

3 Pharmakologischer Teil

3.1 Allgemeine Angaben

3.1.1 Testmodelle

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen wurden an verschiedenen funktionellen *In-vitro*-Testmodellen auf ihre Aktivität am Histamin-H₁-Rezeptor untersucht. Hierfür sind insbesondere Organpräparationen, die eine hohe Rezeptordichte sowie leicht meßbare, rezeptorspezifische Effekte aufweisen, besonders gut geeignet.

Als Standardmodell für die routinemäßige Aktivitätsbestimmung der neu entwickelten Substanzen wurde das isolierte, von anhaftendem Mesenterial-Gewebe befreite, Meerschweinchen-Ileum (MS-Ileum) verwendet.

Für agonistisch aktive Verbindungen wurde zusätzlich die Rezeptoraffinität des Standard-H₁-Antagonisten Mepyramin bestimmt, um sicherzustellen, daß die durch die neuen Verbindungen ausgelösten Effekte auf eine reine Vermittlung über Histamin-H₁-Rezeptoren zurückzuführen sind. Diese wurde über die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve der Agonisten in Gegenwart variierender Mepyramin-Konzentrationen bestimmt und als pA₂-Wert angegeben.²⁴⁰

Partial agonistisch wirkende Substanzen wurden zusätzlich anhand der Dissoziationskonstante des *Partialagonist/Rezeptor*-Komplexes (K_p) nach *Kaumann* und *Marano* pharmakologisch charakterisiert.^{241,242} Hierzu nutzte man die Fähigkeit der Substanzen, durch ihren *partiellen* Antagonismus eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve eines *vollen* Agonisten zu induzieren, da beide Verbindungen um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren. Als voller Agonist wurde in diesem Testmodell Histamin verwendet. Die Ermittlung des pK_p-Wertes erfolgte hierbei durch Aufnahme einer zweiten Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin nach Zugabe einer definierten Konzentration des *partiellen* Agonisten.

Die zusätzliche Bestimmung der Histamin-H₁-Rezeptor-Aktivität einiger neu entwickelter Agonisten an der isolierten Meerschweinchen-Aorta (MS-Aorta) und der Ratten-Aorta lieferte interessante Aufschlüsse über die Wirkung der Verbindungen in verschiedenen Geweben und Spezies.

Zur Absicherung der reinen H₁-Rezeptor-Vermittlung der beobachteten Effekte wurde auch in diesen beiden Testmodellen deren Mepyramin-Sensitivität untersucht.

Abschließend wurden einige ausgewählte, potente Verbindungen in verschiedenen funktionellen *In-vitro*-Testmodellen auf ihre Rezeptorselektivität getestet. Für diese Untersuchungen standen Modelle für den Histamin-H₂-Rezeptor, den Histamin-H₃-Rezeptor und den Muskarin-M₃-Rezeptor zur Verfügung.

Die Fähigkeit dieser Verbindungen, mit dem Histamin-H₂-Rezeptor zu interagieren, wurde am spontan schlagenden rechten Meerschweinchen-Atrium bestimmt. Hierzu wurde das Ausmaß der Inhibierung der Histamin-induzierten Zunahme der Herzfrequenz gemessen.

Die Effektivität am Histamin-H₃-Rezeptor wurde über die Inhibierung der (*R*)- α -Methylhistamin-vermittelten Relaxation elektrisch stimulierter, longitudinaler Muskelpräparate des Meerschweinchen-Ileums ermittelt.

Die Aktivität am muskarinergen M₃-Rezeptor wurde über das Ausmaß der Kontraktion des vom Mesenterial-Gewebe befreiten Meerschweinchen-Ileums im Vergleich zu Carbachol bestimmt. Zur Maskierung H₁-Rezeptor-vermittelter Effekte wurde der Referenz-H₁-Antagonist Mepyramin (1 μ M) zugesetzt.

3.1.2 Statistische Absicherung

Unterschiede in der Wirkstärke (pEC₅₀ oder rel. Pot.) und der intrinsischen Aktivität (E_{\max}) wurden auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Dazu wurde zunächst ein F-Test auf Varianzhomogenität durchgeführt, gefolgt von einem zweiseitigen t-Test nach *Student* (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 0.05$).²⁴³

Für die Mittelwerte der intrinsischen Aktivität (E_{\max}), der Wirkstärke (pEC₅₀) sowie der pA₂- bzw. pD' ₂-Werte wurde eine Normalverteilung angenommen.²⁴⁴ Die Berechnung der 95 %-Vertrauensbereiche dieser Mittelwerte erfolgte auf Basis der t-Wert-Verteilung nach *Student*.

3.1.3 Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
E_{\max}	intrinsische Aktivität; Quotient aus dem Maximaleffekt der zu untersuchenden Substanz und dem des jeweiligen Standardagonisten (synonym: Maximal-effekt, Efficacy)
n.b.	nicht bestimmbar
n.d.	nicht bestimmt (<i>not done</i>)
EC_{50}	Konzentration eines Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt bewirkt; Maß für die Potenz eines Agonisten
pEC_{50}	negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration eines Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt bewirkt (= pD_2)
Rel. Pot.	relative Potenz des Agonisten gegenüber Histamin als Referenzsubstanz am jeweiligen Testorgan, dargestellt als Verhältnis der EC_{50} -Werte
pA_2	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante des <i>Pharmakon/Rezeptor</i> -Komplexes ($pA_2 = -\log c_A + \log (CR-1)$)
$-\log c_A$	negativ dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Antagonisten (A)
CR	Verhältnis der Konzentrationen des Agonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten, die zur Erzielung desselben Effektes erforderlich sind (<i>concentration ratio</i>)
pD'_2	negativ dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des nicht-kompetitiven Antagonisten, bei der der Agonist nur noch 50 % des maximal erreichbaren Effektes bewirkt ($pD'_2 = -\log c_A + \log(x-1)$ mit $x = E_{\max}/E_{\max(A)}$)
K_p	Dissoziationskonstante des <i>Partialagonist/Rezeptor</i> -Komplexes
KWK	Konzentrations-Wirkungskurve
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of mean</i>)

3.2 Bestimmungen im funktionellen Meerschweinchen-Ileum-

Assay

3.2.1 Aktivität und Mepyramin-Sensitivität

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits mehrere potente N^{α} -substituierte Histaprodifen-Derivate. Erste Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen hatten gezeigt, daß bei unverzweigten N^{α} -alkylsubstituierten Verbindungen die Aktivität am Histamin- H_1 -Rezeptor mit zunehmender Länge der Alkyl-Kette abnahm. Damit stellt Methylhistaprodifen (**1**) den potentesten Vertreter dieser Reihe dar.¹⁶⁸ Diese Entwicklung korreliert mit den Ergebnissen, die bei N^{α} -Alkylierung von Histaminen sowie 2-Phenylhistaminen beobachtet wurden; auch hier war mit Einführung längerer, raumerfüllender Alkyl-Ketten ein fortschreitender Abfall der Aktivität zu verzeichnen.³⁴

Bei den N^{α} -substituierten Histaminen konnte jedoch überraschend ein Anstieg der H_1 -agonistischen Aktivität bei Einführung längererkettiger ω -Phenylalkyl-Substituenten am N^{α} -Stickstoff des Histaprodifens beobachtet werden, wobei bei Verwendung eines Butyl-Spacers ein Optimum an Wirkung erreicht wurde (vgl. Kap. 1.2.1).^{82,83}

Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Klasse der Histaprodifene führte zur Entwicklung von N^{α} -(4-Phenylbutyl)histaprodifen (**2**), einem partiellen Agonisten des Histamin- H_1 -Rezeptors, der die Aktivität von Methylhistaprodifen (**1**) etwa um den Faktor 3 übertraf.

Damit lagen wichtige Anhaltspunkte für mögliche strukturelle Erfordernisse für potente und selektive Histamin- H_1 -Rezeptor-Agonisten vor. Diese Anforderungen sollten durch konsequente Variation der N^{α} -Seitenkette herausgearbeitet und die Aktivität der Verbindungen optimiert werden.

Alle neu dargestellten Substanzen wurden routinemäßig am Meerschweinchen-Ileum auf ihre H_1 -Aktivität untersucht.

Daneben wurde die Mepyramin-Sensitivität der Verbindungen untersucht. Hierbei konnte die Zuordnung der beobachteten Effekte zum H_1 -Rezeptor über eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve eines Agonisten mit Hilfe definierter Mepyramin-Konzentrationen bestätigt werden. Ein Vergleich der hieraus resultierenden pA_2 -Werte mit den publizierten Affinitätskonstanten für Mepyramin am Histamin- H_1 -Rezeptor ($pA_2 = 9.36$,²⁴⁵ $pA_2 = 8.89$ ²⁴⁶) lieferte zusätzliche Hinweise auf das Wirkprinzip der verschiedenen Agonisten.

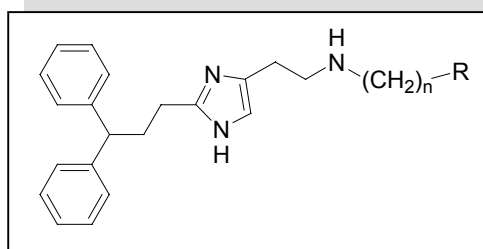
3.2.1.1 N^{α} -Phenylalkyl-Histaprodifene



Zunächst sollte ausgehend von den potenten partiellen Histamin- H_1 -Rezeptor-Agonisten N^{α} -(3-Phenylpropyl)histaprodifen (**PPH**) und N^{α} -(4-Phenylbutyl)histaprodifen (**2**) die Kettenlänge der Phenylalkyl-Seitenkette optimiert und die Übertragbarkeit der für N^{α} -substituierte Histamine^{82,83} etablierten Struktur-Wirkungsbeziehungen überprüft werden. Dazu wurden Phenylalkyl-Verbindungen (**44** - **47**) mit einem Alkyl-Spacer mit 1 - 6 CH_2 -Einheiten dargestellt.

Die pharmakologischen Ergebnisse der Verbindungen im Meerschweinchen-Ileum sind in Tabelle **3.2.1** aufgeführt.

Mit Ausnahme des Benzyl-Derivats **44**, das antagonistische Aktivität am Histamin- H_1 -Rezeptor aufwies, verhielten sich alle neu synthetisierten Verbindungen im Meerschweinchen-Ileum als partielle Agonisten des Histamin- H_1 -Rezeptors mit intrinsischen Aktivitäten zwischen 26 und 55 % und einer relativen Potenz von 85 - 955 % der Histamin-Wirkung (**HA**, 100 %). Das Phenylethyl-Derivat **45** erwies sich mit einer Aktivität von 350 % äquipotent zu Methylhistaprodifen (**1**), einer der Leitverbindungen der N^{α} -substituierten Histaprodifene. Bei der homologen Phenylpropyl-Verbindung (**PPH**) dagegen wurde ein Abfall in Potenz und intrinsischer Aktivität etwa um den Faktor 2 beobachtet. Erneute Kettenverlängerung zum Butyl-Derivat (**2**) bewirkte einen starken Anstieg der H_1 -agonistischen Potenz. Mit Verwendung längerer Alkyl-Ketten sank die Affinität zum Histamin- H_1 -Rezeptor wieder ab. Während sich die Phenylpentyl-Verbindung **46** mit annähernd 4-facher Histamin-Wirkung noch als potenter partieller Agonist im Meerschweinchen-Modell erwies, ging die Aktivität bei Verwendung eines Hexyl-Spacers (**47**) nahezu verloren.

