

3 Pharmakologischer Teil

3.1 Allgemeine Angaben

Zur pharmakologischen Charakterisierung der zuvor beschriebenen Histamin-H₃-Rezeptorantagonisten wurden verschiedene Testmodelle verwendet.

Die Bestimmung der *In-vitro*-Aktivität erfolgte in unterschiedlichen Testmodellen. In einer Bindungsstudie am humanen H₃-Rezeptor wurde die Affinität der Substanzen getestet. Zum einen wurde die Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom in CHO-K1-Zellen exprimierten menschlichen H₃-Rezeptor, zum anderen von [³H]-N^α-Methylhistamin vom in C6-Rattengliazellen exprimierten Rezeptor ermittelt.^{82,211} In einem funktionellen Testmodell wurde die Inhibierung der Hemmung der elektrisch-induzierten Kontraktion des Längsmuskels durch (*R*)- α -Methylhistamin am Meerschweinchen-Ileum gemessen, aus der die H₃-Rezeptoraktivität abgeleitet werden kann.^{212,213} Der Histamin-H₃-Rezeptor ist bei diesem Modell auf cholinergen Neuronen lokalisiert. Daher mußte zusätzlich die muskarinerge M₃-Rezeptoraktivität bestimmt werden, um eine nicht histaminerge H₃-Rezeptorwirkung ausschließen zu können.²¹⁴ Schließlich wurde für einige Verbindungen deren antagonistische Aktivität in einem [³H]-Histaminfreisetzungstest an Synaptosomen des zerebralen Rattencortex bestimmt.^{10,88} Dies trifft überwiegend für die Verbindungen zu, die zu Beginn dieser Arbeit hergestellt wurden, als noch kein humanes Testmodell zur Verfügung stand. Nach Etablierung dieses Testsystems wurde auf eine weitere Testung an der Ratte verzichtet.

Zusätzlich wurden für ausgewählte Substanzen die Selektivitäten an histaminergen H₁- und H₂-Rezeptoren in funktionellen Testmodellen am Meerschweinchen-Ileum (H₁) oder am rechten Vorhof des Meerschweinchen-Atriums (H₂) bestimmt.²¹⁴

Bei einigen Verbindungen wurde außerdem deren Inhibition der Histamin-N^ε-Methyltransferase, getestet an isolierter HMT aus der Niere der Ratte, bestimmt. Bei der Bestimmung der HMT-Inhibition wurde durch Messung der Konzentration von freigesetztem N^ε-Methylhistamin die molare Konzentration ermittelt, die eine halbmaximale Inhibition bewirkt (IC₅₀-Wert).²⁰²

In-vivo wurde die Aktivität der Verbindungen nach *peroraler* Applikation an Swiss Mäusen bestimmt. Dazu wurde *post mortem* die Konzentration an N^ε-Methylhistamin im ZNS ermittelt und daraus die Dosis, die einen halbmaximalen Effekt (ED₅₀) bewirkt, berechnet.^{88,215}

Eine Übersicht über die verwendeten Testmodelle mit Angabe der pharmakologischen Kenngrößen ist in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-2 enthält eine Aufzählung der verwendeten Abkürzungen und Symbole.

Tab. 3-1 Übersicht über die verwendeten pharmakologischen Testmodelle.

Rezeptor/ Enzym	Spezies	Organ	Gemessener Effekt	Kenngröße
<i>in-vitro</i>				
Histamin				
H ₁	Meerschweinchen	Ileum	Kontraktion	pA ₂ , pD' ₂
H ₂	Meerschweinchen	Rechter Vorhof	Herzfrequenz	pA ₂ , pD' ₂
H ₃	Ratte	Synaptosomen des zerebralen Kortex	[³ H]-Histamin- freisetzung	rK _i
H ₃	Meerschweinchen	Ileum	Relaxation	pA ₂
H ₃	klonierte humane Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen		Verdrängung von [¹²⁵ I]-Iodoproxyfan	hK _i
H ₃	klonierte humane Rezeptoren, exprimiert in C6-Gliazellen		Verdrängung von [³ H]-N ^α - Methylhistamin	h'K _i
HMT	Ratte	Niere	N ^ε -Methylhistamin- bildung	IC ₅₀
Muskarin				
M ₃	Meerschweinchen	Ileum	Kontraktion	pA ₂
<i>in-vivo</i>				
Histamin				
H ₃	Maus	Gehirn	N ^ε -Methylhistamin- bildung	ED ₅₀

Tab. 3-2 Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole.

Abkürzung	Bedeutung
i.a.	Quotient aus dem Maximaleffekt einer Substanz und dem Maximaleffekt der Standardtestsubstanz (intrinsische Aktivität).
EC ₅₀	Molare Konzentration eines Agonisten, die den halbmaximalen Effekt bewirkt, angegeben als EC ₅₀ ± S.E.M. (S.E.M. = Standardfehler des Mittelwertes), berechnet nach <i>Parker</i> und <i>Waud</i> . ^{216,217}
ED ₅₀	<i>In-vivo</i> -Dosis, die den halbmaximalen Effekt bewirkt, angegeben als ED ₅₀ ± S.E.M. ^{216,217}
gp	Meerschweinchen (guinea-pig)
IC ₅₀	Molare Konzentration, die eine halbmaximale Inhibierung bewirkt, angegeben als IC ₅₀ ± S.E.M. ²⁰²
K _i	Scheinbare Dissoziationskonstante des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes, angegeben als K _i ± S.E.M. (berechnet nach <i>Cheng</i> und <i>Prusoff</i>). ²¹⁸
-	Nicht bestimmt
n.d.	Nicht definierbar
pA ₂	Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration eines kompetitiven Antagonisten, bei der die doppelte molare Agonistenkonzentration benötigt wird, um denselben Effekt zu erzielen (berechnet nach <i>van Rossum</i>). ²¹⁹
pD' ₂	Negativ dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration eines nicht-kompetitiven Antagonisten, der nur noch 50 % des maximal erreichbaren Effektes des Agonisten bewirkt. ²¹⁹

3.2 *N*-Benzylpiperidine

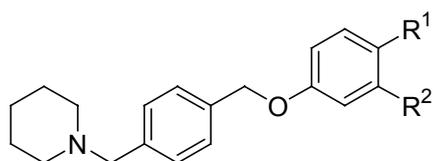
In der Vergangenheit wurden in unserem Arbeitskreis 3-(1*H*-Imidazol-4-yl)propyl-arylether synthetisiert, die als Proxifan-Klasse Eingang in die Literatur gefunden haben und von denen Ciproxifan²²⁰ und Imoproxifan⁹⁸ als potente Histamin-H₃-Rezeptorantagonisten größere Bedeutung erlangt haben (Kap.1.7.5). Eine Weiterentwicklung dieser Klasse stellt der Austausch des Imidazolrings durch aliphatische oder alicyclische Amine durch *Ganellin* et al. dar.¹⁰⁶ Mit Piperidin-analogen Proxifanen wurden in Testmodellen von Ratte und Maus sehr gute Resultate erzielt. Zusätzlich wurde in unserem Arbeitskreis auch in anderen Klassen von Histamin-H₃-Rezeptorantagonisten der Ersatz des Imidazolrings mit wechselndem Erfolg untersucht.¹⁰⁷ Die hier beschriebenen Substanzen stellen eine Erweiterung dieser Arbeiten dar, indem sie auf eine weitere Klasse von H₃-Rezeptorliganden Bezug nehmen, die von Schering-Plough entwickelt wurde.¹¹⁵ In einem ersten Ansatz wurde der Imidazolring durch einen Piperidinring ersetzt. Der für diesen Verbindungstypus charakteristische *p*-Xylen- α,α' -diyl-Spacer wurde beibehalten und mit der typischen Aryloxy-Partialstruktur der Proxifane verbunden. Es sollte gezeigt werden, ob durch das Einfügen eines Phenylrings in den Propylspacer und durch Verwendung eines Piperidinrings, was eine höhere Lipophilie aber auch gleichzeitig eine höhere Rigidität der Substanzen bewirkt, die pharmakologische Aktivität entscheidend beeinflusst werden kann.

3.2.1 Halogensubstituierte Ether

Zunächst sollen die unsubstituierte Grundstruktur sowie Verbindungen beschrieben werden, die in *para*-Position halogeniert sind (Tab. 3-3). Exemplarisch wurden bei der *para*-Chlorverbindung verschiedene zusätzliche Substituenten in *meta*-Position eingefügt. Die Ausgangsverbindung **32** zeigte bereits moderate Affinität zum humanen H₃-Rezeptor. Wie schon bei den Klassen der Proxifane und Proxyfane konnten durch die Einführung von verschiedenen Substituenten vornehmlich in *para*-Position des Phenylrings erhebliche Aktivitätssteigerungen erzielt werden. Die Einführung von Halogenen (**33-34**, **38 - 39**) als elektronenziehende Substituenten an dieser Stelle erhöhte die Rezeptorbindung ungefähr um das Doppelte. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Halogenverbindungen nur geringfügig voneinander. Unterschiede in Elektronegativität oder Atomradius scheinen von untergeordneter Bedeutung zu sein. Am Beispiel der *para*-Chlorverbindung **34** sollte der Einfluß eines zusätzlichen Substituenten in *meta*-Position untersucht werden. Ein zusätzliches

Chloratom (**36**) erniedrigte die Affinität, während Fluorierung (**35**) die *In-vitro*-Aktivität erhöhte. Als besonders vorteilhaft erweist sich eine Methylierung (**37**), die zur besten Verbindung in dieser Reihe führte. Im *In-vivo*-Testmodell zeigten die Ausgangsverbindung **32** und alle *para*-halogenierten Verbindungen nach peroraler Verabreichung keinen oder nur minimalen Einfluß auf die intrazerebrale *N*^c-Methylhistaminkonzentration,

Tab. 3-3 Halogensubstituierte Verbindungen.



