

VU Research Portal

Design and Synthesis of New Histamine H4 Receptor Ligands

Smits, R.A.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Smits, R. A. (2009). *Design and Synthesis of New Histamine H4 Receptor Ligands*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SUMMARY

Design and synthesis of new histamine H₄ receptor ligands

Histamine is an important chemical messenger in a variety of physiological processes. This imidazole-containing ligand mediates its effects via a group of four G protein-coupled receptors (GPCRs), named the histamine H₁ receptor (H₁R), H₂R, H₃R and H₄R after the order of their discovery. In chapter 1, an overview of the relevance of the histaminergic GPCRs (H₁R-H₄R) is given together with a selection of the known ligands that bind these receptors. The H₃R has the highest homology with the H₄R and many of the imidazole-ligands originally designed for the H₃R also bind the H₄R to some extent. The H₄R structure and function show that this newest member of the histamine receptor subfamily is a pharmacologically distinct GPCR with a unique expression pattern throughout the body. In the past several years, significant progress has been made with respect to the development of new H₄R ligands. Medicinal chemistry efforts have provided researchers with a number of pharmacological tools to study the relevance of the H₄R in biology (e.g. the H₄R agonists 4-methylhistamine and the H₄R antagonist JNJ7777120). Using these tools in *in vivo* models of human disease, it has become apparent that the H₄R plays an important role in inflammatory and allergic disorders as well as in the modulation of pain and pruritis (itch). Although H₄R research is still in the preclinical stage 'these findings may lead to novel treatment paradigms to fulfill the unmet clinical demand for innovative therapies in H₄R related diseases.

The work described in this thesis focused on the development of novel H₄R ligands that can be used in *in vitro* or *in vivo* studies to characterize the pharmacology of the H₄R and contribute to the understanding of its role in physiology. The starting point for this project was the anti-psychotic drug clozapine that is known to bind many G protein-coupled receptors, including the H₄R. Optimization of the structure of clozapine as described in chapter 2 resulted in the potent H₄R agonist VUF6884 (H₄R, pK_i=7.60). Pharmacological data suggest that VUF6884 and the known reference antagonist JNJ7777120 can be used to describe the orthosteric binding site (the site where also histamine binds the receptor) of the H₄R, because both JNJ7777120 and VUF6884 displace [³H]histamine in a competitive

manner. It was also demonstrated that the effects of the agonist VUF6884 are competitively antagonized by the selective H₄R antagonist JNJ7777120, indicating considerable overlap of their binding sites. On the basis of the derived SAR and saturation binding experiments, a flexible alignment model was constructed that was intended to be the premise for the design of novel H₄R ligands.

Using the flexible alignment model, in chapter 3 a series of small compounds (fragments) was designed, synthesised and evaluated at the H₄R. From this series, 2-(4-methyl-1-piperazinyl)-quinoxaline (VUF10050, pK_i=6.05) was identified as a new lead structure for the development of H₄R ligands. Exploration of the structure-activity relationship (SAR) of this quinoxaline scaffold was performed using molecular modeling and parallel synthesis approaches. This strategy led to the identification of 6,7-dichloro-3-(4-methylpiperazin-1-yl)quinoxalin-2(1*H*)-one (VUF 10214, pK_i=8.25) and 2-benzyl-3-(4-methyl-piperazin-1-yl)quinoxaline (VUF 10148, pK_i=7.40) as very potent new H₄R ligands. *In vivo* studies in the rat revealed that compound VUF10214 has significant anti-inflammatory properties in a carrageenan induced paw-edema model for inflammation.

In a scaffold hopping exercise described in chapter 4 and using the SAR information obtained from the development of the quinoxaline H₄R ligands a second fragment was optimized, leading to a series of quinazoline-containing H₄R compounds. This approach led to the discovery of 6-chloro-*N*-(furan-3-ylmethyl)2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-amine (VUF10499) and 6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)quinazolin-4-amine (VUF10497) as potent human H₄R inverse agonists (pK_i= 8.12 and 7.57 respectively). Interestingly, both compounds also possess considerable affinity for the human histamine H₁ receptor (H₁R) and therefore represent a novel class of dual action H₁R/H₄R ligands, a profile that potentially leads to added therapeutic benefit in inflammatory and allergic conditions. Compounds from this novel series of quinazolines behave as antagonists at the rat H₄R and were found to possess anti-inflammatory properties *in vivo*.

