

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

VINCRISTINA ALCALOIDE DE
VINCA ROSEA L.

354

M O N O G R A F I A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

AURORA DE LA PEÑA DIAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS Posi

ABE 1976

FECHA

PROC M+

338

M+



QUIMICA

Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE Socorro Salas Tavares.

VOCAL Raymundo Cruz Almanza.

SECRETARIO Consuelo Rubio Poo.

1er. SUPLENTE Raúl Enriquez Habib.

2do. SUPLENTE Teresa Reguero Reza..

Este trabajo se desarrolló en la biblioteca del Instituto de Química de la U.N.A.M. y en la biblioteca de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

Agradezco al Señor Químico Raúl Enriquez Habib y al Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales A.C. (I.M.E.P.L.A.M.), las facilidades y ayuda prestada al desarrollo de éste trabajo.

INDICE

I	INTRODUCCION	Página 1
II	GENERALIDADES	Página 15
III	EXTRACCION Y SEPARACION	Página 19
IV	METODOS DE ANALISIS	Página 28
V	ESTRUCTURA	Página 32
VI	SINTESIS	Página 35
VII	BIOSINTESIS	Página 49
VIII	USOS Y ASPECTOS FARMACOLOGICOS	Página 57
IX	BIBLIOGRAFIA.	

I INTRODUCCION.

El interés que ha despertado la vincristina (I), (Figura 1), alcaloide de *Vinca rosea* Linn, en numerosos grupos de investigación científica se pone de manifiesto - en el elevado número de publicaciones relacionadas con diversos aspectos de éste alcaloide dimérico.

Este interés se encuentra justificado no sólo porque representa un valioso elemento quimioterapéutico en la lucha contra el cáncer sino porque ha reforzado y aún recompensado la búsqueda de principios activos de origen natural.

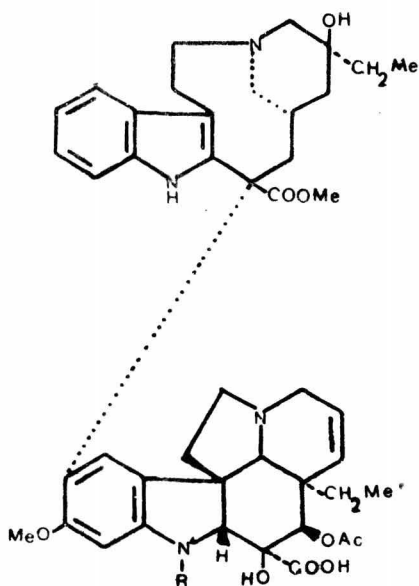
El propósito de éste trabajo, es el de realizar una recopilación bibliográfica sobre éste compuesto, que incluye su descubrimiento, clasificación botánica, extración y purificación, intentos de síntesis y aplicaciones.

El presente trabajo recopila la mayoría de las publicaciones ante la imposibilidad de sbarcarlas todas y permite la obtención de una información básica acerca de ellas, pero debe tenerse en cuenta que para un estudio profundo es necesario consultar los artículos originales.

1.1 Descripción de la vincristina.

La vincristina o leurocristina es un alcaloide extraído de *Vinca rosea* Linn,¹ cristaliza en forma de pequeñas - placas de color blanco e inodoras, funde a 218-220°C - con descomposición; $[\alpha]_D^{25} = 26.2^{\circ}$ (EtCl₂); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 220$,

El sulfato de vincristina es un polvo cristalino, blan-



- I R = CH=O
 II R = Me

La estructura de vincristina (I) difiere a la de vinblastina (II), sólo en el substituyente del nitrógeno de la parte vindolínica de la molécula.

Derivado 22-oxo de metil (4-(acetiloxi)-9-5-etil-1,4,5,6,7,8,9,10-octahidro [5hidroxi-9-(metoxicarbonil)-2H-3,7-metanoazaciclundecino [5,4-b] indol-9-il] -3a-etil-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahidro-5-hidroxi-8-metoxi-6-metil-1H-indolizino [8,1-cd] carbazola-5-carboxilato.)

Fórmula Emprírica C₄₆ H₅₆ N₄ O₁₀

Peso Molecular 824.98

Figura 1.

co, inodoro, altamente higroscópico, soluble en agua, - metanol, poco soluble en etanol; ²pH de 3.5 a 4.5 (en solución acuosa al 0.1 %). Tiene de 95 a 105 % de sustancia activa en base seca. La pérdida por secado al vacío a 60°C, hasta peso constante, no es mayor de 12 %.

$[\alpha]_D^{25} = +56^\circ$ a $+60^\circ$ en cloroformo al 1 %. Se puede identificar por espectrofotometría de ultravioleta y por cromatografía en placa fina.¹ Su relación espectrofotométrica es $\frac{E_{297}}{E_{259}} = 0.95$ a 1.05 (en metanol).

El patrón de difracción de rayos X de vincristina como base libre, recristalizada en metanol, fué determinado a una longitud de onda de 2.2896 Å⁰ utilizando radiaciones de cromo y un filtro de vanadio³ y se presenta en la Tabla I.

<u>d</u>	<u>I/I₁</u>	<u>d</u>	<u>I/I₁</u>
10.86	0.12	4.19	0.04
10.27	0.04	3.97B	0.20
9.73	1.00	3.83	0.02
9.26	0.30	3.77	0.02
8.82	0.30	3.62	0.08
8.59	0.60	3.57	0.08
7.44	0.60	3.42	0.12
7.10	0.30	3.35	0.04
5.89	0.20	3.24	0.04
5.66B	0.30	3.20	0.04
5.45	0.80	3.08	0.08
5.17	0.08	2.96	0.08

λ	I/I_1	λ	I/I_1
5.09	0.08	2.85	0.04
4.76B	0.16	2.78	0.04
4.55	0.16	2.63	0.04
4.41	0.04	2.47	0.04
4.28	0.08	2.43	0.04

Tabla I.

El espectro de ultravioleta del sulfato de vincristina⁴ (Figura 2), tiene las siguientes características:

máximo a 221 nm,	E = 47,100
máximo a 225 nm,	E = 15,400
mínimo a 275 nm,	E = 11,400
inflexión a 290 nm,	E = 14,000
máximo a 296 nm,	E = 15,600

Pecueños puntos de inflexión aparecen también a 260 nm y a aproximadamente 305 nm.

Los espectros de infrarrojo de algunos alcaloides de Vinca rosea Linn son muy similares. Las similitudes y diferencias se discuten en varias publicaciones.⁵⁻⁷

El espectro de infrarrojo se presenta en la Figura 3.

El espectro de resonancia magnética nuclear fué de gran utilidad para determinar la estructura del sulfato de vincristina⁸ y se reproduce en la Figura 4.

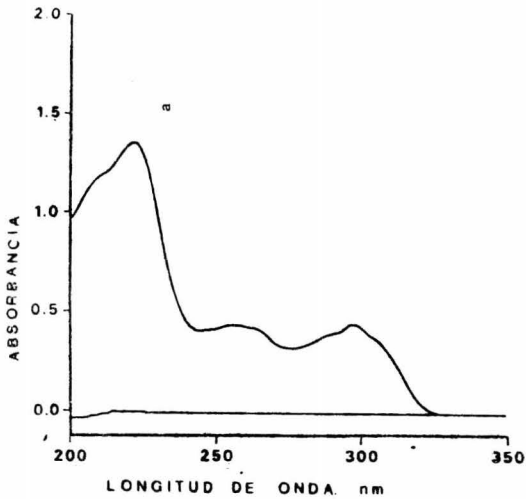


Figura 2. Espectro de ultravioleta del sulfato de vin -
cristina en etanol al 95 %; instrumento: Cary modelo 15.

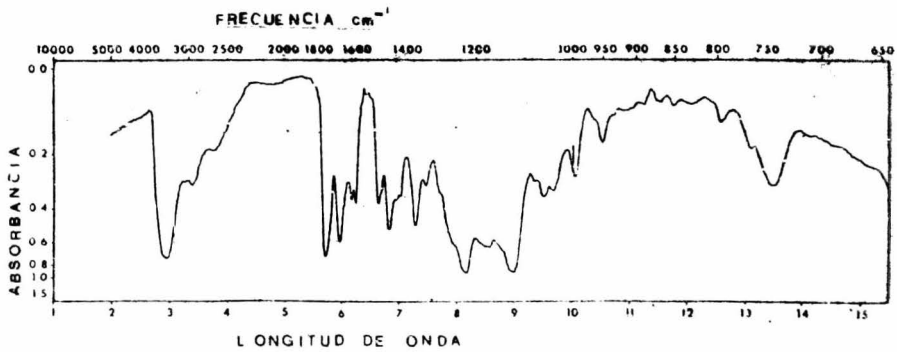


Figura 3. Espectro de infrarrojo del sulfato de vincristina en pastilla de KBr; instrumento: Perkin-Elmer 221.

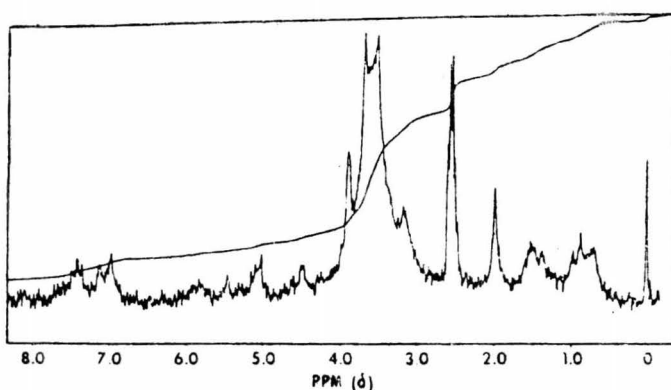


Figura 4. Espectro de resonancia magnética nuclear del sulfato de vincristina en dimetil sulfoxido deuterado; instrumento: Varian HA-60.

1.2 Vincristina en el contexto total de alcaloides.

El término alcaloide denota generalmente una entidad química, básica, nitrogenada, de origen vegetal, con carácter semejante al de los álcalis en cuanto a su facultad de formar sales con los ácidos.

En la mayor parte de éstos compuestos, el nitrógeno se encuentra asociado a carbono e hidrógeno en una estructura heterocíclica y/o aromática, indicando cierta similitud en su formación. La formación de los alcaloides es una parte integral del metabolismo del nitrógeno en un gran número de plantas.

Su distribución histológica en una planta sugiere que son sintetizados en el tejido parenquimatoso joven, en crecimiento; en la corteza de la planta se acumulan en estado sólido en forma de sales. Se encuentran en las

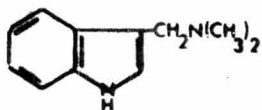
semillas, en las hojas y raíces, en donde no se presentan en estado libre, sino formando sales con algún ácido (cítrico, málico, tánico, succínico, oxálico, sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, etc.⁹).

La característica nutricional del suelo, que en general afecta el crecimiento de las plantas, es un factor importante que influye en la formación de alcaloides, que ocurre durante el crecimiento de tejidos jóvenes, por lo que cualquier factor que incremente el crecimiento de éstos tejidos aumentará la formación de alcaloides. Las plantas productoras de alcaloides se encuentran generalmente en suelos cuyo pH es de 4 a pH 8.

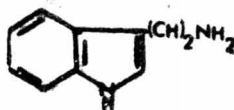
Los alcaloides de acuerdo a su estructura química se clasifican¹⁰ en indólicos, relacionados con piridina, quinolina, isoquinolina, pirimidina, purina, pteridina.

Los alcaloides indólicos comúnmente se clasifican en los siguientes subgrupos: a) alcaloides simples, b) alcaloides ergot, c) alcaloides harmala, d) alcaloides yohimbe, e) alcaloides estricnos.

Los alcaloides simples se asemejan al triptofano en su estructura, como la gramina y la triptamina.



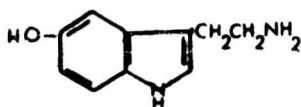
Gramina.



Triptamina.

La serotonina (5-hidroxi-triptamina) es importante por

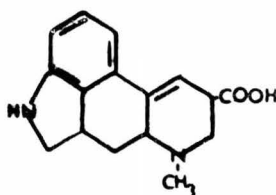
su aparente conexión con los procesos mentales, tiene función importante en el patrón de actividad mental.¹⁰



Serotonina.

Los alcaloides ergot¹¹ se producen por un hongo conocido como cornezuelo, es el nombre que se le da al esclerocio del hongo *Claviceps purpurea* que infecta muchas especies de plantas y particularmente al centeno. Existen seis alcaloides, cada uno de los cuáles es una mezcla de la forma levorrotatoria y dextrorrotatoria. Únicamente la forma levorrotatoria es fisiológicamente activa - causando contracciones del tejido muscular.

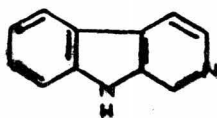
Un ejemplo de los alcaloides ergot es el ácido lisérgico cuya dietilamida presenta una actividad fisiológica muy apreciable.



Ácido Lisérgico.

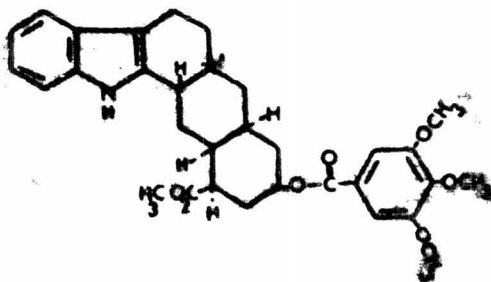
Los alcaloides harmala, tienen en común una estructura tricíclica lineal con núcleos de indol y piridina, a -

éste sistema se le conoce como beta-carbolina.



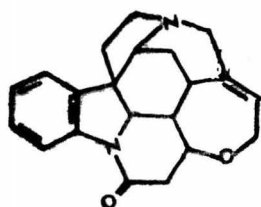
Beta-carbolina.

Los alcaloides yohimbe estan relacionados a ésta estructura, el ejemplo más importante es la reserpina, la cuál tiene un uso clínico en el tratamiento de la hipertensión y una acción tranquilizante.



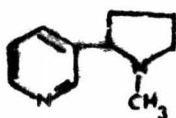
Reserpina.

Dos ejemplos importantes de alcaloides estrícnos son la estricnina y la brucina, que se encuentran en las hojas de las plantas del género estrícnos cuya estructura se deriva de 2,3 dihidroindol.

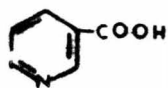


Brucina $R=OCH_3$ ₃
 Estricnina $R=H$

Entre los alcaloides relacionados con piridina estan -
 la nicotina, nicotinamida-adenin-dinucleótido, ácido -
 nitotínico.

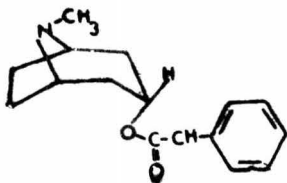


Nicotina.

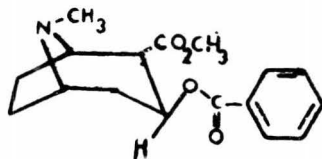


Acido Nicotínico.

Los alcaloides tropano son compuestos derivados de anillos reducidos de pirrol y piridina. Dos de los alcaloi-
 des más importantes son la atropina y la cocaína.

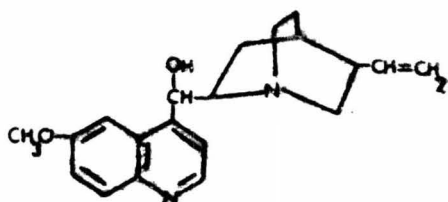


Atropina.



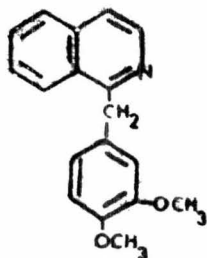
Cocaína.

Los alcaloides derivados de quinolina se encuentran en la corteza de la quina y tienen un valor medicinal como antimalaricales. El ejemplo más notable es la quinina.

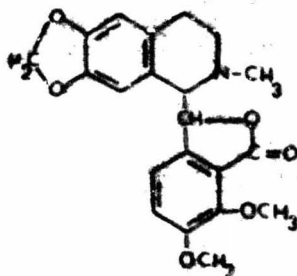


Quinina.

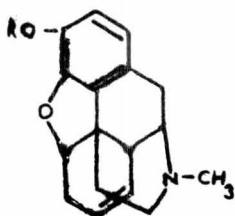
Muchos alcaloides presentan sistemas de anillos de isoquinolina como los alcaloides del opio e incluyen la narcotina, papaverina, morfina, codeína y muchos otros los cuáles se encuentran en las semillas de la amapola.



Papaverina.



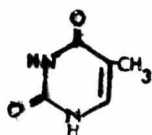
Narcotina.



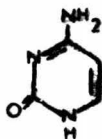
Morfina R=H

Codeína R=CH₃

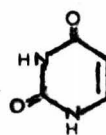
Alcaloides con sistemas de anillos de pirimidina se encuentran en timina, citosina, uracilo, los cuáles son componentes estructurales de ácidos nucleicos y algunas coenzimas como el pirofosfato de tiamina y de la vitamina B₁ cuya deficiencia produce la enfermedad conocida como beri beri.



Timina.

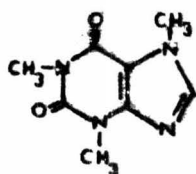


Citosina.

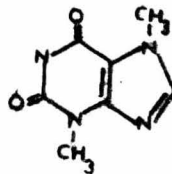


Uracilo.

La cafeína y teobromina son alcaloides estimulantes del tipo purina.

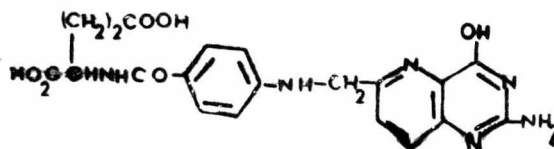


Cafeína.



Teobromina.

Del tipo de la pteridina encontramos al ácido fólico o vitamina B₁₀.



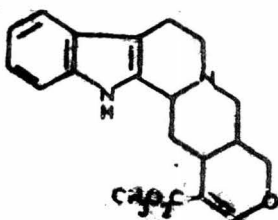
Ácido fólico.

1.3 La vincristina en el contexto de *Vinca rosea* Linn.

Vinca rosea Linn es una fuente de alcaloides de alta actividad antineoplásica.

