



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 08 509 T2 2004.12.16**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 165 064 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 08 509.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/08938**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 920 121.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/59875**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **25.02.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.12.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 31/192**
A61K 31/196

(30) Unionspriorität:
127835 P 05.04.1999 US

(73) Patentinhaber:
**City of Hope, Duarte, Calif., US; Proscience Corp.,
Albertson, N.Y., US**

(74) Vertreter:
Hansmann & Vogeser, 81369 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**RAHBAR, Samuel, Encino, US; LALEZARI, Iraj,
Scarsdale, US**

(54) Bezeichnung: **Neue Hemmer von fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukten (AGEs)**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Modifikation und Alterung von Proteinen durch Umsetzung mit Glucose und anderen reduzierenden Zuckern wie Fructose oder Ribose, und insbesondere die Hemmung der nicht-enzymatischen Glykosilierung von Proteinen, die häufig zur Bildung von fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukten und Quervernetzungen führt.

[0002] Eine erhöhte Konzentration reduzierender Zucker im Blut und in der intrazellulären Umgebung resultiert in der nicht-enzymatischen Bildung von Glykosilierungs- und Dehydrierungs-Kondensations-Komplexen, die als fortgeschrittene Glykosilierungsendprodukte (AGEs) bekannt sind. Diese Komplexprodukte bilden sich an freien Aminogruppen von Proteinen, an Lipiden und an DNA (Bucala und Cerami, 1992; Bucala et al., 1993; Bucala et al., 1984). Dieses Phänomen wird als "Bräunungs-" oder "Maillard"-Reaktion bezeichnet und wurde früh in diesem Jahrhundert in der Nahrungsmittelindustrie (Maillard, 1916) entdeckt. Die Bedeutung ähnlicher Prozesse in der Biologie wurde erst nach der Entdeckung glykosilierten Hämoglobins und dessen erhöhter Präsenz bei Diabetikern (Rahbar, 1968, Rahbar et al., 1969) offensichtlich. Bei menschlichen Diabetikern und in Diabetes-Tiermodellen sind diese nicht-enzymatischen Reaktionen beschleunigt und verursachen erhöhte AGE-Bildung und erhöhte Glykosilierung langlebiger Proteine wie Kollagen, Fibronektin, Tubulin, Proteine der Augenlinse, Myelin, Laminin und Aktin zusätzlich zu Hämoglobin und Albumin und auch LDL assoziierter Lipide und Apoproteine. Darüber hinaus wurden braune Pigmente mit zu den Maillard-Produkten später Stadien ähnlichen Spektral- und Fluoreszenz-Eigenschaften in vivo in Verbindung mit mehreren langlebigen Proteinen wie den Proteinen der Augenlinse und dem Kollagen älterer Personen gefunden. Eine altersbezogene lineare Zunahme an Pigmenten zwischen dem Alter von 20 bis 90 Jahren wurde beim menschlichen Durakollagen beobachtet. AGE modifizierte Proteine nehmen während des Alterns langsam zu und es wird von ihnen angenommen, dass sie zum normalen Gewebeumbau betragen. Ihr Spiegel nimmt bei Diabetikern als Ergebnis anhaltend hoher Blutzuckerspiegel zu und führt durch verschiedene Mechanismen einschließlich Veränderung der Funktion und Struktur von Gewebeproteinen, Stimulation der zellulären Antworten durch AGE-spezifische Rezeptoren oder der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS) (vgl. Boel et al., 1995 wegen eines neueren Übersichtsartikels) zu Gewebeschäden. Die strukturelle und funktionelle Unversehrtheit der betroffenen Moleküle, die oft bedeutende Rollen bei zellulären Funktionen spielen, wird durch diese Modifikationen mit schwerwiegenden Folgen für betroffene Organe wie Niere, Auge, Nerven oder mikrovaskuläre Funktionen (Silbiger et al., 1993; Brownlee et al., 1985) gestört.

[0003] Es ist bekannt, dass strukturelle Änderungen an Makromolekülen durch AGEs unter normalen Umständen mit zunehmendem Alter gehäuft auftreten. Dieses zunehmende Auftreten wird bei Diabetes massiv beschleunigt und ist stark mit Hyperglykämie assoziiert. Die Bildung von AGE an einem Protein in der subendothelialen Basalmembran führt beispielsweise zur extensiven Ausbildung von Quervernetzungen, was zu schweren strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Protein/Protein- und Protein/Zell-Interaktion in der Gefäßwand führt (Haitoglou et al., 1992; Airaksinen et al., 1993).

[0004] Es ist zur Diskussion gestellt worden, dass die vermehrte Bildung und die Akkumulation fortgeschrittener Glykosylierungsendprodukte (AGEs) bei der Pathogenese diabetischer Komplikationen und beim Altern eine bedeutende Rolle spielen und zu progressiver und irreversibler intermolekularer Proteinquervernetzung führen (Monnier et al., 1986). Dieser Prozess wird durch Diabetes beschleunigt und es wurde postuliert, dass er zur Entwicklung einer Bandbreite diabetischer Komplikationen einschließlich Nephropathie (Nicholls und Mandel, 1989), Retinopathie (Hammes et al., 1991) und Neuropathie (Cameron et al., 1992) beiträgt. Insbesondere führt die Gewebeschädigung der Nieren durch AGEs zu einer progressiven Abnahme der renalen Funktion und zu terminaler Niereninsuffizienz (end-stage renal disease = ESRD) (Makita et al., 1994) und zur Anhäufung niedermolekularer AGE-Peptide (Glykotoxine) (Koschinsky et al., 1997) im Serum von Patienten mit ESRD (Makita et al., 1991). Diese niedermolekularen AGEs können leicht neue Quervernetzungen mit Plasma- oder Gewebekomponenten, z. B. mit Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) (Bucala et al., 1994) oder Kollagen (Miyata et al., 1993) ausbilden und das Fortschreiten der Gewebeschädigung und die Morbidität bei Diabetikern beschleunigen.