Since the thiophen and furan moieties of VUF10497 and VUF10599 are relatively lipophilic we attempted to replace these groups with more polar substituents to increase the water solubility of the quinazolines. This resulted in the discovery of the series of sulfonamide-substituted quinazolines (Chapter 5) with high affinity for the H₄R (pK_i= 8.12). As a result of its polar nature, the sulfonamide moiety leads to improved solubility and is believed to probe a distinct H₄R binding pocket that was previously identified using the abovementioned flexible alignment modeling approach. By introducing a variety of

substituents on the quinazoline-sulfonamide compounds, the H₄R affinity was optimized. The interactions of the new sulfonamide ligands as well as of the set of quinazoline compounds from chapter 4 were collectively described by a QSAR equation. Pharmacological studies revealed that the sulfonamide analogues have excellent H₄R affinity and behave as inverse agonists at the human H₄R. *In vivo* evaluation of the potent 2-(6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazoline-4-amino)-N-phenyl ethanesulfonamide (VUF10519, pK_i= 8.31), revealed it to also have good anti-inflammatory activity in an animal model of acute inflammation.

The two potent histamine H₄ receptor ligands (5-chloro-1*H*-2-yl)(4-methylpiperazin-1-yl)methanone (JNJ7777120, developed by Johnson & Johnson) and 2-(6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazoline-4-amino)-ethanesulfonamide (VUF10558, described in chapter 5) were selected to be developed into potential radioligands for monitoring inflammatory processes with positron emission tomography (PET). In chapter 6, we describe how the selected compounds were successfully labeled with an [¹¹C]isotope in high radiochemical yield and purity. Evaluation of the radioligands *in vivo* in rats showed two distinct distribution profiles. [¹¹C]JNJ7777120 was found to rapidly enter the central nervous system and was retained in hippocampus and olfactory bulb tissue. This observation suggests the presence of H₄R receptors in these brain areas. In contrast, [¹¹C]VUF10558 did not appear to enter the CNS but was only present in the periphery. The two ligands presented in this study therefore are complementary tools to further characterize the H₄R.

During an in-house database screen we identified *S*-(2-guanidylethyl)-isothiourea as a high affinity agonist (VUF8430) for the histamine H₄ receptor with a 33-fold selectivity over the histamine H₃ receptor and negligible affinity for the other histamine receptor subtypes. In chapter 7 this nonimidazole ligand is introduced as a useful and complementary pharmacological tool that enables further unraveling of the physiological roles of the H₄ receptor. To provide convenient access to this new pharmacological tool a novel synthetic procedure was developed. Using microwave chemistry in the final synthesis step, the compound readily crystallizes from the reaction vessel in high purity. This procedure allows for the straightforward synthesis of VUF8430 in large quantities.

SAMENVATTING (SUMMARY IN DUTCH)

Ontwerp en synthese van nieuwe histamine H₄ receptor liganden

Histamine is een belangrijke chemische boodschapper bij een verscheidenheid aan fysiologische processen. Dit imidazool ligand sorteert zijn effect door te binden aan een groep G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs), deze receptoren heten de histamine H₁ receptor (H₁R), H₂R, H₃R en H₄R en zijn vernoemd naar de volgorde waarin ze zijn ontdekt. Een overzicht van het belang van deze histamine receptoren wordt gegeven in hoofdstuk 1, samen met een selectie uit de reeds bekende liganden die aan deze GPCRs binden. De aminozuurvolgorde van de H₃R heeft de grootste overeenkomst met die van de H₄R en veel van de imidazool bevattende liganden die oorspronkelijk voor de H₃R zijn ontworpen hebben ook affiniteit voor de H₄R. Door het verschil in structuur en functie is het evenwel duidelijk dat deze meest recent ontdekte histamine receptor farmacologisch gezien uniek is met een geheel verschillend expressiepatroon in het lichaam. In de laatste jaren is er aanzienlijke vooruitgang geboekt op het gebied van de ontwikkeling van nieuwe H₄R liganden. Farmacochemisch onderzoek heeft ertoe geleid dat onderzoekers de beschikking kregen over verschillende farmacologisch actieve H₄R liganden om het belang van de H₄R in de biologische processen te kunnen bestuderen (voorbeelden zijn de H₄R agonist 4-methylhistamine en de H₄R antagonist JNJ7777120). Het gebruik van H₄R liganden in studies met onder andere proefdieren, heeft duidelijk gemaakt dat de H₄R een belangrijke rol speelt bij ontstekingsprocessen en allergische aandoeningen. alsmede het ontstaan van pijn en pruritis (jeuk). De reeds bekende liganden voor de H₄R hebben verschillende eigenschappen die ze ongeschikt maken voor het beantwoorden van specifieke onderzoeksvragen. Zo is bijvoorbeeld de antagonist JNJ7777120 door zijn korte *in vivo* halfwaardetijd in proefdieren ongeschikt voor het bestuderen van chronische ontstekingsprocessen of andere langdurige *in vivo* studies. Hoewel het H₄R onderzoek zich nog in de preklinische ontwikkelingsfase bevindt, kunnen nieuwe liganden mogelijk leiden tot innovatieve toepassingen om een aantal slecht of onbehandelbare H₄R gerelateerde aandoeningen te behandelen.