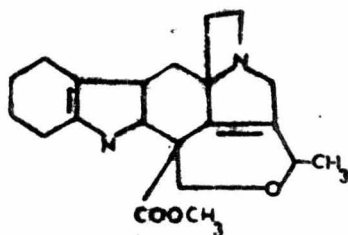
Los alcaloides de *Vinca rosea* Linn son alcaloides indólicos que pueden pertenecer a:¹²

A. Bases yohimbe como ajmalicina (III), serpentina, alstonina, reserpina, tetrahidroalstonina, sitsiriquina.



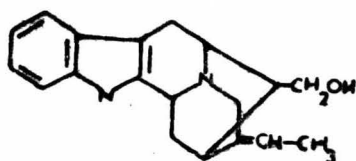
(III)

B. Bases estricno como lochneridina, lochnericina, lochnerinina, akuamina (IV).



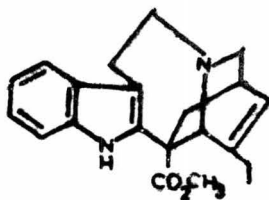
(IV)

C. Bases sarpagina como lochnerina y perivina (V).



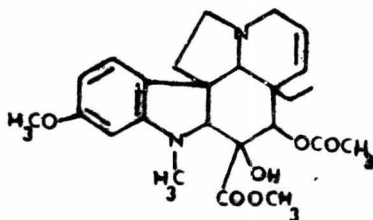
(V)

D. Bases iboga como catarantina (VI), cleavamina, velbanamina.



(VI)

E. Aspidosperma como vindolina (VII), vindolinina, vindolidina.



(VII)

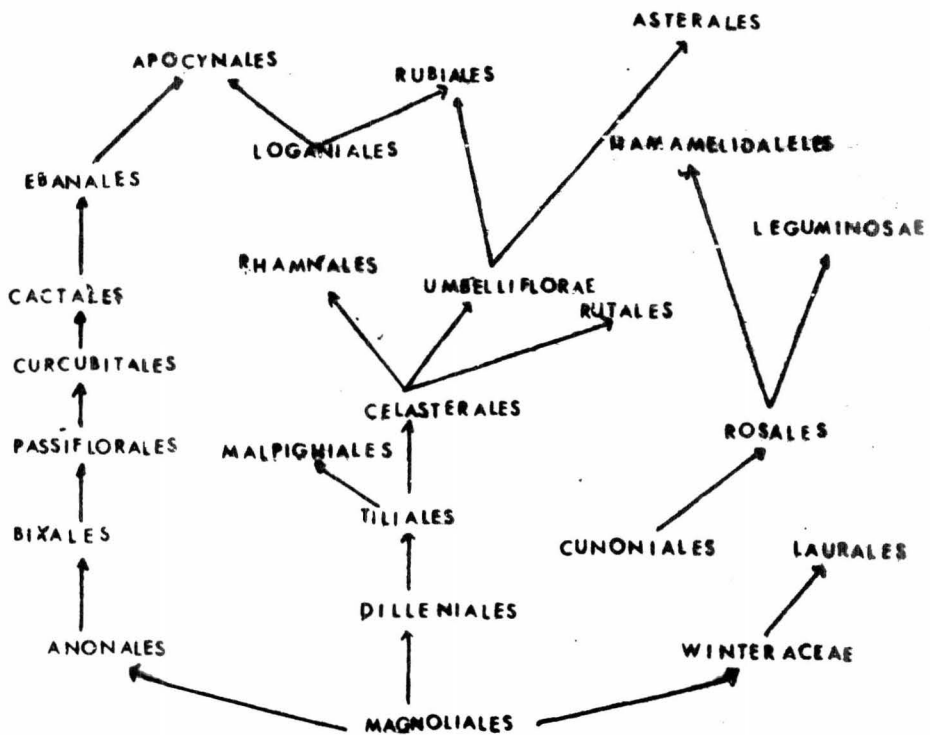
F. Diméros aspidosperma-iboga como vincristina y vinblastina (Figura 1); neoleurocristina, leurosina, neoleurosina, pleurosina, carosina, catarina, cataricina.

G. Otros diméros como vindolicina, vincamicina, vincardina y carosidina.

II GENERALIDADES.

2.1 Botánica.

Con el objeto de situar bajo el aspecto botánico a *Vinca rosea* Linn, planta de la que se obtiene vincristina, se presenta en el siguiente esquema la orientación de las dicotiledoneas derivadas de magnoliales:¹³



La clasificación en ordenes y familias¹³ de algunas dicotiledoneas derivadas de magnoliales es la siguiente:

Orden.	Familia.
Magnoliales	Magnoliaceae
Anonales	Anonaceae
Laurales	Lauraceae
Cucurbitales	Cariaceae
Cactales	Cactaceae
Rosales	Calycanthaceae
Leguminosae	Papilionaceae
Hamamelidales	Buxaceae
Rhamnales	Rhamnaceae
Rutales	Rutaceae
Umbelliflorae	Umbelliferae
Loganiales	Loganiaceae
Rubiales	Rubiaceae
Asterales	Compositae
Apocynales	Apocynaceae

A la familia Apocynaceae¹⁴ se le divide en tres subfamilias que son las siguientes:

- Plumeroideae.
- Cerebroideae.
- Echitoideae.

A la subfamilia Plumeroidae¹⁴ pertenecen las siguientes tribus:

- Carisseae, Chilocarpeae, Amebolaniae, Tabernamonteneae,
- Alstonieae, Rauwolfieae, Allamandaeae.

A la tribu Alstonieae¹⁴ pertenecen los siguientes géneros:

Alstonia (inkl. Tonduzia), Amsonia, Aspidosperma, Catharanthus, Diplorhynchus, Dyera, Geissospermum, Gonioma, Haplophyton, Holarrhena, Plumeria, Rhazia, Vinca.

El género Vinca fué originalmente establecido por Linneo en 1735,¹⁵ V. minor, V. major, V. rosea, V. lutea, V. pusilla, V. difformis, V. herbacea y V. pubescens.

En 1828 Reichenbach agregó el género Lochnera a las Apocynaceae e incluyó una especie Lochnera rosea (V. rosea). En agosto de 1838 Endlicher describió las diferencias entre el género Vinca y Lochnera, pero previamente, en febrero del mismo año, G. Don, había establecido el género Catharanthus, cuyas características generales fueron idénticas a las del género Lochnera. Don, describió las características de Catharanthus roseus y Catharanthus pusillus. Ya que la publicación de Don antecedió a la de Endlicher, el género Catharanthus tuvo prioridad sobre Lochnera.

Pichon en su trabajo sobre la clasificación de las Apocynaceae³ ha clasificado a Vinca y Catharanthus de la manera siguiente:

Orden: Apocynales.

Familia: Apocynaceae.

Sub-familia: Alstonieae.

Sub-tribu: Catharanthinae.

Género: Catharanthus G. Don.

Sección 1. *Lochnera* (Reich. f.) Pich.

Catharanthus lanceus (Boj. ex A.DC.) Vinca -
lancea (Boj. ex A.DC.) K. Schum., Lochnera lan-
cea (Boj. ex A.DC.)

Catharanthus longifolius (Pich.) Pich. Lochne-
ra longifolia Pich.

Catharanthus trichophyllus (Bak.) Pich. Loch-
nera trichophylla Bak.

Catharanthus roseus (L.) G. Don Vinca rosea L.,
Lochnera rosea (L.) Reich. f.

C. roseus f. albus (Sweet)

C. roseus f. ocellatus (Sweet) G. Don

Sección 2. *Cuba-veela* (A.DC.) Pich.

Catharanthus pusillus (Murr.) G. Don Vinca pu-
silla Murr., Lochnera pusilla (Murr.) K. Schum.

Sección 3. *Androyella* (Pich.) Pich.

Catharanthus scitulus (Pich.) Pich. Lochnera -
scitula Pich.

Vinca L.

Vinca herbácea Waldst et Kit.

Var. libanotica (Lucc.) Pich.

Var. sessilifolia (A.DC.) Pich.

Var. herbacea.

Var. major L.

Var. difformis (Pourn.) Pich.

Vinca major Pich.

Vinca minor L.

Pichon considera el género *Catharanthus* que comprende - seis especies de pequeños arbustos y hierbas, las cuáles son predominantemente originarias de Madagascar.

Catharanthus roseus (L.) G. Don, *Vinca rosea* L., *Lochnera rosea* (L.) Reichb. f., es una especie pantropical, - originaria de Madagascar y dispersa en la India, Indochina, Indonesia, Filipinas, Australia, Sudamérica, Norteamérica, Indias Occidentales, Brasil y cultivada en Europa y otros países como ornamental.

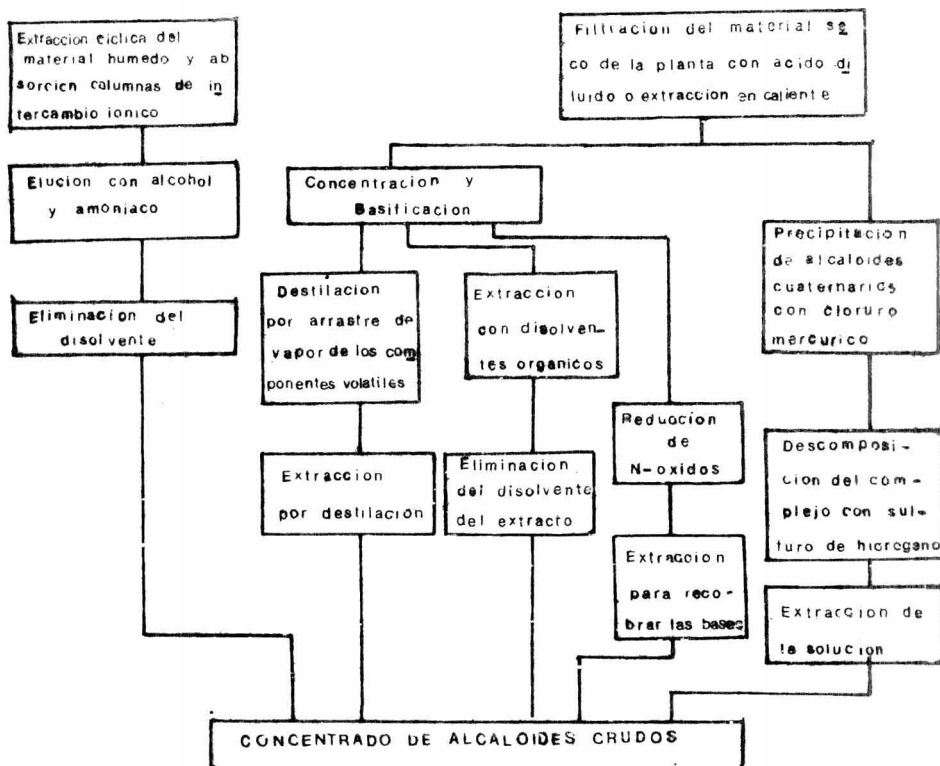
Tiene un crecimiento rápido, es sub-arbustiva, leñosa - en la base, de 40-80 cm de alto con ramas erectas. Las hojas son opuestas, oblongadas y pecioladas (e-8 cm x - 1.5-5 cm), teniendo una base aguda y extremo redondeado o mucronado. La planta es pubescente, especialmente cuando joven, pero existe una glabra variante.

Las flores son violetas, rosas o blancas pero en variedades cultivadas se encuentran a menudo formas manchadas.

III EXTRACCION Y SEPARACION.

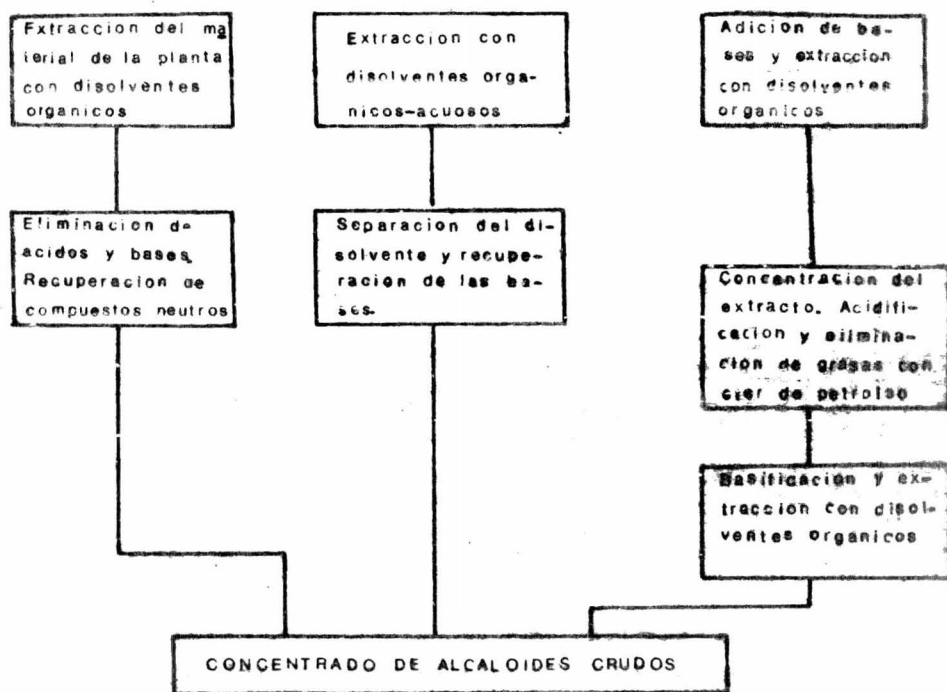
Aunque el aislamiento de un alcaloide es en última instancia un problema particular, existen una variedad de métodos que hasta el punto de obtención de un concentrado de alcaloides el diagrama de extracción es fundamentalmente similar e incluye generalmente extracciones acuosas y con disolventes orgánicos alternativamente.

Un esquema general de extracción de alcaloides se presenta a continuación en forma diagramática¹⁷ (Esquema I) en el que se describen las principales rutas que pueden seguirse para obtener un concentrado de alcaloides crudo.



Esquema I.

De los diferentes tipos de extracción uno de los más usuales es la extracción por disolventes orgánicos (Esquema II), sobre todo cuando el proceso de desengrasado es especialmente importante, como ocurre cuando se emplean tallos y hojas, raras veces es necesario desengrasar la raíz.¹⁸



Esquema II.

Para extraer los alcaloides, un método general¹⁷ consiste en alcalinizar la muestra previamente desengrasada, con hidróxido de calcio, hidróxido de amonio o carbonato de sodio, liberando así a los alcaloides de sus sales y pasándolos a bases libres. Posteriormente se realiza una extracción con cloroformo, éter, benceno, etanol o cloruro de metileno. En el proceso de desengrasado con éter de petróleo, la mayoría de los alcaloides resulten insolubles en éste disolvente, sin embargo, es necesario investigar su presencia cualitativamente con

los reactivos usuales para alcaloides (Mayer, Wagner, - Dragendorff o Scheibler),¹⁷ ya que algunos alcaloides pueden aumentar su solubilidad en los extractos, debido a la presencia de grasas. Cuando los reactivos mencionados indican la presencia de alcaloides en los extractos etéreos y su extracción como bases amorfas, por cristalización directa o de sus derivados no puede llevarse a cabo, es necesario emplear la cromatografía en columna.¹⁸ Los alcaloides son extraídos del disolvente orgánico - con una solución acuosa acidificada. El extracto acuoso se alcaliniza y vuelve a ser extraído con un disolvente orgánico, usualmente éter o cloroformo, obteniéndose - así un concentrado de alcaloides.¹³ Algunos clorhidratos de alcaloides son solubles en cloroformo y ésta propiedad puede servir para separarlos.¹⁹

Una modificación al proceso anterior consiste en hacer una extracción con una mezcla de un disolvente orgánico y agua, separando y secando posteriormente la fase orgánica. Los alcaloides que no son básicos pueden obtenerse después de eliminar los compuestos ácidos o alcalinos de la fase orgánica.

La extracción acida se usa menos frecuentemente y se basa en el hecho de que la mayoría de los alcaloides son básicos (la rutaecarpina es una notable excepción) y - por tanto, solubles en soluciones ácidas acuosas, permitiendo separar los alcaloides de los compuestos insolubles en agua presentes en todas las plantas.¹³ Este - tipo de extracción se ha utilizado con éxito cuando - se emplea material vegetal húmedo y las sales de los - alcaloides solubles en agua son separadas del extracto

acuoso con resinas de intercambio iónico.

Cuando se emplea la extracción acuosa con material seco, ésta se realiza alternativamente con un ácido diluido como sulfúrico o tartárico, debiendo realizarse en frío cuando existe la posibilidad de descomposición de las sustancias. El extracto acuoso resultante se alcaliniza y es extraído con un disolvente orgánico, pudiendo eliminarse los compuestos volátiles con una destilación por arrastre de vapor.

Los alcaloides cuaternarios, son usualmente bastante solubles en agua y se recuperan mediante una reacción de precipitación con cloruro de mercurio o reactivo de Mayer, produciéndose un complejo mercuríco que precipita, del cuál se recuperan los alcaloides descomponiendo el complejo con ácido sulfhídrico.

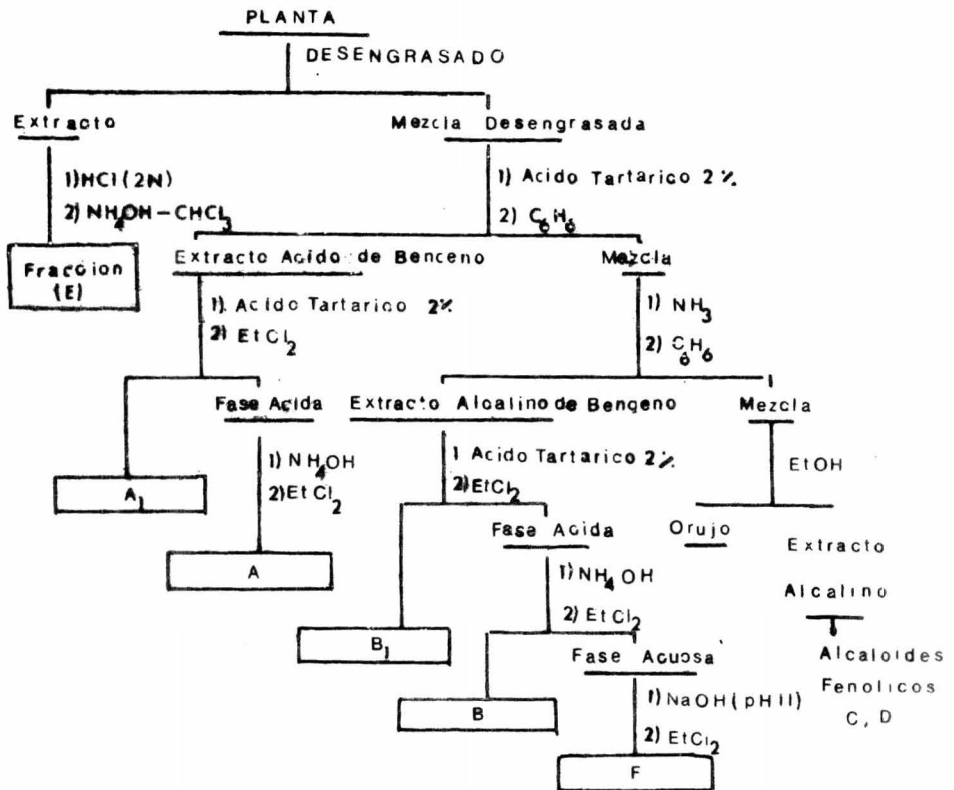
Algunos alcaloides, se encuentran presentes en las plantas como N-óxidos y pueden ser reducidos con cinc en medio ácido, siendo posteriormente extraídos con cloroformo.

Una vez obtenido un concentrado de alcaloides, la separación depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de los alcaloides en particular.

En la separación de los alcaloides de la quina,²⁰ ha dado buen resultado la cristalización fraccionada; la destilación fraccionada es recomendable cuando existen uno o varios componentes volátiles como ocurre en el caso de los alcaloides hemlock.²¹ Otros ejemplos del empleo de diferentes técnicas de separación son la cromatografía de adsorción en los alcaloides del senecio,²³ la separación de los alcaloides del veratrum en contra

corriente,²² la cromatografía en papel en los alcaloides del curare,²⁴ la electroforesis en los alcaloides del estricnina,²⁵ el intercambio iónico en los alcaloides del yohimbe²⁶ y la permeación en gel.²⁷⁻³¹

Para la separación de los alcaloides presentes en *Vinca rosea* Linn se ha empleado, entre otros, el siguiente sistema de extracción³² (Esquema III).