[0005] Unlängst wurde über direkte, auf den Beitrag der AGEs beim Fortschreiten der diabetischen Nephropathie (Vlassara et al., 1994) deutende Hinweise berichtet. Tatsächlich induziert die Infusion bereits gebildeter AGEs bei gesunden Ratten glomeruläre Hypertrophie und mesangiale Sklerose, Expression der Gene für Matrixproteine und die Produktion von Wachstumsfaktoren (Brownlee et al., 1991; Vlassara et al., 1995). Weitere Studien haben gezeigt, dass Aminoguanidin (AG), ein Inhibitor der AGE-Bildung, die Gewebeschädigung der

Glomeruli verbessert und die Albuminurie bei induzierten diabetischen Ratten verbessert (Soulis-Liparota et al., 1991, Itakura et al., 1991). Beim Menschen haben erniedrigte Hämoglobin(Hb)-AGE-Spiegel (Makita et al., 1992) einhergehend mit einer Verbesserung der Nierenfunktion als Ergebnis einer Aminoguanidin-Behandlung bei Diabetikern weitere Hinweise für die Bedeutung der AGEs bei der Pathogenese diabetischer Komplikationen geliefert (Bucala und Vlassara, 1997).

[0006] Die weltweite, insbesondere in den USA auftretende Verbreitung von Diabetes mellitus, die in diesem Land Millionen von Patienten mit einer bedeutenden Zunahme von Morbidität und Mortalität zusammen mit der hohen finanziellen Belastung für die Behandlung diabetischer Komplikation heimsucht, sind bedeutende Anreize für die Suche nach und die Entwicklung von Arzneimitteln mit einem Potential zur Verhütung und Behandlung der Komplikationen dieser Erkrankung. Bisher sind die Mechanismen der durch Hyperglykämie verursachten Gewebeschädigung bei Diabetikern nicht gut verstanden. Jedoch sind vier pathogene Mechanismen einschließlich erhöhter Polyolstoffwechselaktivität, Aktivierung von bestimmten Proteinkinase C-(PKC)-Isoformen, Bildung und Akkumulation fortgeschrittener Glykosilierungsendprodukte und erhöhte Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Kennedy und Lyons, 1997) diskutiert worden. Jüngste immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen, von ESRD-Patienten erhaltenen Nierengeweben (Horie et al., 1997) und an Linsen diabetischer Ratten (Matsumoto et al., 1997) unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Carboxymethyllysin (CML), Pentosidin, den beiden bekannten Glykosilierungsprodukten, und Pyrralin haben diese AGE-Komponenten in verschiedenen Läsionen der Nieren und der Rattenlinsen lokalisieren können und weitere Hinweise zugunsten der AGE-Bildung in enger Verbindung mit der Erzeugung von ROS als hauptsächliche Faktoren bei der Verursachung dauerhafter und irreversibler Modifikation der Gewebeproteine bereitgestellt. Deshalb sind Inhibitoren der AGE-Bildung und Antioxidantien vielversprechend als wirksame Mittel zur Verhütung und Behandlung diabetischer Komplikationen.

[0007] Zusätzlich zu Alterung und Diabetes ist die Bildung von AGEs mit verschiedenen pathologischen Zuständen verbunden. IgM-Anti-IgG-AGE erscheint in klinischen Messungen mit der Aktivität rheumatoider Arthritis (Lucey et al., 2000) assoziiert zu sein. Eine Korrelation zwischen AGEs und rheumatoider Arthritis wurde auch bei nordamerikanischen Indianern (Newkirk et al., 1998) festgestellt. AGEs sind in den Gehirnplaques bei der Alzheimer-Erkrankung zugegen und ihre Gegenwart kann helfen, die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung zu fördern (Durany et al., 1999; Munch et al., 1998; Munch et al., 1997). Urämische Patienten haben im Vergleich zu altersangeglichenen Kontrollen erhöhte Spiegel von Serum-AGEs (Odani et al., 1999; Dawnay und Millar, 1998). AGEs sind auch mit Neurotoxizität in Verbindung gebracht worden (Kikuchi et al., 1999). AGE-Proteine sind bei Mäusen (Sano et al., 1999) und Dialyse-Patienten (Takayama et al., 1998) mit Arteriosklerose in Verbindung gebracht worden. Eine Studie an mit Aminoguanidin gefütterten Kaninchen zeigte, dass erhöhte Mengen von Aminoguanidin zu reduzierter Plaquebildung in der Aorta führen und legt damit nahe, dass fortgeschrittene Glykosilierung an der Atherogenese beteiligt sein könnte, und zeigt die Möglichkeit auf, dass Inhibitoren der fortgeschrittenen Glykosilierung den Prozess verzögern können (Panagiotopoulos et al., 1998). Erhebliche Ablagerung von N(epsilon)carboxymethyllysin (CML), einem fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukt wird bei Hyalineinschlüssen in Astrocyten bei Personen mit familiärer amyotropher Lateralsklerose gesehen, nicht aber in gesunden Kontrollen (Kato et al., 1999; Shibata et al., 1999). Zigarettenrauchen ist auch mit erhöhter Akkumulation von AGEs im Plasma-LDL, in den Strukturproteinen in den Gefäßwänden und in den Proteinen der Augenlinse in Verbindung gebracht worden, wobei einige dieser Wirkungen zur Pathogenese der Arteriosklerose und zu anderen mit Tabakgebrauch verbundenen Erkrankungen führen (Nicholl und Bucala, 1998). Schließlich hat eine Studie, bei der Ratten Aminoguanidin gefüttert wurde, gezeigt, dass die Behandlung vor progressiver kardiovaskulärer und renaler Verschlechterung schützte (Li et al., 1996).