Nr.	R ¹	R ²	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
32	H	H	227	6.70±0.16	≈30	5.94±0.13
33	F	H	123	-	≈15	-
34	Cl	H	124	6.57±0.12	>10	6.22±0.15
35	Cl	F	95	-	>10	-
36	Cl	Cl	167	-	>10	-
37	Cl	CH ₃	42	<6.7	>10	6.73±0.18
38	Br	H	114	-	>10	-
39	I	H	107	-	>10	-
40	CF ₃	H	125	-	>10	-

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

was sich zwar mit den Ergebnissen der Proxifane deckt, aber im Vergleich zu den Proxifanen enttäuschend ist. Auch die mit einer zu Chlor bioisosteren Trifluormethylgruppe substituierte Verbindung **40** zeigt mit **34** identische Werte. Die unsubstituierte Verbindung **32** zeigt im H₃-Meerschweinchen-Testmodell moderate Aktivität. Erwähnenswert ist auch die relativ hohe Muskarin-M₃-antagonistische Aktivität dieser Verbindungen, die zusätzlich bestimmt wird, da die H₃-Ergebnisse dadurch verfälscht werden können. Mit der Einführung eines

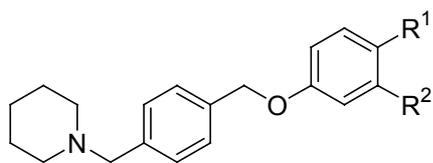
Chlorsubstituenten wird die H₃-Aktivität leicht erniedrigt, während die M₃-Aktivität weiter ansteigt.

3.2.2 Alkyl- bzw. alkylarylsubstituierte Ether

Der Vergleich der monomethylierten mit den dimethylierten Substanzen **41** - **43** zeigt einen positiven Effekt auf die Bindungsstärke an den humanen H₃-Rezeptor, sobald sich die Methylgruppe *para*-ständig befindet (**41**). Eine Tendenz zu sinkender Affinität ist in der Reihe der *para*-alkylierten Verbindungen zu beobachten (**41**, **44** - **45** und **50**). Eine zunehmende Kettenlänge scheint sich negativ auszuwirken. Die Einführung einer zusätzlichen *meta*-Methylgruppe (**42**) hat einen geringen Einfluß auf die Affinität. Im Gegensatz dazu bewirkt der Ringschluß der Propylgruppe (**45**) zu einem 5-Indanolderivat (**46**) oder der Butylgruppe (**48**) zu einem 1,2,3,4-Tetrahydronaphth-6-olderivat (**49**) eine deutliche Affinitätssteigerung bis zu Werten, die in der Größenordnung des dihalogenierten Produkts **35** liegen. Eine wesentlich ausgeprägtere Erhöhung der Affinität ist beim Übergang der Pentyl- (**50**) zu einer Cyclopentylgruppe (**51**) zu finden. Die Affinität bleibt aber insgesamt schlechter als **41**. Während die Einführung einer Pentylgruppe einen massiven Abfall der Aktivität bewirkt, läßt sich die Aktivität durch den Ringschluß auf das Niveau der wesentlich kleineren Propyl- und Isopropylverbindungen **45**, **47** und sogar der unsubstituierten Ausgangsverbindung **32** anheben. Der Einfluß von elektronenziehenden kurzkettigen Alkylsubstituenten scheint somit von geringem Ausmaß zu sein.

Die Einführung von Phenylalkylsubstituenten brachte keinen entscheidenden Vorteil. Durch den Zusatz eines planaren aromatischen Ringsystems bleiben die Werte im Bereich der Alkylsubstitution. Auch hier sinkt die Aktivität mit steigender Kettenlänge (**52** - **53**). Interessant ist, daß eine Rigidisierung der Phenylethylgruppe durch Einführung einer Doppelbindung eine leichte Aktivitätssteigerung bewirkt (**54**).

Bei den *In-vivo*-Ergebnissen zeigen die aromatisch-substituierten Verbindungen ebenfalls schwache (**53**) oder keine Aktivität (**52** und **54**). Anders verhält es sich bei den *para*-Alkylderivaten **41** - **42** und **44** - **51**. Sie zeigen relativ hohe antagonistische Potenz mit Werten unter 5 mg/kg. Obwohl eine direkte Korrelation von Kettenlänge und *In-vivo*-Potenz nicht erkennbar ist, zeigten Methyl- oder Ethylsubstituenten bessere Ergebnisse als längere Ketten. Überraschend zeigen sowohl die Pentylverbindung **50** als auch sein Cyclopentyl-Analogon **51** übereinstimmende *In-vivo*-Werte bei stark differierenden *In-vitro*-Werten. Das Verschieben der Methylgruppe von *para*- nach *meta*-Position (**43**) bewirkt einen starken Aktivitätsabfall, der weniger ausgeprägt auch bei der 3,4-dimethylierten Verbindung **42** zu

Tab. 3-4 Alkyl- und arylalkylsubstituierte Verbindungen.

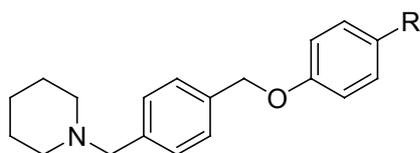
Nr.	R ¹	R ²	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
41	CH ₃	H	126	<6.52	1.8±0.4	6.26±0.13
42	CH ₃	CH ₃	149	<6.7	4.8±0.8	6.50±0.14
43	H	CH ₃	334	6.39 ^d	≈20	5.97±0.15
44	C ₂ H ₅	H	163	-	2.2±0.5	-
45	C ₃ H ₇	H	257	<6.3	4.3±0.9	6.13±0.09
46	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		87	<6.9	1.9±0.4	6.63±0.11
47	CH(CH ₃) ₂	H	253	-	3.0±1.0	-
48	C ₄ H ₉	H	169	-	2.8±1.8	-
49	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		92	-	3.5±1.5	-
50	C ₅ H ₁₁	H	1130	-	3.0±1.1	-
51		H	201	-	3.1±0.6	-
52		H	238	<5.8	>10	5.58±0.11
53		H	890	<6.3	≈30	6.04±0.15
54		H	761	-	>10	-

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse; ^d Mittelwert aus 2 Messungen.

finden ist. Sobald beide Methylgruppen über eine Methylengruppe zu einem Indanylring (**46**) verbunden werden, erhöht sich die *In-vivo*-Wirksamkeit wieder auf das Niveau der *para*-Methylverbindung **41**. Eine Ausdehnung des Bicyklus zu einem 1,2,3,4-Tetrahydronaphthylring (**49**) scheint sich tendentiell leicht negativ auszuwirken, jedoch sind die Werte nicht signifikant unterschiedlich. Die starken Schwankungen in den Ergebnissen hier, aber auch bei den Substanzen mit längeren Alkylketten **48** und **50** deuten auf einen zunehmenden Einfluß der sterischen Eigenschaften des Substituenten auf die Bindungsfähigkeit zu der lipophilen Bindungstasche des Rezeptors hin, können aber auch durch unterschiedliche Metabolisierungseffekte bedingt sein. Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich somit nicht auf Parameter, wie z.B. Lipophilie, Rezeptor-Ligand-Interaktionen oder metabolisches Verhalten beschränken, sondern lassen sich nur über ein komplexes Gebilde verschiedener Parameter bestimmen. Am Meerschweinchen-Ileum konnte die H₃-Aktivität bei keiner der getesteten Verbindungen mit Ausnahme von **43** (Tab. 3-4) eindeutig bestimmt werden. Die antagonistische Wirkung am M₃-Rezeptor ist in dieser Reihe zu hoch, um zu exakten H₃-Ergebnissen zu kommen. Tendentiell scheint ein zusätzlicher Phenylring (**52** - **53**) die M₃-Aktivität abzuschwächen. Gleichzeitig nimmt aber auch die H₃-Aktivität ab.

3.2.3 Alkoxy- und arylalkoxysubstituierte Ether

Bei den *para*-Hydrochinonderivaten **55** - **58** zeigt sich ein neues Bild (Tab. 3-5). Einerseits fördert die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung durch den zusätzlichen Sauerstoff im Substituenten die Affinität zum Rezeptor im Vergleich zu den Alkyl- bzw. Phenylalkylgruppen. Andererseits nehmen im Gegensatz zu den alkylierten Verbindungen die Rezeptoraffinität und die schwache *In-vivo*-Aktivität bei Kettenverlängerung von Methyl (**55**) zu Propyl (**56**) zu. Die *In-vitro*-Ergebnisse sind bei Phenoxy- (**57**) und Benzoxysubstitution (**58**) beinahe identisch. Analog zu den aromatisch substituierten Verbindungen (**52** und **53**) zeigen **57** und **58** einen Verlust von *In-vivo*-Aktivität. Interessant ist, daß die Phenoxyverbindung **57** eine eindeutige H₃-Rezeptoraktivität im Meerschweinchen-Ileum zeigt und damit auch der M₃-Antagonismus leicht zurückgedrängt zu sein scheint.

Tab. 3-5 Alkoxy- und arylalkoxysubstituierte Verbindungen.