Het werk in dit proefschrift had als doel nieuwe chemische verbindingen te ontwikkelen die gebruikt kunnen worden voor het karakteriseren van de farmacologie van de H₄R door het uitvoeren van *in vitro* en *in vivo* experimenten. Zo kan een bijdrage geleverd worden aan het begrijpen van de rol van deze receptor in fysiologische processen. Het uitgangspunt voor dit project was het antipsychoticum clozapine, waarvan bekend is dat het aan zeer veel GPCRs bindt. Het optimaliseren van de structuur van clozapine voor een hoge H₄R affiniteit, zoals is beschreven in hoofdstuk 2, leidde tot de ontdekking van de potente H₄R agonist VUF6884 (H₄R, pK_i=7.60). Farmacologische experimenten toonden aan dat zowel VUF6884 en de antagonist JNJ777120 aan de orthostere bindingsplaats (de plek waar ook histamine de receptor bindt) van de H₄R binden. Er is aangetoond dat beide verbindingen [³H]histamine op een competitieve manier van de receptor kunnen verdringen. Ook is aangetoond dat de effecten van VUF6884 competitief worden geremd door de antagonist JNJ777120, dit suggereert een aanzienlijke overlap van de plaatsen waar beide verbindingen de receptor binden. Op basis van de structuur-activiteits relatie (SAR) studie van de clozapine analoga, is een 'flexible alignment' model ontwikkeld met als doel dit te gebruiken voor het ontwerp van nieuwe H₄R liganden.

Op basis van het model is er, zoals beschreven in hoofdstuk 3, een serie kleine verbindingen (fragmenten) ontworpen, gesynthetiseerd en getest op de H₄R. Deze serie bevatte onder andere 2-(4-methyl-1-piperaziny)-quinoxaline (VUF10050, pK_i=6.05). Deze verbinding is geselecteerd als een nieuw startpunt voor de ontwikkeling van quinoxaline H₄R liganden. Vervolgens werd er een onderzoek naar de SAR van deze quinoxaline verbinding gedaan met behulp van molecular modeling en parallele synthese. Deze strategie resulteerde in twee nieuwe zeer potente H₄R liganden; 6,7-dichloro-3-(4-methylpiperazin-1-yl)quinoxalin-2(1*H*)-one (VUF 10214, pK_i=8.25) en 2-benzyl-3-(4-methylpiperazin-1-yl)quinoxaline (VUF 10148, pK_i=7.40). *In vivo* studies toonden aan dat VUF10214 significante ontstekingsremmende eigenschappen heeft in een model voor acute ontstekingen in de rat.

De serie fragmenten bevatte ook een tweede verbinding met een quinazoline groep, deze verbinding was het startpunt voor de studie die beschreven staat in hoofdstuk 4. Door een 'scaffold hopping' strategie toe te passen en met behulp van de SAR die tijdens de quinoxaline was bestudeerd, is ook het quinazoline fragment geoptimaliseerd voor H₄R affiniteit. Deze aanpak leidde tot de ontdekking van 6-chloro-*N*-(furan-3-ylmethyl)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-amine (VUF10499, pK_i=8.12) en 6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-*N*-(thiophen-2-ylmethyl)quinazolin-4-amine (VUF10497, pK_i=7.57) als

potente histamine H₄R inverse agonisten. Beide verbindingen bezitten eveneens aanzienlijke affiniteit voor de H₁R en zijn mogelijk een uitgangspunt voor de ontwikkeling van een nieuwe klasse antihistaminica die twee receptoren kunnen bezetten. H₁/H₄ antagonisme gecombineerd in een molecuul kan mogelijk toegevoegde klinische waarde hebben in ontstekingsprocessen en allergische aandoeningen. De verbindingen uit deze serie gedragen zich als antagonisten op de rat H₄R en hebben een ontstekingsremmende werking *in vivo* in de rat.

