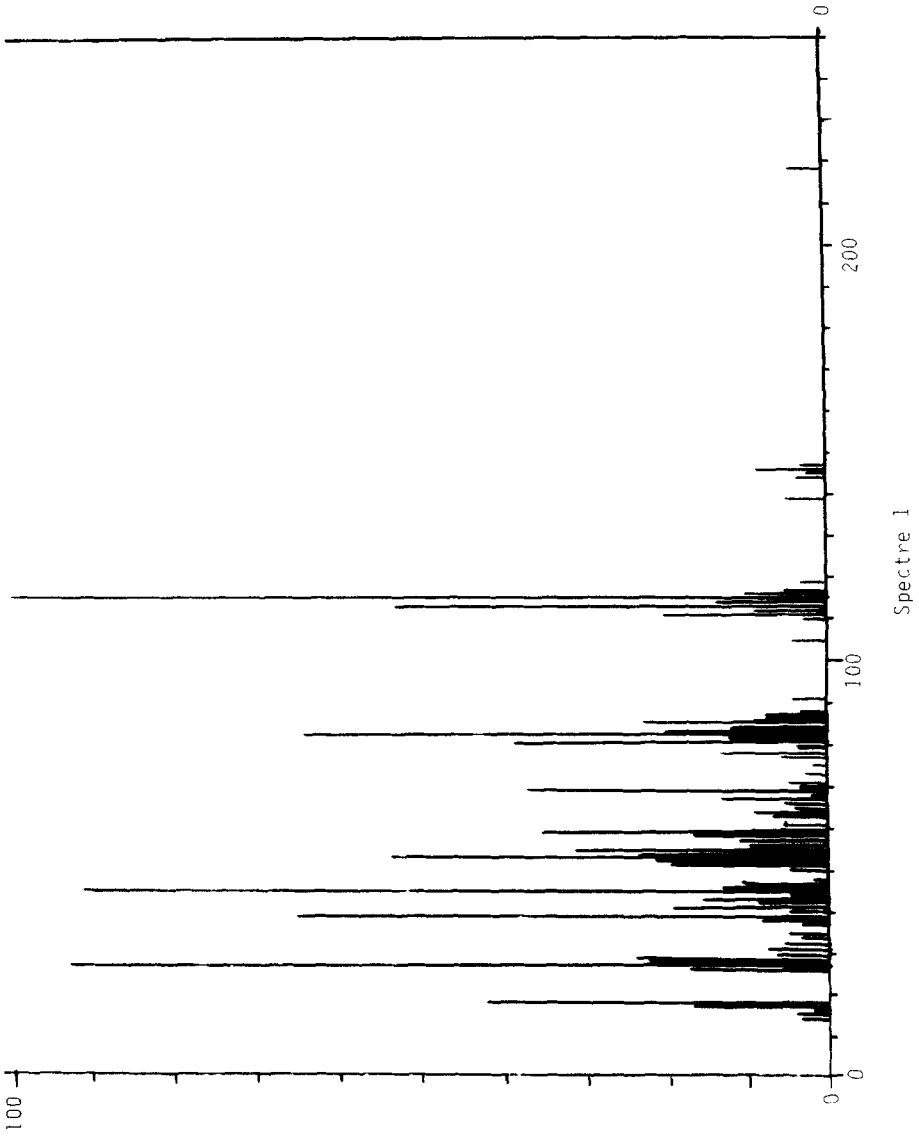
Initialement, nous avons prévu de suivre le schéma 1 pour l'obtention de la mercapto-2 pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 10 nécessaire. Ce schéma prend avantage de réactions aux stades 5 et 6 que nous avons rapportées, pour une autre synthèse, il y a de nombreuses années (2).

