

새로운 계열의 선택적 COX-2 저해제: Luotonin A 동족체 및 그 질소 유도체

김동현 · 량경록 · 오준석 · 장영동* · 김진철 · 홍태균 · 황남경 · 정환기 · 김윤경 · 장현옥*

영남대학교 약학대학

(Received July 16, 2007; Revised August 21, 2007)

A New Class of Selective COX-2 Inhibitor: Luotonin A Homologues and their Aza-analogues

Dong Hyeon Kim, Jing-Liu Liang, Joon Seok Oh, Yurngdong Jahng*, Jin Cheul Kim, Tae Gyun Hong, Nam Kyung Hwang, Hwan-Ki Chung, Yun Kyung Kim and Hyeun Wook Chang*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract — A series of luotonin A homologues and their aza-analogues were prepared and evaluated their inhibitory activities on COX-1 and 2 as well as their selectivities on COX-2. The aza-analogue of dimethylene-bridged homologue of luotonin A, 3,3'-dimethylene-2-(1',8'-naphthyrid-2'-yl)-4(3H)-quinazolinone (**2b**), exhibited strongest inhibitory activity against COX-1 and COX-2 dependent phase of prostaglandin D₂ generation in mouse bone marrow-derived mast cells in a concentration-dependent manner with an IC₅₀ of 39.3 and 1.89 μM, respectively. Selectivity of **2b** on COX-2 over COX-1 was 21 which implied **2b** can be a potential lead for the development of selective COX-2 inhibitor.

Keywords □ luotonin A, COX-2 inhibitor, bone marrow-derived mast cell, prostaglandin D₂, 3,3'-dimethylene-2-(quinolin-2'-yl)-4(3H)-quinazolinone, 3,3'-dimethylene-2-(1',8'-naphthyrid-2'-yl)-4(3H)-quinazolinone

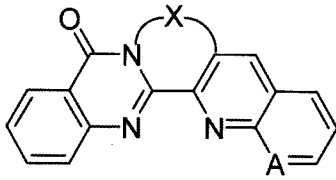
전통적인 비스테로이드계 소염진통제(NSAIDs)는 대부분이 위장장관에 궤양과 출혈을 주 증상으로 하는 심각한 부작용을 동반하는데 이와 같은 부작용은 위장관의 보호에 일정역할을 담당하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 과도한 억제에 기인하는 것으로 밝혀진 바 있다.¹⁾ 따라서 선택적 cyclooxygenase-2(COX-2) 저해작용을 가진 소염진통제의 개발이 시작되어 celecoxib,²⁾ rofecoxib,³⁾ valdecoxib,⁴⁾ etoricoxib,⁵⁾ parecoxib sodium,⁶⁾ 및 cimicoxib⁷⁾ 등이 임상에 쓰여지게 되었다. 그 중 rofecoxib는 심장마비 등의 심각한 부작용으로 발매가 중단되었으나 기타 제제는 현재까지 시장에서 경쟁력을 확보하고 있다.

한편, IL-3 존재하에서 배양한 생쥐 골수유래비만세포(bone marrow-derived mast cells, BMMC)는 IL-10, IL-1β의 혼합조건에서 *c-kit* ligand(KL) 또는 FcεRI 교차에 의하여 활성화되면 COX-2의 발현과 함께 prostaglandin D₂(PGD₂)의 생산, 내재성 사이토카인의 발현 등이 유도되는 것으로 최근 밝혀진 바 있다.⁸⁾ BMMC는 *in vitro*에서 쉽게 배양될 수 있다는 사실과 여러 사이

토카인에 대해 반응성을 가지며, 결합조직형, 점막형 비만세포로의 분화 이전 미 성숙 단계 세포라는 점 등에서 비만세포의 병태생리학적 측면을 연구하는데 좋은 재료가 된다. 뿐만 아니라 BMMC를 이용하여 COX-2에 대한 선택적 저해제를 찾는 연구도 지속적으로 이루어지고 있다.⁹⁾