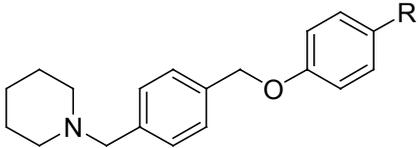
Nr.	R	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
		hK_i [nM] ^a	gpH_3 pA_2 ^b	ED_{50} [mg/kg] ^c	gpM_3 pA_2 ^b
55	OCH ₃	119	-	≈20	-
56	OC ₃ H ₇	88	6.48±0.09	≈10	6.26±0.12
57		530	6.30±0.17	>10	5.82±0.17
58		550	-	>30	-

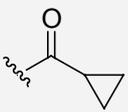
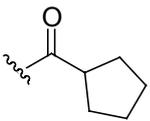
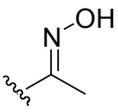
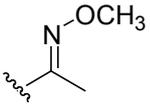
^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

3.2.4 Carbonyl- bzw. oximsubstituierte Ether

Interessant ist die nahezu identische Affinität der acetylierten Verbindung **6** mit der Leitstruktur Acetoproxyfan. Leider wird die gute *In-vivo*-Wirksamkeit von Acetoproxyfan nicht erreicht. Die deutliche *In-vitro*-Aktivitätssteigerung beim Wechsel von einer Acetyl- zu einer Cyclopropylcarbonylgruppe, wie es die Beispiele **23** und Ciproxyfan verdeutlichen, fällt bei der Testung gegen [¹²⁵I]-Iodoproxyfan geringer aus als bei den Proxyfanen. Bezüglich der *In-vivo*-Potenz zeigt sich dabei im Vergleich zu ihren Vorläufern sogar eine wesentliche Verschlechterung. Eine Ringvergrößerung (**63**) wiederum führt zu einem starken *In-vitro*-Aktivitätsverlust, jedoch *in-vivo* zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg. Im Gegensatz zu den vergleichbaren Werten der acetylsubstituierten Verbindung **6** zeigen die *N*-Benzylpiperidine in einem funktionellen Testmodell an Rattensynaptosomen im Vergleich zu Aceto- oder Ciproxyfan eine fast 100fach niedrigere Potenz. Gleichzeitig nimmt von der Acetyl- zur Cyclopropylcarbonylgruppe die Potenz um den Faktor 3 ab, während dies bei den Proxyfanen eine leichte Erhöhung bewirkte. Ferner zeigen **6** und **23** hohe antagonistische Aktivität am Meerschweinchen-H₃-Rezeptor (Tab. 3-6).

Tab. 3-6 Carbonyl- und oximsubstituierte Verbindungen.



Nr.	R	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vitro</i> rK _i [nM] ^c	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^d	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
6		84±11 23 ^e	7.21±0.09	109±19	3.9±1.9	-
23		66±8 6 ^e	7.07±0.15	329±84	5.9±1.2	5.63±0.12
63		157	-	-	2.8±0.9	-
18		55	7.08±0.14	-	≈5	5.65±0.14
19		129	6.61±0.15	-	6.4±0.6	6.31±0.06
Acetoproxifan²²¹		87	7.8	0.8	0.24	4.3
Ciproxifan²²⁰		46	8.4	0.5	0.14	5.5
Imoproxifan⁹⁸		-	8.6	0.26	0.034	5.2

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c Rattensynaptosomen; ^d perorale Applikation an Mäuse; ^e Verdrängung von [³H]-N^α-Methylhistamin vom humanen H₃-Rezeptor (h'K_i).

Verbindung **6** wurde zudem auf ihre Histamin-N^α-Methyltransferase hemmende Wirkung hin untersucht, um einen daraus resultierenden möglichen Nebeneffekt im *In-vivo*-Testmodell ausschließen zu können. Das Ergebnis (IC₅₀ = 10.4±1.3 μM) bestätigte, daß die Struktur nur

untergeordnete Affinität zum Enzymprotein besitzt und damit keine Beeinflussung der Ergebnisse zu befürchten ist.

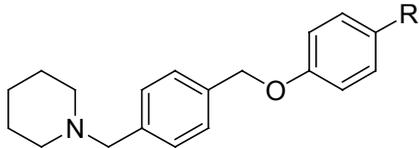
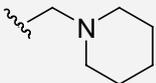
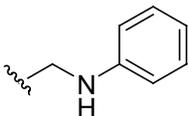
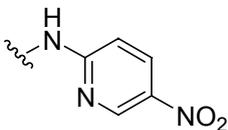
Die Weiterentwicklung des Acetoproxifans zum Imoproxifan durch Derivatisierung der Acetyl-Funktion zum *N*-Hydroxyimin zeichnete sich durch eine starke Zunahme der *In-vivo*-Potenz im Vergleich zu **6** aus. Diese strukturelle Veränderung brachte bei dem hier beschriebenen Liganden (**18**) *in-vivo* keinen Vorteil, jedoch konnte damit die Affinität zum humanen H₃-Rezeptor weiter verbessert werden. Das Methoximderivat **19** zeigte bei fast gleich bleibender oraler Wirkung einen starken Abfall der *In-vitro*-Aktivität. Beim Meerschweinchen sind die Werte für **18** und **23** nahezu identisch, jedoch geringfügig niedriger im Vergleich zu **6**. Für das Methoximderivat **19** zeigt sich ein deutlicher Abfall der H₃-Aktivität bei gleichzeitigem starken Anstieg des M₃-Antagonismus. Auffallend ist, daß trotz der relativ hohen M₃-Werte, die H₃-Werte wieder eindeutig bestimmt werden konnten.

3.2.5 Aminsubstituierte Ether

Analog zu den Erfahrungen der Alkoxy- und Carbonylsubstitution zeigen auch die mit Amin-Funktionen substituierten Substanzen gute Ergebnisse. **59**, das als heterozyklisches Analogon der carbonyl- und iminsubstituierten Verbindungen betrachtet werden kann, zeichnet sich durch eine bis dahin unerreichte Rezeptoraffinität bei gleichbleibender *In-vivo*-Aktivität aus. Durch die Verwendung einer zusätzlichen Piperidinomethylgruppe (**60**) ließ sich das *In-vitro*-Ergebnis sogar nochmals um das ca. 10fache auf 2.8 nM steigern. Leider ist damit aber auch eine Halbierung der *In-vivo*-Wirkung verbunden. **59** weist im Meerschweinchen einen pA₂ von 7.8 und damit die höchste Potenz unter den Nicht-Acetyl-Verbindungen auf. Auch im Hinblick auf die Selektivität ist **59** am H₃-Rezeptor im Vergleich zum M₃-Rezeptor um fast 3 10er Potenzen stärker aktiv. Bei der Betrachtung des gpH₃-Wertes von **60** fällt die höhere Aktivität am humanen Rezeptor auf. Bei diesen beiden Substanzen stellt sich zusätzlich die Frage, welches der beiden basischen Zentren im Molekül für die Wechselwirkung mit der Histaminbindungsstelle des H₃-Rezeptors verantwortlich ist. Die These, daß die Piperidin Funktion der Phenoxygruppe von **60** sich möglicherweise besser in die Bindungstasche des Rezeptorproteins einpaßt, wird gestützt durch die Ergebnisse der in Kap. 3.6 näher erläuterten inversen Ether **68** und **69**, die sich mit ihrer 4-(Piperidinomethyl)phenoxy-Struktur der klassischen 4-(Piperidinomethyl)benzyloxy-Struktur als eindeutig überlegen erwiesen haben. Anhand der Ergebnisse von **61** läßt sich der Einfluß eines stickstoffhaltigen Substituenten abschätzen. Im direkten Vergleich mit der phenylethylsubstituierten Verbindung **53** zeigt sich die Substanz *in-vitro* 10fach potenter, aber auch *in-vivo* ist sie klar überlegen. Dieses Bild

bleibt auch im Vergleich zum benzoxysubstituierten **58** erhalten (vergl. Tab. 3-5). Da es sich um ein Anilinderivat handelt, muß die Bedeutung der Basizität allerdings eingeschränkt beurteilt werden. Eine mögliche Erklärung für die höhere Affinität ist eine bessere Fähigkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rezeptormolekül. Mit der aufgrund ihrer Amidin-Partialstruktur hier aufgeführten *para*-Nitro-pyridinaminverbindung **62** sollte für eine andere Klasse von H₃-Rezeptorantagonisten

Tab. 3-7 Aminsubstituierte Verbindungen.

Nr.	R	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
		hK _i [nM] ^a	gpH ₃ pA ₂ ^b	ED ₅₀ [mg/kg] ^c	gpM ₃ pA ₂ ^b
59		27	7.80±0.16	4.0±1.3	4.93±0.18
60		2.8	7.42±0.10	9.6±4.5	5.29±0.17
61		90	<6.7	≈10	6.65±0.10
62		26	6.92±0.17	≈15	5.56±0.09

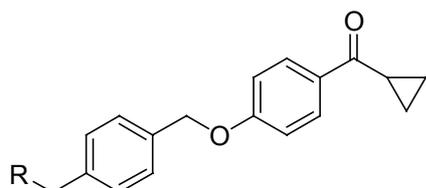
^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

der Einfluß der hier verwendeten 4-Methylbenzyl-Partialstruktur untersucht werden. In den Arbeiten von *Apelt* zeigen entsprechend substituierte 3-(Piperidin-1-yl)propylether sehr hohe Affinität im humanen Testmodell bei gleichzeitig geringer Aktivität als HMT-Inhibitoren.²⁰² Zwar konnten die sehr guten Ergebnisse der Vorläufer nicht erhalten werden, aber mit dem neuen Spacer bleibt die Affinität trotzdem auf hohem Niveau.

3.3 Ciproxifan-Analoga

In den Anfängen der Untersuchung am humanen H₃-Rezeptor stand zunächst nur ein Testmodell mit N^α-Methylhistamin als Referenzsubstanz zur Verfügung, bei dem das Rezeptorprotein in C6-Gliazellen der Ratte transient exprimiert wurde.

Tab. 3-8 Cyclopropylcarbonylsubstituierte Verbindungen.



Nr.	R	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vitro</i> rK _i [nM] ^c	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^d	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
22		20 4 ^e	7.51±0.15	56±14	3.2±1.0	5.55±0.13
23		66±8 6 ^e	7.07±0.15	329±84	5.9±1.2	5.63±0.11
24		-	-	-	≤10	-
25		-	-	-	5.7±1.1	-
Ciproxifan		46	8.4	0.5	0.14	5.5

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c Rattensynaptosomen; ^d perorale Applikation an Mäuse; ^e Verdrängung von [³H]-N^α-Methylhistamin vom humanen H₃-Rezeptor (h'K_i).