Esquema III.

De acuerdo al Esquema III, inicialmente se mezcla el material desengrasado con una solución de ácido tartárico al 2 % con el fin de formar las sales de las bases fuertes y poder extraer las bases débiles con benceno.¹⁸

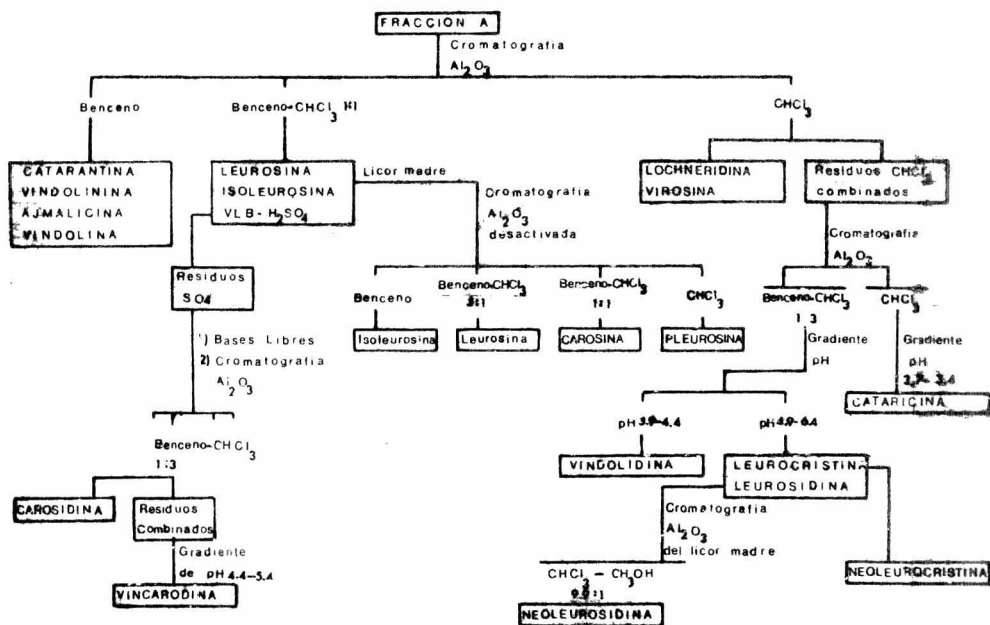
Los extractos bencénicos se concentran, y se agrega una solución de ácido tartárico al 2 %, el benceno residual se elimina por destilación al vacío. Este proceso es básicamente un arrastre de vapor y se prefiere a la extracción en fase binaria, dado que se evita la formación de emulsiones estables. Esta operación puede efectuarse también con una solución acuosa de ácido cítrico 0.1 N. Los residuos insolubles se separan por filtración.

La fase acuosa ácida así obtenida contiene el 85 % de los alcaloides presentes en el extracto "ácido" de benceno original. Una nueva extracción de ésta fase a $\text{pH}=3$ con dicloruro de etileno, produce la fracción A_1 en la cuál estan contenidas las bases débiles. La posterior alcalinización a $\text{pH}=8.5$ y extracción con dicloruro de etileno produce la fracción A, en la cuál estan contenidos los alcaloides oncolíticos: leurosina, vinblastina, vincristina y leurosidina.³²

La alcalinización de la fase acuosa original con hidróxido de amonio permite que los alcaloides de mayor basicidad puedan ser extraídos con el disolvente orgánico, siguiendo el Esquema III para producir los extractos B, B_1 , F, C y D.

La fracción A, que contiene vinblastina, vincristina, leurosina y leurosidina, se purifica mediante cromato -

grafía en columna en sílmina parcialmente desactivada y la técnica de extracción con gradientes de pH. Esto se representa diagramáticamente en el esquema IV.³²



Esquema IV.

La técnica de extracción-separación por gradientes de -

pH se fundamenta en la diferente basicidad que poseen - los alcaloides de cada extracto, y consiste en la realización de extracciones con disolventes orgánicos a diferentes valores de pH.

Svoboda¹ ha aplicado con éxito el método siguiente de extracción-separación de los extractos crudos de alcaloides de Vinca rosea Linn: 10 g de la fracción cruda se - disuelven en 500 ml de benceno y se filtra la substancia insoluble. Se extraen los alcaloides con 500 ml de ácido cítrico 0.1 N eliminandose el benceno evaporando al vacío, hecho que no sólo evita la formación de emulsiones estables sino que conlleva una destilación por -- arreste de vapor. Se filtra la substancia insoluble y se ajusta el volúmen a 500 ml. Se realiza una extracción al pH resultante (aproximadamente pH 2.75-2.85) y se -- aumenta gradualmente el pH con hidróxido de amonio (3.40 3.90, 4.40, 4.90, 5.40, 5.90, 6.40, 7.50), haciendo extracciones con 500 ml de benceno en cada valor de pH. Los residuos de cada extracto pueden ser recristalizados comunmente de metanol, etanol o acetona.

La vincristina como base libre recristaliza de metanol y como sulfato recristaliza de etanol.

Como resultado de la aplicación de la cromatografía en alúmina y de extracciones por gradientes de pH es factile encontrar mezclas 1:1 de vincristina y leurosidina.¹ Esta mezcla se separa disolviendo en metanol ca -- liente y enfriando, cristalizando así vincristina.

En otros métodos se emplea también la extracción orgánica; ³³ usando metanol al 90 % para obtener un concentrado de alcaloides, en donde el 70 % corresponde a una mezcla

de vinblastina, leurosina (N-demetil-vinblastina) y vincristina. La purificación se lleva a cabo por cristalización y cromatografía de los sulfatos de los alcaloides. En este proceso el extracto concentrado de alcaloides se acidula con ácido sulfúrico hasta $\text{pH}=2$, filtra y extrae a pH de 8.5-9 con benceno. La redisolución en etanol conteniendo 10 % de ácido sulfúrico produce los sulfatos de los alcaloides de cuya cromatografía se obtiene sulfatos de vinblastina, leurosina y vincristina. El rendimiento de la extracción de vincristina puede incrementarse aplicando reacciones de formilación³⁴ y oxidación.³⁵ La reacción de formilación con ácido fórmico y anhídrido acético se realiza sobre un concentrado de alcaloides diméricos que contienen N-demetil-vinblastina. El incremento en el rendimiento de vincristina es del orden de 50 %.

La oxidación del N-CH_3 de sulfato de vinblastina³⁵ con óxido de cromo produce N-demetil-vinblastina en 20 % y sulfato de vincristina en 50 %. La posterior formilación aumenta hasta 70 % el rendimiento de vincristina.

IV METODOS DE ANALISIS DE VINCRISTINA.

4.1 Análisis espectrofotométrico.

Para su análisis² se pesan con precisión aproximadamente 30 mg, se disuelven en metanol, y se afora hasta 100 ml. Posteriormente se transfieren 10 ml de ésta solución a un matraz aforado de 100 ml y se diluyen con metanol hasta la marca. Se determina la extinción molar de la solución en una celda espectrofotométrica de 1 cm, a una lon

gitud de onda de máxima absorbancia, 297 ± 1 nm, usando metanol como referencia. El contenido de sustancia activa de la muestra se calcula tomando en cuenta el valor de extinción específica ($E_c = 177$) y el valor de extinción obtenido experimentalmente.

4.2 Análisis Colorimétrico.

Un método colorimétrico que se aplicó para el análisis de sulfato de vinblastina³⁶ puede aplicarse también al análisis de sulfato de vincristina.³⁷ Si se adiciona a vinblastina una mezcla apropiada de anhídrido acético, cloruro de acetilo, piridina y ácido sulfúrico, se produce un color rosa fuerte. Para la determinación se usa un espectrofotómetro con celda de 1 cm.

La vincristina presenta la misma curva que la vinblastina, sin embargo la banda de absorción máxima de vincristina tiene un coeficiente de extinción menor en un 25 % que vinblastina. El método puede utilizarse para medir la estabilidad de sulfato de vinblastina y posiblemente también para el sulfato de vincristina.

4.3 Identificación Colorimétrica.

Los alcaloides producen reacciones coloridas con numerosos reactivos, si se calienta aproximadamente 1 mg de alcaloide con ácido clorhídrico al 50 % que contenga 0.2 % de vainillina se produce un color rosado, con ácido sulfúrico concentrado a temperatura ambiente no produce ninguna coloración, el ácido nítrico produce un color amarillo. El ácido sulfúrico concentrado que contenga trazas de formaldehído produce un color vino brillan

te. Cuando se calienta el alcaloide con ácido sulfúrico al 40-60 % se produce un color rosa pálido. Cuando se emplea ácido sulfúrico al 10 % que contenga 1 % de sulfato cérico se obtiene un color naranja fuerte que cambia rápidamente a amarillo.

Jakovljevic y colaboradores,³⁷ encontraron reacciones coloridas distintivas para varios alcaloides de *Vinca rosea* Linn, una solución al 1 % de sulfato cérico de amonio en ácido fosfórico al 85 % a temperatura ambiente, una solución de sulfato férrico de amonio al 1 % en ácido fosfórico al 85 % y calentando el reactivo con el alcaloide en un baño de agua durante 10 min, una solución al 1 % de sulfato férrico de amonio con ácido sulfúrico al 75 % a temperatura ambiente. Se disuelven aproximadamente 200 - 300 mcg del alcaloide con 1 ml del reactivo correspondiente; la vincristina con el sulfato cérico de amonio en ácido fosfórico produce una coloración azul violeta, con el sulfato férrico de amonio en ácido fosfórico produce una coloración rosada, con el sulfato férrico de amonio en ácido sulfúrico produce una coloración azul que cambia a verde azulada.

4.4 Cromatografía.

La cromatografía en placa fina es un método rápido, reproducible y efectivo para analizar y separar muestras que contienen vinblastina, vincristina, leurosina y leurosidina.

Jakovljevic y colaboradores,³⁷ encontraron que por cromatografía en placa fina con placas de alúmina preparadas con hidróxido de litio 0.5 N y empleando como eluyente

5 % de etanol absoluto en acetonitrilo (v/v) se separaron leurosina $R_f=0.23$ y vincristina $R_f=0.51$. Con la misma matriz adsorbente y como eluyente 30 % de acetonitrilo en benceno (v/v) separaron leurosina $R_f=0.27$ y vinblastina $R_f=0.36$. Sugieren que el análisis de los alcaloides debe hacerse por alguno de los dos métodos o por ambos y deben observarse con luz ultravioleta de baja longitud de onda colocando la placa sobre un fondo blanco y empleando como revelador una solución de sulfato cérico de amonio al 1 % en ácido fosfórico al 85 %. Por éste método no es posible separar una mezcla de vinblastina, vincristina, leurosina y leurosina. Cone y colaboradores³⁸ pudieron determinar diferentes alcaloides de *Vinca rosea* Linn con placas de sílice preparadas con agua, placas de sílice preparadas con hidróxido de potasio 0.5 N o con placas de alúmina y empleando como eluyentes diferentes sistemas de disolventes: cloroformo-acetato de etilo (1:1), acetato de etilo-etanol absoluto (3:1), benceno 100 %, cloroformo 100 %, benceno-cloroformo (3:1), acetato de etilo 100 %, acetato de etilo-etanol absoluto (1:1).

La leurosina y la vincristina se determinaron como bases libres en placas de alúmina con acetato de etilo al 100 % seguido de acetato de etilo-etanol absoluto (3:1), con valores de R_f de 0.54 y 0.37 respectivamente. Por éste método tampoco fué posible separar una mezcla de vinblastina, vincristina, leurosina y leurosina.

Farnsworth y colaboradores³⁹ desarrollaron un método en donde es posible separar una mezcla de vinblastina, vincristina, leurosina y leurosina por cromatografía en -

placa fina con Silica Gel G unidimensional y bidimensional, con cloroformo-metanol (95:5) como eluyente y con el reactivo cromogénico sulfato cérico de amonio. Los valores resultantes de R_f fueron los siguientes: leurosidina 0.06 ± 0.01 , vincristina 0.16 ± 0.03 , vinblastina 0.24 ± 0.02 , leurosina 0.45 ± 0.03 , ajmalicina (referencia) 0.64 ± 0.03 .

Posteriormente el mismo autor¹⁶ publicó un método utilizando cromatografía en placa fina con Silica Gel G y un sistema de tres eluyentes: acetato de etilo-etanol absoluto (3:1), n-butanol-ácido acético glacial-agua destilada (4:1:1), metanol absoluto y el reactivo cromogénico sulfato cérico de amonio para analizar y separar la mayoría de los alcaloides de *Vinca rosea* Linn.

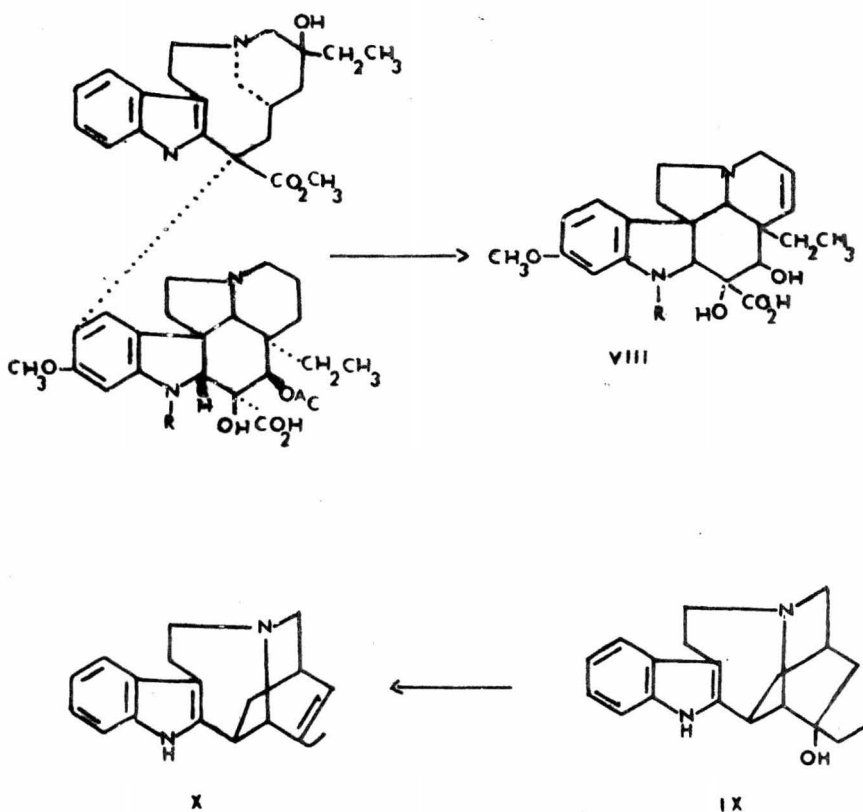
Los alcaloides se cromatografían como bases libres disueltos en benceno, cloroformo o metanol. Los resultados de R_f para vincristina son 0.18 ± 0.04 , 0.16 ± 0.04 0.39 ± 0.02 con los tres eluyentes respectivamente.

V ESTRUCTURA:

La caracterización y asignación estructural de vincristina está muy ligada a la de vinblastina, de tal manera que al solucionarse el problema estructural de una se conoció consecuentemente la estructura de la otra. La similitud entre las estructuras de vinblastina y vincristina fué establecida mediante análisis y superposición de sus espectros de ultravioleta,⁴⁰ además de tener sus espectros de infrarrojo idénticos. Mediante este mismo procedimiento se logró correlacio-

nar a vinblastina y vincristina con vindolina y catarantina, sobreponiendo el espectro de infrarrojo de vinblastina o vincristina con una solución de una mezcla equimolecular de vindolina y catarantina,⁴¹ además de identificar los grupos $-\text{COOCH}_3$, OCH_3 (aromático), N-CH_3 (para vinblastina), O-C-CH_3 y NH indólico, mediante los desplazamientos químicos presentes en el espectro de resonancia magnética nuclear.

Algunas de éstas consideraciones fueron comprobadas mediante la hidrólisis, en presencia de agentes reductores de vinblastina y vincristina,⁴² obteniendo descetilvindolina (VIII), velbanamina (IX) y cleavamina (X).



En función de que se conocía⁴³ la transformación en medio ácido de catarantine (XI) a clavamina (X) (Figura 5) se supuso, erróneamente, que la parte indólica de vinblastina y vincristina, tenía el núcleo de la catarantine, asignándole en función de ésto la primera estructura (XII).

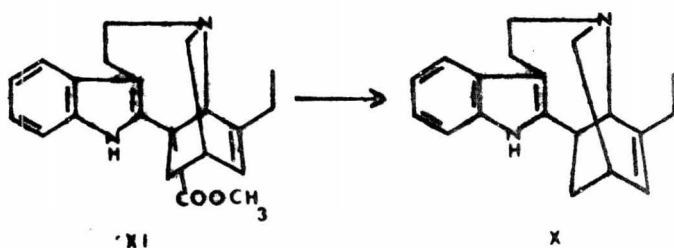
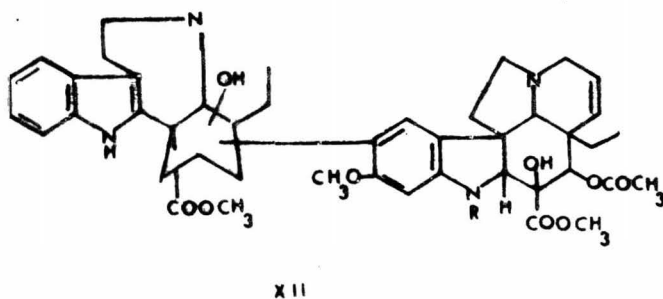


Figura 5.



A pesar de ésta asignación incorrecta,⁴³ representó el avance más significativo en la determinación de la estructura de éstas dos moléculas.

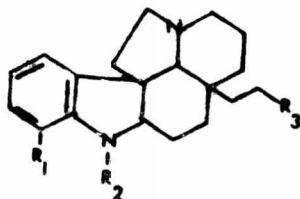
La posición de la unión entre la parte indólica y la parte indolínica no fué posible determinarla sino hasta después de dos años por Bremann y colaboradores^{44,45} -- quienes mediante espectrometría de masas (espectros de alta resolución) modificaron la fórmula mínima de vincristina y vinblastina en dos unidades de masa atómica, $C_{46}H_{58}N_4O_9$ para vinblastina y $C_{46}H_{56}N_4O_{10}$ para vincristina, y por lo tanto considerando el núcleo de velbenamina (IX) como la parte indólica del dimero y asignando su unión a la parte indolínica por medio de la posición 18' proponiendo la estructura (Figura 1) como la correcta para vincristina y vinblastina. La posición por medio de la cuál está unida la parte indolínica con la parte indólica es la posición 15, ésto fué determinado en función de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento presentados por los protones de las posiciones 14 y 17 de 15-bromo-vindolina y vindolina,⁴² (constantes de acoplamiento características para protones para). La configuración de los centros asimétricos de la estructura (Figura 1) de éstas moléculas fué comprobada mediante un estudio por rayos X.^{45,46,47}

VI SINTESIS.