중국에서는 고대로부터 骆驼蒿[Luo-Tuo-Hao, *Peganum nigellastrum* Bunge(Zygophyllaceae)]를 류마티즘과 같은 염증질환의 치료에 사용하여 왔으나 약리활성에 관한 연구가 주류를 이루고 있다.¹⁰⁾ 骆驼蒿에 대한 지속적인 연구는 알칼로이드인 luotonin A(Fig. 1)의 분리 및 구조결정과 더불어 leukemia P-388 세포에 대하여 강한(IC₅₀=1.8 μg/ml) 억제작용이 있음¹¹⁾을 확인하였으며 그 메커니즘과 관련하여 최근 Cagir 등은 luotonin A가 topoisomerase I-의존성의 세포독성을 유발하는 것으로 보고한 바 있다.¹²⁾ 이와 같은 생물학적 특성과 특이한 구조적 특성은 많은 합성화학적 접근을 유도하였고 상당히 많은 전합성 방법이 확립되어 보고되었으며,¹³⁾ 그 유도체들의 합성과 생물학적 특성에 관한 연구도 수행된 바 있다.¹⁴⁾ 한편 연구자들은 luotonin A의 평면성을 지닌 헤테로고리인 3(4H)-quinazolinone 핵의 N3와 quinoline 핵의 C3를 polymethylene bridge로 연결함으로써 두 방향족고리의 평면각(dihedral angle)을 인위적으로 조절한 일련

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2811, 2821 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) ydjahng@yu.ac.kr, hwchang@yumail.ac.kr



- 1 A = CH, 2 A = N
 a X = -CH₂- (A = CH, luotonin A)
 b X = -(CH₂)₂-
 c X = -(CH₂)₃-

Fig. 1 - Structure of luotonin A and its analogues.

의 luotonin A 동족체를 합성하고 이들의 세포독성 및 형태학적 특성에 대한 연구를 수행한 바 있으며 luotonin A의 질소 동족체인 7-aza-luotonin A(2a)가 SK-OV-3(ovary adenocarcinoma) 및 L1210 (leukemia)에 대하여 강한 세포독성을 확인한 바 있다.¹⁵⁾

骆驼蒿가 류마치즘과 같은 염증질환의 치료에 오랜 기간 사용되어 왔음에도 불구하고 그 주 성분인 luotonin A에 대한 염증관련 연구는 전무한 점에 착안하여 luotonin A 및 그 동족체 그리고 질소 유도체들의 COX 저해활성을 평가하고자 하였다.

실험 방법

시약

Recombinant mouse *c-kit* ligand(KL), IL-10, aspirin는 Sigma Chemical사(St. Louis, MO), IL-1 β , IL-3, WEHI-3 cell는 일본 Showa 대학 Kudo Ichiro 교수로부터, lipopolysaccharide(LPS)는 Difco Laboratories사(Detroit, MI), RPMI-1640 Medium는 GIBCO BRL사(Carlsbad, California, USA), Fetal bovine serum(FBS)는 Hyclone사(Logan, Utah, USA), PGD₂ assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), BCA Protein Assay Reagent는 PIERCE사(Billerica, MA, USA), dimethylsulfoxide(DMSO)는 MERCK사(Damstadt, Germany)에서 구입하여 사용했으며, 이외의 모든 시약은 특급품을 사용하여 하였다. 시료인 화합물 1과 2는 Lee *et al.*¹⁵⁾의 방법으로 합성하여 물리화학적 및 분광학적인 방법으로 구조를 확인하고 HPLC 99.8% 이상의 순도를 지닌 것을 이용하였다.

BMMC의 조제

Male BALB/c mice로부터 채취한 골수세포를 10% FBS, 100 U/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin, 100 μ M MEN Non-essential amino acid solution을 포함한 RPMI 1640 medium에 IL-3(WEHI-3 cell 배양하여 얻어진 상등액)을 최종 50%(v/v) 되도록 넣은 배양액으로 약 4주 배양하여 98% 이상의 homogenous한 BMMC를 얻어서 실험에 사용하였다.