In einem groben Screening sollte ein erster Überblick über das Verhalten der strukturell verschiedenen Verbindungen am H₃-Rezeptor verschafft werden. Dabei war die Cyclopropylcarbonylgruppe der Acetylgruppe wie schon zuvor am H₃-Rezeptor der Ratte oder des Meerschweinchens auch hier überlegen. An einigen Verbindungen sollten die

Auswirkungen einer Modifikation des Piperidinrings, wie z.B. Methylsubstitution, bestimmt werden, die gleichzeitig in der Gruppe der zu den Proxifanen analogen 3-(Piperidin-1-yl)-propyl-arylether interessante Ergebnisse im Rattenmodell erzielt haben. Als Ausgangsverbindung wurde das Ciproxifan-Analogon **23** gewählt. Im Vergleich zu Ciproxifan zeichnet sich eine Ringverkleinerung zu einem fünfgliedrigen Pyrrolidinring (**22**) durch einen 6fachen Anstieg der *In-vitro*-Potenz im Rattenmodell aus. Auch *in-vivo* zeigt sich ein positiver Effekt. Beim groben Screening am humanen H₃-Rezeptor erzielt **22** nur geringfügig höhere Affinität. Die spätere Nachuntersuchung mit dem [¹²⁵I]-Iodoproxyfan-Bindungsstudien-Modell ergab schließlich 3mal niedrigere Ergebnisse als **23**. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Rattenmodell verbesserten sich die Werte im Meerschweinchenmodell nur geringfügig. Die Potenz am M₃-Rezeptor bleibt wie auch bei **23** auf dem Niveau von Ciproxifan. Eine Ringöffnung des Pyrrolidinrings zu einem Diethylamin (**25**) führte zu einer oralen Wirkabschwächung auf das Niveau von **23**. Mit der Einführung eines 4-Methylpiperidinrings (**24**) geht die *In-vivo*-Aktivität verloren.

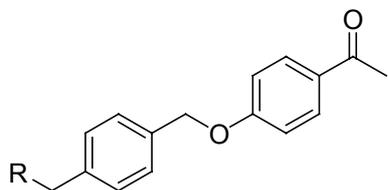
3.4 Acetoproxifan-Analoga

Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben, sollten die Auswirkungen einer Modifikation des Piperidinrings durch Ringvergrößerung, -verkleinerung, -öffnung oder Methylsubstitution am Heterozyklus auch in dieser Klasse untersucht werden (Kap. 3.2 *N*-Benzylpiperidine). Da die in Kap. 3.2.6 beschriebenen Ciproxifan-Analoga synthetisch schlecht zugänglich waren, wurden trotz besserer pharmakologischer Ergebnisse acetylsubstituierte Verbindungen mit gleicher Zielsetzung hergestellt. Die tendentiell bessere *In-vivo*-Wirksamkeit und nur geringfügig niedrigere Aktivität im humanen *In-vitro*-Testmodell, vor allem aber eben die wesentlich einfachere Zugänglichkeit begünstigten diese Entscheidung.

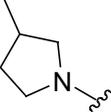
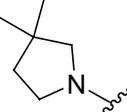
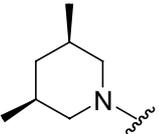
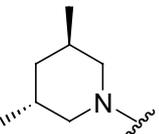
Die Ergebnisse der Ringmodifikationen sind in Tabelle 3-9 dargestellt. Ausgehend von der Leitstruktur **6** führte die Ringerweiterung des Piperidinrings zu einem siebengliedrigen Azepanring zu einer deutlichen Verbesserung der *In-vitro*-Ergebnisse am humanen Rezeptor, jedoch zu einer Verschlechterung der Werte am Meerschweinchen H₃-Rezeptor (**7**). Die *In-vivo*-Resultate liegen in etwa auf gleichem Niveau. Im Gegensatz dazu führt eine Ringverkleinerung zu einem Pyrrolidinring zu einer erneuten Affinitätssteigerung am humanen H₃-Rezeptor, während die Aktivität am Meerschweinchen weiter abnimmt (**5**). Auch die *In-vivo*-Aktivität ist tendentiell höher einzustufen. Interessant ist weiterhin, daß die Potenz

im Rattenmodell im Unterschied zum Meerschweinchenmodell ebenfalls deutlich zunimmt. Ansatzweise werden hier Speziesunterschiede erkennbar, die aber aufgrund der geringen

Tab. 3-9 Acetoproxifan-Analoga.



Nr.	R	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^b	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^c	<i>in-vitro</i> rK _i [nM] ^d	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^c
5		26±4 3 ³	1.9±1.0	7.74±0.08	41±10	-
6		84±11 23 ^e	3.9±1.9	7.21±0.09	109±19	-
7		37	4.3±2.2	7.51±0.09	-	6.04±0.05
16		91	3.4±0.8	7.16±0.13	-	5.46±0.06
17		-	>10	-	-	-
11		2 ^e	1.0±0.6	8.0±0.03	-	5.77±0.06
12		22 ^e	7.6±1.4	-	-	-
13		25	3.4±0.8	-	-	-
8		1.2±0.1 ^e	0.78±0.23	8.18±0.05	-	5.54±0.1

9		21	3.2±1.2	-	-	-
10		230	≈10	-	-	-
14	 <i>meso-cis</i>	-	>10	-	-	-
15	 <i>rac-trans</i>	-	>10	-	-	-

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b perorale Applikation an Mäuse; ^c Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^d Rattensynaptosomen; ^e Verdrängung von [³H]-N^α-Methylhistamin vom humanen H₃-Rezeptor (h'K_i).

Datenlage keine weitergehende Interpretation zulassen. Analog zu den Ergebnissen für das Ciproxifan-Analogon **25** führt eine Ringöffnung zu einem Diethylaminrest zu *In-vitro*-Werten, die denen der Piperidinverbindung ebenbürtig sind (**16**). Im Folgenden werden die Auswirkungen einer Methylsubstitution am Heterozyklus diskutiert. Das Diisopropylderivat **17** kann in diesem Fall als dimethylsubstituiertes Diethylamin aufgefaßt werden. Interessant ist, daß mit dieser Strukturänderung die *In-vivo*-Aktivität verloren geht. Substituiert man den Piperidinring, so zeigt sich, daß eine Methylgruppe in Position 2, also dem Stickstoff benachbart, eine deutliche Steigerung sowohl der *In-vitro*- als auch der *In-vivo*-Aktivität bewirkt (**11**). Bemerkenswert ist, daß die Aktivität am humanen Rezeptor wesentlich stärker zunimmt, als beim gp-Rezeptor. Wird die Methylgruppe um eine Methylengruppe verschoben (**12**), so sinkt die *In-vivo*-Wirksamkeit deutlich unter das Niveau der unsubstituierten Ausgangsverbindung **6**. Die Ergebnisse im humanen Testmodell scheinen sich ähnlich zu verhalten. Ebenso verhält es sich bei einem 4-Methylpiperidinring, der ungefähr gleiche *In-vitro*-Ergebnisse erzielt (**13**). Im Vergleich zu seinem cyclopropylcarbonyl-substituierten Analogon **24** ist die *In-vivo*-Aktivität erhöht.

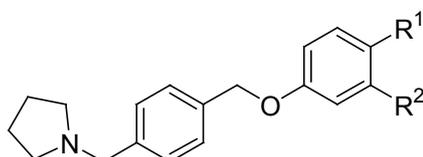
Ähnliche Verhältnisse werden bei einem Pyrrolidinring erzielt. Auch hier werden bei Einführung einer Methylgruppe vicinal zum Stickstoff die besten Ergebnisse erreicht, wobei im Vergleich zum Schritt Piperidin→Pyrrolidin nochmals eine Steigerung der Aktivität/Affinität in allen Testsystemen zu sehen ist. Das 2-Methylpyrrolidinderivat **8** stellt die potenteste Verbindung in dieser Klasse dar. Sobald die Methylgruppe verschoben wird, sinken parallel zu den entsprechenden Piperidinen die Aktivitäten bei allen Testmodellen signifikant (**9**). Die Abschirmung des basischen Zentrums durch die benachbarte Methylgruppe scheint demnach von untergeordneter Bedeutung zu sein. Vielmehr sieht es so aus, als ob die Methylgruppe den Stickstoff in eine bessere dreidimensionale Position überführt, aus der eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rezeptorprotein resultiert. Daß den sterischen Anforderungen eines H₃-Rezeptorantagonisten dabei enge Grenzen gesetzt sind, lassen die Ergebnisse von **10** vermuten. Durch die Anwesenheit einer zweiten Methylgruppe in Position 3 sinkt die Affinität um etwa das 10fache im Vergleich zu **8**, ebenso sind die *In-vivo*-Resultate herabgesetzt. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine *In-vivo*-Potenz nicht direkt mit der Lipophilie in Korrelation zu setzen. Auch die Werte der 3,5-Dimethylpiperidinverbindungen **14** und **15** stützen diese Aussage beim Vergleich mit dem 3-Methylpiperidinderivat **12**. Da keine *In-vitro*-Daten für die beiden *meso-cis* bzw. *rac-trans* Isomere vorliegen, ist eine Interpretation der sterischen Anforderungen nicht möglich.

3.5 Variation der Acetophenon-Partialstruktur

Da sich ein Pyrrolidinring durch eine Wirksteigerung im humanen und im Maus-Testmodell auszeichnete, wurde versucht, die Aktivität durch Variation der Acetophenon-Partialstruktur (**5**) weiter zu erhöhen. Dazu wurde zum einen die Acetyl-Funktion um eine Methylengruppe verlängert (**28**), zum anderen in *meta*-Position mit einer zusätzlichen Methylgruppe substituiert (**29**). Es zeigt sich, daß damit die *In-vivo*-Potenz der Verbindungen nicht signifikant gesteigert werden konnte. Während die Kettenverlängerung eher eine Verschlechterung der Werte ergab, hatte die *meta*-Methylgruppe keinen Einfluß auf die *In-vivo*-Aktivität. Die Ergebnisse im humanen Testmodell ergaben hingegen eine leichte Affinitätssteigerung, wobei sich die Strukturänderungen in ihren Auswirkungen kaum voneinander unterscheiden. Auch im Meerschweinchen-Modell zeigen die Modifikationen nahezu identische Werte, die allerdings leicht unter denen der Acetyl-Verbindung **5** liegen. Interessant ist dabei, daß beide Modifikationen die Ergebnisse des hier nochmals aufgeführten

Ciproxifan-Analogons **22** tendentiell übertreffen. Die zusätzlichen Methylgruppen, aber auch der Cyclopropylring scheinen die Liganden am humanen Rezeptor besser zu verankern.

Tab. 3-10 N-Benzylpyrrolidine.