Schéma 1

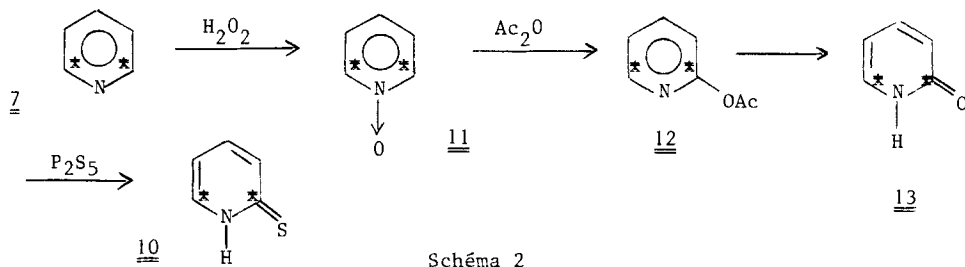


La condensation du cyanure de sodium (<sup>14</sup>C) : 2 avec le di bromo 1-3 propane conduit au dicyano(<sup>14</sup>C-1,3) propane : 3 dont l'hydrolyse en milieu chlorhydrique fournit l'acide glutarique (<sup>14</sup>C-1,5) (1) : 4 avec un rendement de 80%. La pureté de l'acide est contrôlée par radiochromatographie liquide à haute performance (CLHP). La cyclisation de 4 en glutarimide (<sup>14</sup>C-2,6) : 5 est effectuée avec un rendement de 81% par barbottage d'ammoniac à  $280^\circ\text{C}$  selon (2). La chloration de 5 avec  $\text{PCl}_5$  dans  $\text{PCl}_3$  (3) conduit à la dichloro-2,6 pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 6 avec un rendement de 60%. L'hydrogénation catalytique avec le nickel de Raney, du produit brut précédent fournit la pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 7 avec un rendement de 70% (2).

L'action de l'amidure de sodium sur la pyridine devait permettre d'obtenir l'aminopyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 8 (4). La bromo-2-pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 9 étant obtenue, via le sel de diazonium de 8, en présence de brome et d'acide bromhydrique (5). La mercapto-2 pyridine : 10 devrait être obtenue par action de la thiourée sur 9 selon (6).



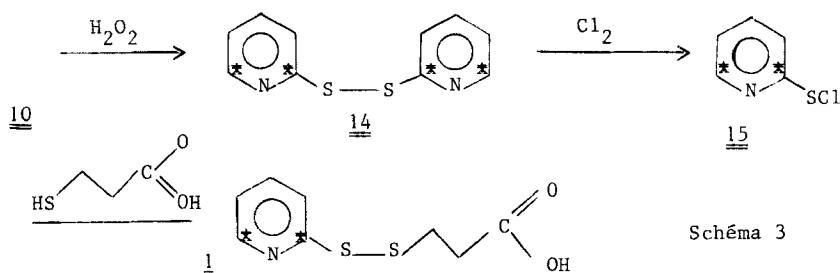
Les difficultés rencontrées pour obtenir la pyridine anhydre sur des microquantités (1,5 mmoles) nous ont conduits à modifier le schéma 1 à partir du stade 7 et opter pour le schéma 2 :



L'adaptation de la méthode d'Ochaia (7) permet d'obtenir à partir du chlorhydrate de pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 7 le N-oxycarbone de pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 11 par action de l'eau oxygénée dans l'acide acétique en présence d'acétate de sodium. Le rendement de cette étape est de 72% après recyclage de la pyridine n'ayant pas réagi. 11 chauffé en présence d'anhydride acétique selon (8) et (9) fournit la pyridone-2 (<sup>14</sup>C-2,6) : 13 via l'acétyloxy-2 pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 12 avec un rendement brut de 94% et de 74% après purification par chromatographie liquide sur silice.

Des essais de thiolation à partir de 13 ont été effectués à l'aide du réactif de Lawesson : [bis-(méthoxy-4 phenyl)-2,4] phosphétane-1,3 disulfure (10). Les rendements dé terminés par CLHP étaient de 50%. Des essais effectués selon (11) par chauffage de 13 dans P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> ont donné de faibles rendements dûs à la difficulté d'homogénéiser le milieu réactionnel sur des micro-quantités. Par contre 13 chauffé avec P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> en suspension dans le xylène a donné 10 avec des rendements de 75% (dosage CLHP). Lors de la synthèse radioactivé la mercapto-2 pyridine : 10 purifiée par chromatographie liquide sur silice s'est oxydée en partie pour fournir un mélange de 80% de 10 et 20% de disulfure de di(pyridinyl-2) (<sup>14</sup>C-2,6) : 14. Le rendement global de cette étape est après purification de 73%.

La synthèse est enfin poursuivie selon le schéma 3 : (12).



14 est obtenu par oxydation de 9 en présence d'eau oxygénée, le produit est recueilli par filtration. Le chlore réagit ensuite à basse température (-40°C) sur 14 pour donner le chlorure de sulfé-nyl-2 pyridine ( $^{14}\text{C}$ -2,6) : 15 qui sans être isolé est mis en réaction avec l'acide mercapto-3 propanoïque pour fournir 1 qui est purifié par extraction, précipitation et chromatographie liquide à haute performance sur colonne de phase inverse.