Übereinstimmend mit früher erzielten Ergebnissen^{82,87} zeigte Verbindung **2**, deren Phenyl-Ring einen Abstand von vier CH_2 -Einheiten zum N^{α} -Stickstoff besitzt, mit 10-facher Histamin-Wirkung und einer intrinsischen Aktivität von 50 % in dieser Reihe die höchste Potenz am Histamin- H_1 -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileums.

Tab. 3.2.1 *N*^α-Phenylalkyl-Histaprodifene **44** - **47**

Nr.	R	n	Agonismus			Mepyramin
			pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
44		1	pD'₂ = 5.66 ± 0.05			-
45		2	7.24 ± 0.05	350	55 ± 3	8.91 ± 0.12
PPH		3	6.80 ± 0.07	126	26 ± 3	9.23 ± 0.12
2		4	7.68 ± 0.04	955	49 ± 2	8.93 ± 0.13
46		5	7.29 ± 0.07	386	50 ± 2	8.89 ± 0.14
47		6	6.63 ± 0.07	85	28 ± 2	8.71 ± 0.17
111		4	n.b.	n.b.	6 ± 3	n.b.
HA			6.70 ± 0.03	100	100	9.07 ± 0.03
1^a	H	1	7.24 ± 0.02	343	99 ± 1	9.13 ± 0.06

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 1.2.1, Tab. 1.2.1.

Die Abnahme von agonistischer Potenz und intrinsischer Aktivität bei Übergang von einem Phenylethyl- (**45**) auf ein Phenylpropyl-Derivat (**PPH**) und der starke Anstieg von Potenz und Maximaleffekt bei Kettenverlängerung um eine weitere CH₂-Einheit (**2**) deutet auf eine entscheidende Rolle der konformativen Ausrichtung des Phenyl-Rings für die Rezeptorbindung hin.

Der nahezu vollständige Wirkungsverlust bei Austausch des terminalen Phenyl-Rings der potenten Verbindung **2** durch einen gesättigten Cyclohexan-Ring (**111**) lieferte einen ersten Hinweis auf die Notwendigkeit einer aromatischen Struktur in der Seitenkette für Aktivität und Affinität von *N*^α-substituierten Histaprodifenen.

Die kontraktile Effekte aller agonistisch wirksamen N^{α} -Phenylalkyl-Histaprodifene konnten durch den Referenz- H_1 -Antagonisten Mepyramin inhibiert werden. Die hohe Übereinstimmung der hier für Mepyramin ermittelten pA_2 -Werte mit den Literaturwerten an H_1 -Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileums ließ auf eine ausschließlich durch H_1 -Rezeptoren vermittelte agonistische Wirkung dieser Verbindungen schließen.

3.2.1.2 N^{α} -Thienylalkyl-Histaprodifene

Um die generelle Gültigkeit der für die Phenylalkyl-Histaprodifene erhaltenen Struktur-Wirkungsbeziehungen zu überprüfen, wurden in der Folge weitere Serien von N^{α} -substituierten Histaprodifen mit variierender Länge des Alkyl-Spacers und einem ω -ständigen aromatischen Rest dargestellt. Zugleich sollte untersucht werden, inwiefern die Art des endständigen Aromaten die Rezeptorbindung beeinflusst. Dazu wurde der Phenyl-Rest durch eine bioisostere Thienyl-Gruppe substituiert. Die Darstellung von stellungsisomeren 2- und 3-verknüpften Thienyl-Reihen ermöglichte Rückschlüsse auf den Einfluß der Stellung des Heteroatoms zur Alkyl-Kette auf die H_1 -agonistische Aktivität und Affinität der Verbindungen.

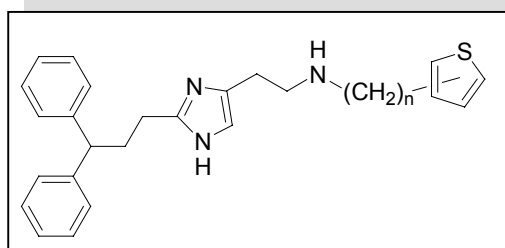
Tabelle 3.2.2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der pharmakologischen Testung dieser Verbindungen.





Die neu synthetisierten Verbindungen **84 - 87** (2-Thienylalkane) und **88 - 91** (3-Thienylalkane) verhielten sich im Meerschweinchen-Ileum als partielle Agonisten.

In Analogie zur Phenylalkyl-Reihe erreichte die Potenz der Verbindungen in beiden Reihen bei Verwendung einer Butyl-Kette (**86, 90**) ein Optimum und fiel bei weiterer Kettenverlängerung wieder ab. Auch der alternierende Aktivitätsverlauf von einer Ethyl- über eine Propyl- zur Butyl-Kette wurde bestätigt (Abb. 3.2-1).

Die Verbindungen der 2-Thienylalkyl-Reihe (**84 - 87**) wiesen dabei gegenüber den Verbindungen der Phenylalkyl-Reihe (**PPH, 2** und **45 - 47**) etwa um den Faktor 3 abgeschwächte Potenzen auf. In dieser Reihe war der Einfluß der Kettenlänge des Spacers weniger stark ausgeprägt als in der Phenyl- und der isosteren 3-Thienyl-Reihe.

Die 3-Thienylalkyl-substituierten Derivate **88 - 91** dagegen erwiesen sich zu den Phenylalkanen äquipotent bzw. konnten deren Potenz bei leicht erhöhter intrinsischer Aktivität geringfügig übertreffen.

Tab. 3.2.2 *N*^α-Thienylalkyl-Histaprodifene **84** - **91**

Nr.	R	n	Agonismus			Mepyramin
			pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
84		2	7.25 ± 0.07	352	53 ± 3	8.90 ± 0.11
85		3	7.07 ± 0.04	235	41 ± 3	8.97 ± 0.05
86		4	7.34 ± 0.11	433	43 ± 3	9.16 ± 0.09
87		5	7.22 ± 0.06	327	29 ± 4	8.62 ± 0.14 ^a
88		2	7.57 ± 0.10	733	61 ± 2	8.71 ± 0.11
89		3	6.90 ± 0.08	158	24 ± 2	8.95 ± 0.12 ^a
90		4	7.71 ± 0.08	1016	52 ± 3	9.13 ± 0.07
91		5	7.27 ± 0.10	372	38 ± 4	9.35 ± 0.10 ^a
HA			6.70 ± 0.03	100	100	9.07 ± 0.03
2^b			7.68 ± 0.04	955	49 ± 2	8.93 ± 0.13

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'₂). ^b Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 3.2.1.1.1, Tab. 3.2.1.

Die im wesentlichen höhere Potenz der 3-substituierten Thienyl-Derivate gegenüber ihren 2-Thienyl-Analogen läßt eine zusätzliche Stabilisierungsmöglichkeit der Rezeptorbindung für dieses Stellungsisomer vermuten.

Wie bei den Phenylalkyl-Derivaten konnte auch bei allen Thienylalkyl-Verbindungen die reine Histamin-H₁-Rezeptor-Vermittlung der kontraktile Effekte im Meerschweinchen-Ileum durch ihre Inhibierbarkeit durch den Referenzantagonisten Mepyramin sichergestellt werden. Die Effekte der Verbindungen **87**, **89** und **91** beruhten auf einem nicht-kompetitiven Mechanismus und wurden daher in Tab. 3.2.2 als pD'₂-Werte angegeben.

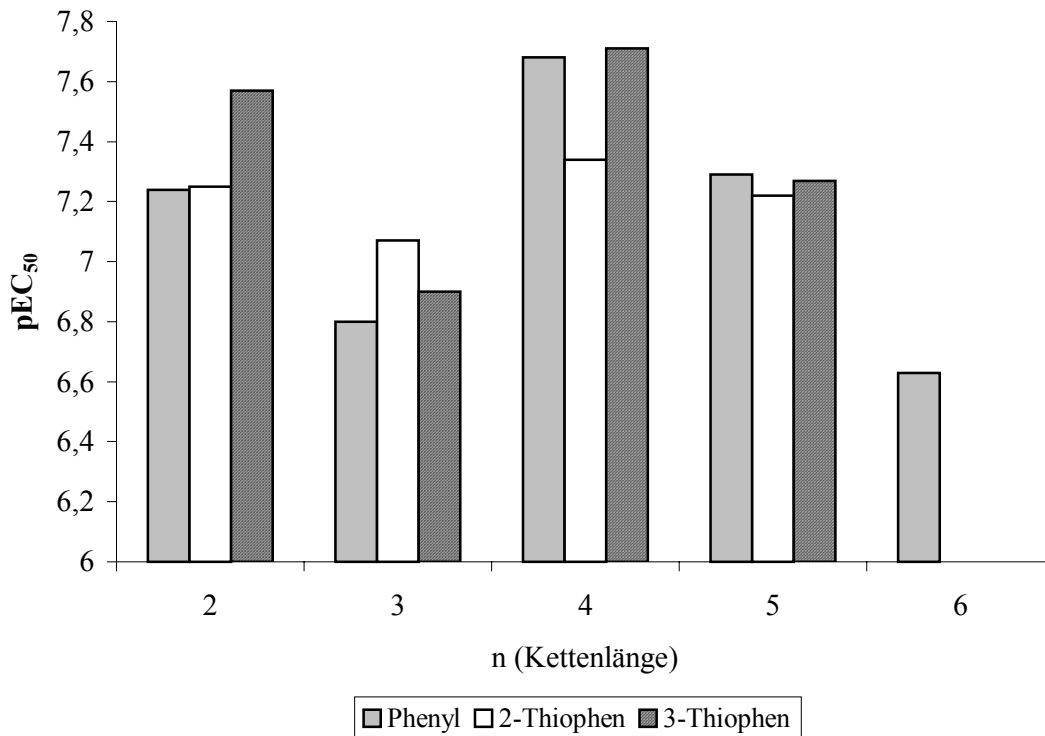


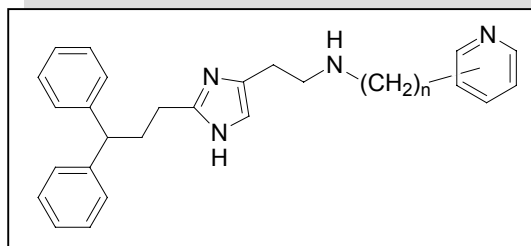
Abb. 3.2-1 N^α -Phenylalkyl- und N^α -Thienylalkyl-Histaprodifene: Kettenlänge und Aktivität

3.2.1.3 N^α -Pyridylalkyl-Histaprodifene

In der Klasse der N^α -substituierten Histamine hatte sich gezeigt, daß die Einführung von Imidazolyethyl-Substituenten gut toleriert wurde.^{82,83,87} Die Übertragung dieser Beobachtung auf die Histaprodifene führte zur Entwicklung von Suprahistaprodifen (**3**), dem bislang potentesten Histaprodifen-Derivat am Meerschweinchen-Ileum.⁹⁴

Ähnlich positive Ergebnisse hatten sich bei Verwendung von schwächer basischen, lipophilen 2-Pyridylethyl-Resten ergeben.^{82,83,87} Daher wurden analog zu diesen Verbindungen Histaprodifen-Derivate mit Pyridylalkyl-Seitenkette dargestellt. Hierbei sollte die Synthese stellungsisomerer *ortho*-, *meta*- und *para*-Pyridyl-Reihen Aufschluß über die optimale Position des Heteroatoms zur Alkyl-Seitenkette ermöglichen. Um zudem die Übertragbarkeit der optimalen Kettenlänge auf basisch substituierte Arylalkyl-Seitenketten zu überprüfen, wurde die Länge des Alkyl-Spacers innerhalb der Pyridylalkyl-Reihen erneut von 1 - 5 CH_2 -Einheiten variiert.