Omdat de thiofeen en furan groepen van respectievelijk verbindingen VUF10497 en VUF10499 vrij lipofiel zijn is er getracht om deze groepen voor meer polaire groepen te vervangen teneinde de wateroplosbaarheid te verhogen. Deze strategie leidde tot de serie zeer potente sulfonamide gesubstitueerde quinazolines in hoofdstuk 5. De nieuwe zijketen wordt verondersteld een interactie aan te kunnen gaan met een pocket van de receptor die eerder gedefinieerd is op basis van een flexible alignment model (hoofdstuk 3).

Door het introduceren van verschillende substituenten op de sulfonamide stikstof is de affiniteit voor de H₄R geoptimaliseerd. De interactie van de sulfonamide quinazolines en een aantal eerder ontwikkelde quinazolines is beschreven met een 'qualitative structure-activity relationship' (QSAR) vergelijking.

De sulfonamide analoga hebben hoge affiniteit voor de humane H₄R en gedragen zich op deze receptor als inverse agonisten. *In vivo* onderzoek met 2-(6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazoline-4-amino)-*N*-phenyl ethanesulfonamide (VUF10519, pK_i= 8.31), toonde aan dat deze verbinding een significante ontstekingsremmende werking had in een proefdier model voor acute ontstekingsreacties.

De twee potente H₄R liganden (5-chloro-1-*H*-2-yl)(4-methylpiperazin-1-yl)methanone (JNJ7777120) ontwikkeld door Johnson & Johnson en 2-(6-chloro-2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazoline-4-amino)-ethanesulfonamide (VUF10558, beschreven in hoofdstuk 5) zijn geselecteerd om verder te ontwikkelen tot potentiële radioliganden. Deze radioliganden zouden gebruikt kunnen worden om ontstekingsprocessen waar te nemen door middel van positron emissie tomografie (PET). In hoofdstuk 6, staat beschreven hoe de twee geselecteerde verbindingen succesvol gelabeld zijn met een [¹¹C]isotoop met hoge radiochemische opbrengst. Na het bestuderen van de distributie van de radioliganden in de rat, werden twee zeer verschillende distributiepatronen waargenomen. [¹¹C]JNJ7777120 passeerde snel de bloed-hersen barrière (BHB) en werd vastgehouden in de hippocampus en de bulbus olfactorius. Deze waarneming doet vermoeden dat er H₄R receptoren aanwezig zijn in deze specifieke hersengebieden. In tegenstelling tot [¹¹C]JNJ7777120

leek [¹¹C]10558 de BHB niet te passeren en de distributie van dit radioligand leek zich dus te beperken tot de periferie. Beide liganden in deze studie kunnen door het verschil in distributiepatroon beschouwd worden als complementaire stoffen die gebruikt kunnen worden voor onderzoek aan de H₄R

Gedurende een screen van een serie verbindingen uit onze eigen database, werd *S*-(2-guanidylethyl)-isothiourea ontdekt als een potente H₄R agonist. Deze verbinding heeft een hoge H₄R affiniteit en een 33-voudige selectiviteit voor de H₄R over de H₃R, terwijl de affiniteit voor de andere histamine receptoren nagenoeg verwaarloosbaar is. In hoofdstuk 7 wordt deze verbinding geïntroduceerd als een nuttig en complementair farmacologisch hulpmiddel dat gebruikt kan worden bij het doorgronden van de fysiologische rol van de H₄R. Een nieuwe synthese procedure voor VUF8430 is eveneens ontwikkeld, zodat deze verbinding snel en eenvoudig gesynthetiseerd kan worden. Door het gebruik van microwave chemie in de laatste stap en het uitkristalliseren van de eindverbinding in het reactievat kan VUF8430 in grote hoeveelheden en hoge zuiverheid worden verkregen.

DANKWOORD (ACKNOWLEDGEMENTS IN DUTCH)

Het doorlopen van een promotietraject is geen solistische exercitie en daarom wil ik graag de mensen die hebben bijgedragen aan het behalen van mijn doctorstitel hartelijk bedanken. Allereerst wil ik mijn copromotor Iwan en promotor Rob bedanken dat zij mij de gelegenheid hebben gegeven om te beginnen aan een project dat mij ontzettend veel plezier heeft gegeven.