Le rendement en produit pur à partir de 10 est de 30%. Les impuretés principales recueillies au cours de la purification finale sont 10 et 14 et représentent 27% de l'activité mise en jeu.

Le produit contrôlé par chromatographie en couche mince et par CLHP présente une pureté radioactive de 98,7% ; 14 est l'impureté majeure (1%) présente dans le produit.

L'activité spécifique initiale (89 mCi/mMole) déterminée par spectrométrie de masse a été abaissée à 55 mCi/mMole par dilution isotopique avec de l'entraîneur froid.

Le spectre U.V. du produit marqué est identique à celui du produit "froid", l'activité spécifique déterminée à partir de ces spectres confirme celle obtenue par spectrométrie de masse.

Le rendement global à partir du cyanure de sodium  $^{14}\text{C}$  est de 4%.

### PARTIE EXPERIMENTALE

Abréviations : C.C.M. : chromatographie couche mince.

C.L.H.P. : chromatographie liquide haute performance.

Acide glutarique : 4

A 500 mCi de cyanure de sodium sec, (5,55 mmole) ; Activité spécifique 45 mCi/mMole) on ajoute 10 ml de diméthylsulfoxyde anhydre et 2,8 mmole de dibromo-1,3 propane distillé. On chauffe 1 heure à 90°C. On élimine le diméthylsulfoxyde par évaporation sous vide et reprend le dicyano-1,3 propane formé par 20 ml d'acide sulfurique à 50% en poids. On porte à reflux 15 heures et extrait 4 en continu à l'éther. On recueille 400 mCi d'acide glutarique.

C.L.H.P. : Colonne Aminex HP x 87 (Bio. Rad.) élution : Acide sulfurique 0,013 N ;  $k' = 1,1$ .

La pureté radiochimique du produit est de 98%.

Glutarimide (<sup>14</sup>C-2,6) : 5

L'acide précédent (400 mCi; 4,4 mmoles) est porté à sec dans un tube étroit. On le chauffe à 150°C pendant 1h30mn sous courant d'ammoniac sec puis la température est portée progressivement à 280°C ; elle est maintenue à cette valeur pendant 30 mn toujours sous courant d'ammoniac. Une partie du produit se sublime sur les parois froides du tube. Après refroidissement on reprend par du méthanol, porte à sec et sublime à 80°C sous haut-vide. On recueille 380 mCi de produit radioactivement pur.

C.C.M. : Support : Whatman KC-18 - solvant : méthanol : 80, eau : 20 ; Rf : 0,70.

Dichloro-2,6-pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 6

La glutarimide (380 mCi ; 4,3 mmoles) est portée à sec dans un ballon de forme poire. On y ajoute 2380 mg de pentachlorure de phosphore (11,4 mmoles) et 3 ml de trichlorure de phosphore. On agite à la température ambiante pendant 48 heures. on reprend avec de l'eau glacée, agite pendant 1 heure et extrait la dichloro-2,6 pyridine en continu par le pentane. On recueille 228 mCi de produit contenant une impureté qui est probablement de la trichloro 2-4-6 pyridine (<sup>14</sup>C-2,6).

C.C.M. : Support : Whatman KC-18 - solvant : méthanol : 80, eau : 20 ; Rf : 0.80-impureté ; Rf : 0,75.

Pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 7

Dans un ballon contenant environ 1 g de Nickel de Raney (Prolabo) on ajoute 800 mg de potasse en pastille dissous dans 15 ml d'éthanol. On agite pendant 1 heure sous atmosphère d'hydrogène. On ajoute ensuite la dichloropyridine brute en solution dans 15 ml d'éthanol. On laisse sous hydrogène pendant 15 heures ; on purge à l'azote, filtre et recueille 158 mCi de pyridine en solution dans l'éthanol.

La pyridine est contrôlée par C.L.H.P. en phase inverse. Colonne Zorbax C-8 ; élution : méthanol : 50, eau : 50 , détection U.V. 254 nm ; k' = 1.