Nr.	R ¹	R ²	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
5		H	26±4 3 ^d	7.74±0.08	1.9±1.0	
28		H	13	7.53±0.12	2.9±1.1	5.61±0.10
22		H	20 4 ^d	7.51±0.15	3.2±1.0	5.55±0.13
29		CH ₃	15	7.54±0.10	≈2	5.25±0.09

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse; ^d Verdrängung von [³H]-N^α-Methylhistamin vom humanen H₃-Rezeptor (h'K_i).

3.6 Selektivitätsdaten ausgewählter Verbindungen

Einige Verbindungen wurden aufgrund ihrer ausgesprochen guten *In-vivo*- und *In-vitro*-Ergebnisse zusätzlich auf ihre Aktivität an den anderen Histaminrezeptorsubtypen bestimmt. Die Aktivität am H₁-Rezeptor wurde in Analogie zur Bestimmung der H₃-Werte am Meerschweinchen-Ileum, die am H₂-Rezeptor an der Meerschweinchen-Aorta gemessen.²¹⁴

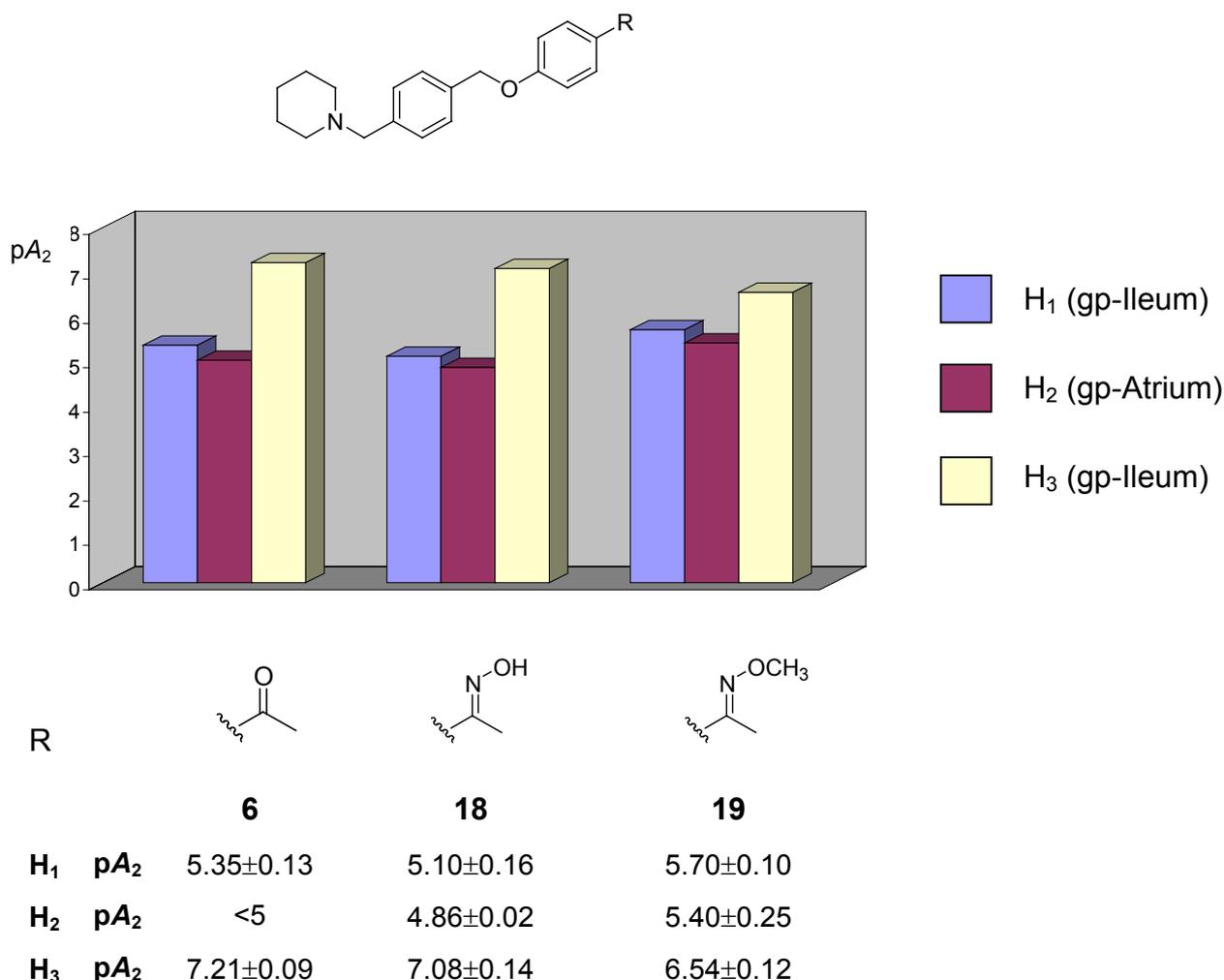


Abb. 3-1 Selektivitätsdaten I.

Die Umwandlung des Acetylrestes (**6**) in eine Oximstruktur (**18**) bewirkte einen geringen Abfall der Aktivitäten an allen Histaminrezeptorsubtypen, der beim H₃-Rezeptor etwas geringer ausgeprägt ist. Durch die Modifikation zu einem Methoximderivat **19** geht die Selektivität weitgehend verloren. In etwa in der gleichen Größenordnung, in der die H₃-Aktivität abnimmt, steigt die Aktivität an den beiden anderen Subtypen an. Im Ergebnis zeigen die Verbindungen mäßige bis gute Präferenz zum H₃-Rezeptor. Beim Wechsel vom Piperidinring (**6**) zum Pyrrolidinring (**5**) zeigt sich eine leichte Abnahme der Aktivität am H₁-Rezeptor, während sie am H₂-Rezeptor nahezu identisch bleibt. Gleichzeitig führt die Aktivitätszunahme am H₃-Rezeptor zu einer stärkeren Ausprägung der Selektivität (>100). Die Substitution des Heterozyklus mit einer Methylgruppe in 2-Position (**8**) schließlich erhöht die Potenz am H₁-Rezeptor in stärkerem Maß als am H₃-Rezeptor. Die Wirkung am H₂-Rezeptor wird damit auf das Niveau von **18** abgesenkt.

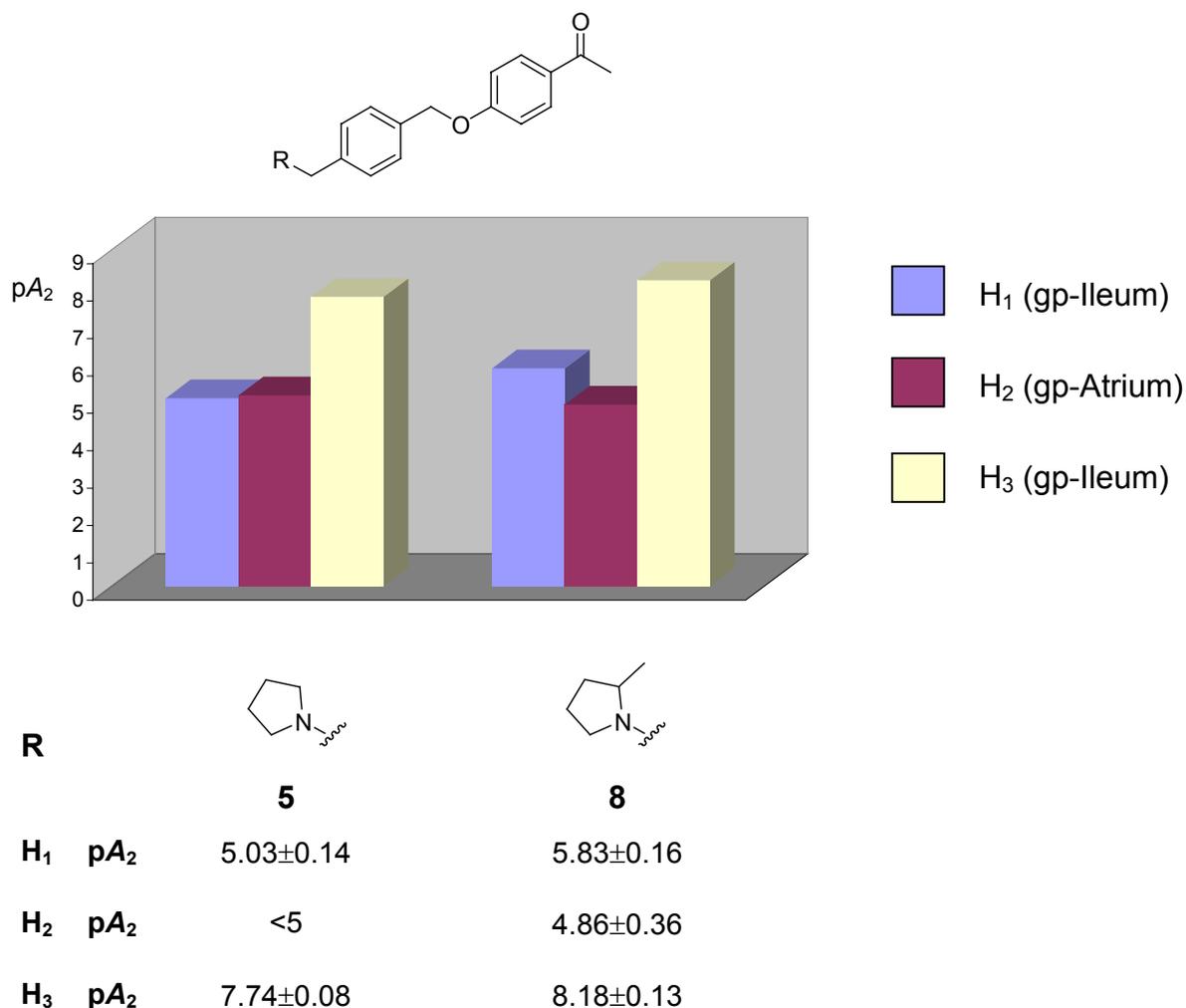


Abb. 3-2 Selektivitätsdaten II.