Die Ergebnisse der routinemäßigen Testung im Meerschweinchen-Ileum sind in Tabelle **3.2.3** aufgeführt.

Tab. 3.2.3 *N*^α-Pyridylalkyl-Histaprodifene **48** und **92** - **104**

Nr.	R	n	Agonismus			Mepyramin
			pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
92		1	pA ₂ < 6.0			-
48		2	7.67 ± 0.05	923	92 ± 1	8.76 ± 0.06
93		3	7.67 ± 0.04	930	80 ± 2	8.78 ± 0.05
94		4	8.17 ± 0.06	2968	89 ± 1	8.95 ± 0.05
95		5	7.76 ± 0.03	1142	81 ± 2	8.72 ± 0.04
96			2	7.11 ± 0.03	254	64 ± 3
97	3		6.93 ± 0.06	169	48 ± 4	8.74 ± 0.09
98	4		7.87 ± 0.05	1479	88 ± 1	8.77 ± 0.05
99	5		7.65 ± 0.05	885	80 ± 2	8.83 ± 0.11
100		1	pA ₂ = 5.78 ± 0.09			-
101		2	6.94 ± 0.09	174	78 ± 3	8.83 ± 0.06
102		3	6.67 ± 0.07	92	39 ± 4	8.49 ± 0.09 ^a
103		4	7.66 ± 0.10	912	83 ± 1	8.95 ± 0.06
104		5	7.14 ± 0.07	273	47 ± 5	8.63 ± 0.10 ^a
HA			6.70 ± 0.03	100	100	9.07 ± 0.03
2^b			7.68 ± 0.04	955	49 ± 2	8.93 ± 0.13

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'₂). ^b Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 3.2.1.1.1, Tab. 3.2.1.

Mit Ausnahme der Pyridylmethyl-Derivate **92** und **100** verhielten sich alle Verbindungen der Pyridyl-Reihen als potente partielle Agonisten des Histamin- H_1 -Rezeptors.

In Analogie zur Benzyl-substituierten Verbindung **44** zeigten **92** und **100**, bei denen der Pyridin-Ring über eine Methylen-Brücke mit dem N^α -Stickstoff des Histaprodifens verknüpft ist, antagonistische Aktivität am H_1 -Rezeptor. Somit scheint ein Abstand von mindestens zwei CH_2 -Einheiten zwischen dem N^α -Stickstoff und der aromatischen Funktion der Seitenkette eine wichtige Voraussetzung für eine agonistische Aktivität am Histamin- H_1 -Rezeptor zu sein.

Das 2-Pyridyl-Derivat **48** erwies sich als äquipotent mit Phenylbutylhistaprodifen (**2**) und dem Thienyl-Derivat **90**, zeigte jedoch mit einem E_{\max} -Wert von $92 \pm 1\%$ deutlich erhöhte intrinsische Aktivität.

In der 2-Pyridyl-Reihe war das Propyl-Derivat **93** äquipotent mit seinem kürzerkettigen Homologen **48**, in der 3- und 4-Pyridyl-Reihe wurde bei Verwendung eines Propyl-Spacers wie zuvor bei den Phenyl- und Thienyl-Derivaten ein Abfall von Potenz und intrinsischer Aktivität beobachtet.

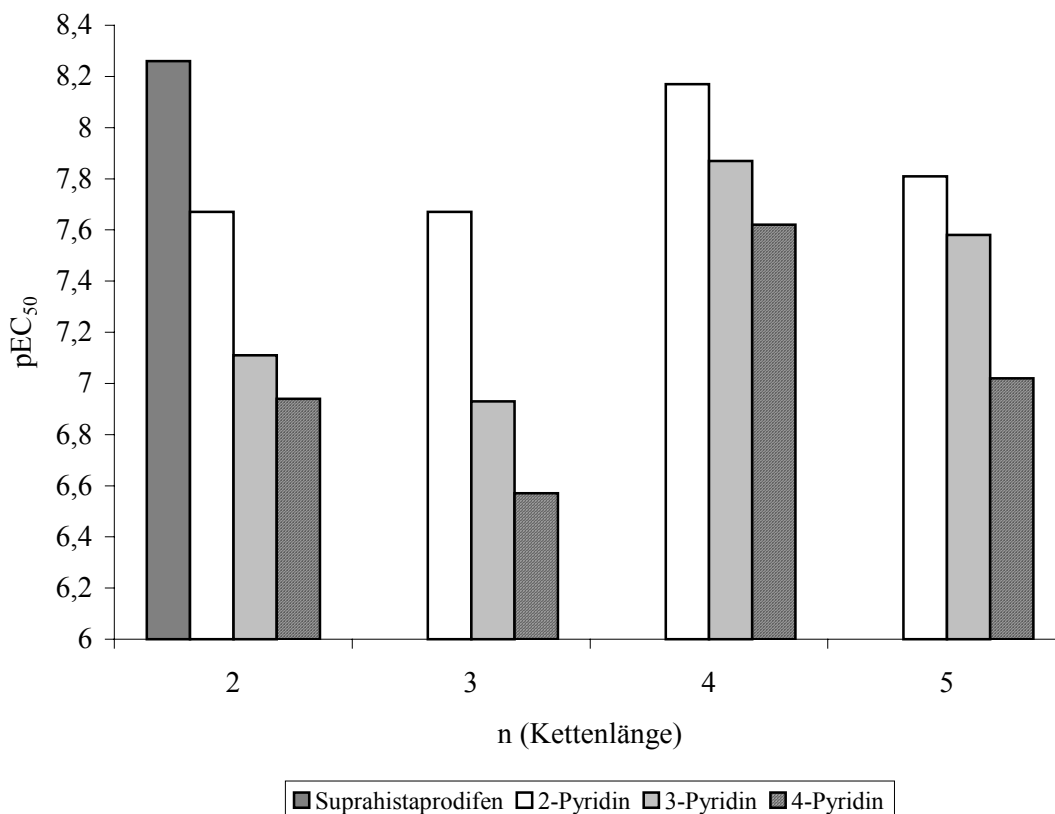


Abb. 3.2-2 N^α -Pyridylalkyl-Histaprodifene: Kettenlänge und Aktivität

In Analogie zu den „neutralen“ Phenyl- und Thienylalkyl-Histaprodifenen wurde auch bei den basischen Pyridyl-Derivaten unabhängig von der Position des Pyridin-Stickstoffs zur Alkyl-Seitenkette ein Optimum bei Verwendung eines 4-gliedrigen Alkyl-Spacers beobachtet (**94**, **98** und **103**) (Abb. 3.2-2).

Das 2-Pyridylbutyl-Derivat **94** erwies sich als potentester partieller Agonist in der Reihe der basisch substituierten N^{α} -Arylalkyl-Histaprodifene. Mit etwa 30-facher Histamin-Wirkung und einer intrinsischen Aktivität von $89 \pm 1\%$ ist diese Verbindung nahezu äquipotent mit der Leitstruktur Suprahistaprodifen (**3**), dem potentesten bisher in der Literatur beschriebenen partiellen Agonisten des Histamin- H_1 -Rezeptors im Meerschweinchen-Ileum.

Mit erneuter Kettenverlängerung zu einem Spacer mit fünf CH_2 -Einheiten (**95**, **99** und **104**) wurde auch bei den Pyridyl-Derivaten unabhängig vom Substitutionsmuster ein Abfall von agonistischer Potenz und Maximaleffekt beobachtet.

Die Potenz der Verbindungen nahm in der Reihenfolge *ortho*-Pyridyl > *meta*-Pyridyl > *para*-Pyridyl ab. Die Übereinstimmung dieser Ergebnisse mit früheren Beobachtungen⁸² deutet darauf hin, daß sich eine Nachbarschaft des basischen Zentrums zur Alkyl-Seitenkette besonders günstig auf die Rezeptorbindung auswirkt.

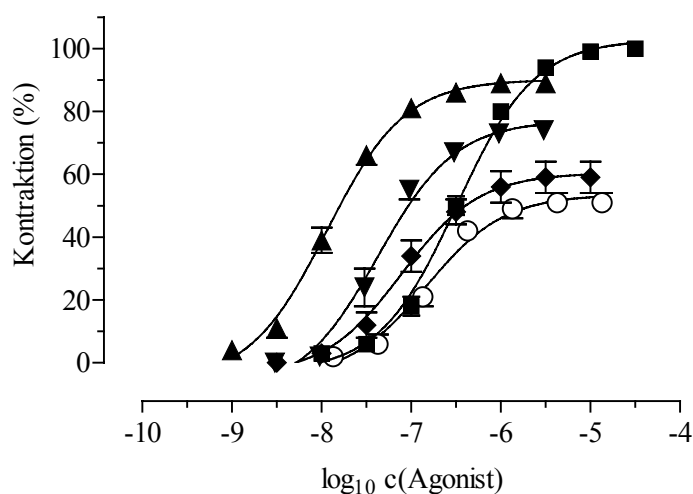


Abb. 3.2-3 Konzentrations-Wirkungskurve von Histamin (■) und **94** in Abwesenheit (▲) und Anwesenheit (▼ 3 nM, ◆ 10 nM, ○ 30 nM) von Mepyramin

Wie schon für die Verbindungen mit „neutralen“ ω -ständigen Substituenten wurde auch hier die Verdrängung des Referenz- H_1 -Antagonisten Mepyramin am Meerschweinchen-Ileum gemessen, um sicherzustellen, daß der beobachtete Effekt auf reiner H_1 -Rezeptor-Vermittlung beruht. Wie aus Tab. 3.2.3 ersichtlich, erwiesen sich alle durch agonistisch aktive Verbindungen ausgelösten Effekte als Mepyramin-sensitiv. Die Ähnlichkeit der pA_2 -Werte

dieser Reihe zu den Literaturwerten für Mepyramin^{245,246} weist auf eine überwiegend selektive Antagonisierung der vermittelten Effekte durch Mepyramin hin. Jedoch wurde bei zahlreichen Verbindungen neben einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve auch eine konzentrationsabhängig zunehmende Depression des Maximaleffektes beobachtet (Abb. 3.2-3).