N-oxyde de pyridine ( $^{14}\text{C}$ -2,6) : 11

La pyridine en solution dans l'éthanol est reprise par 10 ml de HCl et portée à sec par évaporation sous vide. On ajoute alors au chlorhydrate de pyridine 2 ml d'acide acétique, 1 ml d'eau oxygénée à 32% et 164 mg d'acétate de sodium (2 mmoles). On chauffe 3 heures à 75°C. On transfère sous vide les solvants et la pyridine n'ayant pas réagi, on reprend à l'eau et transfère à nouveau l'eau et la pyridine résiduelle. On reprend le résidu au chloroforme, ajoute du carbonate de sodium anhydre et filtre.

La pyridine n'ayant pas réagi est à nouveau traitée comme précédemment.

On recueille après réunion des deux fractions : 111 mCi d'oxyde de pyridine.

Le produit est purifié par chromatographie sur silice (appareil Mini-Prep-Jobin-Yvon) : solvant d'élution : chloroforme : 95, méthanol : 5. On obtient 108 mCi de produit radioactivement pur.

Pyridone-2 ( $^{14}\text{C}$ -2,6) : 13

Dans un ballon contenant l'oxyde de pyridine (108 mCi - 1,2 mmole) on ajoute 5 ml d'anhydride acétique, on chauffe 15 heures à 130°C, reprend à l'eau, agite 10 mn et porte à sec, sous vide. Une partie de l'activité est recueillie dans l'évaporat, il s'agit d'a cétyleoxy-2 pyridine non hydrolysée.

Après hydrolyse totale par agitation pendant 15 mn dans l'eau on obtient 100 mCi de pyridone-2.

C.C.M. : Whatman KC-18 - solvant : méthanol : 80, eau : 20 ; RF : 0,85.

Silice Merck Ref. 5715 Solvant : chloroforme : 95, méthanol : 5 ; Rf : 0,20.

Le produit est purifié par chromatographie sur silice- (appareil Mini-Prep-Jobin-Yvon) élution : chloroforme : 95, méthanol : 5.

On obtient 80 mCi de pyridone radioactivement pure par contrôle CLHP et CCM.



C.L.H.P. : colonne Zorbax CN élution : méthanol : 100, détection U.V. 299 nm. k' : 1,1.

C.C.M. : Silice Merck Ref. 5715 solvant : chloroforme : 95, méthanol : 5 ; Rf : 0,20.

Mercapto-2 pyridine (<sup>14</sup>C-2,6) : 10

1/ Essai inactif avec le réactif de Lawesson.

A 1 mmole de pyridone-2 on ajoute 0,5 mmole de [bis-(methoxy-4 phényl)-2,4-dithio-2,4] phosphetane-1,3 disulfure et 2ml de toluène; On porte à reflux pendant 6 heures, reprend à l'eau et extrait au toluène puis au dichlorométhane. Le produit est contrôlé et dosé par CLHP.

C.L.H.P. : colonne Zorbax CN-élution méthanol : 5, eau : 95 ; k' = 0,4.

2/ Essai radioactif avec le pentasulfure de phosphore.

A 80 mCi de pyridone-2 portée à sec dans un ballon piriforme on ajoute 4 ml de xylène anhydre et 1 g de P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>. On chauffe sous agitation pendant 2H30 mn à 130°C. On laisse refroidir à 40°C; on hydrolyse, neutralise avec du carbonate de sodium et extrait au xylène puis au dichlorométhane ; on porte à sec sous vide et reprend au méthanol.

C.C.M. : Silice Merck Ref. 5715 ; Solvant : chloroforme : 95, méthanol : 5 ; Rf : 0,6.

Le produit est purifié sur colonne de silice H 60 Merck (appareil Mini-Prep-Jobin-Yvon) - solvant d'élution : chloroforme : 95, méthanol : 5.

On recueille 2 fractions.

1/ une fraction pure de disulfure de di(pyridinyl-2).

2/ une fraction contenant à la fois du disulfure de di(pyridinyl-2) et de la mercapto-2 pyridine.

Les 2 fractions rassemblées, on obtient 60 mCi de mélange.

Disulfure de di(pyridyl-2) ( $^{14}\text{C}$ -2,6) : 14

Au mélange de mercapto-2 pyridine et de disulfure de di(pyridyl-2) refroidi à 0°C on ajoute 1 ml d'eau puis goutte à goutte 2 ml d'une solution d'eau oxygénée (3,1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 32% dans 10 ml d'eau). Il y a un précipité immédiat et décoloration de la solution. On recueille sur filtre "Millipore" et reprend avec du dichlorométhane.