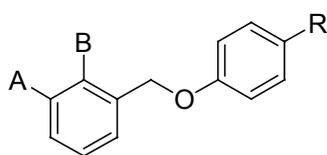
3.7 ortho- und meta-Substituierte N-Benzylpiperidine

Ausgehend von der sehr ähnlichen *In-vitro*-Affinität im humanen Testmodell und der unterschiedlichen *In-vivo*-Aktivität von *para*-methyl- (**41**) bzw. chloresubstituierten 1-(4-(Phenoxymethyl)benzyl)piperidinen (**34**) wurden deren entsprechende *meta*- und *ortho*-N-Benzylpiperidin-Analoga synthetisiert (Tab. 3-11). Sie sollten Aufschluß geben, in welchem Ausmaß die sterische Ausrichtung des basischen Amins für die pharmakologische Aktivität von Bedeutung ist.

Bei den Testungen stellte sich heraus, daß mit Ausnahme von **64**, das eine schwache Aktivität zeigt, alle Verbindungen dieser Reihe analog zur *para*-Chlorleitstruktur **34** *in-vivo* unwirksam sind. Im Hinblick auf die Rezeptoraffinität ist die *para*-Substitution der *meta*- oder *ortho*-Substitution weit überlegen. Für **64** und **65** können noch Werte im nanomolaren Bereich festgestellt werden, während **66** und **67** deutlich darüber liegen. Überraschend zeigt die *meta*-

Chlorverbindung **65** hier eine weit bessere Aktivität als die *meta*-Methylverbindung **64**. Im Meerschweinchen-Test geht mit dem *ortho*-Substitutionsmuster jegliche Affinität zum Rezeptor verloren. Die hier ermittelten Werte lassen wiederum keine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu. Obwohl für viele der vorherigen unklaren Ergebnisse eine zu hohe muskarinerge M₃-antagonistische Aktivität der Substanzen als Grund genannt werden kann, läßt sich dieses bei **66** nicht beobachten. Eventuelle direkte Einflüsse auf Ionenkanäle oder andere makromolekulare Strukturen müssen hier zur Diskussion gestellt werden.

Tab. 3-11 *ortho*- und *meta*-substituierte *N*-Benzylpiperidine.

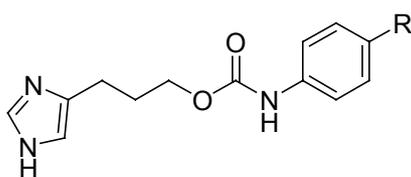


Nr.	A	B	R	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
64		H	CH ₃	≈500	n.d.	10±2	5.90±0.10
65		H	Cl	256±31	-	>10	-
66	H		CH ₃	>1000	n.d.	>10	<5.0
67	H		Cl	≈1000	-	>10	-
41				126	<6.52	1.8±0.4	6.26±0.13
34				124	6.57±0.12	>10	6.22±0.15

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

3.8 Austausch der Ether-Funktion durch andere funktionelle Gruppen.

Der Entwicklung der Proxifane gingen viele Versuche mit verschiedenartigen funktionellen Gruppen voraus, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Verbindungen mit einer Carbamat-Funktion konnten als Antagonisten,^{210,222} aber auch als partielle Agonisten identifiziert werden,⁹⁴ aber auch Ester-, Harnstoffderivate, Carbamate und Amine ergaben potente Liganden am H₃-Rezeptor.^{223,224}



FUB 208

R = Cl
ED₅₀ = 3.5 mg/kg p.o.
h'K_i = 24 nM

FUB 139

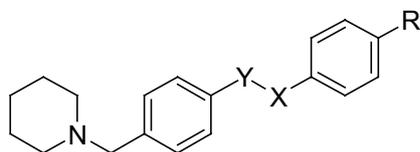
R = CH₃
ED₅₀ = 2.1 mg/kg p.o.
rK_i = 11 nM

Abb. 3-3 Beispiele mit Carbamat-Partialstruktur.

Als Beispiel seien **FUB 208** und **FUB 139** (Abb. 3-3) genannt, aber auch die Leitverbindungen von Schering-Plough sind in ihren funktionellen Gruppen sehr heterogen zusammengesetzt (Kap. 1.7). Ausgehend von den Phenylethern **41** und **34** wurde eine Anzahl Verbindungen mit unterschiedlichen Funktionalitäten anstelle der Ether-Partialstruktur hergestellt (Tab. 3-12). Als Substituent wurde wieder jeweils eine Methylgruppe oder ein Chlorsubstituent gewählt, da sich beide Substanzen durch fast identische Rezeptoraffinität, aber gänzlich unterschiedliches *In-vivo*-Verhalten auszeichnen. Auf der Grundlage der herausragenden Ergebnisse von **60** wurden zunächst inverse Ether synthetisiert um zu überprüfen, ob und inwieweit der Piperidinomethylphenoxyrest aus **60** ein effektiveres Grundgerüst als die 4-(Piperidinomethyl)benzyl-Partialstruktur darstellt. Das Verschieben der Sauerstofffunktion um eine CH₂-Gruppe in Richtung des basischen Zentrums bewirkt eine ca. 3fache Erhöhung der Affinität bei fast gleichbleibender *In-vivo*-Wirksamkeit (**68**). Bei einem Chlorsubstituenten wird damit eine geringe *In-vivo* Aktivität erzielt und der Effekt auf den humanen H₃-Rezeptor merklich gesteigert (**69**). Für die Schwefel-Analoga **70** und **71** werden ähnliche aber leicht schwächere *In-vivo*-Daten erhalten. Obwohl das Chlorderivat **71** noch leichte *In-vivo*-Aktivität besitzt, fällt seine Rezeptorbindung deutlich unter die von **34**. Der Austausch des Ethersauerstoffs durch einen schwach basischen Stickstoff führt für das methylsubstituierte Derivat **72** noch zu einer verbesserten Affinität und schwacher *In-vivo*-Wirksamkeit, bei einem Chlorsubstituenten (**73**) dagegen zu annähernd gleichen Ergebnissen wie für die Leitsubstanz. Mit einer Ester-Funktion erreicht man für **74** gute humane *In-vitro*-Ergebnisse, jedoch ist sie wie ihr Chlor-Analogen **75** und die Carbamate **76** und **77** peroral

inaktiv. Ähnlich wie der Thioether **71** zeigen **75** und **77** erheblich schlechtere *In-vitro*-Aktivitäten.

Tab. 3-12 Verbindungen mit verschiedenen funktionellen Gruppen.



Nr.	Y	X	R	<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
41	CH ₂	O	CH ₃	126	<6.52	1.8±0.4	6.26±0.13
34	CH ₂	O	Cl	124	6.57±0.12	>10	6.22±0.15
68	O	CH ₂	CH ₃	38±9	6.25±0.14	2.4±0.5	5.98±0.12
69	O	CH ₂	Cl	73	6.39±0.06	≈25	6.13±0.10
70	CH ₂	S	CH ₃	31±10	<6.8	≈5	6.61±0.09
71	CH ₂	S	Cl	179	-	≈30	-
72	CH ₂	NH	CH ₃	81±15	6.26±0.07	12±2	5.88±0.17
73	CH ₂	NH	Cl	130	6.59±0.12	>10	5.96±0.08
74	CH ₂	O-C(=O)	CH ₃	37±3	6.26±0.10	≥10	5.63±0.09
75	CH ₂	O-C(=O)	Cl	254	-	>10	-
76	CH ₂	O-C(=O)-NH	CH ₃	79±12	6.07±0.09	>10	5.40±0.13
77	CH ₂	O-C(=O)-NH	Cl	203	6.07±0.15	>10	5.80±0.21

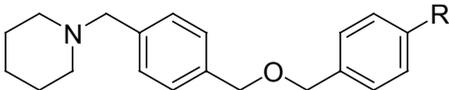
^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

Mit den hier durchgeführten Änderungen der funktionellen Gruppe zeigen die getesteten Verbindungen mit Ausnahme des Thioethers **70** auch wieder eine definierbare Aktivität im Meerschweinchen-Testmodell, die allerdings mit pA₂-Werten zwischen 6.07 und 6.59 bei den meisten Verbindungen deutlich niedriger liegt als die entsprechenden Humandaten. Die getesteten Verbindungen besitzen eine relativ hohe M₃-antagonistische Potenz.

Eine Veränderung der funktionellen Gruppe scheint somit eher Konsequenzen auf die humane als auf die Meerschweinchen-*In-vitro*-Aktivität zu haben. Eine elektronenschiebende Methylgruppe ist dem elektronenziehenden Chloratom vorzuziehen, um hohe Affinitäten am humanen Rezeptor zu erzielen. Im funktionellen Testsystem an der Maus reichen nur der inverse Ether **68** und der Thioether **70** an die Ergebnisse von **41** heran.

In einem weiteren Ansatz wurden Dibenzylether hergestellt, die als Analoga der Proxifyfan-klasse aufgefaßt werden können. Mit den hergestellten Verbindungen wird ein direkter Vergleich mit diesen Leitstrukturen möglich. Die Substanzen zeigen bei Verwendung der 4-(Piperidin-1-ylmethyl)benzyl-Partialstruktur wie die Proxifyfane keine *In-vivo*-Aktivität. Eine Fluor-substitution bleibt erfolglos (**79**). Die Affinitäten liegen bei der unsubstituierten Verbindung **78** leicht höher als bei dem entsprechenden Phenoether **32**, sobald aber mit einem Halogenatom substituiert wird (**79** - **81**), sinken sie unter die Ergebnisse der entsprechend substituierten Phenoether. Interessant ist der „Ausreißer“ der chloresubstituierten Verbindung **80**, die deutlich höhere Affinität erzielt. Die am Meerschweinchen getestete Substanz **80** zeigt ebenso einen pA_2 , der denen der anderen Verbindungen sehr ähnlich ist. Eine höhere H_3 -Selektivität ist im Hinblick auf die hohe M_3 -antagonistische Aktivität ebenfalls nicht zu erkennen.

Tab. 3-13 Verbindungen mit Dibenzylether-Struktur.