[0008] Der Mechanismus der Hemmwirkungen von Aminoguanidin in der Kaskade der Glykosilierungsereignisse ist untersucht worden. Gegenwärtig ist der genaue Mechanismus der AG-vermittelten Inhibierung der AGE-Bildung nicht vollständig bekannt. Mehrere in vitro Versuchsreihen führten zu gegensätzlichen Folgerungen. Um es kurz zu machen, verursachen erhöhte Konzentrationen reduzierender Zucker spontane Reaktionen zwischen der Carbonylgruppe bei Kohlenhydraten und der Aminogruppe bei Proteinen, was zum Folgenden führt:

1. Reversible Bildung von Schiffschen Basen gefolgt von
2. Amadori-Kondensations/Dehydrierungs-Produkten wie 3-Deoxyglucoson (3-DG), einer hoch reaktiven Dicarbonylverbindung (Kato et al., 1990).
3. Irreversible und hochreaktive fortgeschrittene Glykosilierungsendprodukte. Beispiele für frühe Amadori-Produkte sind Ketoamine, die zur Bildung später AGEs weitere Kondensationsreaktionen durchlaufen. Eine Anzahl von AGE-Produkten wurde gereinigt und unlängst charakterisiert, wobei jede nur eine geringe Fraktion der in vivo erzeugten AGEs darstellt. Beispiele sind Pyrralin, Pentosidin, Carboxymethyllysin (CML), Carboxyethyllysin (CEL), Crossline, Pyrrolopyridin, Methylglyoxallysin-Dimer (MOLD), Arg-Lys-Imi-

dazol, Argininpyridin, Cypentodin, Piperidindinonenol und -alkyl, Formyl, Diglycosylpyrrol (Vlassara, 1994).

[0009] Die Analyse der in vitro an einem synthetischen Peptid gebildeten Glykosilierungsprodukte hat gezeigt, dass Aminoguanidin die Bildung der frühen Amadori-Produkte nicht hemmt (Edelstein and Brownlee, 1992). Ähnliche Schlüsse wurden durch Analyse der an BSA gebildeten Glykosilierungsprodukte erzielt (Requena et al., 1993). In beiden Experimenten wurde die Bildung von AGE durch AG stark inhibiert wie durch Fluoreszenzmessungen und Massenspektrometrie analysiert. Durch Massenspektrometrie konnten keine Peptidkomplexe mit molekularen Massen detektiert werden, die dem Einbau von AG in den Komplex entsprochen hätten. Detaillierte mechanistische Studien unter Verwendung von NMR, Massenspektroskopie und Röntgendiffraktion haben gezeigt, dass Aminoguanidin mit dem AGE-Vorläufer 3-DG zur Bildung von 3-Amino-5- und 3-Amino-6-substituierten Triazinen (Hirsch et al., 1992) reagiert. Im Gegensatz dazu haben andere Experimente unter Verwendung markierten ¹⁴C-AGs mit Linsenproteinen nahe gelegt, dass AG an die Proteine gebunden wird und auch mit der aktiven Aldoseform freier Zucker reagiert (Harding, 1990).

[0010] Über einige andere potentielle Arzneimittelkandidaten als AGE-Inhibitoren ist unlängst berichtet worden. Diese Studien haben die Fähigkeit der Mittel zur Hemmung der AGE-Bildung und AGE-Proteinquervernetzung im Vergleich zu Aminoguanidin (AG) durch in vitro- und in vivo-Evaluation ausgewertet (Nakamura et al., 1997; Kochakian et al., 1996). Ein kürzlicher Durchbruch auf diesem Gebiet ist die Entdeckung einer Verbindung, N-Phenacylthiazoliumbromid (PTB), die selektiv von AGE stammende Proteinquervernetzungen in vitro und in vivo (Vasan et al., 1996; Ulrich und Zhang, 1997) spaltet. Die pharmakologische Fähigkeit zur Spaltung irreversibler AGE-vermittelter Proteinquervernetzungen bietet eine potentielle therapeutische Nutzung.