El enfoque principal que se ha dado a los intentos de síntesis total de vinblastina y vincristina, tratando de ser congruentes con la naturaleza, ha sido el de una síntesis de tipo convergente en función de los dos es-cuelotos de degradación reductiva que presentan éstos alcaloides diméricos: desacetilvindoline (VIII) y velba-

namina (IX) y la posterior condensación de éstos dos núcleos. De tal manera, que aparentemente el problema de la síntesis de vincristina se limita a los problemas - que pueda presentar la síntesis de éstas dos moléculas por separado y el posterior problema de la condensación. Analizaremos, por lo tanto como primer punto la síntesis de la parte indolínica.

La parte indolínica (Figura 6), cuya dificultad de síntesis a su vez se centra en la construcción de los anillos correspondientes a decahidro-pirroloquinolina -- (XIV), núcleo común de varios alcaloides, como por ejemplo: aspidoespermina (XIIIa), vallesina (XIII b), limaspermina (XIII c) y aspidoespermidina (XIII d).



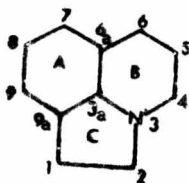
XIII a. $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{COCH}_3$; $R_3 = \text{H}$

XIII b. $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{CHO}$; $R_3 = \text{H}$

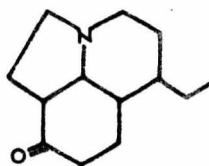
XIII c. $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{COC}_2\text{H}_5$; $R_3 = \text{OH}$

XIII d. $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Figura 6.



XIV



XV

De tal manera que los estudios realizados para éstos -
 compuestos serán comunes para la síntesis del esquele-
 to indolínico de la vindolina (XVII b). Las diferentes
 rutas que han sido reportadas en la síntesis de aspidos
 permina y derivados llegan a un intermediario común -
 (XV), preparándolo por diferentes métodos^{48, 49} (inclu -
 yendo rearrreglos térmicos y catálisis con ácidos), co-
 mo por ejemplo el informado por Stork y colaboradores⁵⁰
 y que a continuación se describe (Figura 7) y cuyas ma-
 terias primas son muy sencillas de preparar como la -
 enamina (A), que es tratada con acrilato de etilo (B),
 el cuál mediante una reacción de anillación da la ceto-
 na alfa, beta insaturada (C). Esta es transformada por
 los métodos usuales en la ceto-amina (D) que es cicliza-
 da a (E) mediante una reacción tipo Michael, la ceto -
 amina (D) es tratada con el cloruro del ácido cloroacé-
 tico dando la N-acilación (F) que es tratada con un me-
 dio básico fuerte para producir la cetoamida (G) que a
 su vez por reducción con LiAlH_4 después de proteger la
 cetona nos da el intermediario (XV), el cuál por el mé

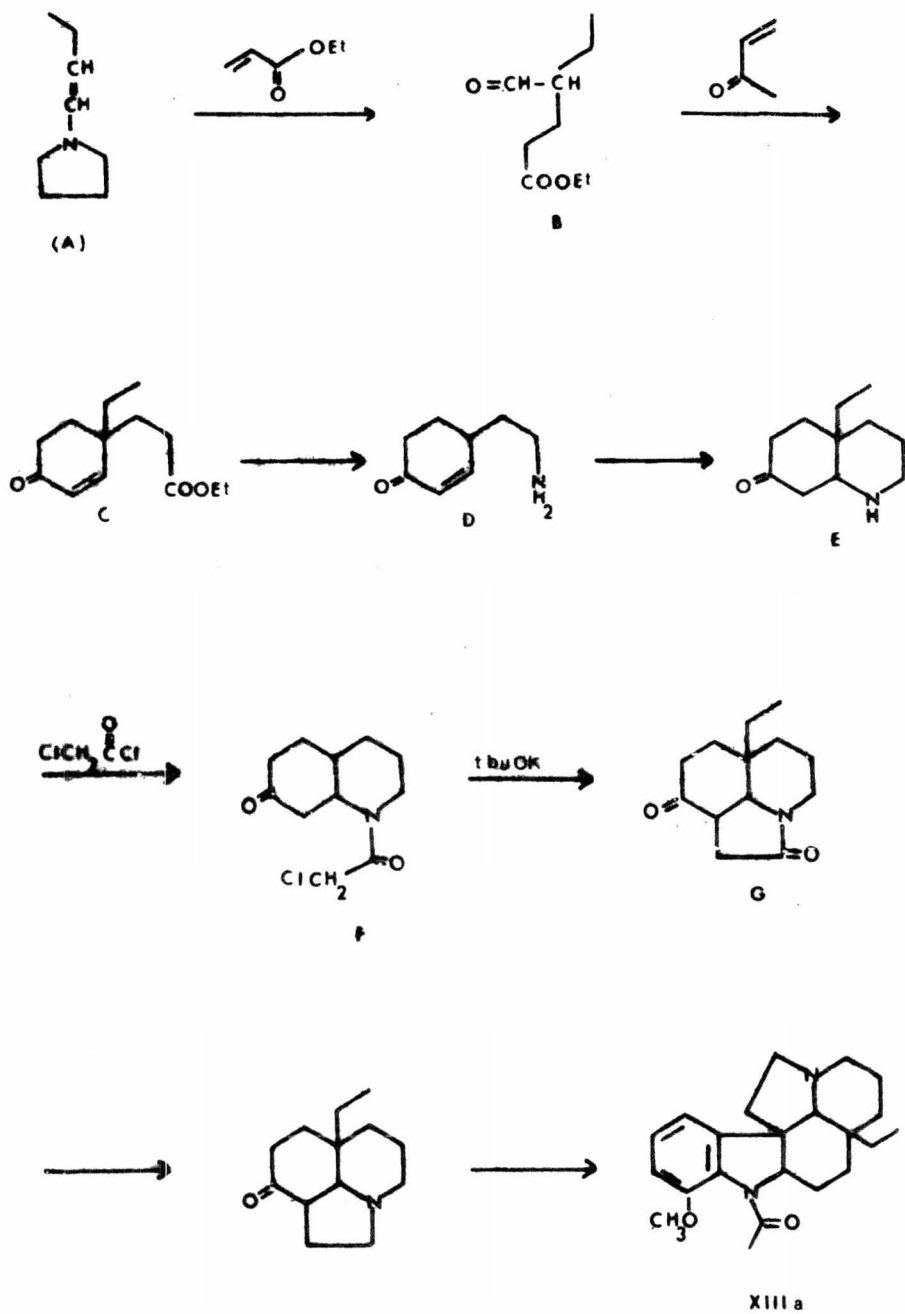


Figura 7.

todo general de Piesher para la síntesis de indoles es transformado en aspidospermina (XIII a).

Con el fin de determinar la conformación del intermedio (Figura 8), éste y la cetoamida (G) han sido sometidos a un estudio muy detallado en resonancia magnética nuclear⁵¹⁻⁵³ dando como resultado las conformaciones - (XV a y XV b) para ésta cetoamina, sin embargo éstas - estructuras han sido puestas en duda en trabajos mas recientes.⁵⁴

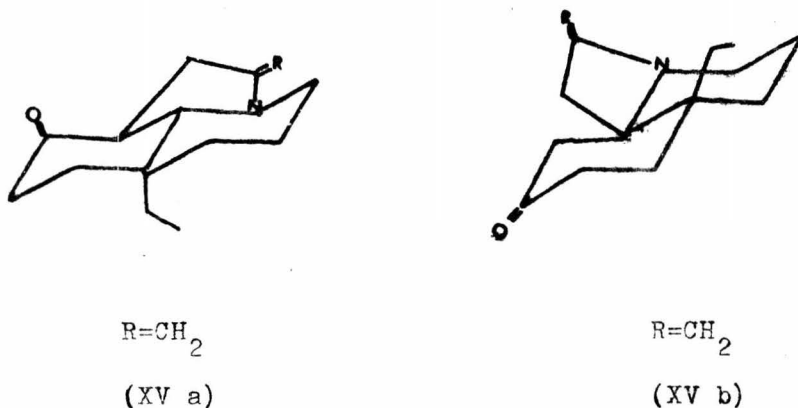
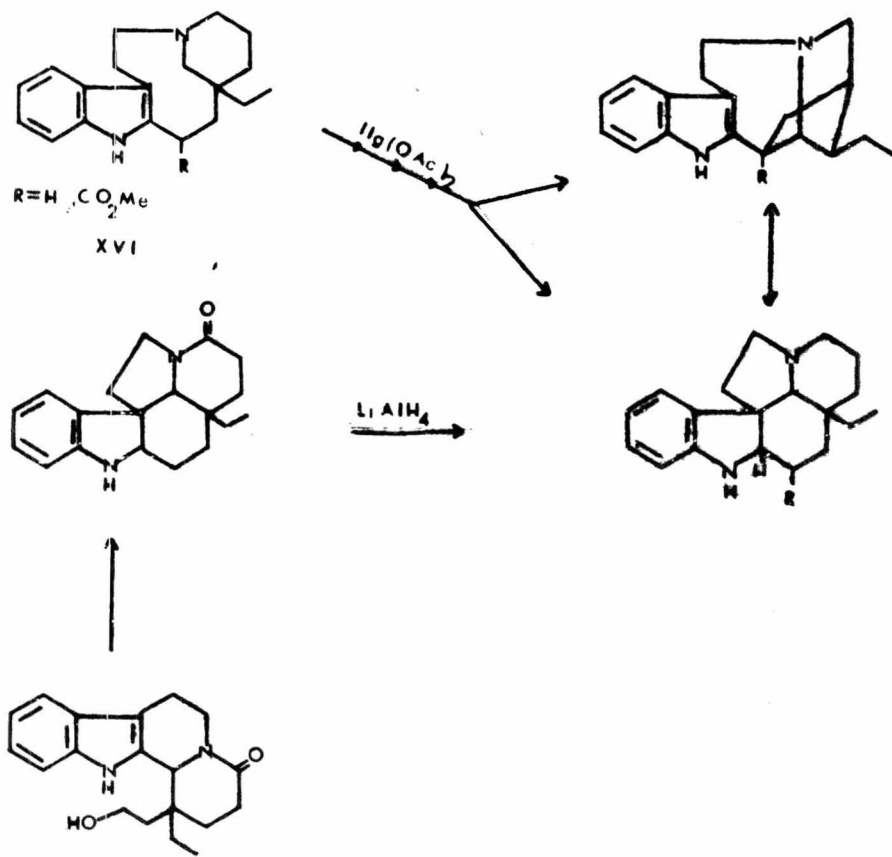


Figura 8.

Otro método sumamente interesante en la síntesis del esqueleto de la aspidospermina y que posiblemente sea similar al proceso biosintético realizado por la planta, consiste en una reacción de ciclización trans anular de un intermediario apropiado (XVI) (Figura 9) de nueve miembros.^{55, 56} El método es muy versátil ya que la reacción además de ser estereoespecífica⁵⁷ para generar los centros asimétricos de los sistemas naturales,⁵⁸ se puede aplicar, con las modificaciones apropiadas para la síntesis de otros sistemas como por ejemplo cleavamina

y quebranchemina.^{59, 60, 61, 62}

Una extensión de éste sistema pentacíclico natural es - un proceso sencillo de isomerización con ácidos minerales o de Lewis.⁶³



Recientemente Büchi,⁶⁴ llevó a cabo la síntesis de vindorosina (XVII a) cuya estructura tiene una relación muy cercana a la de vindolina (XVII b, Figura 10). El paso más interesante de ésta síntesis lo constituye una ciclización interna del indol (XVIII, Figura 10) mediante un ácido de Lewis.

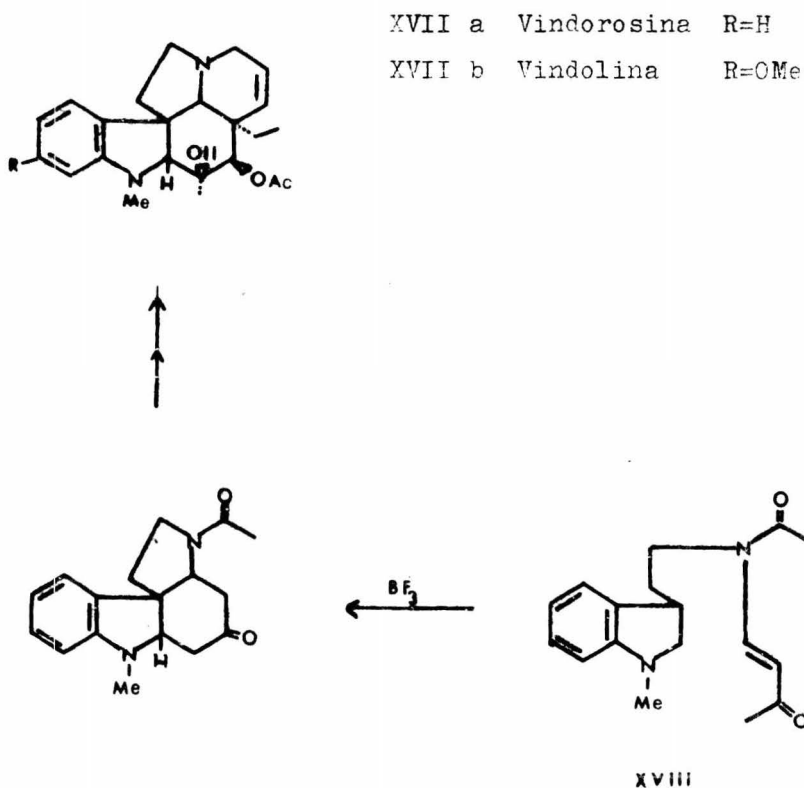


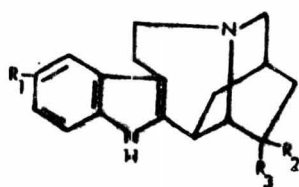
Figura 10.

La síntesis de la parte indólica, velbanamina (IX), de los dimeros de vinblastina y vincristina ha sido estudiada ampliamente ya que éste núcleo es común para gran número de alcaloides de las ibogas que junto con los -

miembros de las aspidospermas se encuentran en Vinca rosea L. y vincristina y vinblastina forman un sistema dimérico combinado de aspidosperma-iboga.

En éstas bases hay esqueletos de velbanamina, como son la catarantina⁶⁵ y sus análogos⁶⁶ que se transforman en cleavamina en medio ácido (Figura 5).

De tal manera que la síntesis de ibogamina (XIX a) y sus análogos⁶⁷⁻⁷⁶ es muy importante.



- XIXa Ibogamina $R_1=R_3=H$ $R_2=Et$
 XIXb Epiibogamina $R_1=R_2=H$ $R_3=Et$
 XIXc Ibogaina $R_1=OCH_3$ $R_2=Et$ $R_3=H$
 XIXd Epiibogaina $R_1=OCH_3$ $R_2=H$ $R_3=Et$

Figura 11.

Fundamentalmente el sistema de ibogamina y velbanamina lo constituye el anillo de nueve miembros.

La primera síntesis de ibogamina fué reportada por Büchi, 67, 68, la cuál constituye también la primera síntesis de este anillo de nueve átomos característico de ésta serie. Los métodos de síntesis de ibogamina son vastos y variados siguiendo diferentes rutas y no teniendo preferencia sobre algún intermediario o tipo de reacción en especial como el caso de la vindolina y sus análogos. Sin embargo, la mayoría de estos sistemas se pueden aplicar potencialmente a la síntesis de velbanamina como por ejemplo el intermediario A (Figura 12) empleado por Büchi en la síntesis de velbanamina.^{77, 78} Este intermediario es transfor

mado en (B) mediante las modificaciones funcionales - apropiadas, el cuál es tratado como clorhidrato con indol acetato de sodio en presencia de clorhidrato de - 1, (etil, 3 dimetilaminopropil) carbamida, en agua para - dar (C), la posterior ciclización con ácido paratoluen-sulfónico, e hidrolisis del éter resultante con una mez - cla de ácido perclórico y ácido acético da el compuesto (D), que tiene el núcleo de la catarantina (XI). Este, en presencia de terbutóxido de potasio sufre una ruptu - ra para dar la dicetoamida (E) que ya contiene el nú - cleo de velbanamina (IX) y cleavamina (X), ésta reacción de retroaldolización constituye uno de los pasos más in - teresantes de ésta síntesis. Posteriormente se reduce - selectivamente los carbonilos, primero con borohidruro de sodio y después con cloruro estanoico y ácido para to - luen sulfónico, para dar el indol (F), que por oxida - ción de la cetona sobre la cuál se efectúa una reacción de Grignard y finalmente una reducción con aluminio hi - druro de litio de la amida obteniéndose velbanamina. Kutney y colaboradores⁷⁹ desarrollaron una síntesis para la serie cleavamina (X), velbanamina (IX) cuyo paso - más interesante lo constituye la reacción de ruptura - del sistema de catarantina al sistema de cleavamina - (Figura 13), la cuál tiene la estereoquímica adecuada - para ello.

Otro intermediario interesante en ésta síntesis lo cons - tituye la preparación de la cloro indolina (Figura 14) que si bien aquí no es de gran importancia, si lo es en la síntesis de los dimeros.

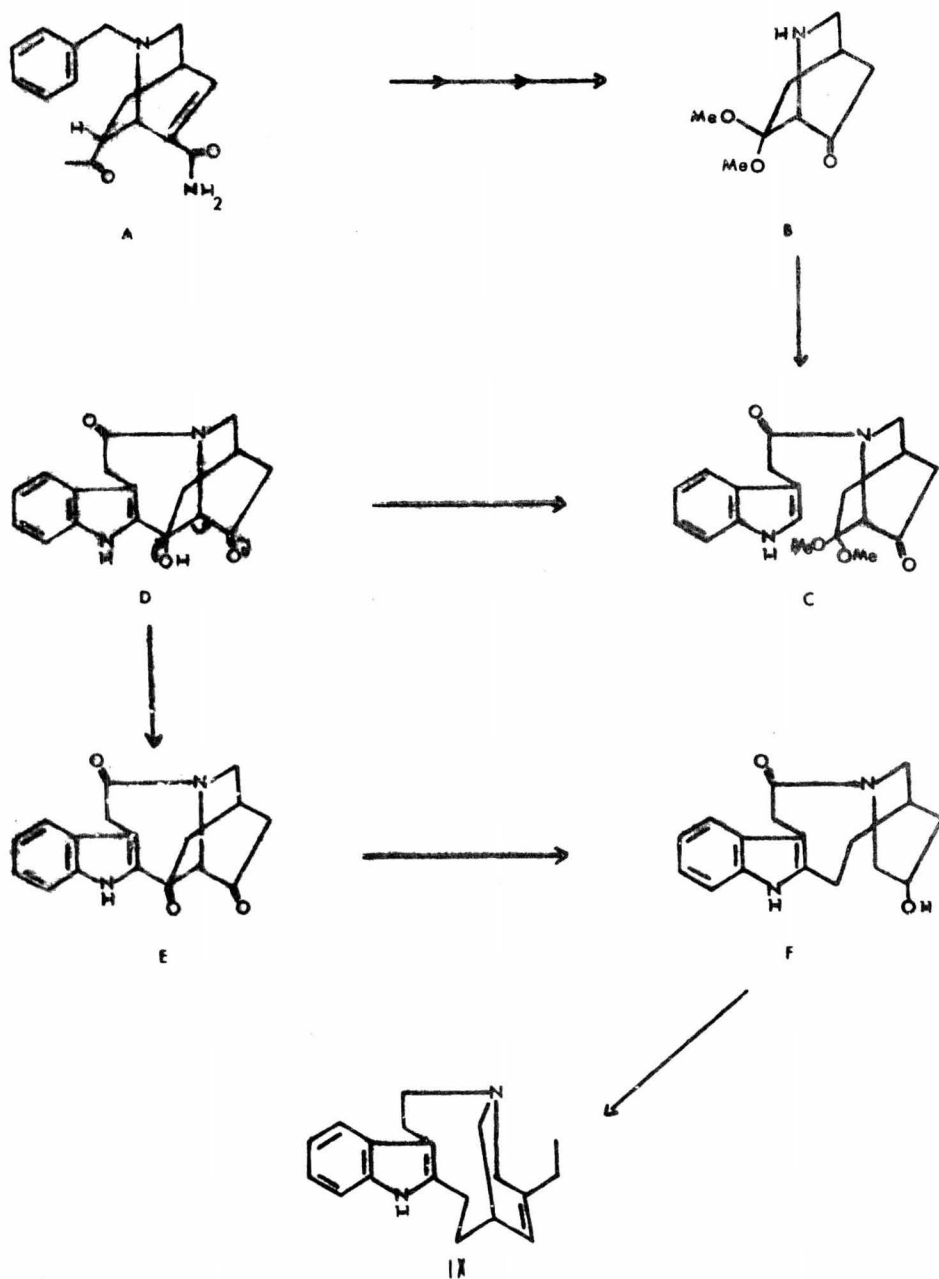


Figura 12.