Als Ursache für dieses Phänomen, das häufig bei Agonisten mit geringer intrinsischer Aktivität zu beobachten ist, kommt neben der Beteiligung anderer Rezeptor-Bindungsstellen oder einer Abnahme der Rezeptor-Sensitivität insbesondere eine pseudoirreversible Hemmung des Rezeptors in Frage. Hierbei erfolgt die Dissoziation des *Mepyramin/Rezeptor*-Komplexes verlangsamt, so daß die Assoziation des *Agonist/Rezeptor*-Komplexes gestört und quasi nur ein „Halbgleichgewicht“ zwischen Agonist und Antagonist am Rezeptor zu beobachten ist.²⁴⁷

Für die *para*-Pyridyl-Verbindungen **102** und **104** dagegen wurde eine nicht-kompetitive Hemmung der agonistischen Effekte durch Mepyramin ermittelt.

3.2.1.4 *N*^α-Imidazolylalkyl-Histaprodifene

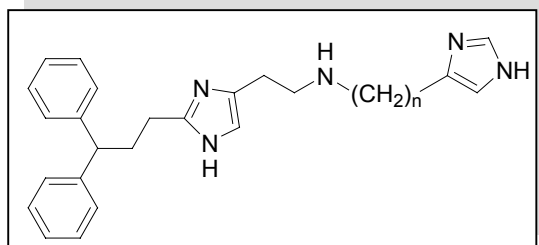
Die Ergebnisse aus der Reihe der Pyridylalkane ließen hoffen, daß die Potenz von Suprahistaprodifen (**3**), des bislang potentesten Histamin-H₁-Rezeptor-Agonisten, durch Ersatz der Ethylen-Gruppe durch einen Butyl-Spacer nochmals erhöht werden könnte. Daher wurden in der Folge die zu **3** homologen Verbindungen mit einem Propyl- (**105**) bzw. Butyl-Spacer (**106**) synthetisiert (Tab. 3.2.4).

Auf die Synthese der Imidazolylmethyl- und der Imidazolylpentyl-Verbindung wurde aufgrund der Ergebnisse der vorhergegangenen Reihen in dieser Serie verzichtet.

Interessanterweise ließen sich die Ergebnisse der Phenyl-, Thienyl- und Pyridylalkane nicht auf die Imidazolylalkyl-Histaprodifene übertragen (Tab. 3.2.4).

Während das Propyl-Derivat **105** mit einer Potenz von rund 1450 % relativ zu Histamin und einer intrinsischen Aktivität von 95 % noch einen sehr potenten Agonisten des Histamin-H₁-Rezeptors darstellte, wies das Butyl-Derivat **106** gegenüber **3** eine um den Faktor 20 verringerte relative Potenz und deutlich niedrigere intrinsische Aktivität auf. Damit zeigte diese Verbindung nur geringfügig höhere Aktivität am Histamin-H₁-Rezeptor als das biogene Amin Histamin.

Tab. 3.2.4 *N*^α-Imidazolylalkyl-Histaprodifene **3**, **105** und **106** im Vergleich zu verschiedenen Mono- und Dimeren



Nr.	n	Agonismus			Mepyramin
		pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
383	2	8.26 ± 0.06	3630	96 ± 1	8.83 ± 0.04
105	3	7.87 ± 0.05	1468	95 ± 1	8.73 ± 0.08
106	4	6.91 ± 0.06	163	86 ± 4	8.77 ± 0.05
HA		6.70 ± 0.03	100	100	9.07 ± 0.03
2-PEA^a		5.45	5.6	n.b.	n.b.
HP^a		6.74 ± 0.05	111	100	9.11 ± 0.04
1^a		7.24 ± 0.02	343	99 ± 1	9.13 ± 0.06
BisHP^a		7.93 ± 0.05	1679	69 ± 2	9.05
BisMHP^a		7.56	720	55	n.d.
48^b		7.67 ± 0.05	923	92 ± 1	8.76 ± 0.06

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 1.2.1, Tab. 1.2.1. ^b Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 3.2.1.2.1, Tab. 3.2.3.

Die Überprüfung der Mepyramin-Sensitivität der erzeugten Effekte ließ auf eine reine H₁-Rezeptor-Vermittlung schließen.

Die Ursachen für die massiven Potenzunterschiede zwischen Suprahistaprodifen (**3**) und seinen längerkettigen Homologen können kontrovers diskutiert werden.

3 ist formal als Amalgam aus Histaprodifen und einem zusätzlichen Histamin bzw. als substituiertes Dimer des biogenen Amins Histamin zu betrachten (Abb. 3.2-4).

Damit stellt diese Verbindung eine Kombination der Strukturen zweier potenter Agonisten des Histamin-H₁-Rezeptors, den Pharmakophoren Histaprodifen und Histamin, dar, wobei sie deutlich erhöhte Aktivität aufweist.

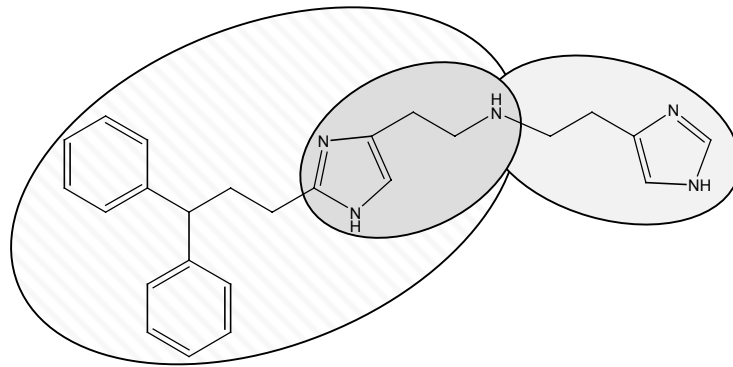


Abb. 3.2-4 Strukturelemente des Suprahistaprodifens (**3**)

Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen bietet die von *Portoghese*²⁴⁸ postulierte sogenannte „bivalent ligand approach“.²⁴⁸⁻²⁵⁰ Entsprechend dieser Theorie beruht die Potenzsteigerung einer bivalenten Verbindung im Vergleich zu ihren Monomeren auf einer möglichen Besetzung von zwei sehr ähnlichen oder identischen benachbarten Erkennungsstellen. Als bivalente Liganden sind dabei nicht nur die Dimere von Agonisten bzw. Antagonisten eines Rezeptors zu betrachten, sondern alle Verbindungen mit zwei diskreten Erkennungsstellen (Pharmakophoren), die über einen Spacer miteinander verbunden sind,²⁴⁸ wobei der Abstand zwischen den beiden Pharmakophoren von entscheidender Bedeutung für die Potenz der Verbindungen ist. Die optimale Länge des Spacers ist abhängig vom Rezeptor(subtyp) und kann auch bei $n = 0$ liegen.^{248,249}

Neben der Überbrückung von zwei Erkennungsstellen ist eine Erhöhung der Aktivität auch durch Wechselwirkung des zweiten Pharmakophors mit einer für das jeweilige Rezeptorsystem einzigartigen, akzessorischen Bindungsstelle möglich.^{248,249}

Nach dieser Theorie wäre die deutlich geringere Potenz der längerkettigen Homologen **105** und **106** des Suprahistaprodifens (**3**) durch das Fehlen einer bivalenten Struktur erklärbar.

Für ihre Anwendbarkeit auf Histamin-H₁-Rezeptor-Agonisten vom Histaprodifen-Typ spricht, daß auch die Dimere von Histaprodifen (**HP**) (*N,N*-Bis(2-(2-(3,3-diphenylpropyl)-1*H*-imidazol-4-yl)ethyl)amin, **BisHP**) und Methylhistaprodifen (**1**) (*N*-Methyl-*N,N*-bis(2-(2-(3,3-diphenylpropyl)-1*H*-imidazol-4-yl)ethyl)amin, **BisMHP**) sowie Verbindung **48**, die ein Amalgam aus Histaprodifen (**HP**) und 2-Pyridylethanamin (**2-PEA**) darstellt, gegenüber ihren Monomeren deutlich erhöhte Potenz zeigen (Tab. **3.2.4**).

Nicht erklärbar ist mit dieser Theorie jedoch die Verdreifachung der H₁-agonistischen Potenz des längerkettigen Homologen **94** der Pyridyl-Verbindung **48**, die nur einen Pharmakophor besitzt; möglich wäre allerdings auch hier eine Wechselwirkung mit einer akzessorischen Bindungsstelle.

Ein zweiter Erklärungsansatz für das pharmakologische Verhalten der Imidazolylalkyl-substituierten Histaprodifene basiert auf der doppelten Histamin-Struktur des Suprahistaprodifen (**3**) (Abb. **3.2-4**).

Mit dem Vorhandensein von zwei Histamin-Partialstrukturen erhebt sich die Frage, über welches dieser Elemente die Rezeptorbindung primär erfolgt. Theoretisch ist für diese Verbindung neben dem in Kapitel **1.2.2.2** beschriebenen Bindungsmodell für Histaprodifen-Derivate auch eine primäre Bindung über das terminale Histamin-Element möglich, wodurch der Bindungsmodus gegenüber den übrigen Histaprodifenen drastisch verändert wäre. In diesem Fall könnte sich eine Verlängerung der Ethanamin-Seitenkette um eine (**105**) bzw. zwei CH₂-Einheiten (**106**) -wie schon bei Homohistamin beobachtet (Kap. **1.2.1**)⁸⁰- in einem drastischen Aktivitätsabfall durch gestörte Wechselwirkungen mit Asp¹⁰⁷ des H₁-Rezeptorproteins äußern.

Die bisherigen Ergebnisse sind jedoch nicht ausreichend, um diese Theorie eindeutig zu belegen; zur Bestätigung ist die Darstellung zahlreicher Analoga des Suprahistaprodifens, insbesondere die Modifizierung der Imidazolylethyl-Seitenkette, wie durch Alkylierung der Seitenkette in α -Position, der Imidazol-Funktion in 2-Position oder des N^r-Stickstoffs, erforderlich, um das Ausmaß der Auswirkungen kleiner struktureller Veränderungen auf die Rezeptoraktivität und -affinität zu erforschen.

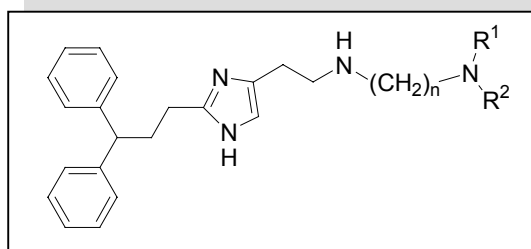
Denkbar wäre auch, daß die unterschiedlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen auf unterschiedliche Bindungseigenschaften des stärker basischen, hydrophileren und bifunktionalen Imidazol-Rings (2 Stickstoff-Atome) im Vergleich zu den lipophileren, maximal monofunktionalen Phenyl-, Thienyl- und Pyridyl-Analoga (0 - 1 Heteroatome) an der Agonisten-Bindungsstelle des Histamin-H₁-Rezeptors des Meerschweinchen-Ileums zurückzuführen ist. In diesem Fall könnte Suprahistaprodifen (**3**) optimal an die Rezeptor-Bindungsstelle angelagert werden, während weitere Kettenverlängerung (**105**, **106**) die Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein negativ beeinflusst.