[0011] Es ist gut dokumentiert, dass frühes pharmazeutisches Eingreifen gegen die langfristigen Folgen der Hyperglykämie-induzierten Quervernetzung die Entwicklung später Diabetes-Komplikationen verhindert. Die Entwicklung von nicht-toxischen und hoch wirksamen Arzneimitteln, die die Glucose-vermittelte Quervernetzung in den Geweben und Körperflüssigkeiten vollständig unterbindet ist ein äußerst erstrebenswertes Ziel. Der Prototyp der zur Intervention bei der Bildung von AGEs an Proteinen sowohl in vitro als auch in vivo untersuchten pharmazeutischen Verbindungen ist Aminoguanidin (AG), eine kleine Hydrazin-ähnliche Verbindung (Brownlee et al., 1986). Jedoch wurde für eine Anzahl weiterer Verbindung eine solche Hemmwirkung auf die AGE-Bildung gefunden. Beispiele dafür sind D-Lysin (Sensi et al., 1993), Desferrioxamin (Takagi et al., 1995), D-Penicillamin (McPherson et al., 1988), Thiaminpyrophosphat und Pyridoxamin (Booth et al., 1997), die keine strukturellen Ähnlichkeiten mit Aminoguanidin haben.

[0012] Es werden derzeit klinische Versuche mit AG als erstem zur Hemmung der AGE-Bildung vorgesehenem Arzneimittel durchgeführt (Corbett et al., 1992). Eine Reihe von hydrazinähnlichen Verbindungen und N-hydrazinverbindungen wurden untersucht. Bisher hat sich AG als die nützlichste Verbindung mit weniger Nebenwirkungen als die anderen im Stand der Technik getesteten Verbindungen erwiesen. Jedoch ist AG ein gut bekannter selektiver Inhibitor von Stickoxid (NO) und kann auch antioxidative Effekte haben (Tilton et al., 1993).

[0013] Eine Anzahl weiterer potentieller als AGE-Inhibitoren zu verwendender Arzneimittelkandidaten ist unlängst entdeckt und sowohl in vitro als auch in vivo (Nakamura et al., 1997; Soulis et al., 1997) untersucht worden. Trotz des vielversprechenden Erfolges in Untersuchungen mit Aminoguanidin und ähnlichen Verbindungen besteht weiterhin Bedarf, zusätzlich AGE-Hemmer zu entwickeln, und die Verfügbarkeit und die Bandbreite der Aktivität und des therapeutischen Nutzens zu erhöhen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Für Derivate von aryl- und heterocyclischem Ureido- und aryl- und heterocyclischen Garboxamidphenoxisobuttersäuren und von Benzoessäure wurde gefunden, dass sie die nicht-enzymatische Glykosilierung von Proteinen inhibieren, die häufig zur Bildung von fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukten und Quervernetzungen führt. Für viele weitere Phenoxybuttersäurederivate sowie auch für gewisse andere, unten aufgeführte Verbindungen wurde auch gefunden, dass sie die nichtenzymatische Glykosilierung von Proteinen hemmen. Die nicht-enzymatische Glykosilierung und Quervernetzung von Proteinen ist Teil des Alterungsprozesses mit Glykosilierungsendprodukten und der mit dem Lebensalter zunehmenden Quervernetzung langlebiger Proteine. Dieser Prozess wird durch erhöhte Konzentrationen reduzierender Zucker im Blut und in der intrazellulären Umgebung verstärkt wie er bei Diabetes auftritt. Die strukturelle und funktionelle Integrität der betroffenen Moleküle wird durch diese Modifikationen beeinträchtigt und dies kann zu schwerwiegenden Folgen führen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Hemmung dieses Prozesses nicht-enzymatischer Glykosilierung und Quervernetzungen und damit zur Hemmung einiger der schädlichen, durch Diabetes

oder durch Alterung verursachten Auswirkungen verwendet werden. Die Verbindungen sind auch nützlich zur Verhütung von vorzeitiger Alterung, rheumatoider Arthritis, Morbus Alzheimer, Urämie, Neurotoxizität, Arteriosklerose, Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie und des Verderbens von Proteinen in Nahrungsmitteln und können die Verfärbung von Zähnen verhindern.

KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0015] **Fig. 1** stellt die allgemeine Formel dar, die viele, aber nicht alle der aryl- und heterocyclischen Ureido- und aryl- und heterocyclischen Carboxamidophenoxyisobuttersäuren der Erfindung umfasst. R_1 , R_2 , R_3 und R_4 können gleich oder verschieden sein und sind unabhängig voneinander aus der aus Wasserstoff, Halogen, unverzweigtem oder verzweigt-kettigem Alkyl von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl von 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen bestehenden Gruppe ausgewählt, R_5 und R_6 können gleich oder verschieden sein und sind aus der aus Wasserstoff, Halogen, unverzweigten oder verzweigt-kettigen Alkylgruppen von 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Alkyl, worin der Alkylanteil von 1 bis 6 Kohlenstoffatome hat, Cycloalkyl von 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl bestehenden Gruppe ausgewählt und R_7 ist Wasserstoff oder eine unverzweigte oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen.

[0016] Die **Fig. 2A–B** zeigen die Wirkungen der verschiedenen Inhibitorverbindungen auf Vollblut, das während 5 h (**Fig. 2A**) oder 16 h (**Fig. 2B**) mit δ -Glu inkubiert wurde. Die Balken der Graphik stellen die erhaltenen HbA_{1c} -Spiegel dar. Die Inhibitoren wurden mit 1 mM Endkonzentrationen verwendet, außer Aminoguanidin, dessen Konzentration bei 50 mM lag. Bei **Fig. 2A** bedeuten die Balken der Graphik: A: Grundlinienkontrolle, die Blut und PBS, aber kein δ -Glu enthält; B: enthält δ -Glu behandeltes Blut, ohne das ein Inhibitor zugegen ist; C: enthält Blut plus δ -Glu plus Aminoguanin; D–L: diese enthalten Blut plus δ -Glu plus LR26, bzw. LR28, LR29, LR33, LR36, LR41, LR45, LR49 und LR62. Bei **Fig. 2B** bedeuten die Balken der Graphik: A: Grundlinienkontrolle, die Blut und PBS, aber kein δ -Glu enthält; B: enthält δ -Glu behandeltes Blut ohne Inhibitor; C: enthält Blut plus δ -Glu plus Aminoguanidin; D–L: diese enthalten Blut plus δ -Glu plus LR66 bzw. LR67, LR71, LR79, LR80, LR81, LR85, LR88 und LR92. Alle Proben enthalten dieselbe Konzentration an Blut und δ -Glu.