COX-1 및 COX-2 활성의 측정

COX-1에 의한 PGD₂의 생성량은 BMMC를 2 \times 10⁵ cells/well의 농도로 맞춘 후 검체를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2시간 동안 preincubation하였다. 그 다음 세포 자극제로 KL(100 ng/ml), IL-10(100 U/ml), LPS(200 ng/ml)를 2시간 처리한 후 배양 상등액 중의 PGD₂의 생성량을 측정하여 COX-1 활성으로 판정하였다. COX-2에 의한 PGD₂의 생성을 측정하기 위해서는 미리 세포에 존재하는 COX-1을 불활성화시키기 위하여 BMMC를 미리 1 \times 10⁷ cells/ml 농도로 하여 10 μ g/ml의 aspirin으로 2시간 동안 배양하였다. 그 다음 BMMC를 enriched medium으로 3회 세척하였다. 이후 1 \times 10⁶ cells/ml 농도로 하여 100 ng/ml KL, 100 U/ml IL-10, 5 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml LPS 및 검체를 일정농도의 혼합조건에서 37°C CO₂ incubator 내에서 8시간 동안 배양하였다. 반응은 120 \times g, 4°C에서 5분간 원심분리하여 종결시키며, 원심분리 후 상등액을 PGD₂ 생성량의 측정에 이용하였다. PGD₂는 PGD₂ assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정된 후 COX-2 활성으로 환산하였다.

Western blot analysis

96-Well plate에 2 \times 10⁵ cells/200 μ l의 농도로 배양된 세포에 lysis buffer(20 mM Tris, 137 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 10% glycerol, 1% Triton x-100, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄)를 넣고 얼음에서 30분 둔 후(5분마다 vortex 함) 원심분리 하여 상층 액을 취하였다. 2 \times 10⁵ cells/200 μ l의 농도로 얻은 세포의 단백질을 SDS-PAGE로 전기 영동을 하고 20% methanol, 25 mM Tris(pH 7.4), 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose paper로 electro transfer하였다. 단백질이 이동된 membrane은 Ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% skim milk용액으로 30분간 실온에서 blocking하였다. 그리고 TTBS(0.05 M Tris, 0.75 M NaCl, 0.25% Tween 20) 완충액으로 희석한 1차 antibody와 membrane을 12시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 TTBS로 3회 세척했다. 다시 horseradish peroxidase가 부착된 2차 antibody와 2시간 반응시키고 TTBS로 3회 세척했다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 ECL 용액으로 2분간 반응한 후 film에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

합성 화합물의 COX-1 의존의 급성반응 및 COX-2-의존성의 지연 반응에 대한 영향과 더불어 PGD₂ 생합성에 대한 반응을 bone marrow-derived mast cells(BMMC)을 이용하는 Murakami

Table I – Inhibitory activity of luotonin A and its homologues and aza-analogues on COXs

Compound	Inhibitory activity (μM)		Selectivity ^b
	COX-1	COX-2	
1a	64.4%@50	14.4%@50	9
1b	IC ₅₀ ^a =199.4	IC ₅₀ ^a =21.9	
1c	48.5%@50	20.8%@50	
2a	3.5%@50	28.9%@50	21
2b	IC ₅₀ ^a =39.3	IC ₅₀ ^a =1.89	
2c	IC ₅₀ ^a >200	IC ₅₀ ^a =176.7	
NS-398	IC ₅₀ ^a =1.67	IC ₅₀ ^a <0.002	

^aResults were mean values of three separate experiments with duplication.

^bValues are IC₅₀ ratio's of COX-1/COX-2.

등의 방법으로 측정하여,⁸⁾ 그 결과를 Table I에 나타내었다.

특이적인 구조활성관계는 확인할 수 없었지만 몇 가지 중요한 결론을 내릴 수 있었다. Luotonin A 자체는 50 μM 수준에서 COX-1 저해활성(64.4% inhibition)을 나타내었으나 COX-2에 대하여서는 비교적 약한 저해활성을 나타내었다. Luotonin A(**1a**)와 trimethylene-bridged 동족체가 dimethylene homologue(**1b**)에 비하여 COX-1에 대하여 강한 억제효과를 나타내었다. 또한 aza-analogue는 COX-1 보다 COX-2에 대하여 상대적으로 강한 저해활성을 나타내었으며 dimethylene-bridged system에서 가장 강한 COX-2에 대한 저해활성(IC₅₀=1.89 μM)과 보다 나은 선택성을 나타내었다. 따라서 고대로부터 염증관련 증상에 'Luo-Tuo-Hao'을 사용¹⁶⁾한 것은 luotonin A의 COX 저해작용과 이에 기인한 소염진통작용에 근거한 것으로 추정된다.