Nr.	R	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
		hK_i [nM] ^a	gpH_3 pA_2 ^b	ED_{50} [mg/kg] ^c	gpM_3 pA_2 ^b
78	H	206	-	>10	-
79	F	261	-	>10	-
80	Cl	145	6.31±0.18	>10	5.99±0.10
81	Br	213	-	>10	-

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H_3 -Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse.

Auf die Bestimmung der Auswirkungen längerkettiger Arylalkyl-Funktionen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet, da bereits ein Phenylpropyletherderivat existiert (Abb. 3.-4), welches sowohl *in-vitro* (rK_i >1600 nM) als auch *in-vivo* (ED_{50} >10 mg/kg) enttäuschte.

War man früher von einem generellen Aufbauschema für einen Histamin- H_3 -Rezeptorantagonisten, wie in Abb. 1-7 gezeigt, ausgegangen, hat sich diese Meinung

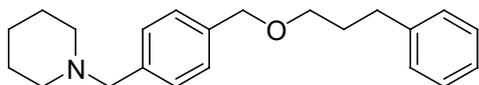


Abb. 3-4 FUB 655.

durch die Entwicklung von weiteren potenten Liganden, die diesem Schema nicht folgen, relativiert. GT 2227, aber auch FUB 427 sind an dieser Stelle als Beispiele zu nennen. Das Stilbenderivat **82** sollte exemplarisch für diesen Verbindungstypus vom Schema abweichen und zeigen, ob hier ein Fehlen einer polaren Gruppe zu einem Wirkverlust führt. Zusätzlich war es interessant, ob der Piperidinring sich als Nachteil erweisen würde, nachdem der Austausch des Imidazolrings von FUB 427 durch einen Piperidinring zu einem starken Aktivitätsverlust führte. In diesem Fall zeigte sich eine gute *In-vivo*-Potenz. Ebenso wurden gute Aktivitäten am humanen H_3 -Rezeptor gemessen. Aufgrund der gleichzeitig zu hohen Aktivität am M_3 -Rezeptor konnten am Meerschweinchen-Ileum erneut keine eindeutigen Ergebnisse bestimmt werden.

Tab. 3-14 Verbindungen mit apolaren Ketten.

Nr.		<i>in-vitro</i> hK _i [nM] ^a	<i>in-vitro</i> gpH ₃ pA ₂ ^b	<i>in-vivo</i> ED ₅₀ [mg/kg] ^c	<i>in-vitro</i> gpM ₃ pA ₂ ^b
GT 2227		4.2 ^d	-	0.7 ^e	-
82		79±13	<6.3	4.4±0.4	6.24±0.12
FUB 427		-	7.1	1.0	-

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H_3 -Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse; ^d Rattenkortex; ^e *ex-vivo* intraperitoneal an der Ratte.

3.9 3-(1H-Imidazol-4-yl)- und 3-(Piperidin-1-yl)propyl-arylether

Nach der erfolgreichen Klonierung des humanen H₃-Rezeptors durch *Lovenberg* und Mitarbeiter¹¹ begann im Laufe dieser Arbeit ein breites Screening der in unserem Arbeitskreis bereits vorhandenen H₃-Liganden an diesem Rezeptor. Dabei zeigten *para*-alkylierte bzw. 3,4-dialkylierte 3-(1H-Imidazol-4-yl)propylarylether ebenso wie 3-(Piperidin-1-yl)propylarylether hohe Rezeptoraffinität.

Auch die Testung der *para*-alkylsubstituierten 1-(4-(Phenoxyethyl)benzyl)piperidine erbrachte ähnliche Resultate. Um eventuelle Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich Kettenlänge, -verzweigungen oder Verwendung eines planaren Phenylrings feststellen zu können, wurden weitere Substanzen dieses Typs synthetisiert, wobei sich diese Arbeit auf *para*-substituierte Verbindungen beschränkt.

Tab. 3-15 3-(1H-Imidazol-4-yl)propyl-arylether.

Nr.	R	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
		hK _i [nM] ^a	gpH ₃ pA ₂ ^b	ED ₅₀ [mg/kg] ^c	gpM ₃ pA ₂ ^b
UCL 1791	C ₂ H ₅	3.6	7.4 ^d	0.2	-
FUB 395	CH(CH ₃) ₂	86	-	2.2	-
83	C(CH ₃) ₃	3.4±0.3	6.82±0.13	4.8±0.2	5.49±0.15
84	C ₄ H ₉	5.8	6.80±0.15	0.7±0.25	5.50 ^e
85		45	6.43±0.20	≥10	5.07±0.48

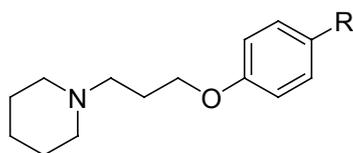
^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Funktioneller Test am Meer-schweinchen-Ileum; ^c perorale Applikation an Mäuse; ^d Bindungsstudie mit [³H]-N^α-Methylhistamin an der Ratte; ^e 2 gleiche Werte.

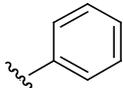
In Tabelle 3-15 sind die imidazolhaltigen Propylether angegeben. Während im Testmodell an Rattensynaptosomen die Carbonyl-Funktion eine starke Aktivitätserhöhung bewirkte, scheint

das Fehlen der Acylgruppe am humanen H₃-Rezeptor vorteilhaft zu sein. UCL 1791, das als hydriertes Analogon von Acetoproxifan betrachtet werden kann, zeigt eine fast 10fache höhere Aktivität im Vergleich zur Ratte und eine hohe *In-vivo*-Potenz. Bei Substitution mit einer Isopropylgruppe (FUB 395) sinken beide Werte deutlich. Wird durch Verwendung eines tert.-Butylrestes die räumliche Ausdehnung weiter erhöht, zeigt **83** erstaunlicherweise eine Anhebung der *In-vitro*-Aktivität zurück auf das Niveau der kleineren Ethylverbindung, obwohl die *In-vivo*-Wirkung weiter sinkt. Mit einer Butylkette wird erneut eine sehr gute orale Aktivität erhalten (**84**). Gleichzeitig bleibt die Rezeptoraffinität im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich.

Am Meerschweinchen-Ileum wird eine gute Aktivität auch bei Fehlen des Carbonylsauerstoffs gemessen, der bei den 1-(4-(Phenoxymethyl)benzyl)piperidinen in diesem Testmodell wichtig zu sein scheint. Die *In-vivo*-Unwirksamkeit der phenylsubstituierten Verbindung **85** deutet ebenfalls auf einen negativen Einfluß einer Kettenverzweigung hin. Der planare Aromat bewirkt im Vergleich zu Alkylresten eine schlechtere Bindung am Rezeptor, was auf die Orientierung gegenüber den anderen Aromaten zurückzuführen sein könnte.

Durch den Austausch des Imidazolrings der zuvor beschriebenen Verbindungen durch einen Piperidinring erhält man teilweise deutlich differierende Ergebnisse. Alle Verbindungen zeichnen sich durch sehr hohe *In-vivo*-Potenz aus. Mit steigender Kettenlänge bis zu einem Optimum der Butylkette (**86**) nimmt auch die *In-vivo*-Aktivität zu. Bei der Pentylkette steigen die Werte wieder an (**87**). Zwischen den *In-vitro*-Daten und der Struktur läßt sich keine Korrelation feststellen. Die Affinität ist bei einer Isopropylgruppe (UCL 2278) ca. 6mal höher, bei einer Butylgruppe hingegen etwa nur halb so groß (**86**). Weitere Kettenverlängerung zu einer Pentylkette verschlechtert die Ergebnisse (**87**). Eine Übereinstimmung in den Werten ist in den Nager-Testsystemen zu finden. Bei Vergleich von **84** mit **86** ist durch den Imidazolaustausch ein Anstieg sowohl der *In-vitro*- als auch der *In-vivo*-Aktivität ungefähr um den Faktor 3 zu beobachten. Sehr interessant ist auch das Verhalten des phenylsubstituierten Piperidinopropylethers **88**. Im Unterschied zu **85** zeichnet sich **88** durch eine sehr gute *In-vivo*-Potenz und durch eine über 10fach höhere Rezeptoraffinität aus.

Tab. 3-16 3-(Piperidin-1-yl)propyl-arylether.

Nr.	R	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
		hK _i [nM] ^a	mK _i [nM] ^b	gpH ₃ pA ₂ ^c	ED ₅₀ [mg/kg] ^d	gpM ₃ pA ₂ ^c
UCL 2284^e	C ₂ H ₅	12±1	87±11	-	1.2±0.2	-
UCL 2283^e	C ₃ H ₇	8.1±1.2	48±4	-	0.54±0.14	-
UCL 2278^e	CH(CH ₃) ₂	14±2	114±12	-	0.92±0.26	-
86	C ₄ H ₉	16	-	7.39±0.06	0.22±0.06	6.48±0.12
87	C ₅ H ₉	47	-	7.01±0.14	0.31±0.06	6.36±0.08
88		3.7±0.5	-	7.50±0.21	≈0.6	6.02±0.22

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom H₃-Rezeptor aus Mäusesynaptosomen; ^c Funktioneller Test am Meerschweinchen-Ileum; ^d perorale Applikation an Mäuse; ^e Prof. J. C. Schwartz, persönliche Mitteilung.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann somit leider keine Aussage getroffen werden, welches Ringsystem höhere Speziesselektivität ergibt. Sie schaffen aber gute Ansatzpunkte für weitere Optimierungen der vorhandenen Histamin-H₃-Rezeptorliganden, die nunmehr für den menschlichen Rezeptor gezielt entwickelt werden können.