[0017] **Fig. 3A–B** veranschaulichen die Daten aus einem BSA-Glucose-Assay und zeigen die Prozenzhemmung der AGE-Bildung durch 1 mM der Inhibitoren im Vergleich zu 50 mM Aminoguanidin. Bei **Fig. 3A** bedeuten die Balken der Graphik: A: Aminoguanidin, B: LR26, C: LR28, D: LR29, E: LR33, F: LR36, G: LR41, H: LR45, I: LR49 und J: LR62. Bei **Fig. 3B** bedeuten die Balken der Graphik: A: Aminoguanidin, B: LR66, C: LR67, D: LR71, E: LR79, F: LR80, G: LR81, N: LR85, I: LR88 und J: LR92.

[0018] **Fig. 4A–B** stellen Daten eines G.K.-Ribose-Assay dar und zeigen die Prozenzhemmung der AGE-Bildung durch 1 mM der Inhibitoren im Vergleich zu 50 mM Aminoguanidin. Bei **Fig. 4A** bedeuten die Balken der Graphik: A: Aminoguanidin, B: LR26, C: LR28, D: LR29, E: LR33, F: LR36, G: LR41, H: LR45, I: LR49 und J: LR62.

[0019] Bei **Fig. 4B** bedeuten die Balken der Graphik: A: Aminoguanidin, B: LR66, C: LR67, D: LR71, E: LR79, F: LR80, G: LR81, H: LR85, I: LR88 und J: LR92.

[0020] **Fig. 5** zeigt die Strukturformeln von LR1–LR14.

[0021] **Fig. 6** zeigt die Strukturformeln von LR15–LR28.

[0022] **Fig. 7** zeigt die Strukturformeln von LR29–LR42.

[0023] **Fig. 8** zeigt die Strukturformeln von LR43–LR56.

[0024] **Fig. 9** zeigt die Strukturformeln von LR57–LR73.

[0025] **Fig. 10** zeigt die Strukturformeln von LR74–LR92.

[0026] Die **Fig. 11A–B** zeigen die Ergebnisse immunchemischer Studien über die Hemmwirkungen repräsentativer Verbindungen unter Verwendung eines spezifischen ELISA-Assays, bei dem die Hemmung der Quervernetzung von Kollagen mit AGE-BSA gemessen wird.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Im Zuge des Screenens verschiedener Klassen organischer Verbindungen zur Untersuchung ihrer möglichen Hemmwirkungen auf fortgeschrittene Glykosilierungsendprodukte (AGEs) wurde gefunden, dass die meisten der Phenylureido-substituierten Phenoxylpropionsäurederivate inhibitorische Wirkungen hatten und mehrere dieser Verbindungen in einer niedrigeren als der gleichstark hemmenden Aminoguanidin-Konzentration wirksame Inhibitoren der AGE-Bildung waren.

[0028] Diese Verbindungen und deren nützliche, in der vorliegenden Erfindung verwendeten Zusammensetzungen enthalten Agentien, die zur Reaktion mit der hochaktiven Carbonylzwischenstufe eines frühen Glykosilierungsproduktes in der Lage sind und dadurch diese frühen Produkte an der späteren Bildung der fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukte hindern, die zu Proteinquervernetzung und zu Proteinalterung führen.

[0029] Andere für die vorliegende Erfindung vorstellbare Anwendungen sind: Verhütung vorzeitigen Alterns und des Verderbens der Proteine in Nahrungsmitteln. Die vorliegenden Agentien sind auch im Bereich der Mundhygiene nützlich, da sie das Verfärben der Zähne verhüten.

Verbindungen

[0030] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind zusammengefasst als Derivate von aryl- und heterocyclischen Ureido- und aryl- und heterocyclischen Carboxamidophenoxyisobuttersäuren definiert (Rahbar et al., 1999). Eine allgemeine Formel, die mehrere erfindungsgemäße Verbindungen umfasst, ist in **Fig. 1** gezeigt. Diese Verbindungen sind Teil einer ursprünglich wegen ihrer Wirkungen auf die Modifikation der Sauerstoffaffinität von Hämoglobin durch Absenken der Affinität des Hämoglobins gegenüber Sauerstoff entwickelten Serie und sie verschieben die Hämoglobin-Sauerstoff-Dissoziationskurve nach rechts (Rahbar et al., 1987; Lalezari et al., 1988; Lalezari und Lalezari, 1989; US-Patent 5 268 500, US-Patent 5 292 935, US-Patent 5 093 367, US-Patent 4 921 997).