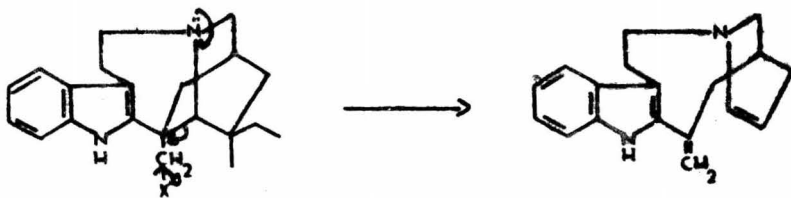


Figura 13.

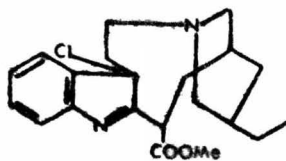


Figura 14.



Figura 15.

Un método novedoso de ruptura como el anteriormente descrito lo constituye el reportado por Nagata y colaboradores⁸⁰ el cuál, utiliza una fragmentación oxidativa con tetracetato de plomo (Figura 15).

En general observamos que en los últimos años se han incrementado los métodos de rupturas del sistema de catarantina a cleavamina como paso importante en la síntesis de velbanamina y compuestos relacionados.

Uno de los primeros intentos importantes de síntesis de alcaloides diméricos en función de la condensación de la parte indólica con la indolínica fué hecho por J. H. Mason⁸¹ que sintetizó 16-hidroxi-dihidro-cleavamina (A, Figura 16) y su condensación con vindolina empleando cloruro de hidrógeno al 1% en metanol a 0°C para obtener demetoxi-carbonil-deoxi-vinblastina (XX).

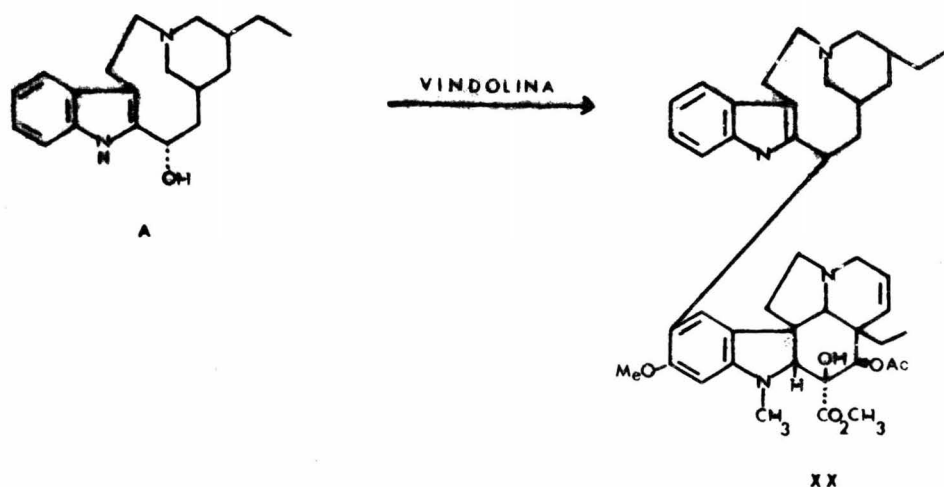


Figura 16.

Esta síntesis ha marcado la pauta a seguir en la síntesis de alcaloides diméricos.

De ésta manera Kutney⁸² efectuó una condensación entre - una cloroindolinina (B; Figura 17) con vindolina, en metanol conteniendo cloruro de hidrógeno al 1.5 % a reflujo, obteniéndolo con 45 % de rendimiento el dimero XXI.

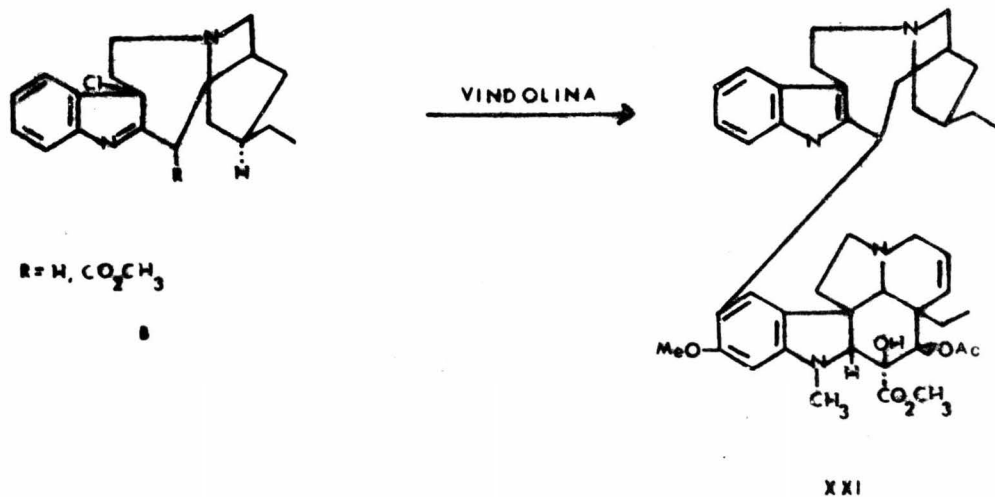


Figura 17.

Tal vez los esfuerzos más cercanos al éxito en la síntesis total de vinblastina y vincristina son los hechos - recientemente por Büchi y colaboradores⁸³ y por Kutney y colaboradores,⁸⁴ que son los investigadores que más han trabajado en éste campo de la síntesis de alcaloides. Büchi hace una semblanza de la planeación de la condensación de la parte indolínica (vindolina) y la parte indólica (derivado oxidado de 18-carbetoxy-velbanamina).

Por otro lado Kutney, tal vez el que más cerca está del éxito, logró sintetizar la 18'-epi-4'-deoxo-4'-epivinblastina (XXII, Figura 18), producto que en la posición 18' no tiene la configuración de los productos naturales, esto desde luego es muy importante ya que la configuración de los centros asimétricos y sus grupos funcionales son indispensables en vincristina y vinblastina para que presenten su actividad antitumor,⁸⁴ de tal manera, que la importancia de éste centro en función de la síntesis resulta obvio. También logró sintetizar algunos derivados de 18'-epi-4'-epivinblastina por medio de la condensación de una cloroindoleina con vindolina.

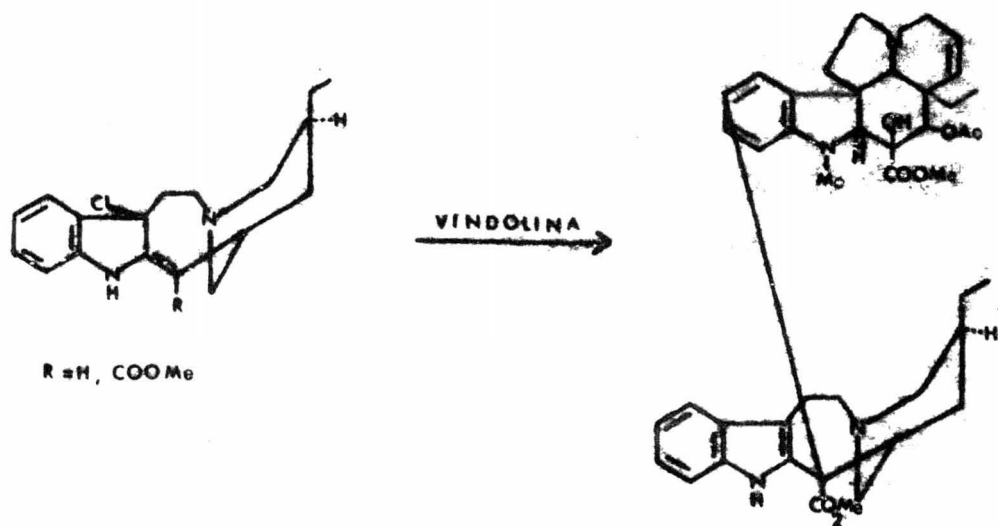


Figura 18.

La configuración en C 18 fué determinada por medio de rayos X. En conclusión los autores señalan que la condensación de cloroindolinas en medio ácido dará el alcaloide dimérico de la serie epi en C 18.

VII BIOSINTESIS.

El esqueleto de los alcaloides indólicos se relaciona estructuralmente con un fragmento de triptamina⁸⁵⁻⁸⁷ y una unidad de 9 o 10 átomos de carbono.⁸⁸

Los alcaloides indólicos pueden clasificarse en tres grupos estructurales,⁸⁹ Corinante-Estricnos, Aspidoesperma e Iboga, como se indica en la Figura 19.

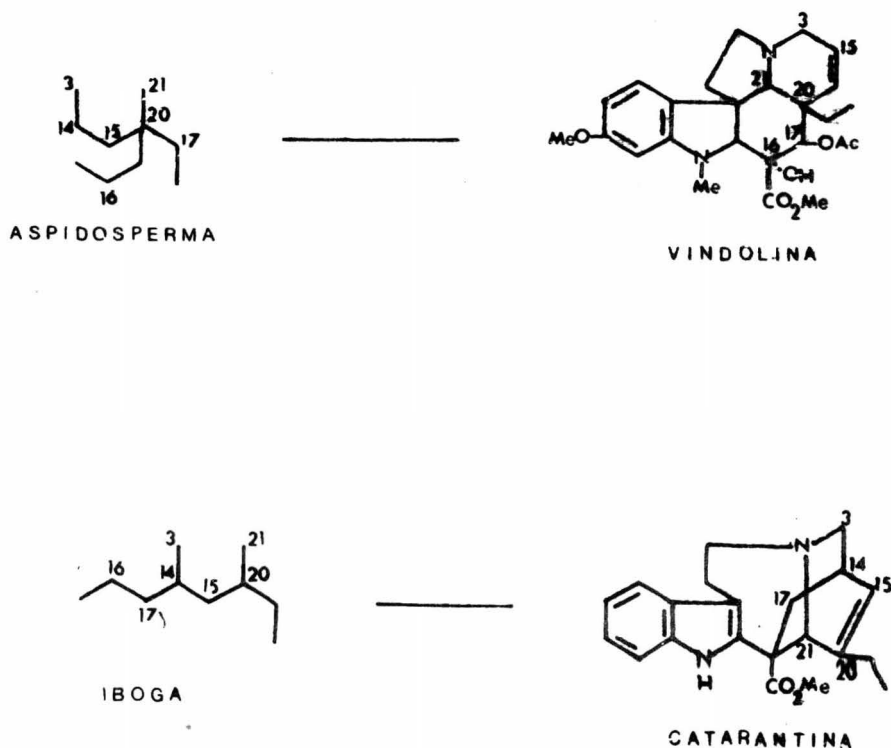




Figura 19.

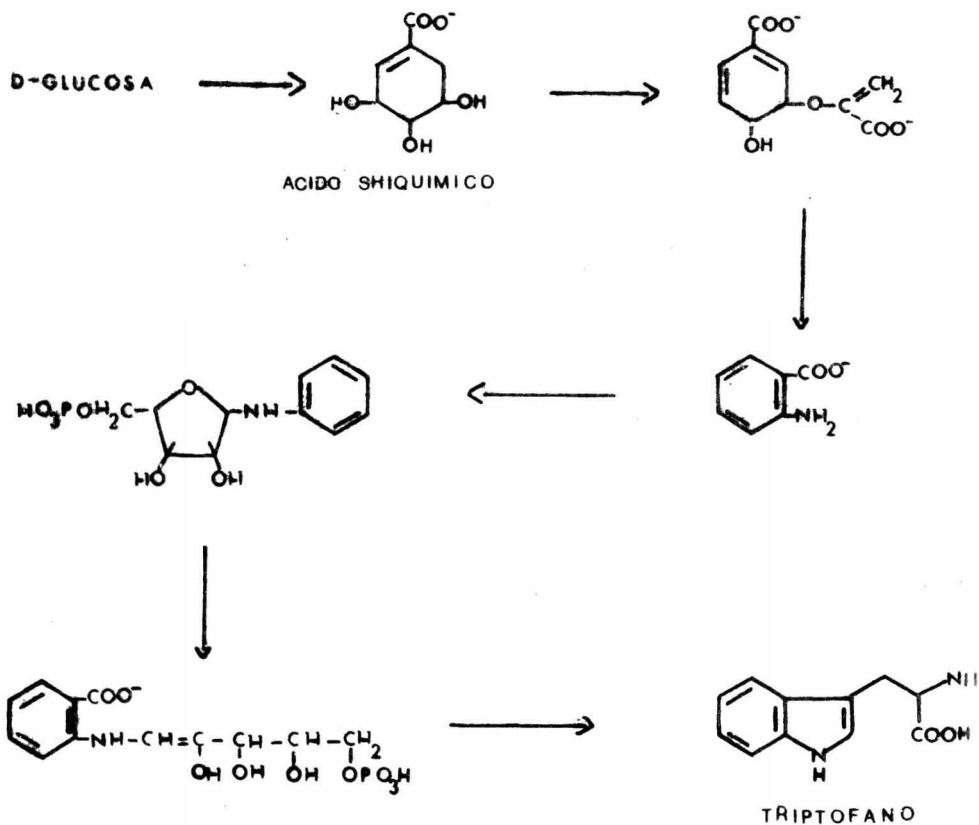


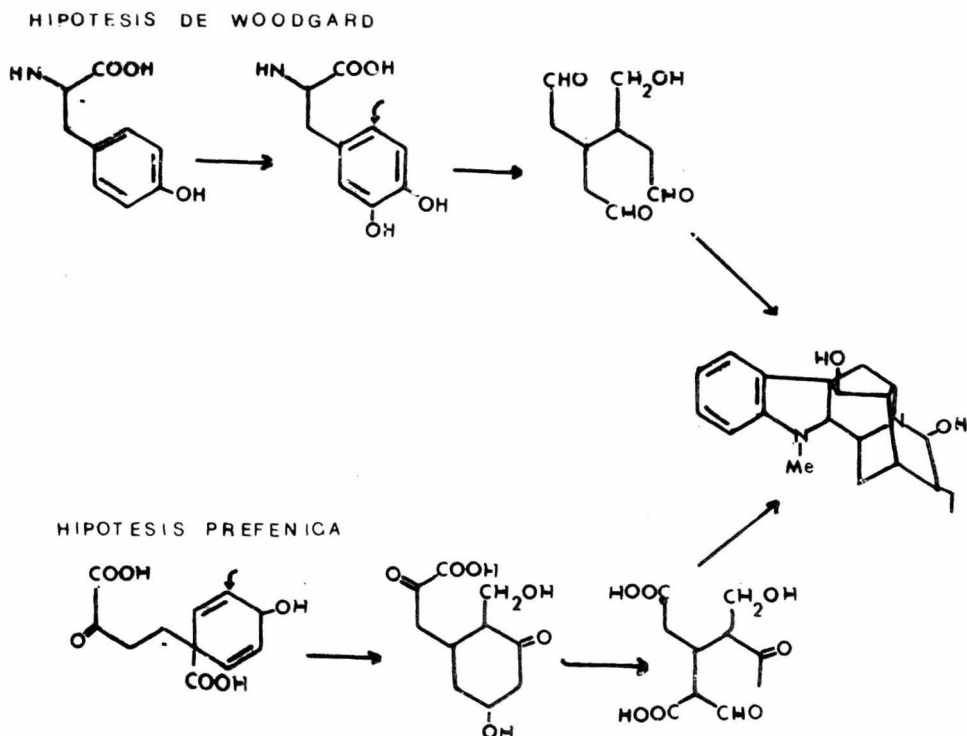
Figure 20.

Biosíntesis del fragmento de triptamina.

El fragmento de triptamina de los alcaloides indólicos se deriva del triptofano,⁹⁰⁻⁹³ el cuál a su vez es sintetizado por la naturaleza a partir del ácido shiquímico⁹⁴ (Figura 20).

Biosíntesis del fragmento no triptamínico.

Se han propuesto cuatro hipótesis para explicar el origen del fragmento no triptamínico de los alcaloides indólicos: A) Hipótesis de Woodgard (Barger-Hahn),⁹⁵⁻⁹⁸ B) Hipótesis de Wenkert o prefénica,⁹⁹ C) Hipótesis de Leete o acetilénica,¹⁰⁰ D) Hipótesis terpénica.¹⁰¹⁻¹⁰² (Figura 21).



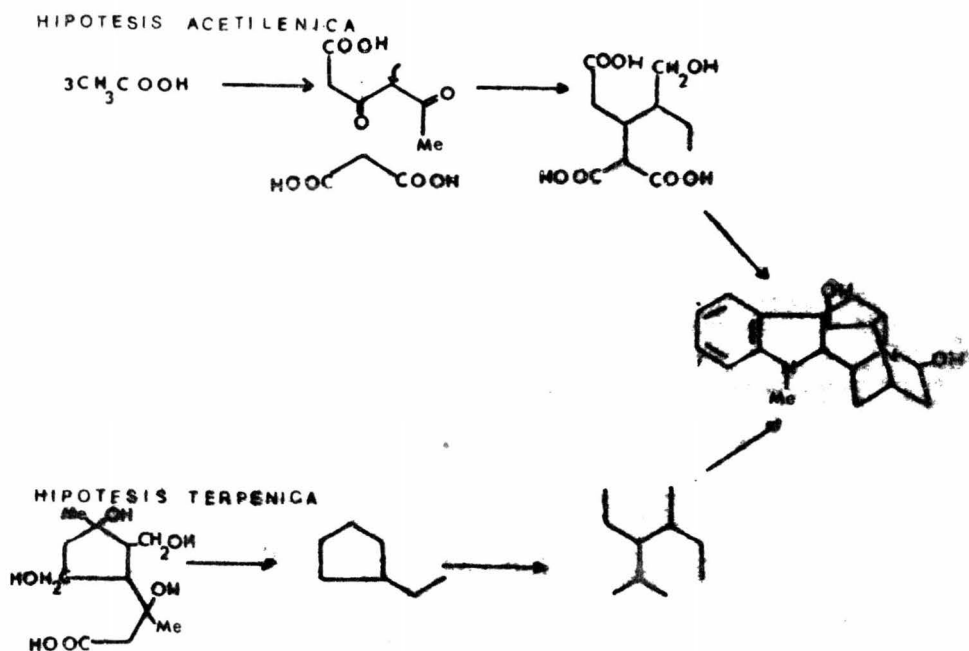


Figura 21.