본 실험에 사용된 화합물들의 PGD₂ 생성저해활성은 COX-2

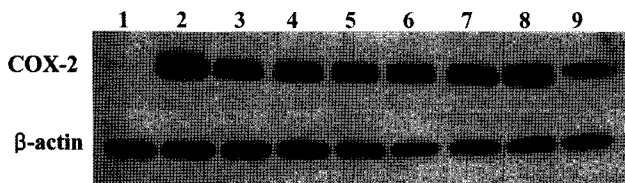


Fig. 2 – Effect of **2b** on COX-2 protein expression. BMMC were preincubated for 30 min with the indicated concentration of **2b** and then stimulated with KL (100 ng/ml), IL-10 (100 U/ml) and LPS (100 ng/ml) at 37°C for 8 h in the presence or absence of **2b**. Samples were processed by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. The immunoblot was then probed with anti-COX-2 at a dilution 1 : 3,000. Luteoline-7-glucoside (L7G) was used as positive control. The test solution of this compound was prepared by dissolving in dimethyl sulfoxide (DMSO) and final concentrations of DMSO were adjusted to 0.1% (v/v) in culture media. The procedure is described in **MATERIALS AND METHODS** in detail. Lane 1: Cell only; Lane 2: Control (-DMSO); Lane 3: Control (+0.1% DMSO); Lane 4: with **2b** (1.3 μM); Lane 5: **2b** (2.5 μM); Lane 6: **2b** (6.3 μM); Lane 7: **2b** (12.5 μM); Lane 8: **2b** (25.0 μM); Lane 9: L7G (10 μM).

효소에 대한 직접적인 저해활성과 더불어 COX-2 단백질 발현을 억제하여 생성량이 저해될 수 있기 때문에 가장 강한 저해활성을 나타낸 화합물인 **2b**에 대하여 COX-2 단백질 발현에 대한 영향을 검토하였다(Fig. 2). 그 결과 화합물 **2b**에 대하여 COX-2 단백질 발현에는 영향이 없었기 때문에, PGD₂ 생성억제는 COX-2의 효소에 직접적 저해활성에 의함이 예상된다.

결론적으로 일련의 3,2'-polymethylene-2-(2'-quinoly)-4(3H)-quinazolinone과 그 질소 등가체를 luotonin A의 동족체로 합성하고 이들에 대한 COX-1과 COX-2에 대한 저해활성과 COX-2에 대한 선택성을 평가하였다. 화합물중에서 3,3'-dimethylene-2-(1',8'-naphthyrid-2'-yl)-4(3H)-quinazolinone(**2b**)가 COX-2에 대하여 가장 강한 활성(IC₅₀=1.89 μM)과 COX-1 대비 선택성은 21로 나타내었으며 그 등가체인 3,3'-dimethylene-2-(quinol-2'-yl)-4(3H)-quinazolinone(**1b**)는 IC₅₀=21.9 μM(selectivity 9.1)로 나타나 새로운 lead로서의 가능성을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소 지원(KRF-2006-005-J01101)에 의하여 수행되었으며, 김동현, 오준석, 홍태균, 황남경, 정환기, 김윤경은 BK21 장학금 수혜자로 이에 감사를 표합니다.

참고문헌

- 1) (a) Futaki, N., Takahashi, S., Yokoyama, M., Arai, I., Higuchi, S. and Otomo, S. : NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins* **47**, 55 (1994). (b) Xie, W., Robertson, R. L. and Simmons, D. L. : Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: A new target for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug. Develop. Res.* **25**, 249 (1992).
- 2) Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., Anderson, G. D., Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Zhang, Y. Y. and Isakson, P. C. : Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J. Med. Chem.* **40**, 1347 (1997).
- 3) Prasit, P., Wang, Z., Brideau, C., Chan, C. C., Charlson, S., Cromlish, W., Ether, D., Evans, J. F., Ford-Hutchinson, A. W., Gauthier, J. W., Gordon, R., Guay, J., Gresser, M., Kargman, S., Kennedy, B., LeBlanc, Y., Leger, S., Mancini, J. O., Neil, G. P.