[0031] Repräsentative erfindungsgemäße Verbindungen sind in den **Fig. 5–10** von LR1 bis LR92 gezeigt und wurden auf ihre Hemmwirkungen auf Proteinglykosilierung und AGE-Bildung gescreent. Für diese Veröffentlichung wurden den Strukturen die folgenden Namen zugeordnet:

- LR1: 4-[3-(6-Chlor-2,4-(1H,3H)chinazolinmedion)]phenoxyisobuttersäure, MW = 374,5
- LR2: 4-(2-Furoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 289
- LR3: (8G5)* 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 383
- LR4: (8p) 4-(4-Ethylcarbamatphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 401
- LR5: (8G4) 4-(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 383
- LR6: 4-Cyclohexylureidophenoxyisobuttersäure, MW = 318
- LR7: 4-(2,3-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 383
- LR8: (8nf) 4-(4-Carboxaldehydphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 328
- LR9: 4-(2-Naphthylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 341
- LR10: (8c1) 4-(4-Methoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 344
- LR11: (8c2) 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 374
- LR12: (8k) 4-(4-Chlor-3-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 393,5
- LR13: (8b1) 4-(4-Methylphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 328
- LR14: (8c3) 4-(3,4,5-Trimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 404
- LR15: 4-(3-Chlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 348,5
- LR16: N-4-(Nitrophthalimido)phenoxyisobuttersäure, MW = 378
- LR17: 4-(2-Thienylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 305
- LR18: 4-(4-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 300
- LR19: 4-(3,4,5-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 417,5
- LR20: L-Bis-[4-(4-chlorbenzamidophenoxyisobutyl)]cystin, MW = 871
- LR21: 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutylamidomethylcyclohexyl-4-carbonsäure, MW = 522
- LR22: DL-N-4[(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyl]pipecolinsäure, MW = 494
- LR23: 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyl-1-amidocyclohexan-1-carbonsäure, MW = 508
- LR24: 4-(4-Iodphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 440
- LR25: 4-(4-Dimethylaminophenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 345
- LR26: 4-(2,4,6-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 417,5
- LR27: 4-(2,4,6-Trimethylphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 356
- LR28: 4-(4-Chlorphenoxyacetamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 363,5
- LR29: 4-(4-Chlor-3-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 406,5

LR30: 4-Chlordiphenylharnstoff-4'-carbonsäure, MW = 290,5
 LR31: 4-(3,4-Dichlorphenylacetamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 382
 LR32: Diphenylurea-4-carbonsäure, MW = 240
 LR33: 4-(2-Chlor-4-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 393,5
 LR34: 4-(Nicotinylamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 300
 LR35: 4-Chlorphenoxyisobuttersäure, MW = 208,5
 LR36: 4-(Benzylsulfonamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 349
 LR37: 4-(2,5-Dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 396
 LR38: L-4-Chlorbenzoylphenylalanin, MW = 303,5
 LR39: 2-Isopropyl-5-methylphenoxyisobuttersäure, MW = 236
 LR40: 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 374
 LR41: 4-(3-Chlor-4-fluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 393,5
 LR42: 4-(3,5-Dichlorbenzamidoethyl)phenoxyisobuttersäure, MW = 384
 LR43: 4-(Phenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 314
 LR44: 4-(Phenylureido-2-chlor)phenoxyisobuttersäure, MW = 348,5
 LR45: 4-(2,6-Dichlor-4-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 406,5
 LR46: 4-(3,5-Difluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 350
 LR47: 4-(N-Methyl-4-chlorbenzamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 347,5
 LR48: 4-(4-Nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 359
 LR49: 4-(Phenylureido)phenoxyessigsäure, MW = 286
 LR50: 4-(4-Chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 351,5
 LR51: 4-(2-Hydroxy-4-chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 377,5
 LR52: 4-(2-Hydroxy-3,5-dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure, MW = 412
 LR53: 4-(2-Chlor-5-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 393,5
 LR54: 4-Carboxyphenoxyisobuttersäure, MW = 224
 LR55: 4-(4-Carboxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 358
 LR56: 4-Ureidophenoxyisobuttersäure, MW = 236
 LR57: Harnstoff-1,3-bis-4-phenoxyisobuttersäure, MW = 416
 LR58: 4-(4-Morpholinosulfonylphenylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 463
 LR59: 4-[(3,4-Dichlorphenylmethyl)2-chlorphenylureido]phenoxyisobuttersäure, MW = 507,5
 LR60: 4-(3-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 315
 LR61: 4-[(3,5-Dichlorbenzoylamino)methyl]phenoxyisobuttersäure, MW = 382
 LR62: 4-(2,4-Dichlorphenacylamino)phenoxyisobuttersäure, MW = 382
 LR63: 4-(Benzylureido)phenoxyisobuttersäure, MW = 328
 LR64: 4-Acetamidobenzoessäure
 LR65: 2-Chlor-4-acetamidobenzoessäure
 LR66: 4-Aminophenoxyisobuttersäure
 LR67: 4-Acetoxybenzoessäure
 LR68: 4-Hydroxybenzoessäure
 LR69: 2-Acetamidoterephthalsäure
 LR70: 5-Chlor-2-acetoxybenzoessäure
 LR71: 2-Acetamido-5-acetoxybenzoessäure
 LR72: 2-Acetoxy-5-hydroxybenzoessäure
 LR73: 2-Amino-5-hydroxybenzoessäure
 LR74: 2-(8-Chinolinoxyl)propionsäure
 LR75: 4-Aminobenzoylglycin
 LR76: N-Guanylguanidino-N'-4-phenoxyessigsäure
 LR77: 2-(2,5-Dichlorphenoxy)propionsäure
 LR78: 4-Dimethylaminobenzoessäure
 LR79: 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoessäure
 LR80: 4-Sulfonamidobenzoessäure
 LR81: 2-Amino-4-chlorbenzoessäure
 LR82: 4-Hydroxyphenylbuttersäure
 LR83: 2-Methyl-4-chinolincarbonensäure
 LR84: 2-Methyl-3,4-chinolindicarbonensäure
 LR85: 6-Brom-2-methyl-3,4-chinolindicarbonensäure
 LR86: 4-Acetamidophenoxyessigsäure
 LR87: 1-(4-Chlorphenoxybutyrylamido)-1-cyclohexancarbonensäure
 LR88: 4-Chlorphenylaminocarbonyliminodiessigsäure
 LR89: 3-Chlor-4-nitrophenylureidophenoxyisobuttersäure