Las tres primeras hipótesis han sido descartadas actualmente,^{103,104} en función de que proponen la intervención de una unidad en C 1, y posteriormente se demostró que en la biosíntesis de alcaloides indólicos no se incorpora ninguna unidad en C 1.^{105,106}

Para la hipótesis terpenica se propone una trayectoria general cuya secuencia se divide en tres puntos. En el primer punto se propone el desarrollo de un glucósido, secologenin y su conversión a vincosida. En el segundo punto se propone una transformación de vincosida a alcaloides corinante y estrichos. Finalmente, en el tercer punto se desarrollan las familias aspidosperma, ibo

ga y eburna.

Thomas¹⁰¹ y Wenkert,¹⁰² propusieron que existía una relación entre la unidad de 9 o 10 átomos de carbono de la unidad no triptamínica con un esqueleto ciclopentanoide monoterpénico.^{88,107-111} Se realizaron experiencias de incorporación con precursores marcados con ^{14}C y los resultados han aportado pruebas que comprueban la validez de ésta hipótesis. Diferentes mevalonatos de sodio marcados con ^{14}C en posiciones 2, 3, 4, 5, se administraron sucesivamente a plantas de *Vinca rosea* L., *Rhazia*, *Stricta*, *Rauwolfia*, *Serpentina* y los alcaloides aislados aparecieron marcados en las posiciones previstas por la hipótesis terpénica.^{112,113} Thomas¹¹⁴ sugirió que el monoterpene debería ser el glucósido loganin, el cuál por ruptura del anillo de cinco miembros forma secologanin, ésto pudo demostrarse por la transformación en *Menyanthes trifoliata* de (2- ^{14}C) y (4- ^{14}C)-geraniol en loganin marcado.¹¹⁰⁻¹¹⁵ Se ha comprobado experimentalmente que el precursor de loganin es deoxiloganin (Figura 22). Se ha aislado también de *Swerita carolinensis* el ácido libre de loganin y se encontró que se deriva bioquímicamente de (2- ^{14}C) mevalonato y de (1- ^{14}C) geranil pirofosfato.¹¹⁶ Con lo que el origen terpénico (incorporación de mevalonato) y el encadenamiento isoprénico (incorporación de geraniol) quedaron comprobados.

Posteriormente se aisló la vincosida, producto de la condensación de secologanin y triptamina.¹¹⁷⁻¹²⁰ Battersby obtuvo "in vitro" una mezcla separable de vincosida e isovincosida por condensación de secologanin y triptamina radioactiva, que fué incorporada por *Vinca rosea* -

produciendo vincosida radioactiva que a su vez fué incorporada en los tres tipos de alcaloides indólicos,¹²¹ mientras que la isovincosida (enúmero en C 3) y la dihidro vincosida no se incorporaron.¹²⁰

Los detalles de la ruta entre loganin y vincosida se conocieron gracias al aislamiento y estudios estructurales^{122,123} de dos glucósidos extraídos de *Menyanthes trifoliata* llamados foliamentina y mentiafolina (Figura 22). Se ha realizado el paso de mentiafolina a loganin¹²³ y se ha encontrado también que secologanin es un precursor de los dos glucósidos y de la lactona swerosida, cuyo metabolismo se realiza por vía del ácido secologánico.^{124,125}

Para la transformación de vincosida a alcaloides corinante y estricnos se requieren enzimas glucosídicas y ciclización del dialdehído ester resultante, de donde se desarrollan geissoschizina, corinanteina y ajmalicina. Scott y colaboradores¹²⁶ proponen un mecanismo (ampliamente comentado)¹²⁷ en el que se postula que el compuesto de donde se desarrollan las familias aspidosperma e iboga por varias oxidaciones y rearrreglos debe ser un éster acrílico (Figura 23).

Vinblastina esta compuesta por vindolina y una unidad hidroxilada de catarantina. Daddona¹²⁹ propone que la biosíntesis se realiza por la dimerización de alcaloides íntimamente relacionados con catarantina y vindolina. Por otra parte, la única evidencia bioquímica que existe en la biosíntesis de vinblastina es que en *V. rosea*, ni (O-metil-³H)-catarantina ni (O-metil-³H)-coronaridina se incorporan a vinblastina, durante las cinco primeras semanas.¹²⁷

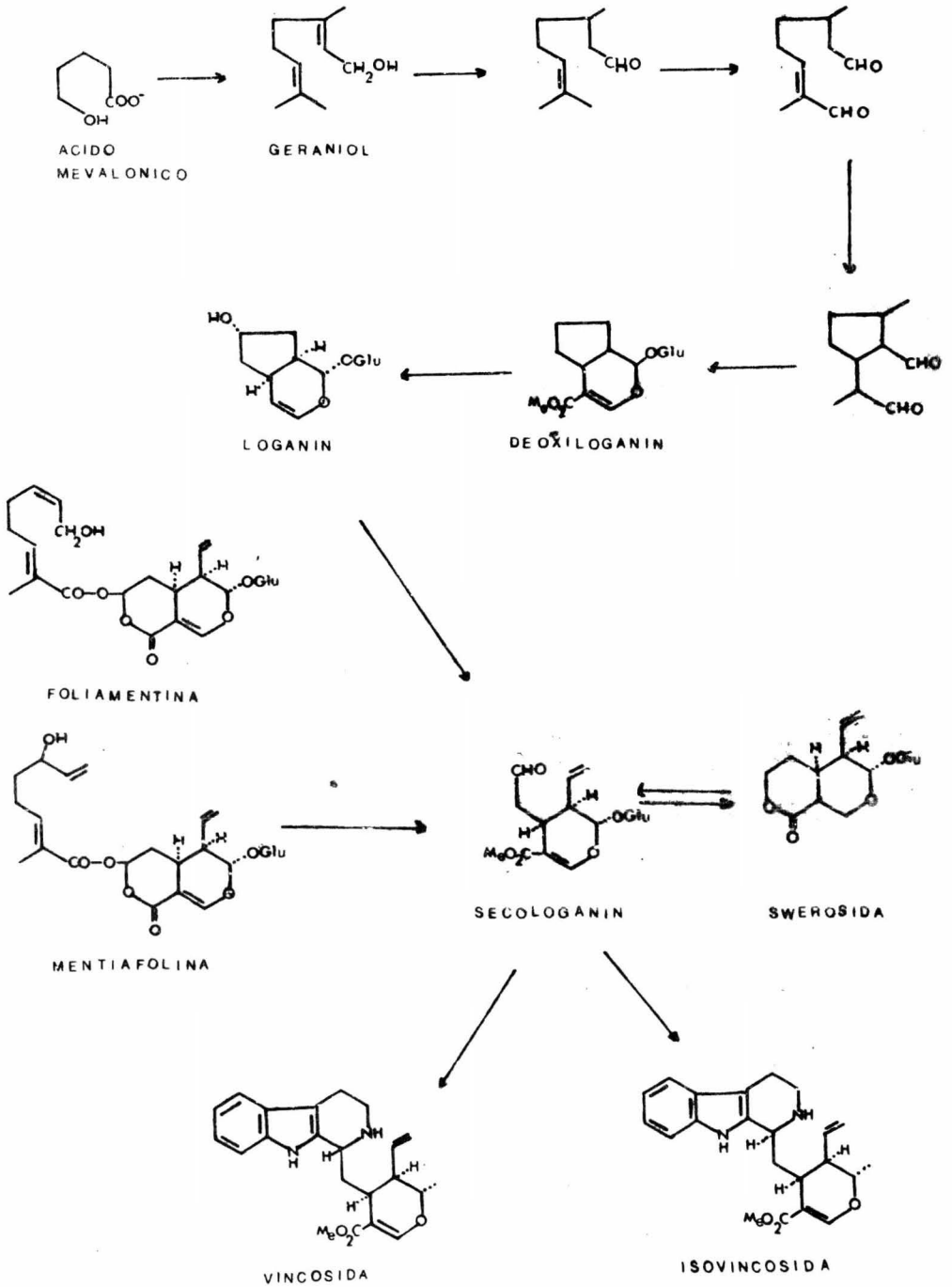


Figura 22.

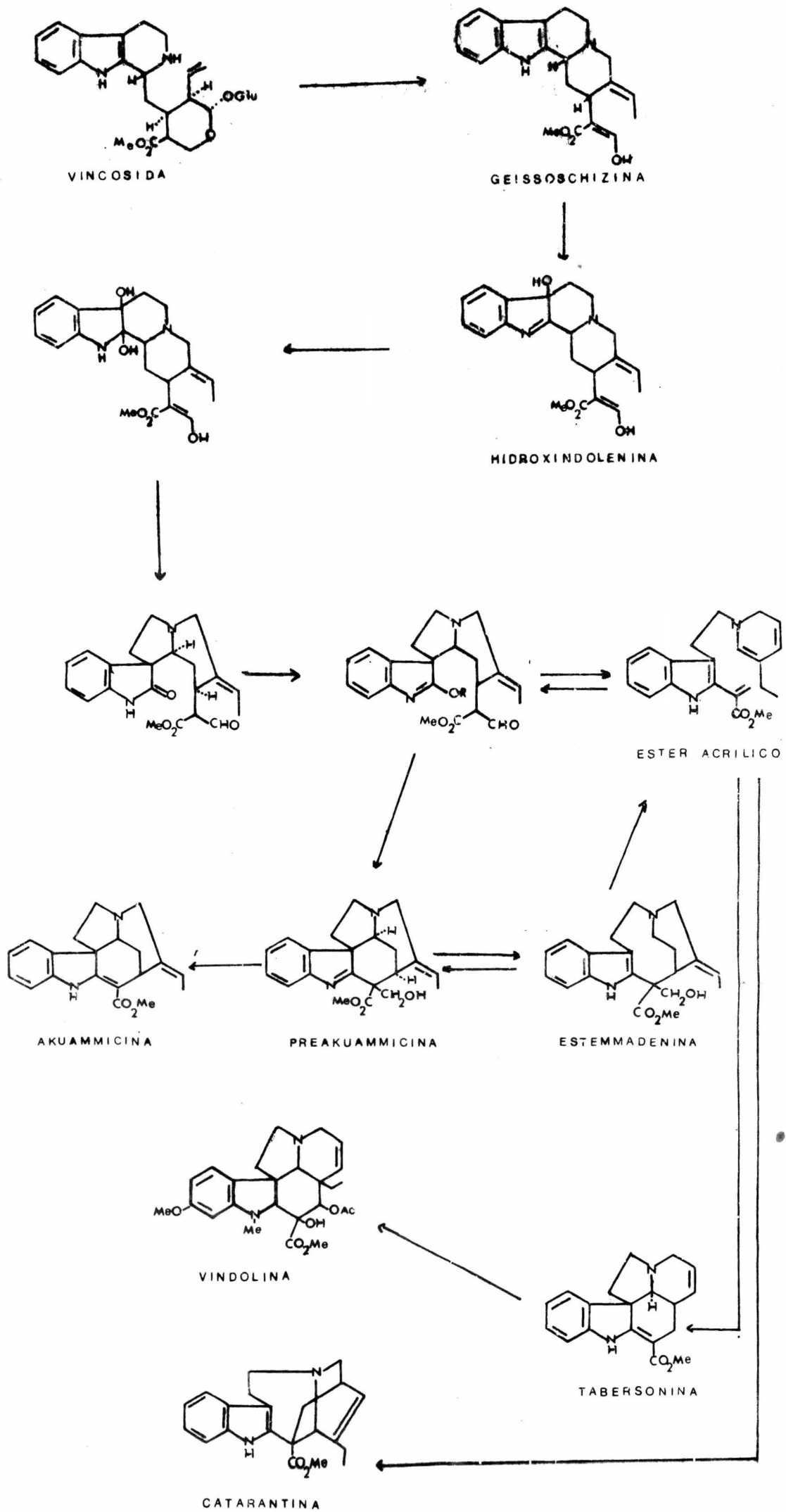


Figura 23.

VIII ASPECTOS FARMACOLOGICOS Y USOS.

Las primeras descripciones de las propiedades medicinales que se encuentran sobre *Vinca rosea* L. mencionan - que en Brasil se tomaban infusiones de las hojas para el tratamiento de hemorragias y escorbuto y para limpiar y cicatrizar heridas.³²

En regiones de Sudáfrica, Australia, Vietnam del Sur, - Filipinas e Inglaterra se preparaban infusiones de las hojas por una supuesta actividad antidiabética.

Se conoce que la mayoría de alcaloides presentes en *Vinca rosea* L. poseen una actividad antibiótica con *V. comma* y *S. aureus* y otros microorganismos.¹³⁰⁻¹⁴⁰

Farnsworth¹⁴¹ revisó ampliamente las primeras descripciones de las propiedades medicinales de la planta.

Varios investigadores observaron que ciertas fracciones de un concentrado de alcaloides producían granulocitopenia periférica y depresión de la médula de los huesos.¹⁴²⁻¹⁴⁶

El grupo de investigación de los laboratorios Lilly demostró que algunas fracciones de alcaloides mostraban - resultados reproducibles en la cura de ratones DBA/2 infectados con leucemia linfocítica y transplantable -- P-1534.

El sulfato de vincristina, tiene un efecto antineoplásico con una gran actividad biológica en tumores experimentales y en cáncer humano como son el tumor de Freund, tumor de Ehrlich, tumor S-180, leucemia 1382 A, leucemia P-1534, carcinoma de Walker 256 entre otros.¹⁴⁷⁻¹⁸⁸

El sulfato de vincristina interrumpe la metafase así co

mo la síntesis de DNA y RNA y se ha demostrado que ataca a las células selectivamente cuando se adiciona durante la fase S (fase DNA-sintética) del ciclo celular. 189-233

Se ha demostrado que el sulfato de vincristina induce trombocitosis; 234-246 alteraciones en microtúbulos citoplásmicos y en microfilamentos por lo que interfiere en la actividad atribuida a éstas estructuras. 247-265 Se informa también de inhibición de la respuesta inmunológica 266-274 y alteraciones en la composición de fosfolípidos y en funciones de la fracción microsomal del músculo esquelético en ratas. 275-282

Se ha encontrado que tiene efectos tóxicos sobre el sistema nervioso periférico, 283-287 pacientes a los que se les ha administrado han presentado durante el tratamiento neuropatía periférica caracterizada por parestesia, depresión de reflejos en los tendones, atonía gastrointestinal con distensión abdominal y dolor. Estas anomalías varían según la dosis total acumulativa y la duración del tratamiento.

Las complicaciones neurológicas son menos comunes y se manifiestan como parálisis del nervio craneal, ataxia, oftalmoplegias, parálisis de la vejiga, psicosis convulsiones y coma. 288

También se ha presentado hiponatremia, hipocloremia con simultánea hipertonicidad urinaria y una irregular secreción de la hormona antidiurética, lo que probablemente sea un reflejo directo de un efecto neurotóxico en el sistema nervioso central. 289, 290

El sulfato de vincristina se administra a los pacientes

combinado con otros compuestos como son 5-fluorouracil, metotrexato, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, prednisona entre otros, presentando diferentes resultados según sea el tiempo, la dosis y la secuencia en que se administran. ²⁹¹⁻³⁴¹

IX BIBLIOGRAFIA.

- 1) G.H. Svoboda, *Lloydia* 24, 173 (1961).
- 2) Chemical Works of Gedeon Richter Ltd. Budapest. Exported by Medimpex 1808, Budapest S.P.O.B. 126 Hungary, Ed. 1975.
- 3) N. Neuss, Lilly Collection of Physical Data of Indole Alkaloids, Vol. 2 Part 1, Lilly Research Laboratories. Eli Lilly Company, Indianapolis, Indiana (1964).
- 4) J.H. Burns, Analytical Profiles of Drug Substances - 463 (1972).
- 5) G.H. Svoboda, M. Gorman, N. Neuss and A.J. Barnes, - *J. Pharm. Sci.*, 50, 409 (1961).
- 6) G.H. Svoboda, M. Gorman, A.J. Barnes and A.T. Oliver, *J. Pharm. Sci.*, 51, 518 (1962).
- 7) I.S. Johnson, J.G. Armstrong, M. Gorman and J.P. -- Burnett, *Cancer Res.*, 23, 1390 (1963).
- 8) N. Neuss, M. Gorman, H.E. Boaz and N.J. Cone, *J. -- Amer. Chem. Soc.*, 84, 1509 (1962).
- 9) Enciclopedia de Tecnología Química Kirk-Othmer, Vol. 1, Ed. UTEHA (1961).
- 10) J.D. Roberts and M.C. Caserio, "Principios Básicos - de Química Orgánica", W.A. Benjamin Inc. (1965).
- 11) N.L. Kent, "Tecnología de los Cereales", Ed. Acribia, Zaragoza, España (1971).
- 12) R.H.F. Manske, "The Alkaloids", Vol. VIII (1965).
- 13) R.H.F. Manske, "The Alkaloids", Vol. I (1965).
- 14) E. Hegnauer, "Chemotaxonomie der Pflanzen", Vol. III, Birkhäuser Verlag (1964).

- 15) R.L. Noble, *Lloydia* 27, 280 (1964).
- 16) N.R. Farnsworth, R.N. Blomster, D. Damretoski, W.A. Meer and L.V. Cammarato, *Lloydia* 27, 302 (1964).
- 17) A.W. Sangaster, *J. Chem. Educ.* 37, 454 (1960).
- 18) G.H. Svoboda, *Lloydia* 27, 299 (1964).
- 19) R.H.F. Manske, *Can J. Research* 8, 210 (1933).
- 20) O. Chick, "Allen's Commercial Organic Analysis", 5th Ed., J.A. Churchill Ltd., London, Vol. 7 (1932).
- 21) B.T. Cromwell and Tracey M.V., "Modern Methods of Plant Analysis", Springer, Berlin, Vol. 4 (1955).
- 22) G. Papineau-Couture and R.A. Burley, *Analyt. Chem.* - 24, 1920 (1952).
- 23) J. Comin and V. Dulofen, *J. Org. Chem.*, 19, 1774 - (1952).
- 24) H. Schmid, J. Kebrle and P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* 37, 787 (1954).
- 25) W. Deckers and J. Scheiber, *Naturwiss* 40, 553 (1953).
- 26) A. Blumenthal, G.H. Eugster and P. Karrer, *Helv. Chim. Acta* 37, 787 (1954).
- 27) G.O. Björling and B. Johnson, *Acta Chem. Scand.* 17, 2638 (1963).
- 28) J. Roberts, *J. Chromatogr.* 34, 112 (1968).
- 29) J.R. Broich, M.M. Demayo and L.A. Dalcortivo, *J. Chromatog.* 33, 526 (1968).
- 30) G.H. Tan and B.G. Andley, *Fitochemistry* 7, 109 (1968)
- 31) T.D. Obeley and J.L. Duncan, *Biochem. Biophys. Comm.* 48, 1339 (1972).
- 32) G.H. Svoboda, I.S. Johnson, M. Gormen and N. Neuss, *J. Pharm. Sci.* 51, 707 (1962).