- Ouellet, M., Percival, M. D., Perrier, H., Riendeau, D., Rodger, I., Tagari, P., Therien, M., Vickers, P., Wong, E., Xu, L. J., Young, R. N., Zamboni, R., Boyce, S., Rupniak, N., Forrest, M., Visco, D. and Patrick, D. : The discovery of rofecoxib, [MK 966, VIOXX[®], 4-(4-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1773 (1999).
- 4) Talley, J. J., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Koboldt, C. M., Masferrer, J. L., Perkins, W. E., Rodgers, R. S., Shaffer, A. F., Zhang, Y. Y., Zweifel, B. S. and Seibert, K. : 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide, Valdecoxib: A potent and selective inhibitor of COX-2. *J. Med. Chem.* **43**, 775 (2000).
- 5) Friesen, R. W., Brideau, C., Chan, C. C., Charleson, S., Deschenes, D., Dube, D., Ethier, D., Fortin, R., Gauthier, J. Y., Girard, Y., Gordon, R., Greig, G. M., Riendeau, D., Savoie, C., Wang, Z., Wong, E., Visco, D., Xu, L. J. and Young, R. N. : 2-Pyridinyl-3-(4-methylsulfonyl)phenylpyridines: Selective and orally active cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2777 (1998).
- 6) Talley, J. J., Bertershaw, S. R., Brown, D. L., Carter, J. S., Graneto, M. J., Kellogg, M. S., Koboldt, C. M., Yuan, J., Zhang, Y. Y. and Seibert, K. : *N*-[[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J. Med. Chem.* **43**, 1661 (2000).
- 7) Almansa, C., Alfon, J., de Arriba, A. F., Cavalcanti, F., Escamilla, I., Gómez, L., Miralles, A., Bartroli, J., Carceller, E., Merlos, M. and García-Rafanell, J. : Synthesis and structure-activity relationship of a new series of COX-2 selective inhibitors: 1,5-diarylimidazoles. *J. Med. Chem.* **46**, 3463 (2003).
- 8) (a) Murakami, M., Bingham, C. O., Matsumoto, R., Austen, K. F. and Arm, J. P. : IgE-dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast cells induces a delayed phase of prostaglandin D₂ generation via prostaglandin endoperoxidase synthase-2. *J. Immunol.* **155**, 4445 (1995). (b) Murakami, M., Matsumoto, R., Urade, Y., Austen, K. F. and Arm, J. P. : c-Kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A₂, prostaglandin endoperoxidase synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D₂ synthesis and increased IgE-dependent prostaglandin D₂ generation in immature mouse mast cells. *J. Biological Chem.* **270**, 3239 (1995).
- 9) Xiao, P.-G. : A Pictorial Encyclopedia of Chinese Medical Herbs (Japanese Edition). Vol. III, Chuokoron-sha, Inc., Tokyo, p. 125 (1992).
- 10) (a) Murakami, M., Matsumoto, R., Austen, K. F. and Arm, J. P. : Prostaglandin endoperoxidase synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D₂ in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 22269 (1994). (b) Moon, T. C., Murakami, M., Kudo, I., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. : A new class of COX-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evodia Rutaecarpa*. *Inflam. Res.* **48**, 621 (1999).
- 11) Ma, Z.-Z., Hano, Y., Nomura, T. and Chen, Y.-J. : Two new pyrroloquinazolinoquinoline alkaloids Peganum nigellastrum. *Heterocycles* **46**, 541 (1997).
- 12) Cagir, A., Jones, S. H., Gao, R., Eisenhauer, B. M. and Hecht, S. M. : Luotonin A. A naturally occurring human DNA topoisomerase I poison. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13628 (2003).
- 13) (a) Servais, A., Azzouz, M., Lopes, D., Courillon, C. and Malacria, M. : Radical cyclization of *N*-acylcyanamides: Total synthesis of luotonin A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 576 (2006). (b) Tangirala, R., Anthony, S., Agama, K., Pommier, Y. and Curran, D. P. : Total synthesis of luotonin and a small library of AB-ring substituted analogs by cascade radical annulation of isonitriles. *Synlett* 2843 (2005). (c) Bowman, W. R., Cloonan, M. O., Fletcher, A. J. and Stein, T. : Synthesis of heteroarenes using cascade radical cyclisation *via* iminyl radicals. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1460 (2005). (d) Twin, H. and Batey, R. A. : Intramolecular hetero Diels-Alder (Povarov) approach to the synthesis of the alkaloids luotonin A and camptothecin. *Org. Lett.* **6**, 4913 (2004). (e) Chavan, S. P. and Sivappa, R. : A short and efficient general synthesis of luotonin A, B and E. *Tetrahedron* **60**, 9931 (2004). (f) Harayama, T., Hori, A., Serban, G., Morikami, Y., Matsumoto, T., Abe, H. and Takeuchi, Y. : Concise synthesis of quinazoline alkaloids, luotonin A and B, and rutaecarpine. *Tetrahedron* **60**, 10645 (2004). (g) Mhaske, S. B. and Argade, N. P. : Regioselective quinazolinone-directed ortho lithiation of quinzolinoylquinoline: Practical synthesis of naturally occurring human DNA topoisomerase poison luotonin A and luotonins B and E. *J. Org. Chem.* **69**, 4563 (2004). (h) Lee, E. S., Park, J. G. and Jahng, Y. : A facile synthesis of simple alkaloids - synthesis of 2,3-polymethylene-4(3*H*)-quinazolinones and related alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **44**, 1883 (2003). (i) Harayama, T., Morikami, Y., Shigeta, Y., Abe, H. and Takeuchi, Y. : A concise synthesis of luotonin A and B. *Synlett* 847 (2003). (j) Osborne, D. and Stevenson, P. J. : A concise formal synthesis of luotonin A. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5469 (2002). (k) Yadav, J. S. and Reddy, B. V. S. : Microwave-assisted rapid synthesis of the cytotoxic alkaloid luotonin A. *Tetrahedron Lett.* **43**, 1905 (2002). (l) Dallavalle, S. and Merlini, L. : A new synthesis of the cytotoxic alkaloid Luotonine A. *Tetrahedron Lett.* **43**, 1835 (2002). (m) Toyota, M., Komori, C. and Ihara, M. : Three-step total synthesis of pyrroloquinazolinoquinoline alkaloid, luotonin A, by intramolecular hetero Diels-Alder reaction. *Heterocycles* **56**, 101 (2002). (n) Molina, P., Tarraga, A. and Gonzalez-Tejero, A. : A convenient divergent approach to the alkaloids isaindigotone