LR90: Methylenbis[4,4'-(2-chlorphenylureidophenoxyisobuttersäure)]

LR91: N,N'-Bis(2-chlor-4-carboxyphenyl)formamidin

LR92: N,N'-Bis(2-carboxyphenyl)formamidin

* Die Zeichen in Klammern sind Lalezari und Lalezari (1989) entnommen.

[0032] Obwohl in der obigen Liste 92 Verbindungen aufgeführt sind, sind viele dieser Verbindungen einander recht ähnlich und können zusammen in eine Gruppe eingeordnet werden. Zum Beispiel sind die Verbindungen LR1 und LR16 beide cyclische Ureidophenoxyisobuttersäuren, die Verbindungen LR2, LR9, LR17, LR20, LR28, LR29, LR31, LR34, LR37, LR38, LR42, LR47, LR50, LR51, LR52, LR61 und LR62 sind Amidophenoxyisobuttersäuren, die Verbindungen LR3-LR8, LR10-LR15, LR19, LR21-LR27, LR30, LR32, LR33, LR40, LR41, LR43, LR44, LR46, LR48, LR49, LR53, LR55, LR58-LR60, LR63, LR89 und LR90 sind Arylureidophenoxyisobuttersäuren, die Verbindungen LR35, LR39, LR54, LR56, LR57, LR66, LR74, LR76, LR77, LR82, LR86 und LR87 sind Clofibrinsäure-Derivate, die Verbindungen LR91 und LR92 sind Formimid-Derivate und die Verbindungen LR64, LR65, LR67-LR75, LR78 und LR83-LR85 sind Arylcarbonsäure-Derivate.

[0033] Die obigen Verbindungen sind in der Lage, die Bildung der fortgeschrittenen Glykosilierungsprodukte an Zielproteinen und die resultierende Proteinquervernetzung zu hemmen. Das grundlegende Prinzip der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Agentien, die den Post-Glykosilierungsschritt, d.h. die Bildung fluoreszierender Chromophore blockieren, wobei die Gegenwart dieser Chromophore mit den schädlichen Folgen von Diabetes und Alterung verbunden ist und zu diesen führt. Ein ideales Agens würde die Bildung des Chromophors und seine assoziierten Quervernetzungen von Proteinen und das Einfangen von Proteinen auf anderen Proteinen, wie sie in den Arterien und den Nieren auftreten, verhüten. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können Säugern einschließlich dem Menschen zur Verhütung oder Verringerung der Proteinglykosilierung und Quervernetzung (Proteinalterung) verabreicht werden. Die Verbindungen können oral und in Abhängigkeit von der Aktivität der einzelnen Mittel in Einzel- oder individuell unterschiedlichen Dosierungen verabreicht werden. Zusätzlich können die Verbindungen parenteral oder rektal verabreicht werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen und das den verschiedenen erfindungsgemäßen Assayverfahren zugrunde liegende Prinzip und deren Verwendung werden in den folgenden Beispielen veranschaulicht.

BEISPIEL 1

Hämoglobin- δ -Gluconolacton (δ -Glu)-Assay

[0034] Die Untersuchung der Bildung früher Glykosilierungsprodukte (Amadori) an Hämoglobin (HbA_{1c}) wird durch Inkubation von Erythrozyten mit einer oxidierten Form von Glucose in Gegenwart und in Abwesenheit der Inhibitorverbindung durchgeführt, gefolgt von der Bestimmung von (HbA_{1c}) im Test im Vergleich zur Kontrolle (Rahbar und Nadler, 1999). Dieser Test beruht auf einem neueren Bericht von Lindsay et al. (1997). δ -Glu, ein oxidiertes Analogon von Glucose, kann innerhalb der Erythrozyten schnell mit Hämoglobin reagieren und die HbA_{1c} -Spiegel innerhalb von Stunden nach der Inkubation beträchtlich erhöhen. Im Gegensatz dazu benötigt Glucose für das Auftreten einer gleichwertigen Reaktion Wochen. Dieser Befund wurde verwendet, um ein Assay-Verfahren zur Messung der Glykosilierung von Hämoglobin im Frühstadium (Amadori-Produkte) und einen Assay zur Bewertung der Fähigkeit eines Inhibitors zur Hemmung der HbA_{1c} -Bildung auszuarbeiten. Um es kurz zu beschreiben, wurde frisch abgenommenes Blut in Kalium-EDTA gegeben und zur Inkubation innerhalb von 30 min nach Entnahme durch Mischen von 200 μl Blut entweder mit 40 μl PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4, allein oder mit 50 mMol/l δ -Glu (Sigma) enthaltendem PBS oder mit 50 mMol/l δ -Glu plus 1 mMol/l Inhibitor enthaltendem PBS vorbereitet. Nach Inkubation während 5 h bei 37°C wurde der Prozentsatz des vorliegenden glykosilierten Hämoglobins bestimmt. Der Prozentsatz glykosilierten Hämoglobins (HbA_{1c}) wurde unter Verwendung eines geeigneten Ionenaustauscher-Systems bestimmt (BIORAD DIAMAT) bestimmt. Die Blutproben wurden dreifach analysiert. Die %-Hemmung der (HbA_{1c})-Bildung durch die Verbindung wurde gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$((B-C)/(B-A)) \times 100$$