Maikel, ik kan met zekerheid zeggen dat jij degene bent die mij het meest heeft geleerd in de afgelopen jaren. Omdat ik geen solide organisch chemische basis had was het voor mij in het begin echt nodig om iemand als jij te kunnen raadplegen. Onze discussies zijn van groot nut voor mij geweest en ik heb mij min of meer de tien chemische geboden eigen gemaakt die de sleutel zijn tot het succesvol synthetiseren van verbindingen.

Sinds februari 2007 was ik opeens een vaak geziene gast in het radionucleidencentrum, omdat ik bezig was met het maken van radioactief gelabelde verbindingen. Bert, dank voor het vertrouwen dat ik van je kreeg en de mogelijkheid om in jouw labs dit gedeelte van mijn onderzoek te mogen uitvoeren. Obbe, jij hebt voor mij een heleboel werk verzet. De sleutel voor succes in medicinal chemistry projecten is de onderliggende farmacologie. Gelukkig kon ik van jouw uitgebreide ervaring gebruik maken. Er is een heel aantal collega's en andere mensen dat ervoor gezorgd heeft dat mijn tijd als promovendus bij de VU als een goede herinnering met mij mee zal gaan. Deze mensen ben ik erg dankbaar voor de goede samenwerking en de leuke tijd die ik met hen gehad heb in de labs en tijdens de koffiepauzes en borrels. Mam, soms voelde ik mij net Alfred Issendorf¹, maar ik hoef mij niet te revancheren op het noodlot. De steun die ik op allerlei manieren van je kreeg heb ik als erg belangrijk en motiverend ervaren.

Van cruciaal belang is het om te kunnen werken vanuit een omgeving waar je je goed voelt. Thuis voelde ik me altijd goed. Eerst met alleen jou Marieke en daarna met Livia en Mijntje erbij. Jullie geven mij energie en maken mij aan het lachen, het leven is leuk met jullie om me heen.

¹ Hermans, W., F. Nooit meer slapen. Uitgeverij de bezige bij, Amsterdam. 1997.

CURRICULUM VITAE

Curriculum Vitae (in English)

In 1977 Rogier Adriaan Smits was born in Groningen where he obtained his high school degree from the Praedinius Gymnasium in 1996. After this he went to the Rijksuniversiteit Groningen (RuG) to study Pharmacy. During his training he visited Purdue university in West-Lafayette (IN, USA) to conduct undergraduate research under supervision of prof. David Nichols. The topic of his research was the synthesis of ligands for dopamine receptors. After a follow-up study at the RuG in the lab of prof. Håkan Wikström he received his M.Sc. degree in 2002 and Pharm D. degree in 2004. He started as a graduate student in the group of prof Rob Leurs at VU University Amsterdam in 2004 where he worked on the design and synthesis of new histamine H₄ receptor ligands. In 2008 he moved to a position within the VU Drug Discovery Center (VU-DDC) that concentrates on the commercialization of academic research.

Curriculum Vitae (in Dutch)

In 1977 is Rogier Adriaan Smits geboren in Groningen alwaar hij in 1996 aan het Praedinius Gymnasium zijn middelbare school diploma behaalde. Hierna is hij aan de Rijksuniversiteit Groningen (RuG) begonnen aan de studie Farmacie. Gedurende de doctoraalfase is hij in voor zijn afstudeeronderzoek naar Purdue university in West-Lafayette (IN, USA) gegaan en heeft daar onder begeleiding van prof. David Nichols gewerkt aan de synthese van liganden voor dopamine receptoren. Na een vervolgonderzoek hierop aan de RuG in het lab van prof. Håkan Wikström haalde hij in 2002 zijn doctoraal examen en in 2004 zijn apothekers examen. In 2004 is hij als promovendus begonnen in de groep van prof. Rob Leurs aan de Vrije Universiteit Amsterdam waar hij gedurende vier jaar heeft gewerkt aan het ontwerp en de synthese van nieuwe histamine H₄ receptor liganden. In 2008 betrok hij een positie binnen het VU Drug Discovery Center (VU-DDC), dat tot doel heeft academische kennis te commercialiseren.