- 33) K. Jovanovics, K. Szasz, E. Bittner, E. Dezseri and J. Eles, Richter Gedeon, Vegyeszeti Gyar Rt., Hung. Teljes 3317 (Cl. c 07 dg) 12 Jan 1972, Appl 27 May - 1970, 18 pp
- 34) K. Jovanovics, K. Szasz, G. Fekete, E. Bittner, E. - Dezseri and J. Eles, Richter Gedeon, Vegyeszeti Gyar Rt. Hung. Teljes 7, 302 (Cl. co7 g), 20 Nov 1973, - Appl RI-435, 13 Jul 1971; 16 pp
- 35) K. Szasz, K. Jovanovics, G. Fekete, E. Bittner, E. - Dezseri and J. Eles, Richter Gedeon, Vegyeszeti, -- Gyar Rt. Hung. Teljes 8058 (Cl. C07 dg) 27 Apr. 1974 Appl. RI-433, 31 Aug. 1971
- 36) I.M. Jakovljevic, J. Pharm. Sci. 51, 187 (1962).
- 37) I.M. Jakovljevic, L.D. Seay and E.W. Shaffer, J. -- Pharm. Sci. 53, 553 (1964).
- 38) N.J. Cone, R. Miller, N. Neuss, J. Pharm. Sci. 52, - 688 (1963).
- 39) N.R. Farnsworth and I.M. Hilinski, J. Chromatogr., - 18, 184 (1965).
- 40) N. Neuss, M. Gorman, G.H. Svoboda, G. Maciak and C. T. Beer, J. Amer. Chem. Soc. 81, 4154 (1959).
- 41) M. Gorman, N. Neuss and G.H. Svoboda, J. Amer. Chem. Soc. 81, 4745 (1959).
- 42) N. Neuss, M. Gorman, H.E. Roaz and N.J. Cone, J. - Amer. Chem. Soc. 84, 1509 (1962).
- 43) M. Gorman and N. Neuss, Am. Chim. (Roma) 53, 43 (1963)
- 44) P. Bommer, W. Mc Murray and K. Bremann, J. Amer. - Chem. Soc. 86, 1439 (1964).
- 45) N. Neuss, M. Gorman, W. Hargrave, N.J. Cone, K. Bre- mann, G. Büchi and R.E. Manning, J. Amer. Chem. Soc.

- 86, 1440 (1964).
- 46) J.W. Moncriel and W.N. Lipscomb, J. Amer. Chem. Soc. 87, 4963 (1965).
- 47) J.W. Moncriel and W.N. Lipscomb, Acta Cryst. 21, 322 (1966).
- 48) Y. Ban, Y. Sato, I. Inoue, M. Nagai, T. Oishi, M. Terashima, O. Yonemitsu and Y. Kanaoka, Tetrahedron Letters 27, 2261 (1965).
- 49) M.E. Uetline and C. Bayha, Tetrahedron Letters, 1311 (1966)
- 50) G. Stork and J.E. Dolfini, J. Amer. Chem. Soc 85, -- 2872 (1963)
- 51) M.J. Uarplus, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2870 (1963).
- 52) K.L. Williamson, J. Amer. Chem. Soc. 83, 4623 (1961)
- 53) R.U. Lemieux, Can. Chem. 40, 1955 (1962).
- 54) Y. Ban and I. Ijima, Tetrahedron Letters, 2523 (1962)
- 55) J.P. Kutney, T. Brown and E. Piers, J. Amer. Chem. - Soc. 86, 2286 (1964)
- 56) J.P. Kutney, E. Piers and R.T. Brown, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1700 (1970)
- 57) A. Camerman, N. Camerman, J.P. Kutney, E. Piers and J. Trotter, Tetrahedron Letters, 637 (1965)
- 58) J.P. Kutney, R.T. Brown and E. Piers, Can. J. Chem. 44, 637 (1966)
- 59) J. P. Kutney and E. Piers, J. Amer. Chem. Soc. 86, - 953 (1964).
- 60) J.P. Kutney, T. Brown and E. Piers, J. Amer. Chem. - Soc. 86, 2287 (1964).
- 61) J.P. Kutney, N. Abdurahmann, C. Gletsos, P. Le Quesne

- E. Piers and I. Vlattas, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1727 (1970)
- 63) F. Ziegler and G.B. Bennett, J. Amer. Chem. Soc. 93, 5930 (1971).
- 64) G. Büchi, K.E. Matsumoto and H. Nishimura, J. Amer. Chem. Soc. 93, 3299 (1971).
- 65) M. Gorman, N. Neuss and N.J. Cone, J. Amer. Chem. Soc. 87, 2073 (1965).
- 66) G. Büchi and R.E. Manning, J. Amer. Chem. Soc. 88, 2532 (1966).
- 67) G. Büchi, D.L. Coffen, K. Kocsis, P.E. Sonnet and F. E. Zeegler, J. Amer. Chem. Soc. 87, 2073 (1955).
- 68) G. Büchi, D.L. Coffen, K. Kocsis, P.E. Sonnet and F. E. Zeegler, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3099 (1966).
- 69) W. Nagata, S. Hirai, K. Kawata and T. Okumura, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5046 (1967).
- 70) W. Nagata, S. Hirai, T. Okomura and K. Kawata, J. Amer. Chem. Soc. 90, 1650 (1968).
- 71) Y. Ban, T. Wakamatsu, Y. Fujimoto and T. Oishi, Tetrahedron Letters, 3383 (1968).
- 72) S.I. Sollay, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6762 (1967).
- 73) M. Ikesaki, T. Wakamatzu and Y. Ban, Chem. Commun., 88 (1969)
- 74) P. Rosenmund, W.H. Haare and J. Bauer, Tetrahedron Letters, 4121 (1969).
- 75) J.W. Hoffman, C.B.S. Rao and T. Komiya, J. Org. Chem. 32, 697 (1967).
- 76) R.L. Augustine and W.G. Prenon, J. Org. Chem. 34, 1070 (1969)

- 77) G. Büchi, P. Kuisa and R.L. Rosati, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2448 (1968)
- 78) G. Büchi, P. Kuisa, K. Ogasawara and R.L. Rosati, J. Amer. Chem. Soc. 92, 999 (1970)
- 79) J.P. Kutney and F. Bylsma, J. Amer. Chem. Soc. 92, - 6090 (1970)
- 80) M. Narisada, F. Watanabe and N. Nagata, Tetrahedron Letters, 3681 (1971)
- 81) J.H. Manson and A. Rahman, Chem. Commun., 1048 (1967)
- 82) J.P. Kutney, J. Beck, F. Bylsman and W.J. Cretney, - J. Amer. Chem. Soc. 90, 4504 (1968).
- 83) G.H. Büchi, Chimia 29, 172 (1975).
- 84) J.P. Kutney, J. Cook, K. Fuji, A.M. Trasurywala, J. Clardy, J. Fayos and H. Wright, Heterocycles 3, 205 (1975).
- 85) A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons, Chem. Commun., 1282 (1968).
- 86) A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons, J. - Chem. Soc. C., 1193 (1969).
- 87) J.P. Kutney, W.J. Cretney, J.R. Hadfield, E.S. Hall, V.R. Nelson and D.C. Wigfield, J. Amer. Chem. Soc. - 90, 3566 (1968).
- 88) T. Money, I.G. Wright, F. Mc Capra, E.S. Hall and A. I. Scott, J. Amer. Chem. Soc. 90, 4144 (1968).
- 89) E. Schlitter and W.I. Taylor, Experientia 16, 244 - (1960).
- 90) E. Leete, J. Amer. Chem. Soc. 82, 6335 (1960).
- 91) E. Leete, Tetrahedron Letters, 35 (1961).
- 92) M. Yamasaki and E. Leete, Tetrahedron Letters, 1499 (1964).

- 93) D. Gröger, K. Stolle and K. Mothes, Tetrahedron --
Letters, 2579 (1964).
- 94) J.P. Begue, Bull. Soc. Chim. France, 2545 (1969).
- 95) R.B. Woodward, Nature, 162, 155 (1962).
- 96) R.B. Woodward, Angew. Chem., 68, 13 (1956).
- 97) G. Hahn and H. Werner, Ann. Chem., 520, 123 (1935).
- 98) G. Berger and C. Scholtz, Helv. Chim. Acta, 16, 1343
(1933).
- 99) E. Wenkert and N.V. Bringi, J. Amer. Chem. Soc., 81,
1474 (1959).
- 100) E. Leete, J. Amer. Chem. Soc., 84, 1068 (1962).
- 101) R. Thomas, Tetrahedron Letters, 544 (1961).
- 102) E. Wenkert, J. Amer. Chem. Soc., 84, 98 (1962).
- 103) D. Gröger, K. Stolle and K. Mothes, Z. Naturforsch.,
21b, 206 (1966); Arch. Pharm., 330, 393 (1967).
- 104) E. Leete, A. Ahmad and I. Kompis, J. Amer. Chem. Soc.,
87, 4169 (1965).
- 105) A.R. Battersby, Pure and Appl. Chem., 14, 447 (1967).
- 106) D.H.R. Barton, G.W. Kirby, R.H. Prager and E.M. ---
Wilson, J. Chem. Soc., 3991 (1965).
- 107) H. Groeggel and D. Arigoni, Chem. Comm., 538 (1965).
- 108) A.L. Battersby, R.T. Brown, R.S. Kapil, A.O. Plunkett
and J.B. Taylor, Chem. Commun., 46 (1966).
- 109) F. Mc Capra, T. Money, A.I. Scott and I.G. Wright, -
Chem. Commun., 537 (1965).
- 110) A.R. Battersby, R.T. Brown, R.S. Kapil, J.A. Knight,
J.A. Martin and A.O. Plunkett, Chem. Commun., 888, -
890 (1966).
- 111) E. Leete and S. Veda, Tetrahedron Letters, 4915 (1966).

- 112) A.R. Battersby, *Pure and Appl. Chem.*, 14, 117 (1967).
- 113) A.I. Scott, *Accounts Chem. Res.*, 3, 151 (1970).
- 114) R. Thomas, *Biogenesis of Antibiotic Substances* (Z. Vanek and Z. Hostalek editors), (Symposium, June -- 1964), p. 163, (New York Academic Press) 1965.
- 115) A.R. Battersby, R.T. Brown, J.A. Knight, J.A. Martin and A.O. Plunkett, *Chem. Commun.*, 346 (1966).
- 116) C.J. Coscia and R. Guarnaccia, *Chem. Commun.*, 138 - (1968).
- 117) R.T. Brown, G.N. Smith and K.S. Stapleford, *Tetrahedron Letters*, 41, 4346 (1968).
- 118) G.N. Smith, *Chem. Commun.*, 912 (1968).
- 119) A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons, *Chem. Commun.*, 1282 (1968).
- 120) A.R. Battersby, A.R. Burnett, E.S. Hall and P.G. - Parsons, *Chem. Commun.*, 1582 (1968).
- 121) A.R. Battersby, A.R. Burnett and P.G. Parsons, *J. - Chem. Soc. C.*, 1187 (1969).
- 122) P. Loew, J. Von Szczepanski, C.J. Coscia and D. Arigoni, *Chem. Commun.*, 1276 (1968).
- 123) A.R. Battersby, A.R. Burnett, G.D. Knowles and P.G. Parsons, *Chem. Commun.*, 1227 (1968).
- 124) R. Guarnaccia, L. Botta and C.J. Coscia, *J. Amer. - Chem. Soc.*, 92, 6098 (1970).
- 125) R. Guarnaccia and C.J. Coscia, *J. Amer. Chem. Soc.*, 93, 6320 (1971).
- 126) A.I. Scott, P.C. Cherry and A.A. Qureshi, *J. Amer. - Chem. Soc.*, 91, 4932 (1969).
- 127) M.T.P. *International Review of Sciences. Organic Che*

mistry Series One Vol. 9, Butterworths, University - Park Press (1973).

- 128) Quereshi, A.A. and A.I. Scott, Chem. Commun., 945, - 947 (1968).
- 129) P.E. Daddona, C.R. Hutchinson, J. Amer. Chem. Soc., 96, 6806 (1974).
- 130) I.C. Chopra, K.S. Jamwal, C.L. Chopra, C.P.N. Nair - and P. Pillay, Indian J. Med. Research Lab., 47, 39 (1959).
- 131) A. Goldin, J.P. Glym, J.B. Maloney, S.R. Humphreys - and M.A. Chirigos, Acta Unio. Intern. Contra Carcum 20, 157 (1964).
- 132) M.A. Chirigos, Methods Drug Eval., Proc. Int. Symp., Milan, 382 (1965).
- 133) N.R. Farnsworth, G.H. Svoboda and R.N. Blomster, J. Pharm. Sci., 57, 2174 (1968).
- 134) T. Tokumaru and A. Avitabile, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137, 29 (1971).
- 135) G. Lubinsky, Ch.F. Lee and R.W. Baron, Can. J. Zool., 49, 1301 (1971).
- 136) W.C. Rose, S.G. Bradley and I.P. Lee, Toxicol. Appl. Pharmacol., 23, 102 (1972).
- 137) S. Saslaw, H. Jarlisle and M. Moheimai, Infec. Immunity, 6, 149 (1972).
- 138) W.C. Rose, S.G. Bradley and I.P. Lee, Antimicrob. - Agents Chemother., 1, 489 (1972).
- 139) N. Mareki and S.G. Bradley, Antimicrob. Agents Chemo ther., 3, 603 (1973).
- 140) Kosobutskii (Moscow), 13, 731 (1973).

- 141) N.R. Farnsworth, *Lloydia* 24, 105 (1961).
- 142) J.H. Cutts, C.T. Beer and R.L. Noble, *Rev. Can. Biol.* 16, 476 (1957).
- 143) S.M. Bernard and F. Stohlman, *J. Clin. Invest.*, 45, 241 (1966).
- 144) H. Gerhartz and K.E. Hampel, *Antitumoral Eff. Vinca rosea Alkaloids, Proc., Symp. G.E.C.A., 1st, Paris*, 57 (1965).
- 145) W. Smith and S. Wilson, *J. Natl. Cancer Inst.*, 39, - 1055
- 146) E. Nesbit and J. Lowman, *Blood*, 34, 633 (1969).
- 147) J.G. Armstrong, *Cancer Chemotherapy Rept.*, 52, 527 - (1968).
- 148) S.A. Schepartz, *Cancer Chemotherapy Rept.*, 2, 3 (1971)
- 149) E. Freireich, *Marquette Med. Rev.*, 31, 108 (1965).
- 150) J.H. Burchenal, V.C. Gregg, J.R. Purple and W. Kreis, *Intern Congr. Chemotherapy, Proc., 3rd, Stuttgart*, - 932 (1963).
- 151) R.H. Adamson, R.L. Dixon, M. Ben, L. Crews, S.B. - Shohet and D.P. Rall, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 157 299 (1965).
- 152) A. Goldin, J.P. Glynn, A.R. Bianco, J.M. Vendetti - and J.B. Maloney, *Intern. Congr. Chemotherapy, Proc. 3rd Stuttgart*, 812 (1963).
- 153) M. Karon, *Clin. Pharmacol. Therap.*, 7, 332 (1966).
- 154) R.M. Still, *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Commonwealth*, 73, 621 (1966).
- 155) M.J. Cline, *Blood*, 30, 176 (1967).
- 156) G. Brambilla, L. Baldini and G. Galli, *Boll. Soc.* -

- Ital. Biol. Sper., 42, 1679 (1966).
- 157) W.S. Wileox, Nat. Cancer Inst. Monogr. No 24, 257 - (1967).
- 158) G. Deysson, M. Adolphe and J. Cheymol, Ann. Pharm. - Fr., 26, 193 (1968).
- 159) L. Morasca and C. Rainisio, Antitumoral Eff. Vinca - rosea Alkaloids, Proc., Symp. G.E.C.A., 1st Paris, - 50 (1965).
- 160) J. Dixon, E. Dulmage, L. Mulligan and L.B. Mellett, Cancer Res., 29, 1810 (1969).
- 161) Mirshaut Yashar, G. Weiss and S. Perry, Cancer Res., 29, 1732 (1969).
- 162) B. Lampkin, T. Magao and A. Mauer, J. Clin. Invest., 48, 1124 (1969).
- 163) Jaquillat and M. Weil, Therapeutique, 46, 419 (1970).
- 164) Yashida Tsuneo, Nippon Univ. J. Med., 11, 189 (1969).
- 165) E. Stephen, J. Cell. Biol., 49, 848 (1971).
- 166) T. Izsak, E. Eylan, A. Gazith, J. Shepiro, S. Naharin and Ch. Raanani, Eur. J. Cancer, 7, 33 (1971).
- 167) M. Aoshima and Y. Sakurai, Gann, 63, 281 (1972).
- 168) R.A. Adams, A. Flowers, R. Sundeen and L.P. Merk, - Cancer (Philadelphia), 29, 524 (1972).
- 169) A. Goldberg, J. Glynn, M. Kende, K. Manthel and A. - Goldin, Cancer Res., 32, 1321 (1972).
- 170) Z. Szentirmay, A. Gyesko and J. Sugar, Z. Krebsforsch Klin. Onkol., 78, 82 (1972).
- 171) A. Gyesko, Z. Szentirmay and J. Sugar, Z. Krebsforsch Klin. Onkol., 78, 90 (1972).
- 172) Z. Szentirmay, A. Gyesko and J. Sugar, Neoplasms, 20,

- 31 (1973).
- 173) A. Gyesko, Z. Szentirmay and J. Sugar, *Neoplasma*, 20, 37 (1973).
- 174) A. Michiko and S. Yoshio, *Gann*, 64, 207 (1973).
- 175) F. Gal, Z.R. Somfai, Z. Szentirmay and L. Nemeth, - *Advan. Antimicrob. Antineoplastic Chemother. Proc. - Int. Congr. Chemother. 7th*, 2, 271 (1971).
- 176) H. Lin and W.R. Bruce, *Ser. Hematol.*, 5, 73 (1972).
- 177) Y. Najean, A. Faille and M. Mulmann-Omanus, *Nouv. - Rev. Fr. Hematol.*, 13, 51 (1973).
- 178) R. Hartenstein, H. Ehrhart and K. Hoffmann, *Z. Krebsforsch Klin. Onkol.*, 79, 213 (1973).
- 179) Z. Szentirmay, A. Gyesko and J. Sugar, *Advan. Antimicrob. Antineoplastic Chemother. Proc., Int. Congr. - Chemother. 7th*, 2, 149 (1971).
- 180) S.R. Opler, *Advan. Antimicrob. Antineoplastic Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother.*, 7th, 2, 269 (1971)
- 181) I.S. Johnson (Eli Lilly and Co.) U.S. 3, 749, 784 - (Cl.424-262; A 61 k), 31 Jul 1973, *Appl.* 84, 199 26 Oct 1970.
- 182) J.F. Borel, *Experientia*, 29, 676 (1973).
- 183) E. Frei, F. Schabel and A. Goldin, *Cancer Res.*, 34, 184 (1974).
- 184) K. Hellmann, A. Salsbury, K. Burrage, A. Le Serve - and S. James, *Chemother. Cancer Dissemination Metastasis*, 355 (1973) Ed. by Garattini, Silvie Raven, - New York.
- 185) B.F. Thain, S.B. Valveley, B. Boreham, C. West, N - Price, A. Noelene, D. Walker and M.J. Churchouse, -

- Cancer Chemother. Rep., Part 1, 58, 189 (1974).
- 186) F. Kansawa, A. Hoshi and K. Kuretani, *Gann*, 65, 55 -
(1974).
- 187) Chu Ming and Hooris Marvin, *Biochem. Pharmacol.*, 23,
503 (1974).
- 188) S. Yancey and A. Bleyer, *Cancer Res.*, 34, 1866 (1974)
- 189) C. Hunter, *Biochem. Pharmacol.*, 12, 283 (1963).
- 190) W.A. Creasey and M.E. Markiu, *Biochem. Pharmacol.*, -
13, 135 (1964).
- 191) A. Creasey and M.E. Markiu, *Biochem. Biophys. Acta*,
87, 601 (1964).
- 192) J. Whang, R. Secoggins, E. Van Scott, D. Rall and M.
Ben, *Cancer, Res.*, 24, 1918 (1964).
- 193) T.N. Mehrotra and G. Cardinali, *Indian J. Pathol. -*
Bacteriol., 8, 98 (1965).
- 194) A. Creasey and M.E. Markiu, *Biochem. Biophys. Acta -*
103, 635 (1965).
- 195) G. Phillip, L.J. Journey and M.N. Goldstein, *Cancer*
Inst., 35, 355 (1965).
- 196) I.J. Slotnick, M. Dougherty and D. James, *Cancer -*
Res., 26A(4), 673 (1966).
- 197) H. Savel, *Progr. Exptl. Tumor Res.*, 8, 189 (1966).
- 198) A.M. Marmont and E. Damasio, *Blood*, 29, 1 (1967).
- 199) B.M. Agustin and W.A. Creasey, *Nature*, 215, 965 (1967)
- 200) J.F. Tannock, *Cell. Exp. Res.*, 47, 245 (1967).
- 201) M.J. Cline, *Brit. J. Haematol.*, 14, 21 (1968).
- 202) W. Lee, E. Dulmage and G.J. Dixon, *Proc. Soc. Exp.*
Biol. Med., 127, 472 (1968).
- 203) E. Wagner and B. Raizman, *Science*, 162, 569 (1968).