C.C.M. : Silice Merck Ref. 5715 ; solvant : chloroforme : 95, méthanol : 5 ; Rf : 0,80.

Acide pyridyl ( $^{14}\text{C}$ -2,6) dithiopropanoïque 1

Le disulfure de (dipyridyl-2) précédent (60 mCi, 0,34 mmole) en solution dans 3 ml de dichlorométhane est refroidi à -40°C, on introduit 6,7 ml de chlore ; on agite 30 mn à -40°C et 30 mn à -20°C.

La température étant maintenue à -20°C on introduit goutte à goutte à l'aide d'une seringue 60  $\mu\text{l}$  acide mercapto-3 propanoïque dissous dans 1,5 ml de dichlorométhane anhydre. On agite pendant 30 mn à -20°C et 15 heures à la température ambiante. Le précipité formé est repris au méthanol. On ajoute 2 ml d'ammoniaque N et porte à sec après avoir repris 3 fois par 10 ml d'un mélange eau-méthanol 50-50.

C.C.M. : Silice Merck Ref. 5715 - solvant chloroforme : 90, méthanol : 10 ; Rf : 0,4.

Le pureté radioactive du produit brut est de 63%. Les deux impuretés majeures sont la mercapto-2 pyridine et le disulfure de di(pyridyl-2).

Le produit est purifié par CLHP préparative : colonne Zorbax C-8 ( $\varnothing$  : 20 mm, L 250 mm)-solvant : méthanol : 45, eau : 55, température 35°C - détection 254 nm - débit 20 ml/mn.

La faible solubilité du produit dans le solvant d'élution nécessite 5 passages.

On recueille ainsi une fraction de 20,6 mCi dont la pureté est de 98,7% ; l'impureté principale représentant 1% est le disulfure de di(pyridyl-2). Cette impureté de dégradation se forme rapidement après la purification.

Conservé à 0°C, dans le t-butanol (1 mCi/ml) le réactif n'a pas subi de radiodécomposition au bout d'une semaine, tandis que dans le dichlorométhane et dans les mêmes conditions on a observé au bout du même temps une radiolyse de 2%.

#### Contrôle du produit :

C.C.M. : Silice Merck F 254 Ref. : 5715.

Solvant : chloroforme : 95, méthanol : 5 ; Rf : 0,30.

C.L.H.P. : Colonne Zorbax ODS - Solvant : méthanol : 60, eau : 40, acide heptane sulfonique : 5% k' = 4,2.

#### Spectrométrie U.V.

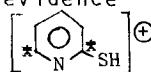
Le spectre effectué dans le méthanol est conforme à celui du témoin froid.

$\lambda_1$  max. : 282 nm ;  $\epsilon_1$  = 4496 ;  $\lambda_2$  max. : 235,5 nm ;  $\epsilon_2$  = 8637.

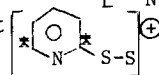
L'activité spécifique calculée à partir de la spectrométrie U.V. et du comptage par scintillation liquide est de 90 mCi/m mole.

#### Spectrométrie de masse.

Le spectre de masse du produit actif (spectre 1) effectué sur un appareil Varian CH7 à une tension de ionisation de 70 eV. correspond à celui du témoin "froid". Le pic de masse est présent m/e : 217-219 (pour le produit <sup>14</sup>C). Le spectre met en évidence le pic de base m/e : 111,113,115 correspondant au fragment



et le pic m/e : 142,144,146 correspondant au fragment



L'activité spécifique calculée sur le pic de base confirme celle obtenue par spectrométrie U.V. : 89 mCi/m mole.