LIST OF PUBLICATIONS

1. **Smits, R., A.**; Lim, H., D.; Stegink, B.; Bakker, R., A.; de Esch I., J., P.; Leurs, R. Characterization of the histamine H₄ receptor binding site: Part I. Synthesis and pharmacological evaluation of dibenzodiazepine derivatives. *J. Med. Chem.* **2005**, 49:4512-6.
2. Lim, H., D., **Smits, R., A.**, Leurs, R.; de Esch, I., J., P. The emerging role of the histamine H₄ receptor in anti-inflammatory therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 13:1365-73.
3. Lim, H., D., **Smits, R., A.**, Bakker, R., A.; van Dam, C., M.; de Esch, I., J., P.; Leurs, R. Discovery of *S*-(2-guanidylethyl)-isothiourea (VUF8430) as a potent nonimidazole histamine H₄ receptor agonist. *J. Med. Chem.* **2006**, 49:6650-1.
4. **Smits, R., A.**; Lim, H., D.; Hanzer, A.; Zuiderveld, O., P.; Guaita, E.; Adami, M.; Coruzzi, G.; Leurs, R.; de Esch I., J., P. Fragment based design of new H₄ receptor-ligands with anti-inflammatory properties in vivo. *J. Med. Chem.* **2008**, 51:2457-67.
5. **Smits, R., A.**; de Esch, I., J., P.; Zuiderveld, O., P.; Broeker, J.; Sansuk, K.; Guaita, E.; Coruzzi, G.; Adami, M.; Haaksma, E.; Leurs, R. The discovery of quinazolines as histamine H₄ receptor inverse agonists using a scaffold hopping approach. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7855-65.
6. **Smits, R., A.**; Istyastono, E., P. Zuiderveld, O., P.; van Dam, C., M., E. de Kanter, F.; Jongejan, A.; Coruzzi, G.; Adami, M.; Leurs, R.; de Esch, I., J., P. Synthesis and QSAR of quinazoline sulfonamides as highly potent human histamine H₄ receptor inverse agonists. *Manuscript submitted*.
7. Jongejan, A.; Lim, H., D.; **Smits, R., A.**; Haaksma, E.; de Esch, I., J., P.; Leurs, R. Delineation of agonist binding to the histamine H₄ receptor using mutational analysis, homology modeling and ab initio calculations. *J. Chem. Inf. Mod.* **2008**, 48, 1455-63.
8. **Smits, R., A.**, Lim, H., D., Leurs, R.; de Esch, I., J., P. Quinazolines and related heterocyclic compounds, and their therapeutic use. WO2008003702, Jan. 10, **2008**.
9. **Smits, R., A.**; Leurs, R.; de Esch, I., J., P. Quinazolines and related heterocyclic compounds, and their therapeutic use. Application number: EP08100015
10. **Smits, R., A.**, Leurs, R.; de Esch, I., J., P. *Drug Discov. Today, Manuscript submitted*.
11. Lim, H., D. ; Adami, M. ; Guaita, E. ; Werfel, T. ; **Smits, R., A.** ; de Esch, I., J., P. ; Bakker, R., A. ; Gutzmer, R. ; Coruzzi, G. ; Leurs, R. Pharmacological characterization of the new histamine H₄ receptor agonist VUF8430. *In press*.

12. Lim, H.D.; Istyastono, E., P.; van de Stolpe, A.; Romeo, G.; Gobbi, S.; Schepers, M.; Lahaye, R.; Menge, W.; Zuiderveld, O. P.; Jongejan, A.; **Smits, R., A.**; Bakker, R., A.; Haaksma, E.; Leurs, R.; de Esch, I., J., P. Clophenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H₃ and H₄ receptors: Synthesis, pharmacological evaluation and cross-target QSAR studies. *Manuscript Submitted.*
13. **Smits, R., A.**, de Esch, I., J., P.; Zuiderveld, O., P.; Leurs, R. New analogues of JNJ7777120 with enhanced metabolic stability. *Manuscript in preparation.*
14. **Smits, R., A.**, de Esch, I., J., P.; Faasse, B. ; Zuiderveld, O., P.; Leurs, R. A SAR study of 2-amino substituted pyrimidine derviatives as ligands for the histamine H₄ receptor. *Manuscript in preparation.*
15. **Smits, R., A.**, de Esch, I., J., P.; Zuiderveld, O., P.; Leurs, R. Windhorst, A., D. Histamine H₄ receptor antagonists: further evaluation of quinazoline sulfonamides. *Manuscript in preparation.*