- 204) P. Warnecke and S. Seeber, *A. Krebsforsch*, 71, 361 - (1968).
- 205) R. de Wayne, T.C. Hall, D. Rosenthol, A. Penta, E. - Loehr, J. Anderson and K. Steinberg, *Cancer Res.*, 29 789 (1969).
- 206) H. Madoc-Jones and F. Mauro, *J. Cell. Physiol.*, 72, 185 (1968).
- 207) P. Warnecke and S. Seeber, *Z. Krebsforsch*, 73, 67 - (1969).
- 208) G. Jagiello, *Experientia*, 25, 695 (1969).
- 209) S. Ungthavorn and M. Joneja, *Amer. J. Anat.*, 126, - 291 (1969).
- 210) R. Harmut and B. Jantsch, *Z. Krebsforsch.*, 74, 295 - (1970).
- 211) M. Francesco and H. Madoc-Jones, *Cancer Res.*, 30, - 1397 (1970).
- 212) F. Helmut and A. Pappas, *Klin. Wochenschr.*, 48, 950 (1970).
- 213) T.A. Connors, *Fundam. Biochem. Pharmacol.*, 514, 1971, Edited by Bacq. Z.M. Pergamon: Oxford Engl.
- 214) M. Semmel, *Biochimie*, 53, 457 (1971).
- 215) O. Kanji, *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, 33, 363 (1970)
- 216) T.J. Fitzgerald, B. Williams and E.M. Vyeki, *Pharmacology*, 6, 265 (1971).
- 217) Sky-Peck and H. Hoeard, *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, - 34, 197 (1971).
- 218) T.P. Waalkes, R.H. Adamson, D. Riddick and R. Gello, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 196, 345 (1972).
- 219) G.P. Wuest, *Verh. Deut. Ges. Inn. Med.*, 76, 190 (1970)
- 220) N. Wright, A. Morley and D. Appleton, *Cell Tissue* -

- Kinet., 5, 351 (1972).
- 221) F.E. Knock, E.M. Galt, Y.T. Oester and R. Sylvester, *Oncology*, 26, 515 (1972).
- 222) U. Torelli, G. Torelli and C. Mauri, *Eur. J. Cancer*, 8, 611 (1972).
- 223) A. Gyesko, Z. Szentirmay and J. Sugar, *Advan. Antimicrob. Antineoplastic, Chemother.*, 7th, 2, 153 (1971). Ed. by Hejzlar, Miroslav. Univ. Park Press, Baltimore Md.
- 224) J. Sugar, O. Csuka and I. Palyi, *Advan. Antimicrob. Antineoplastic, Chemother., Proc. Inst. Congr. Chemother.*, 7th, 2, 157 (1971). Ed. by Hejzlar, Miroslav - Univ. Park Press, Baltimore Md.
- 225) K. Wilms and W. Wilmanns, *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes, Int. Symp.*, 2nd, 483 (1972). Ed. by Gerlach, E. Georgy Thieme, Stuttgart, Ger.
- 226) W. Jusko, *J. Pharmakinet. Biopharmaceutics*, 1, 175 - (1973).
- 227) W. Noack, *Acta Neuropathol.*, 22, 42 (1972).
- 228) Tarneberger and A. Mohr, *Arch. Geschwulstforsch*, 42, 307 (1973).
- 229) W. Klein, F. Kocsis, H. Ahmann, *Ber. Oester. Studienges. Atomenerg. SGAE BER No 2229* (1974).
- 230) D. Mueller, W. Wilmanns, K. Wilms and J. Hauber, *Verh. Deut. Ges. Inn. Med.*, 79, 1381 (1973).
- 231) P. Ernest, *Biomedicine*, 18, 484 (1973).
- 232) L. Gazso and D. Afra, *Ideggyogy. Sz.*, 27, 300 (1974).
- 233) R. Maidhot, W. Jallinghaus, B. Schultze and W. Maurer *Ditsch. Med. Wochenschr.*, 100, 54 (1975).
- 234) M. Galton, *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 28, 423 (1966).

- 235) J.G. White, Amer. J. Pathol., 54, 467 (1969).
- 236) J.H. Robertson and G.M. Mc Carthy, Lancet, 2, 353, - (1969).
- 237) J.H. Robertson, E.H. Woodend and E. Crozier, Brit. - J. Haematol., 19, 331 (1970).
- 238) K. Rak, Brit. J. Haematol., 22, 617 (1972).
- 239) J.H. Robertson, E.H. Crozier and B.E. Woodend, Acta Haematol, 47, 356 (1972).
- 240) G. Zbiden, M. Hegele and L. Grimm, Agents Actions, 2, 241 (1972).
- 241) F. Krizsa, Z. Kovacs and E. Dobay, J. Med. (Basel), 4, 12 (1973).
- 242) F. Krizsa, Z. Kovacs and E. Dobay, Kiserl Orvostud., 25, 8 (1973).
- 243) A.G. Chandorkar, Indian J. Physiol. Pharmacol., 17, 105 (1973).
- 244) Rak Kalman, Kiserl. Orvostud., 25, 366 (1973).
- 245) C. Legrand, A. Eberlin and J.P. Caen, Pathol. - Biol. 21 (suppl), 41 (1973).
- 246) P. Kubisz and J. Suranova, Neoplasma, 21, 711 (1974).
- 247) K.G. Bensch and S. Malawista, Nature, 218, 1176 ---- (1968).
- 248) K.G. Bensch, R. Marantz, H. Wisnieuski and M. Shelanski, Science, 165, 495 (1969).
- 249) R. Marantz and M. Shelanski, J. Cell. Biol., 44, 234 (1970).
- 250) A. Krishan and D. Hsu, J. Cell. Biol., 43, 553 (1969).
- 251) A. Krishan and D. Hsu, J. Cell. Biol., 48, 407 (1971).
- 252) F. Neve, C. Willems and J.E. Dumont, Exp. Cell. Res., 63, 457 (1970).

- 253) A. Krishan, Proc. Electron Microsc. Soc. Amer., 27, 358 (1969).
- 254) W. Schlaepfer, J. Ultrastruct. Res., 36, 367 (1971).
- 255) F. Malaisse-Lagae, M.H. Greider, W. Malaisse and P. E. Lacy, J. Cell. Biol., 49, 530 (1971).
- 256) A. Poisner and J. Beinstein, J. Pharmacol. Exp. Ther. 177, 102 (1971).
- 257) W. Malaisse, F. Malaisse-Lage, M. Walker and P. Lacy, Diabetes, 20, 257 (1971).
- 258) J.E. Dumont, C. Willems, J. Van Sande and P. Neve, - Ann. N.Y. Acad. Sci., 185, 291 (1971).
- 259) S. Banerjee and L. Margulis, Cancer Chemother. Rep. Part 1, 55, 531 (1971).
- 260) P. Neve, P. Ketelbant-Balasse, C. Willems and J.E. - Dumont, Exp. Cell. Res., 74, 227 (1972).
- 261) J.M. England, M.E. Kadin and M.N. Goldstein, J. Cell. Sci., 12, 549 (1973).
- 262) L. Orci, Y. Le Marchand, A. Singh, J.F. Assimacopoulos, Ch. Rouiller and B. Jeanrenaud, Nature (London), 244, 30 (1973).
- 263) R. MacLeod, J.E. Lehmyer and C. Bruni, Proc. Soc. - Exp. Biol. Med., 144, 259 (1973).
- 264) G. Devis and W.J. Malaisse, Diabetologia, 10, 53 - (1974).
- 265) R.L. Teplitz, J.C. Gerson, I. Nazie and K.J. Barr, - Exp. Cell. Res., 90, 392 (1975).
- 266) A.C. Aisenberg and B. Wilkes, J. Clin. Invest., 43, 2394 (1964).
- 267) E.M. Hersh, P. Carbone, V.G. Jong and E.J. Freireich, Cancer Res., 25, 997 (1965).

- 268) F. Blacker, K. Fischer and G. Landbek, Deut. Med. -
Wechenschr., 91, 2259 (1966).
- 269) F. Blacker, G. Landbeck and K. Fischer, Monatsschr.
Kinderheilk, 115, 93 (1967).
- 270) O. Kiran and S. Gross, Blood, 32(2) (pt.1), 198 (1969)
- 271) J.L. Amiel, Recent Results Cancer Res., 21, 41 (1969)
- 272) G.L. Floersshime, Clin. Exp. Immunol., 6, 861 (1970).
- 273) L. Borella and R. Webster, Cancer Res., 31, 420 --
(1971).
- 274) J. Papkowski, H. Bogumil and J. Gioldanowski, Acta -
Physiol. Pol., 23, 973 (1972).
- 275) E.T. Waine and G. Sandler, Nature, 212, 90 (1966).
- 276) G.L. Graff, C. Gueuning and J. Hildebrand, C.R. Soc.
Biol., 161, 2645 (1967).
- 277) G.L. Graff, C. R. Soc. Biol., 162, 588 (1968).
- 278) E. Grossi, C.R. Sirtori, J.F. Weiss and R. Paoletti,
Advan. Exp. Med. Biol., 4, 457 (1969). Ed. by Holmes
William L. Plenum Press, New York, N.Y.
- 279) J.T.R. Clarke, G. Karpati, S. Carpenter and L.S. -
Wolfe, J. Neuropathol. Exp. Neurol., 31, 247 (1972).
- 280) R. Yasin, B.P. Hughes and J. Parker, Lab. Invest., -
29, 207 (1973).
- 281) S. Ballas and E. Burka, Blood, 44, 263 (1974).
- 282) T. Kremmer and L. Holczinger, Biochem. Pharmacol., -
23, 3317 (1974).
- 283) O.S. Selawory and J. Hanian, J. Amer. Med. Assoc., -
183, 741 (1963).
- 284) A. Quevauviller and O. Blampin, Pathol. et Biol., -
Semaine hop., 6, 1481 (1958).
- 285) J.A. Burdum, J. Natl. Cancer Inst., 37, 331 (1966).

- 286) M.L. Shelanski and H. Wisnewiski, Trans. Amer. Neurol. Ass., 93, 137 (1968).
- 287) D.L. Cheney, I. Hanin, N. Marseille, M. Trabucchi and E. Costa, Neuropharmacology, 12, 233 (1973).
- 288) W.D. Meriwether, Oncology, 25, 234 (1971).
- 289) L.M. Slater, R.A. Weiner, A.A. Serpick, Cancer (Philadelphia), 23, 122 (1969).
- 290) H.O. Cutting, The American Journal of Medicine, 51, - 269 (1971).
- 291) J. Ochme and C. Escherbach, Deut. Med. Wochschr., 89, 1208 (1964).
- 292) E.M. Hesh, V.G. Wong and E.J. Freireich, Blood, 27, - 38 (1966).
- 293) C.G. Zubrod, Proc. Roy. Soc. Med., 58(11), Pt. 2, 988 (1965).
- 294) E. Frei, Intern. Congr. Chemotherapy Proc. 3rd., --- Stuttgart, 2, 955 (1963).
- 295) G. Cardinali and G. Cardinali, Chemotherapie, 12, 226 (1967).
- 296) A.R. Mackenzie, Cancer (Philadelphia), 19, 1369 (1966)
- 297) Y. Horn and A. Hochmau, Oncology, 21, 214 (1967).
- 298) M.J. Cline and E. Rosenbaum, Cancer Res., 28, 2516 - (1968).
- 299) M. Goudermand, D. Sautiere-Haby and B. Lerche Habat, Lille Med., 13, 1107 (1968).
- 300) G. Mathe, L. Schwarzenberg, M. Hoyat, M. Schneider - and F. Lepeyrague, Rev. Fr. Etud. Clin. Biol., 13, - 951 (1968).
- 301) E. Schulz and K. Heusmann, Verh. Deut. Ges. Med., 74, 638 (1968).

- 302) P.R. Zendzian, T.W. Tusing, E. Homan and D. Rall, -
(Hazleton Lab., Inc., Falls Church, Va.) U.S. Clearing
house Fed. Sci. Tech. Inform., P.B. Rep. 1969, PB -
184254, Avail CFSTI From U.S. Govt. Res. Develop. Rep.
69(15), 57 (1969).
- 303) W.R. Bruce, B.E. Neeker, W.E. Powers and F.A. Valeri
ot, J. Nat. Cancer Inst., 42, 1015 (1969).
- 304) H.E. Skipper, F.M. Schabel, M.W. Trader and W.R. Las
ter, Cancer Chemother. Rep. Part 1, 53, 345 (1969).
- 305) G. Fassetta, I. Gallo and P.A. Formentin, Acta Pediat.
Lat., 22, 245 (1969).
- 306) H.O. Klein, K.J. Lennartz, W. Habicht, M. Eder and R.
Gross, Klin Wochenschr., 48, 1001 (1970).
- 307) B.M. Mount, L. Stevens and W. Whitmore, Cancer (Phi -
ladelphia), 26, 570 (1970).
- 308) J. Burchenal, D. Benvenisti and M. Dollinger, Recent
Results Cancer Res., 33, 102 (1970).
- 309) D. Ulrich and E. Joachim, Internist, 11, 343 (1970).
- 310) W.R. Shapiro, J. Nat. Cancer Inst., 46, 359 (1971).
- 311) R. Bierling, Recent Results Cancer Res., 33, 114 -
(1970).
- 312) M. Hakala, Biochem. Pharmacol., 20, 81 (1971).
- 313) W.W. Sutow, T.J. Vietti, D.J. Frenbach, D.M. Lane -
and M.H. Donaldson, Cancer Chemother. Rep. Part 1, -
55, 67 (1971).
- 314) T. Vietti, K. Starling, J.R. Wilbur, D. Lonsdale and
D. Lane, Cancer (Philadelphia), 27, 602 (1971).
- 315) Li Min and Kuo Hsu, Clin. Obstet. Gynecol., 13, 928
(1970).
- 316) J. Bernard, M. Boiron, Cl. Jacquillat, D. Levy, M.F.

- Gemon and A. Bussel, Colloc. Int. Cent. Nat. Rech. -
Sci., No 197, 281 (1971).
- 317) J.R. Lagnado and C.A. Lyons, Biochem. J., 126, 9p -
(1972).
- 318) H. Gerhartz, Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci., No
197, 303 (1971).
- 319) R.P. Zendzian and W.R. Teeters, U.S. Clearinghouse -
Fed. Sci. Tech. Inform., P.B. Rep., No 200511, 1971.
- 320) R. Bierling, Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci., No
197, 255 (1971).
- 321) L.T. Nashburn, Cancer (Philadelphia), 28, 1321 (1971)
- 322) J. Priestley, J. Urol., 107, 696 (1972).
- 323) D. Ahmann, R. Hahn and H. Bisel, Cancer Res., 32, -
2432 (1972).
- 324) L. Holczinger, Advan. Antimicrob. Antineoplastic -
Chemotherapy., Proc. Int. Congr. Chemother., 7th, 2,
683 (1971). Ed. by Hejzlar, Miroslav Univ. Park Press:
Baltimore Md.
- 325) S. Somfai, L. Nemeth and F. Gal, Advan. Antimicrob.
Antineoplastic Chemother. Proc. Int. Congr. Chemother.
7th, 2, 275 (1971). Ed. by Hejzlar Miroslav. Univ. -
Park Press, Baltimore Md.
- 326) H.O. Klein, K.J. Lennartz, W. Teichmueller and R. -
Gross, Advan. Antimicrob. Antineoplastic. Chemother.
Proc. Int. Congr. Chemother., 7th, 2, 431 (1971). Ed.
by Hejzlar, Miroslav. Univ. Park Press: Baltimore Md.
- 327) G. Balconi, A. Bossi, M.G. Donelli, S. Filipposchi, -
G. Franchi, L. Morasca and S. Grattini, Cancer Chemo-
ther. Rev., Part 1, 57, 115 (1973).
- 328) M. Fyfe and D. Goldman, J. Biol. Chem., 248, 5067 -

(1973).

- 329) R.F. Jager, S.A. Frisby and V. Oliverio, *Cancer Res.*, 33, 1670 (1973).
- 330) M. Omine, G. Sarna and S. Perry, *Eur. J. Cancer*, 9, 557 (1973).
- 331) K. Dano, *Biochim. Biophys. Acta*, 323, 466 (1973).
- 332) I. Goldman and M. Fyfe, *Mol. Pharmacol.*, 10, 275 (1974)
- 333) F. Schabel, H. Skipper, M. Trader, W. Laster and J. Cheeks, *Cancer Chemother. Rep.*, Part 2, 4, 53 (1974).
- 334) G. Schwarze and P.G. Scheurlen, *Int. Arch. Allergy - Appl. Immunol.*, 46, 629 (1974).
- 335) A. Razez, T. Vietti and F. Valeriote, *Cancer Res.*, - 34, 1857 (1974).
- 336) T. Miyashita, *Juzen Igakkai Zasshi*, 82, 361 (1973).
- 337) G.P. Wheeler, *Cold Spring Harbor Conf. Cell. Proliferation*, 1, 995 (1974).
- 338) N. Jaffe, E. Frei, D. Traggis and Y. Bishop, *N. Engl. J. Med.*, 291, 994 (1974).
- 339) L. Hasholt and K. Danoe, *Hereditas*, 77, 303 (1974).
- 340) Chil Soo Known, *Kallulik Taheak Uiakpu Nonmunjip* 27, 187 (1974).