- and luotonin A. *Synthesis* **11**, 1523 (2000). (p) Ma, Z.-Z., Hano, Y., Nomura, T. and Chen, Y.-J. : Synthesis of cytotoxic pyrroloquinazoline alkaloid luotonin A. *Heterocycles* **51**, 1593 (1999). (p) Kelly, T. R., Chamberland, S. and Silva, R. A. : Total synthesis of luotonin A. *Tetrahedron Lett.* **40**, 2723 (1999). (q) Wang, H. and Ganesan, A. : Total synthesis of the cytotoxic alkaloid luotonin A. *Tetrahedron Lett.* **39**, 9097 (1998). (r) Curran, D. P. : Tangirala, R. S. 228th National Meeting of Am. Chem. Soc. (August 22-26, Philadelphia, PA) 2004, Abs. ORG 398.
- 14) (a) Ma, Z.-Z., Hano, Y. and Nomura, T. : Luotonin A: A lead toward anti-cancer agent development. *Heterocycles* **65**, 2203 (2005). (b) Cagir, A., Jones, S. H., Eisenhauser, B. M., Gao, R. and Hecht, S. M. : Synthesis and biochemical properties of E-ring modified luotonin A derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 2051 (2004). (c) Cagir, A., Eisenhauser, B. M., Gao, R., Thomas, S. J. and Hecht, S. M. : Synthesis and topoisomerase I inhibitory properties of luotonin A analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 6287 (2004). (d) Dallavalle, S., Merlini, L., Beretta, G. L., Tinelli, S. and Zunino, F. : Synthesis and cytotoxic activity of substituted Luotonin A derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5757 (2004). (e) Ma, Z., Hano, Y., Nomura, T. and Chen, Y. : Novel quinazolin-quinoline alkaloids with cytotoxic and DNA topoisomerase II inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1193 (2004). (f) Cheng, K., Rahier, N., Eisenhauser, B. M., Gao, R., Thomas, S. J. and Hecht, S. M. : 14-Azacamptothecin: A potent water-soluble topoisomerase I poison. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 838 (2003).
- 15) Lee, E. S., Park, J. G., Kim, S. I. and Jahng, Y. : Synthesis and properties of luotonin A homologues and their aza-analogues. *Heterocycles* **68**, 151 (2006).
- 16) Xiao, P.-G., Qou, G.-L., Wang, H.-L., Lui, L.-S., Zheng, Y.-L., Jia, Z.-J. and Deng, Z.-B. : Effect of alkaloids from *Peganum nigellastum* on mouse ascetic hepatoma and isolated cells. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.* **2**, 232 (1988).