#### Remerciements

Nous tenons à remercier MM. Olivier GROS, Pierre GROS, Claude MOULINEAU (Centre de Recherches CLIN MIDY MONTPELLIER) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, les informations concernant la dernière étape de la synthèse et le don généreux de produits.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - E. Vogel.  
Practical Organic Chemistry (4 TH Edition)  
479. Longman-London (1978).
- 2 - L. Pichat, C. Baret, M. Audinot.  
Bull. Soc. Chim. France 88, (1954).
- 3 - L.H. Mc Kendry, W.W. Muelder.  
J. Labelled Comp. Radiophar. 15, 87, (1978).
- 4 - E. Vogel.  
Practical Organic Chemistry (4 TH Edition)  
652. Longman-London (1978).
- 5 - C.F.H. Allen, J.R. Thirtle.  
Org. Synth. Coll. Vol. 3, 136, (1955).
- 6 - M. P.V. Boarland, J.F.W. Mc Omie.  
J. Chem. Soc. 1218, (1951).
- 7 - E. Ochiai.  
J. Org. Chem. 18, 534, (1953)
- 8 - J.H. Markgraf, H.B. Brown, S. C. Mohr, R.G. Peterson.  
J. Am. Chem. Soc. 85, 958, (1963).
- 9 - A. Klæbe, A. Latters.  
J. chromatog. 27, 502, (1967).
- 10 - S. Scheibye, J. Kristensen, S.O. Lawesson.  
Tetrahedron 35, 1339, (1979).
- 11 - J. Renault.  
Bull. Soc. Chim. France, 1001, (1953).
- 12 - L. Hernandez, C. Moulineau - Centre de Recherches CLIN MIDY  
méthode non publiée.
- 13 - J.P.E. Carlsson, R.E. Axen, H.N. Yngve, G.E. Lindgren, E.S. Göran (Pharmacia Fine Chemicals A.B.) Ger. Offen. 2,808,523  
(1978) - Chem. Abst. 90, 22821 d (1979).

- 14 - Toyo Jazo Co., Ltd-Ger. Offen. 2,917,001 (1979) - Chem. Abst. 92, 71906 k (1980).
- 15 - G.A. Voisin, F.K. Jansen, P. Gros (C.M. Industries) Fr. Demande 2,466,252 (1981). Chem. Abst. 95, 192368 g (1981).
- 16 - O. Gros, J. Diaz, P. Gros, B. Pau. S.L. Salhi Symposium - QUOVADIS. Anticorps porteurs de toxines ou d'agents anticancéreux - Montpellier, 80, (1980).
- 17 - D.B. Cawley, H.R. Herschman, D.G. Gilliland, R.J. Collier. Cell (Cambridge Mass.) 22, 563, (1980).
- 18 - J.P.E. Carlsson, H. Drevin, R.E. Axen. Biochem. J. 173, 723, (1978).
- 19 - R.L. Kincaid, M. Vaughan. Biochemistry 22, 826, (1983).
- 20 - F.K. Jansen, H.E. Blythman, D. Carrière, P. Casellas, J. Diaz, P. Gros, J.R. Hennequin, F. Paolucci, B. Pau, P. Poncelet, G. Richer, S.L. Salhi, H. Vidal, G.A. Voisin. Immunol. Lett. 2, 97-102 (1980).
- 21 - H.E. Blythman, P. Casellas, O. Gros, P. Gros, F.K. Jansen, F. Paolucci, B. Pau, H. Vidal. Nature 290, n° 5802, 145-146 (1981).
- 22 - F.K. Jansen, H.E. Blythman, D. Carrière, P. Casellas, P. Gros, F. Paolucci, B. Pau, P. Poncelet, G. Richer, H. Vidal. Receptor mediated binding and internalization of toxins and hormones, 24-26 mars 1980, Fort Detrick, Frederick, Md U.S.A., (Acad. Press) J.L. MIDDLEBROOK, L.D. KOHN (Eds), 351-362 (1981).
- 23 - F.K. Jansen, H.E. Blythman, D. Carrière, P. Casellas, O. Gros, P. Gros, J.C. Laurent, F. Paolucci, B. Pau, P. Poncelet, G. Richer, H. Vidal, G.A. Voisin. Immunol. Rev. 62, 185-216 (1982).
- 24 - P. Casellas, J.P. Brown, O. Gros, P. Gros, I. Hellström, F.K. Jansen, P. Poncelet, R. Roncucci, H. Vidal, K.E. Hellström. Int. J. Cancer 30, 437-443 (1982).
- 25 - L.L. Houston, R.C. Nowinski. Cancer Res. 41, 3913-3917 (1981).

- 26 - F. Stirpe, S. Olsnes, A. Pihl.  
J. Biol. Chem. 255, n°14, 6947 (1980).
- 27 - F.J. Martin, W.L. Hubbell, D. Papahadjopoulos.  
Biochemistry, 20, 4229-4238 (1981).
- 28 - W. Godfrey, B. Doe, E.F. Wallace, B. Breddt, L. Wofsy.  
Exp. Cell Res. 135, 137-147 (1981).
- 29 - A.H. Blair, T.I. Ghose.  
J. Immunol. Meth. 59, 129-143 (1983).