3.2.1.5 N^{α} -Aminoalkyl-Histaprodifene

Der Verlust agonistischer Potenz bei Substitution eines Aromaten durch einen gesättigten Cyclohexan-Ring (Kap. 3.2.1) lieferte einen ersten Hinweis, daß ein terminaler Aromat oder Heteroaromat ein essentielles Strukturmerkmal für hohe agonistische Wirkung am Histamin- H_1 -Rezeptor darstellen könnte. Da eine Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der Potenz in der Reihe der Imidazolylalkane auf der größeren Basizität und geringeren Lipophilie des Imidazol-Rests im Vergleich zu einem Pyridin-Ring basiert, sollte in der Folge die Bedeutung des terminalen lipophilen Restes und der Einfluß der Basenstärke auf die Affinität der Histaprodifene untersucht werden. Dazu wurde die Arylalkyl-Seitenkette durch eine hydrophile, stark basische Aminoalkyl-Seitenkette ersetzt.

Die Ergebnisse der pharmakologischen Testung dieser Verbindungen sind in Tab. 3.2.5 zusammengefaßt.

Tab. 3.2.5 N^{α} -Aminoalkyl-Histaprodifene 107 - 110 und 112



Nr.	R^1	R^2	n	Agonismus			Mepyramin
				$pEC_{50} \pm SEM$	Rel. Pot. [%]	$E_{max} \pm SEM$ [%]	$pA_2 \pm SEM$
107	H	H	2	n.b.	n.b.	19 ± 5	n.b.
108	H	H	3	5.50 ± 0.07	6.3	81 ± 3	9.11 ± 0.03^a
109	H	H	4	5.47 ± 0.09	5.8	87 ± 2	9.08 ± 0.07
110	H	H	5	5.84 ± 0.13	7.2	92 ± 4	8.91 ± 0.05^a
112	$\begin{array}{c} -H_2C-H_2C \\ \\ -H_2C-H_2C \\ \\ CH_2 \end{array}$		4	$pA_2 = 6.17 \pm 0.11$			-
HA				6.70 ± 0.03	100	100	9.07 ± 0.03

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'_2).

Die primären Amin-Verbindungen **107 - 110** mit 2 - 5 CH₂-Einheiten stellten schwache Agonisten des Histamin-H₁-Rezeptors dar.

Die Potenz aller Verbindungen war gegenüber Histamin etwa um den Faktor 20 verringert. Aufgrund der geringen Aktivität war innerhalb dieser Reihe kein formaler Zusammenhang zwischen Kettenlänge und Aktivität der Verbindungen bestimmbar. Trotz ihrer geringen Potenz wiesen die Verbindungen mit einem 3 - 5gliedrigen Alkyl-Spacer (**108 - 110**) mit Werten um 90 % eine hohe intrinsische Aktivität auf.

Bei Einführung einer lipophileren, aber ebenfalls stark basischen *N*-Piperidinobutyl-Seitenkette verlor die Verbindung ihre agonistische Aktivität. Verbindung **112** erwies sich als schwacher Antagonist des Histamin-H₁-Rezeptors.

Die Effekte aller primären Amin-Verbindungen ließen sich durch Mepyramin kompetitiv inhibieren.

Diese Ergebnisse lassen wichtige Rückschlüsse auf Struktur-Wirkungsbeziehungen zu.

Der deutliche Verlust an agonistischer Potenz bei Fehlen einer (hetero)aromatischen Funktion in der Histaprodifen-Seitenkette zeigt die entscheidende Bedeutung dieser Funktion für die Potenz der Verbindungen.

Eine basische Funktion in der Seitenkette scheint eine wichtige Voraussetzung für hohe intrinsische Aktivität zu sein.

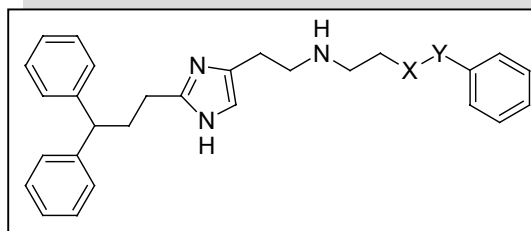
3.2.1.6 Modifikationen des Spacers

Die Schaffung von polaren Zentren mittels Einführung von Heteroatomen in den Alkyl-Spacer bietet zusätzliche Möglichkeiten für Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein. Potentiell kann hierdurch eine Steigerung von Aktivität und Affinität von Verbindungen zu ihrem Rezeptor erzielt werden.

Mögliche positive Auswirkungen der Einführung polarer Elemente in den Spacer sollten auch für die Klasse der *N*^α-substituierten Histaprodifene untersucht werden. Als Ausgangsverbindung für diese Modifikationen wurde die potente Leitstruktur 4-Phenylbutylhistaprodifen (**2**) verwendet, da diese den optimalen Butyl-Spacer, jedoch keine polaren Elemente in der *N*^α-Seitenkette aufwies, die durch zusätzliche Wechselwirkungen mit der Rezeptor-Bindungsstelle die Interpretation der Ergebnisse erschweren könnten. Durch Substitution einzelner Methylen-Einheiten durch Sauerstoff- bzw. Stickstoff-Funktionen entstanden die Ether- und Amin-Analoga **113 - 116** der Leitverbindung **2**.

Die Ergebnisse der Testung dieser Verbindungen am isolierten Meerschweinchen-Ileum sind in Tab. 3.2.6 zusammengestellt.

Tab. 3.2.6 Histaprodifene mit modifiziertem Spacer



Nr.	X	Y	Agonismus			Mepyramin
			pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
113	-CH ₂ -	-O-	7.10 ± 0.07	251	47 ± 2	> 9.0
114	-O-	-CH ₂ -	pA ₂ = 6.40 ± 0.03			-
115	-CH ₂ -	-NH-	6.84 ± 0.07	148	45 ± 3	> 9.0
116	-NH-	-CH ₂ -	pA ₂ = 5.94 ± 0.05			-
1 ^a			7.24 ± 0.02	343	99 ± 1	9.13 ± 0.06
2 ^a			7.68 ± 0.04	955	49 ± 2	8.93 ± 0.13

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 1.2.1, Tab. 1.2.1.

Die Phenolether-Verbindung **113** und die Anilin-Verbindung **115** erwiesen sich als potente Agonisten des Histamin-H₁-Rezeptors. Sie zeigten sich im Meerschweinchen-Ileum annähernd äquipotent mit Methylhistaprodifen (**1**). Gegenüber ihrer Leitstruktur **2** wiesen sie jedoch eine um den Faktor 3 geringere Potenz auf. Die intrinsische Aktivität wurde durch die Einführung der Heteroatome in Position Y kaum beeinflusst. Auffällig war, daß Verbindung **115**, die formal ein phenyl-substituiertes Analogon von **108** darstellt (pEC₅₀ = 5.50 ± 0.07, Tab. 3.2.5), eine im Vergleich deutlich höhere Potenz am H₁-Rezeptor zeigte.

Die Verschiebung des Heteroatoms um eine CH₂-Einheit in Richtung N^α-Atom zur Benzylether- (**114**) bzw. Benzylamin-Verbindung (**116**) dagegen wurde nicht toleriert. Die Verbindungen verhielten sich im Meerschweinchen-Ileum als schwache Antagonisten.

Im Gegensatz zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen konnte die intrinsische Aktivität der Verbindungen durch Einbau einer basischen Funktion in den Spacer nicht positiv beeinflusst werden.

Die gute Übereinstimmung der pA_2 -Werte, die für Mepyramin gegen die Verbindungen **113** und **115** ermittelt wurden, mit den für Mepyramin publizierten Literaturwerten^{245,246} am H_1 -Rezeptor ließ auf eine H_1 -Rezeptor-Vermittlung der ausgelösten Effekte schließen.

3.2.1.7 Substituierte 4-Phenylbutyl-Histaprodifene

Die Aktivität von Rezeptor-Liganden kann häufig durch Einführung von Substituenten in vorhandene aromatische Funktionen positiv beeinflusst werden. Diese Möglichkeit wurde an der Leitverbindung 4-Phenylbutylhistaprodifen (**2**) untersucht. Die Aufklärung dieser Struktur-Wirkungsbeziehungen erfordert die Darstellung einer Vielzahl substituierter 4-Phenylbutyl-Histaprodifene mit elektronenschiebenden und -ziehenden, polaren und unpolaren Substituenten in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch die *ortho*- (**117**) und *para*-Nitro-Verbindungen (**118**) und die *para*-Amino-Verbindung (**119**) dargestellt, um erste Einblicke in die Auswirkungen von mesomeren oder induktiven Effekten sowie von basischer Substitution auf Aktivität und Affinität der Histaprodifene zu erhalten.

Die pharmakologischen Ergebnisse dieser Substanzen sind in Tab. **3.2.7** aufgeführt.

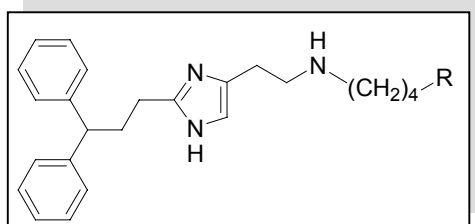
Die ringsubstituierten Verbindungen **117** – **119** erwiesen sich als partielle Agonisten des Histamin- H_1 -Rezeptors.

Die Einführung einer Nitro-Funktion in *ortho*- oder *para*-Position des Phenyl-Rings zeigte negative Effekte. Die Potenz beider Verbindungen war verglichen mit Phenylbutylhistaprodifen (**2**) etwa um den Faktor 10 abgesenkt und lag auf dem Niveau von Histamin. Das *ortho*-Nitro-Derivat zeigte dabei tendenziell höhere agonistische Aktivität.

Nach Reduktion der *para*-Nitro-Funktion (**118**) zu einem Amin (**119**) war eine 10-fach höhere Potenz zu beobachten, so daß **119** annähernd äquipotent mit der Ausgangsverbindung **2** war.

Die intrinsischen Aktivitäten dieser Verbindungen stimmten weitgehend mit dem E_{max} -Wert von Phenylbutylhistaprodifen (**2**) überein und blieben von der Einführung einer Amin-Funktion unbeeinflusst.

Tab. 3.2.7 Ringsubstituierte Phenylbutylhistaprodifene 117 – 119



Nr.	R	Agonismus			Mepyramin
		pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
117		6.81 ± 0.04	130	43 ± 6	8.89 ± 0.03
118		6.74 ± 0.08	91	57 ± 2	> 9.0 ^b
119		7.59 ± 0.03	779	49 ± 2	8.85 ± 0.04
HA		6.70 ± 0.03	100	110	9.07 ± 0.03
2 ^a		7.68 ± 0.04	955	49 ± 2	8.93 ± 0.13

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 3.2.1.1, Tab. 3.2.1. ^b pD₂-Wert.

Die Überprüfung der Mepyramin-Sensitivität der ausgelösten Effekte bestätigte deren überwiegende Vermittlung über Histamin-H₁-Rezeptoren.