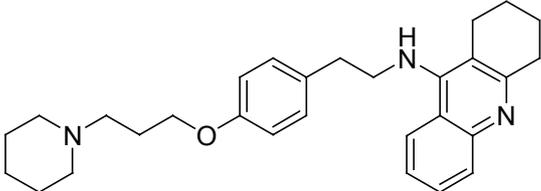
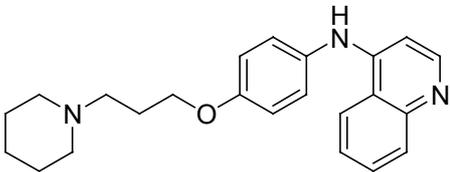
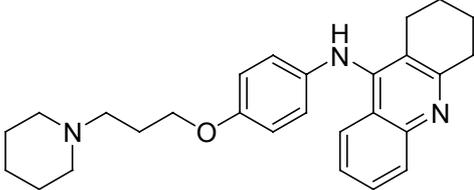
3.10 1,2,3,4-Tetrahydroacridinderivat

Als Ausgangspunkt für die hier beschriebene Verbindung dient die Dissertation von *Apelt*, in der potente Antagonisten des H₃-Rezeptors mit gleichzeitig außerordentlich hoher Hemmwirkung auf die Histamin-N⁷-Methyltransferase beschrieben sind.²⁰⁵

Dies gelang vor allem durch Kombination von 3-(Piperidin-1-yl)propyl-arylethern mit Aminochinolinen oder Aminoacridinen, die z.T. über eine Alkylkette in *para*-Stellung mit der

Phenolteilstruktur verknüpft sind. Die Ergebnisse zeigten, daß die Verbindungen, die über keine verbindende Alkylkette verfügen, mit dem jeweilig verwendeten Heteroaromaten die höchste Aktivität aufweisen. In der Reihe der 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin-Komponenten zeigt die Verbindung mit der kürzesten Alkylkette FUB 833 (Ethylkette) die höchste Aktivität. Die Verbindungen mit einem Aminochinolin als Aminkomponente zeigen bei jeweils gleicher Alkylkettenlänge zumeist die höhere Potenz verglichen mit Verbindungen mit einem anderen Heterozyklus.

Tab. 3-17 3-(Piperidin-1-yl)propylphenoether.

Nr.	<i>in-vitro</i>	<i>in-vivo</i>	<i>in-vitro</i>
	H ₃ hK _i [nM] ^a	H ₃ ED ₅₀ [mg/kg] ^b	HMT IC ₅₀ [nM] ^c
FUB 833 	0.33	>10	48 ± 6
FUB 836 	0.091 ± 0.016	≈30	51 ± 8
89 	0.088 ± 0.012	>10	87 ± 14

^a Verdrängung von [¹²⁵I]-Iodoproxyfan vom humanen H₃-Rezeptor; ^b perorale Applikation an Mäuse; ^c Ratten-niere.

In dieser Reihe wiederum verzeichnet FUB 836 als Substanz, bei der die Alkylkette komplett fehlt und direkt über den Aminstickstoff mit der Phenolteilstruktur verbunden ist, eine der höchsten Affinitäten zum humanen H₃-Rezeptor überhaupt und stellt den bislang potentesten in der Literatur beschriebenen H₃-Rezeptorliganden dar, der gleichzeitig HMT-Inhibition im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich aufweist.

In der Reihe der 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine sollte die Verbindung ohne Alkylkette damit eventuell eine erneute Aktivitätsteigerung bewirken können. Bei der pharmakologischen Testung zeigt sich, daß **89** mit einem hK_i von 88 pM diesem Postulat entspricht, FUB 833 übertrifft und dabei Werte in der Größenordnung von FUB 836 erreicht. Gleichzeitig überzeugt **89** auch bei der Testung auf HMT-Inhibition und stellt damit einen der derzeit potentesten Histamin- H_3 -Rezeptorantagonisten dar.

3.11 Berechnungen zur Lipophilie

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden 1962 durch *Hansch* mit der Korrelation von Verteilungskoeffizienten und biologischer Aktivität begründet.²²⁵ Da die Verbindungen lipophile Strukturen beinhalten, sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen *In-vivo*- (ZNS-Penetration) bzw. *In-vitro*-Aktivität (Rezeptoraffinität) und ihrer chemischen Struktur besteht. Lipophilie oder Lipidlöslichkeit kann durch den Verteilungskoeffizienten zwischen einem wäßrigen Puffer und Octanol bestimmt werden. Durch dieses Zweiphasensystem kann experimentell die Blut-Hirn Schranke simuliert werden.

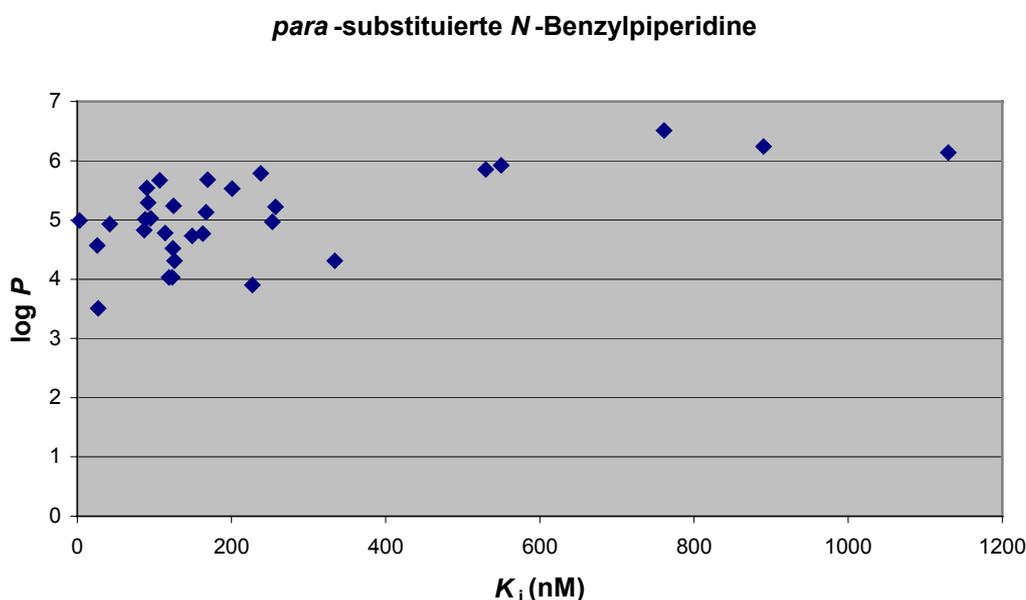


Abb. 3-5 Beziehung von $\log P$ und hK_i .

Als ein Parameter für die Lipophilie einer Verbindung wird der Logarithmus der Verteilung ($\log P$) angegeben. Neben der experimentellen Ermittlung läßt sich der $\log P$ -Wert theoretisch über die molaren Refraktivitäten und Polarisierbarkeiten, die für einzelne Atomgruppen berechnet wurden und in Inkrementtabellen zusammengefaßt sind, berechnen. Mit Hilfe des

modernen Chemieprogramms Chemoffice[®] konnte am Computer nach Angabe der Molekülstruktur der entsprechende $\log P$ -Wert nach der Methode von Ghose und Crippen mit einer Genauigkeit von 0.5 $\log P$ -Einheiten berechnet werden.²²⁶ Anschließend wurden die erhaltenen Ergebnisse der Verbindungen gegen ihre erzielten *In-vitro* bzw. *In-vivo*-Ergebnisse aufgetragen (Abb. 3.5 bzw. Abb. 3.6).

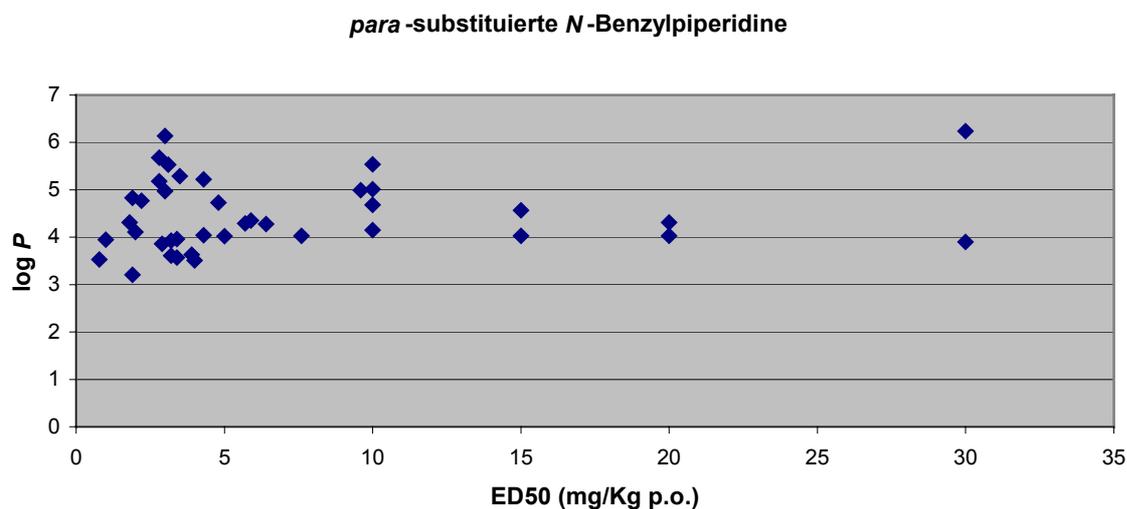


Abb. 3-6 Beziehung von $\log P$ und ED_{50} .

Im Ergebnis zeigt sich bei beiden Vergleichen eine willkürliche Verteilung. Damit konnte keine lineare Korrelation Lipophilie - Rezeptorbindung gefunden werden. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen müssen daher auf Ligand-Rezeptorinteraktionen wie z.B. sterische Hinderung oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beschränkt werden. Auch bei der Korrelation Hydrophobizität - *In-vivo*-Aktivität konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Ob die Verbindungen aufgrund ihrer Lipophilie mittels passiver Diffusion ins Gehirn gelangen, kann somit nicht abschließend beantwortet werden. Auch beim Herausgreifen strukturell verwandter Verbindungen, wie bei der Variation der funktionellen Gruppe oder des *N*-Heterozyklus ließ sich keine Beziehung erkennen. Verbindungen, die *in-vivo* unwirksam sind, wurden nicht dargestellt ($\log P$ -Werte : 4.21 - 5.79). Anzumerken bleibt, daß es sich hierbei um ein grobes Modell handelt, das reale Ergebnisse im praktischen Experiment nicht ersetzen kann.