Die Beurteilung dieser Ergebnisse ist aufgrund der geringen Anzahl an Verbindungen schwierig. Die höhere Aktivität der *ortho*-Nitro-Verbindung 117 läßt die Spekulation zu, ob ein Substituent in *ortho*-Position besser toleriert wird als in *para*-Position. Zur Klärung dieser Frage ist jedoch die Untersuchung einer Vielzahl weiterer, auch *meta*-substituierter Verbindungen nötig.

3.2.2 Rezeptoraffinität

Da pEC_{50} -Werte aufgrund des Phänomens der Rezeptorreserve für Agonisten nur ein ungefähres Maß für die *Agonist/Rezeptor*-Dissoziationskonstante (K_A) darstellen, wird zum Ausdruck der Affinität eines Partialagonisten zu seinem Rezeptor häufig zusätzlich die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des *Partialagonist/Rezeptor*-Komplexes (K_p) herangezogen.

Bei der Bestimmung der Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin in Gegenwart einer definierten Konzentration eines *partiellen* Agonisten erfolgt eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve des *vollen* Agonisten. Diese wird durch die antagonistische Wirkkomponente des Partialagonisten hervorgerufen, da beide Verbindungen um dieselben Bindungsstellen am Rezeptor konkurrieren.

Zur Bestimmung dieser Affinitätskenngröße wurde zunächst eine bekannte Konzentration des zu bestimmenden *partiellen* Agonisten (94, \blacktriangle) als Einmalgabe oder in kumulativer Technik im Organbad vorgelegt.

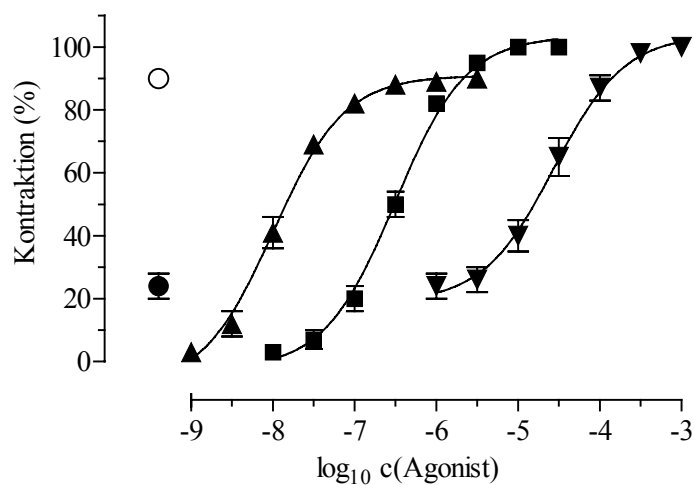


Abb. 3.2-5 Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin in Abwesenheit (■) und Anwesenheit von 94 (▼) und für 94 (▲)

Wie in Abb. 3.2-5 erkenntlich, sank der Maximaleffekt (○) nach Zugabe der letzten Konzentration des *partiellen* Agonisten (94, \blacktriangle) zeitabhängig ab (●). Nachdem der Effekt ein Niveau von 40 - 60 % des Ausgangswertes erreicht hatte, wurde am selben Organ eine Konzentrations-Wirkungskurve für den *vollen* Agonisten Histamin (▼) aufgenommen und die Histamin-Konzentration ermittelt, bei der in An- und Abwesenheit des *partiellen* Agonisten der gleiche Effekt erzeugt wurde.

Aus diesen Wertepaaren konnte der pK_p -Wert mittels einer gewichteten linearen Regression nach *Kaumann* und *Marano*^{241,242} ermittelt werden.

Tab. 3.2.8 gibt eine Übersicht über die Aktivitäts- und Affinitätswerte verschiedener N^a -substituierter Histaprodifene:

Tab. 3.2.8 Aktivität und Affinität N^a -substituierter Histaprodifene

Nr.	$pEC_{50} \pm SEM$	$pK_p \pm SEM$	Nr.	$pEC_{50} \pm SEM$	$pK_p \pm SEM$
45	7.13 ± 0.06	6.35 ± 0.08	96	7.11 ± 0.03	6.52 ± 0.07
46	7.29 ± 0.07	6.28 ± 0.11	97	6.93 ± 0.06	6.18 ± 0.06
47	6.63 ± 0.07	6.15 ± 0.05	98	7.87 ± 0.04	6.88 ± 0.12
84	7.25 ± 0.07	6.33 ± 0.08	99	7.58 ± 0.04	6.61 ± 0.07
85	7.07 ± 0.04	6.10 ± 0.09	101	6.94 ± 0.09	6.02 ± 0.06
86	7.34 ± 0.11	6.42 ± 0.12	102	6.57 ± 0.05	5.69 ± 0.10
87	7.22 ± 0.06	6.30 ± 0.12	103	7.62 ± 0.06	6.56 ± 0.10
88	7.57 ± 0.10	6.59 ± 0.13	104	7.02 ± 0.05	5.90 ± 0.05
89	6.90 ± 0.08	6.53 ± 0.09	3	8.26 ± 0.06	7.67 ± 0.05
90	7.71 ± 0.08	6.77 ± 0.08	105	7.87 ± 0.05	7.14 ± 0.06
91	7.27 ± 0.10	6.39 ± 0.03	106	6.91 ± 0.06	6.17 ± 0.14
48	7.67 ± 0.05	7.15 ± 0.06	108	5.50 ± 0.07	5.71 ± 0.10
93	7.67 ± 0.04	7.13 ± 0.14	109	5.47 ± 0.09	4.60 ± 0.10
94	8.16 ± 0.06	7.45 ± 0.07	113	7.10 ± 0.07	> 9.0
95	7.81 ± 0.02	6.74 ± 0.08	115	6.84 ± 0.07	6.06 ± 0.10

Beim Vergleich der Affinitäten (pK_p -Werte) der in dieser Arbeit beschriebenen Histaprodifen-Derivate mit deren Aktivität (pEC_{50} -Werte) am Histamin- H_1 -Rezeptor fiel auf, daß die pK_p -Werte zumeist deutlich niedriger (bis zu 1 log-Einheit) lagen als die entsprechenden pEC_{50} -Werte. Diese Beobachtung, die mit früheren Daten für Histaprodifene im

Meerschweinchen-Ileum übereinstimmt,⁹² verdeutlicht, daß pEC_{50} -Werte im Gegensatz zu pA_2 -, pK_i - oder pK_p -Werten nicht unbedingt die Affinität der Verbindungen reflektiert.²⁵¹ Jedoch fand sich eine gute Korrelation zwischen diesen Wertepaaren ($r = 0.9074$; $r^2 = 0.8234$; $P < 0.0001$; $n = 28$) (Abb. 3.2-6).

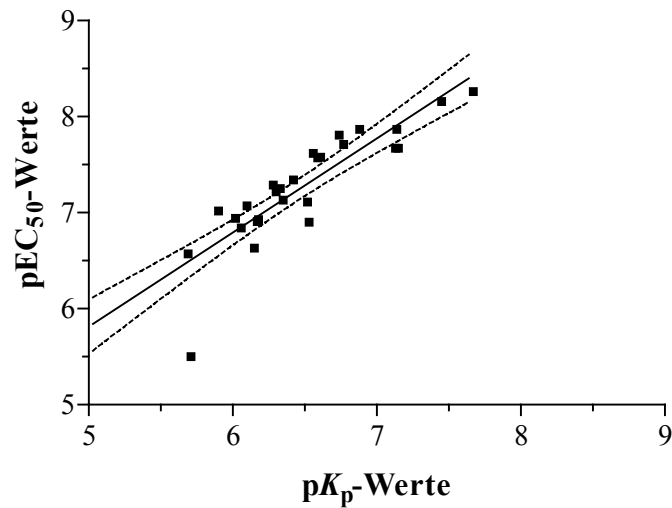


Abb. 3.2-6 Lineare Regression der am Meerschweinchen-Ileum ermittelten pEC_{50} -Werte mit den entsprechenden pK_p -Werten (..... 95 %-Konfidenzintervall)

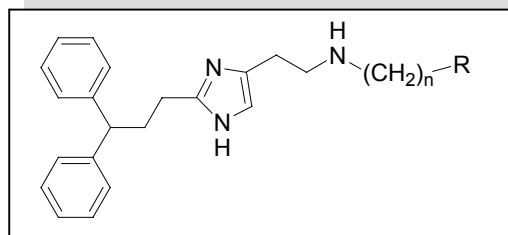
3.3 Bestimmungen in weiteren funktionellen Testmodellen

3.3.1 Aktivität an der isolierten Meerschweinchen-Aorta

Zur Überprüfung der am Meerschweinchen-Ileum erhaltenen Daten auf gewebe-spezifische Unterschiede wurden einige der potentesten Verbindungen zusätzlich an der thorakalen Meerschweinchen-Aorta getestet.

Dazu wurde die über H_1 -Rezeptoren vermittelte Änderung der Kontraktionskraft der vom Endothel befreiten Aorta in Anwesenheit von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) bestimmt. Die durch Zusatz dieses Sensitizers hervorgerufene Demaskierung „stiller“ Rezeptoren bewirkte über eine Sensibilisierung der Aorta eine erhöhte Empfindlichkeit des Organs gegenüber Histamin sowie H_1 -Agonisten.

Tab. 3.3.1 Aktivität ausgewählter Histaprodifene an der Meerschweinchen-Aorta



Nr.	R	n	Agonismus			Mepyramin
			$pEC_{50} \pm SEM$	Rel. Pot. [%]	$E_{max} \pm SEM$ [%]	$pA_2 \pm SEM$
3		2	8.01 ± 0.03	1660	93 ± 3	8.49 ± 0.10
48		2	7.06 ± 0.04	200	88 ± 1	8.36 ± 0.09
94		4	7.85 ± 0.10	1175	89 ± 4	8.79 ± 0.15
96		2	7.03 ± 0.05	195	73 ± 4	8.49 ± 0.11
HA			6.79 ± 0.05	100	113 ± 3	9.00 ± 0.06
1 ^a			7.40 ± 0.07	410	89 ± 4	8.75 ± 0.07

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 1.2.1, Tab. 1.2.1.

Wie aus Tab. 3.3.1 ersichtlich, erwiesen sich die gewählten Verbindungen auch an der Meerschweinchen-Aorta als potente partielle Agonisten. Analog zum Meerschweinchen-Ileum zeigten sie die für basisch substituierte Verbindungen typische hohe intrinsische Aktivität, wobei ein leichter Rückgang der E_{\max} -Werte zu beobachten war.

Die Potenz der Verbindungen war im Vergleich zum Ileum-Assay zum Teil deutlich abgesenkt, jedoch korrelierten die pEC_{50} -Werte gut mit den Ergebnissen für Histamin und Methylhistaprodifen in diesem Assay.⁹² Eine Ausnahme bildete das *meta*-Pyridyl-Derivat **96**, für das im Aorta-Modell eine vergleichsweise höhere Aktivität ermittelt wurde. Untersuchungen einiger Histaprodifen-Derivate, darunter Methylhistaprodifen (**1**) und Suprahistaprodifen (**3**), in einem weiteren Meerschweinchen-Modell, der isolierten Trachea, zeigen ebenfalls gute Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen.⁹⁴

Die generelle Abnahme der Potenz kann unter anderem auf eine deutlich geringere Rezeptordichte der Meerschweinchen-Aorta gegenüber der Ileum-Präparation zurückgeführt werden.

Alle durch die Substanzen ausgelösten Effekte konnten durch den Referenz- H_1 -Antagonisten Mepyramin inhibiert werden. Die hierbei ermittelten Affinitätswerte zeigten gute Korrelation mit den für Histamin publizierten Affinitätswerten am Histamin- H_1 -Rezeptor ($pA_2 = 9.0$).

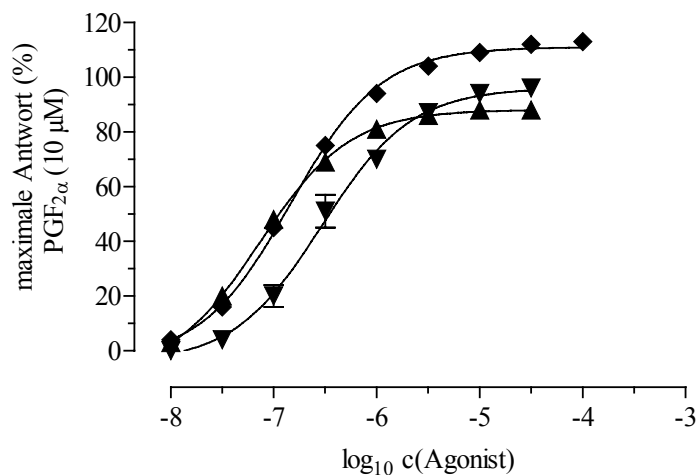


Abb. 3.3-1 Kontraktion der Meerschweinchen-Aorta durch Histamin (◆) und **48** in Abwesenheit (▲) und Anwesenheit (▼) von Mepyramin (10 nM)

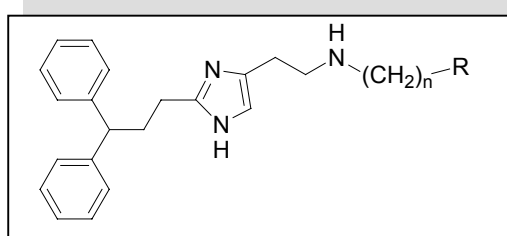
Abb. 3.3-1 zeigt die konzentrationsabhängige Kontraktion von Ringen der Meerschweinchen-Aorta relativ zum Maximaleffekt nach Vorstimulation mit einer Schwellenkonzentration $PGF_{2\alpha}$ durch Histamin (◆) sowie den H_1 -Rezeptor-Agonisten **48** in Abwesenheit (▲) und Anwesenheit von 10 nM Mepyramin (▼). Die Gegenwart von Mepyramin bewirkt auch hier eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve.

3.3.2 Aktivität an der Ratten-Aorta mit intaktem Endothel

Die Histaprodifen-Derivate **3**, **48** und **94** wurden zusätzlich an der Ratten-Aorta untersucht, um Aufschluß über spezies-spezifische Unterschiede im Wirkprofil der Substanzen zu erhalten.

In diesem Modell wird die über H_1 -Rezeptoren vermittelte NO-Freisetzung durch Endothelzellen der Ratten-Aorta zur Bestimmung der Rezeptoraktivität herangezogen. Histamin- H_1 -Rezeptor-Agonisten lösen über diesen Effekt konzentrationsabhängig eine Relaxation vorkontrahierter Organsegmente aus. Statt der sonst üblichen Vorstimulation mit Noradrenalin^{252,253} oder Phenylephrin²⁵⁴ wurden die Organe in diesem Experiment mit dem Thromboxan- A_2 -Rezeptor-Agonisten *U46,619* vorkontrahiert. Die maximale Relaxation ($E_{\max} = 100\%$) wurde in dieser Organpräparation durch Zugabe von Carbachol ausgelöst, da sich sowohl Histamin als auch die getesteten Substanzen in diesem Modell als partielle Agonisten verhielten. Zur besseren Vergleichbarkeit der Agonisten untereinander wurde in Tab. 3.3.2 nicht die maximale Relaxation durch Carbachol, sondern der durch Histamin ausgelöste Maximaleffekt gleich 100% gesetzt.

Tab. 3.3.2 Aktivität ausgewählter Histaprodifene im Ratten-Modell



Nr.	R	n	Agonismus			Mepyramin
			pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	pA ₂ ± SEM
3		2	6.53 ± 0.07	1514	56 ± 4	8.02 ± 0.08
48		2	6.28 ± 0.07	843	59 ± 3	7.98 ± 0.14
94		4	6.62 ± 0.04	1866	65 ± 6	8.21 ± 0.14
HA			5.35 ± 0.04	100	100	8.00 ± 0.07

^a Für Struktur der Verbindung siehe Kap. 1.2.1, Tab. 1.2.1.

Auch in diesem Modell zeigten alle untersuchten Verbindungen partiellen Agonismus am Histamin-H₁-Rezeptor. Die intrinsische Aktivität war im Vergleich zum Meerschweinchen-Assay in allen Fällen deutlich abgesenkt ($E_{\max} \approx 60\%$ der maximalen Histamin-Wirkung). Insbesondere Suprahistaprodifen (**3**), das im Meerschweinchen-Ileum mit einem E_{\max} -Wert von 96 % einen nahezu vollen Agonisten darstellte, wies mit 56 % deutlich niedrigere intrinsische Aktivität auf als die Pyridyl-Verbindungen **48** und **94**.

Neben den E_{\max} -Werten war auch die Potenz der Verbindungen deutlich herabgesetzt. Auch hier sank die Potenz von Suprahistaprodifen (**3**) am drastischsten ab, während die Potenz der Verbindung **48** gegenüber dem Meerschweinchen-Ileum nur leicht abgesenkt war.

Auffällig war auch, daß **3** und **94**, die in Meerschweinchen-Assays 10-fach höhere Potenz als **1** aufwiesen, in der Ratte nur annähernd äquipotent waren.

Die verminderte Aktivität der Verbindungen ist vermutlich auf spezies-spezifische Unterschiede in Rezeptor-Empfindlichkeit für die jeweiligen Agonisten und in der Rezeptordichte zurückzuführen.²⁵⁵

Die drastischen Aktivitätsunterschiede zwischen **1** und den Verbindungen **3** und **94** könnten jedoch auch auf unterschiedliche Struktur-Wirkungsbeziehungen von *N*^α-Arylalkyl-Histaprodifen am Ratten-H₁-Rezeptor hindeuten. Ähnliche Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften verschiedener H₁-Agonisten wurden für den humanen und Meerschweinchen-H₁-Rezeptor beschrieben.²⁵⁶

Der überdurchschnittliche Aktivitätsverlust von Suprahistaprodifen (**3**) könnte jedoch auch ein weiteres Indiz für einen von den übrigen Histaprodifen-Derivaten abweichenden Bindungsmodus am Rezeptor darstellen.

Die von den Verbindungen ausgelösten Effekte konnten vollständig durch Mepyramin antagonisiert werden. Die in Tab. 3.3.2 angegebenen Affinitätswerte für Mepyramin, die durch Verdrängung der Agonisten in der Ratten-Präparation ermittelt wurden, stimmen gut mit den für dieses Modell publizierten Literaturwerten für Histamin am H₁-Rezeptor ($pA_2 = 8.0$) überein.

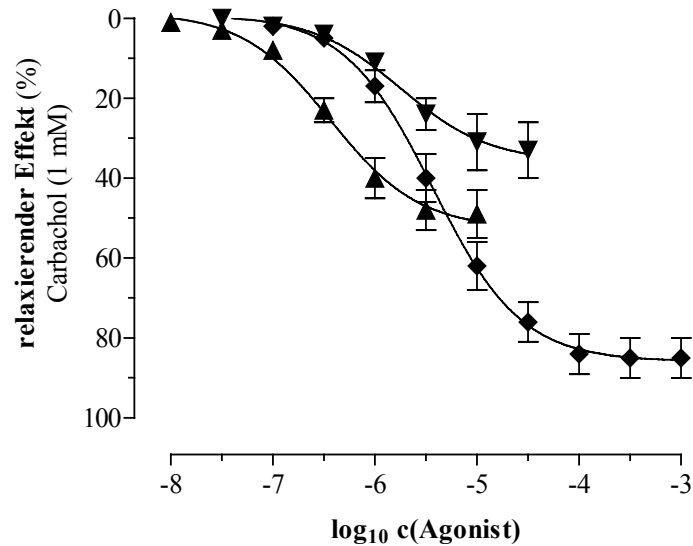


Abb. 3.3-2 Relaxation von Aortenringen der Ratte durch Histamin (◆) und Verbindung **48** in Abwesenheit (▲) und Anwesenheit (▼) von Mepyramin (50 nM)

Abb 3.3-2 zeigt die Relaxation von Ringen der Ratten-Aorta mit intaktem Endothel nach Vorkontraktion mit 15.8 nM *U46,619* am Beispiel der Pyridyl-Verbindung **48**. Sowohl Histamin (◆) als auch **48** (▲) erzeugten konzentrationsabhängig einen relaxierenden Effekt. In Anwesenheit von Mepyramin (▼) war erneut eine Rechtsverschiebung sowie eine Depression der Konzentrations-Wirkungskurve zu beobachten.

3.4 Rezeptorselektivitäten

Für ausgewählte Verbindungen der Pyridylalkyl- und Imidazolylalkyl-Reihen wurde zusätzlich deren H_1 -Rezeptorselektivität in verschiedenen funktionellen *In-vitro*-Testmodellen ermittelt. Die Bestimmung der Potenz am Histamin- H_2 -Rezeptor erfolgte am spontan schlagenden Meerschweinchen-Atrium; zur Bestimmung der Potenz am Histamin- H_3 - und am muskarinergen M_3 -Rezeptor wurden verschiedene funktionelle Testmodelle des Meerschweinchen-Ileums verwendet (Kap. 3.1 und Kap. 5.2.5 - 5.2.7).

Die pharmakologischen Ergebnisse der Verbindungen an den verschiedenen Rezeptormodellen sind in Tab. 3.4.1 und Abb. 3.4-1 dargestellt.

Aufgrund der partialagonistischen Aktivität der Substanzen wurde zur Charakterisierung des H_1 -Agonismus der pK_p -Wert herangezogen. Auf die Unterscheidung zwischen kompetitivem und nicht-kompetitivem Antagonismus wurde in der Abbildung verzichtet.

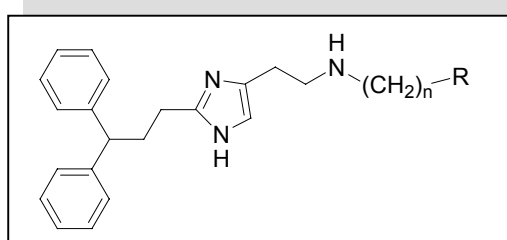
Die Verbindungen der Pyridylalkyl-Reihen wiesen an allen untersuchten Rezeptorsubtypen schwache bis moderate antagonistische Wirkung auf. Insbesondere die Wirkung am Histamin- H_2 -Rezeptor war sehr gering (pD'_2 -Werte < 5). Die Affinitätswerte am H_2 -Rezeptor zeigten innerhalb einer Reihe einen alternierenden Verlauf, wobei keine Korrelation zwischen der Affinität zum H_1 - und H_2 -Rezeptor erkennbar wurde. Anders als am Histamin- H_1 -Rezeptor scheint am H_2 -Rezeptor kein linearer Zusammenhang zwischen Länge des Alkyl-Spacers und Potenz der Verbindungen zu existieren.

Zum Muskarin- M_3 -Rezeptor wiesen die meisten Pyridine mäßige Affinität auf (pA_2 -Werte < 6.5). Diese bei allen Histaprodifen-Derivaten beobachtete, im Vergleich zu anderen Klassen von H_1 -Rezeptor-Agonisten relativ hohe muskarinerge Aktivität ist vermutlich auf den affinitätsvermittelnden Diphenylpropyl-Rest der Histaprodifene zurückzuführen.

Die relativ hohe muskarinerge Affinität verhinderte die genaue Bestimmung der H_3 -Rezeptor-Affinität.

Auch die Verbindungen der Imidazolylalkyl-Reihe zeigten nur mäßige Affinität zum Histamin- H_2 -Rezeptor, wobei Suprahistaprodifen (**3**), der bislang potenteste Histamin- H_1 -Rezeptor-Agonist im Meerschweinchen-Ileum, durch seine *agonistische* H_2 -Aktivität auffiel.

Tab. 3.4.1 Rezeptorselektivitäten der Verbindungen 3, 48 und 93 - 106



Nr.	R	n	<u>H₁-Rezeptor</u>	<u>H₂-Rezeptor</u>	<u>H₃-Rezeptor</u>	<u>M₃-Rezeptor</u>
			pK _p	pD' ₂	pA ₂	pA ₂
3		2	7.67	pEC ₅₀ = 5.0	< 6.0	5.32
105		3	7.14	3.92	6.91	6.11
106		4	6.17	4.12	7.99	6.38
48		2	7.15	4.37	< 6.3	5.30
93		3	7.13	4.96	< 6.5	6.34
94		4	7.45	4.78	< 6.3	6.13
95		5	6.74	5.02	< 6.5	6.29
96		2	6.52	4.62	< 6.3	5.15
97		3	6.18	4.05	n.d.	n.d.
98		4	6.88	4.77	n.d.	n.d.
99		5	6.61	5.25	< 6.5	6.25
101		2	6.2	4.37	< 6.3	6.00
102		3	5.69	4.36	n.d.	n.d.
103		4	6.56	4.59	n.d.	n.d.
104		5	5.90	4.12	n.d.	n.d.

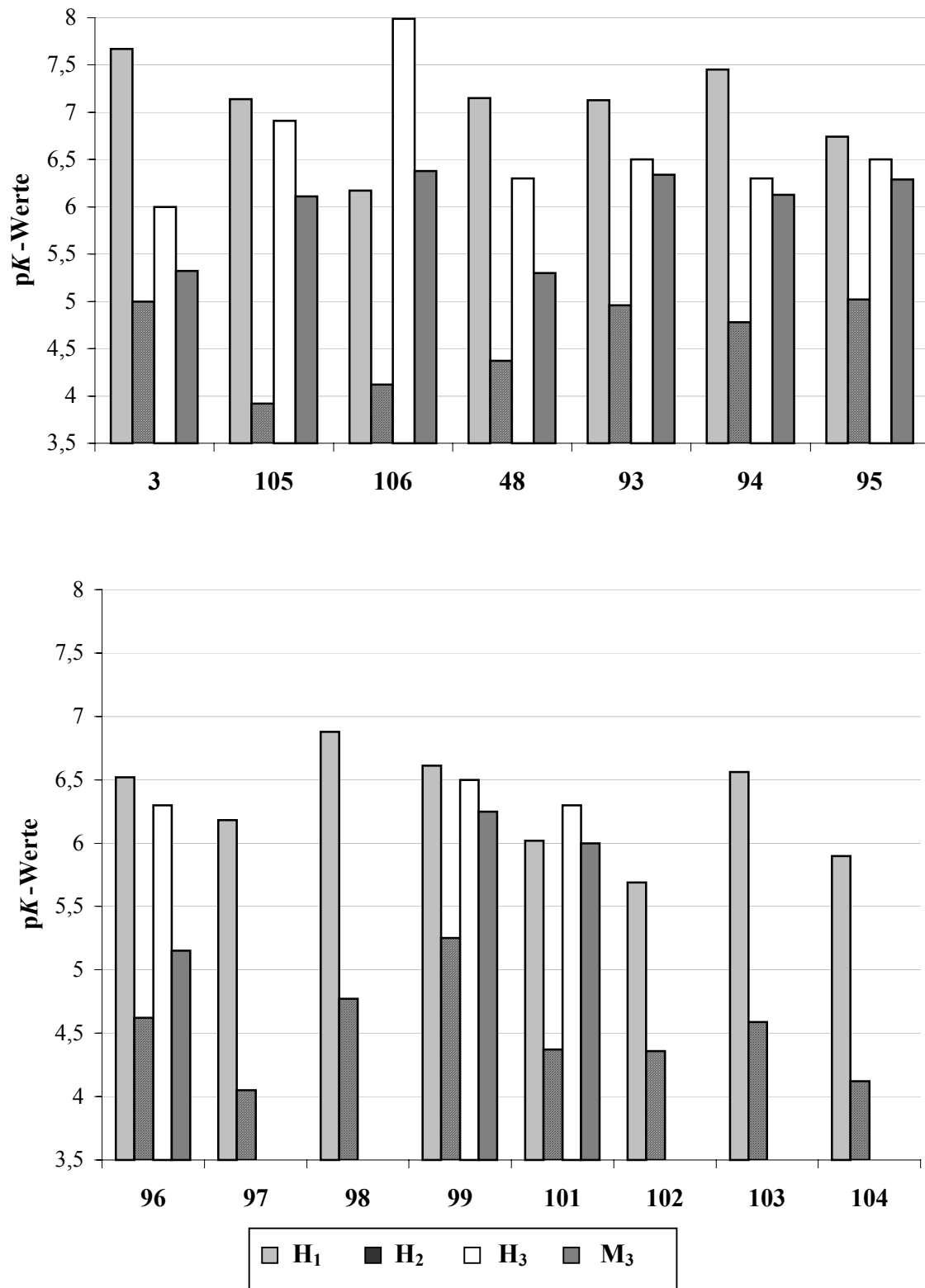


Abb. 3.4-1 Rezeptorselektivitäten der Verbindungen 3, 48 und 93 - 106

Zum Histamin-H₃-Rezeptor wiesen die Imidazolyl-Derivate deutlich höhere Affinität als ihre Pyridyl-Analoga auf. Insbesondere die Imidazolylbutyl-Verbindung **106** zeigte eine H₃-Affinität, die die Affinität zum H₁-Rezeptor um mehr als eine log-Einheit übertraf.

Wie die Verbindungen der Pyridyl-Reihen zeigten auch die Imidazole relativ hohe Affinität zum Muskarin-M₃-Rezeptor, wobei diese mit zunehmender Kettenlänge tendentiell anzusteigen scheint.

Aus den in Tab. 3.4.1 beschriebenen Selektivitätsdaten wurden zur besseren Übersichtlichkeit die in Tab. 3.4.2 dargestellten Affinitätsverhältnisse berechnet.

Tab. 3.4.2 Affinitätsverhältnisse der Verbindungen **3**, **48** und **93** - **106**

Nr.	H ₁ /H ₂	H ₁ /H ₃	H ₁ /M ₃
3	468 : 1	> 47 : 1	224 : 1
105	1660 : 1	2 : 1	11 : 1
106	112 : 1	1 : 66	1 : 1
48	603 : 1	> 7 : 1	71 : 1
93	148 : 1	> 4 : 1	6 : 1
94	468 : 1	> 14 : 1	21 : 1
95	52 : 1	> 2 : 1	3 : 1
96	79 : 1	> 2 : 1	23 : 1
97	135 : 1	-	-
98	129 : 1	-	-
99	23 : 1	> 1 : 1	2 : 1
101	45 : 1	< 1 : 2	1 : 1
102	21 : 1	-	-
103	93 : 1	-	-
104	60 : 1	-	-

Bei Betrachtung des Affinitätsverhältnisses H_1/H_2 für die Pyridyl-Reihen fiel auf, daß in Abhängigkeit von der Kettenlänge ein alternierender Verlauf erkennbar ist, ähnlich wie er auch bei der Bestimmung der Affinität zum Histamin- H_1 -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileums beobachtet wurde. Sowohl in der *ortho*-Pyridyl-Reihe als auch etwas schwächer ausgeprägt in den *meta*- und *para*-Pyridyl-Reihen zeigten die Verbindungen mit einem Ethyl-Spacer (**48**, **96** und **101**) oder einem Butyl-Spacer (**94**, **98** und **103**) deutlich größere Affinitätsunterschiede als ihre Propyl- und Pentyl-Analoga. Insbesondere die Verbindungen der *ortho*-Pyridylalkyl-Reihe (**48** und **94**) zeigten mit einem Affinitätsverhältnis $> 400 : 1$ hohe Selektivität zum H_1 -Rezeptorsubtyp.

Gegenüber H_3 - und M_3 -Rezeptoren war die Affinität zum Histamin- H_1 -Rezeptor deutlich schwächer. Jedoch wiesen in der *ortho*-Pyridylalkyl-Reihe erneut die Verbindungen **48** und **94** mit einem zwei- bzw. viergliedrigen Spacer tendenziell höhere Affinitätsunterschiede zum Histamin- H_1 -Rezeptor auf. In den *meta*- und *para*-Pyridylalkyl-Reihen scheint die Selektivität zum Histamin- H_1 -Rezeptor verloren zu gehen.

Auch in der Imidazolylalkyl-Reihe lieferte die Betrachtung des Affinitätsverhältnisses H_1/H_2 eine deutlich höhere Affinität zum Histamin- H_1 -Rezeptor. Hier fiel vor allem die hohe Selektivität der Propyl-Verbindung **105** mit einem Affinitätsverhältnis von $> 1000 : 1$ auf.

Bei Vergleich der H_1 -Werte mit den Ergebnissen am Histamin- H_3 -Rezeptor ergab sich eine drastische Abnahme der Affinitätsunterschiede mit zunehmender Kettenlänge. Während Suprahistaprodifen (**3**) mit einem Verhältnis von $50 : 1$ noch gute Selektivität zeigte, wies die Butyl-Verbindung **106** eine um den Faktor 66 höhere Affinität zum Histamin- H_3 -Rezeptor als zum Histamin- H_1 -Rezeptor auf. Mit einem pA_2 -Wert von 7.99 stellt diese Verbindung einen potenten, nanomolar wirksamen H_3 -Antagonisten dar.