, worin A die Grundlinien- HbA_{1c} -Konzentration im Kontrollröhrchen, das nicht mit δ -Glu behandelt wurde, B die HbA_{1c} -Konzentration im mit δ -Glu inkubierten Blut, C der HbA_{1c} -Gehalt im sowohl mit δ -Glu als auch mit der Inhibitorverbindung behandelten Teströhrchen sind.

[0035] Die Menge der HbA_{1c} -Bildung unter Verwendung von δ -Glu-behandeltem Vollblut gesunder, freiwilliger Probanden unter Verwendung von 1 mMol/l der Verbindungen ist in den **Fig. A–B** für ausgewählte Verbindungen gezeigt. Die als Prozenzhemmung der HbA_{1c} -Bildung für alle 92 LR-Verbindungen berechneten Ergebnisse

sind in Tabelle 1 gezeigt. Die **Fig. 2A–B** zeigen die Ergebnisse eines Einzelassays, wohingegen die in Tabelle 1 gezeigten Ergebnisse Durchschnittswerte aus 3 Bestimmungen sind.

[0036] Der obige Versuch legt nahe, dass diese Art der Arzneimittelbehandlung zur Verminderung der mit der Bildung früher Glykosilierungsprodukte – eine Vorstufe bei der Bildung fortgeschrittener Glykosilierungsendprodukte – verbundenen Krankheitssymptomatik von Nutzen ist.

BEISPIEL 2

BSA-Glucose-Assay

[0037] Dieser Test wird zur Bewertung der Fähigkeit der Inhibitoren zur Hemmung der Glucose-vermittelten Fluoreszenzentwicklung von BSA (Ikeda et al., 1996) verwendet. BSA (Fraktion V) von Sigma (50 mg/ml) und 800 mM Glucose (144 mg/ml) wurden in 0,2 g/l NaN_3 enthaltendem 1,5 M Phosphatpuffer, pH 7,4, unter aseptischen Bedingungen bei 37°C während 7 Tagen in Gegenwart oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der Verbindungen inkubiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurde jede Probe auf die Entwicklung der spezifischen Fluoreszenz untersucht (Anregung 370 nm; Emission 440 nm). Die %-Hemmung der AGE-Bildung in der Testprobe wurde für jede Inhibitorverbindung gegenüber der Kontrolle berechnet. Aminoguanidin (50 mM) wurde als Positivkontrolle verwendet.

[0038] Die **Fig. 3A–B** zeigen für eine Auswahl der getesteten Verbindungen die Hemmwirkungen von 1 mM/I des neuen Inhibitors gegenüber 50 mM/I Aminoguanidin. Die in den **Fig. 3A–B** dargestellten Ergebnisse stammen aus 1 Bestimmung. Aus 3 Bestimmungen stammende Durchschnittswerte sind für jede der 92 Verbindungen in Tabelle 1 tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 1

Verbindung	δ -Glu-Assay	G.K.-Ribose-Assay	BSA-Glucose-Assay
AG	12,1	67,0	74,0
LR1	28,8	11,2	24,8
LR2	17,3	36,8	45,0
LR3	25,0	40,0	46,2
LR4	19,2	42,5	48,7
LR5	36,5	33,6	66,2
LR6	25,0	9,1	57,5
LR7	19,2	27,5	39,6
LR8	21,0	23,6	47,5
LR9	17,7	0,0	31,2
LR10	22,5	20,5	56,2
LR11	25,8	18,6	50,0
LR12	22,5	43,6	55,0
LR13	21,0	27,5	48,1
LR14	22,5	18,6	49,3
LR15	22,5	30,0	58,1
LR16	35,1	0,0	29,1
LR17	46,4	26,4	12,5

Verbindung	δ -Glu-Assay	G.K.-Ribose-Assay	BSA-Glucose-Assay
LR18	58,1	26,2	37,5
LR19	41,0	40,0	28,4
LR20	52,8	31,0	12,8
LR21	50,1	15,0	7,1
LR22	42,7	10,0	14,2
LR23	45,0	70,0	42,6
LR24	50,0	41,4	31,2
LR25	52,0	30,5	41,5
LR26	73,8	47,1	38,9
LR27	50,0	52,5	52,0
LR28	50,0	63,3	78,8
LR29	52,0	53,1	44,2
LR30	63,6	18,1	16,2
LR31	54,5	9,6	13,3
LR32	47,7	9,5	32,7
LR33	70,4	25,1	41,1
LR34	52,2	15,1	24,0
LR35	47,7	5,7	42,4
LR36	56,8	30,1	44,4
LR37	40,9	41,2	47,7
LR38	50,9	20,2	13,8
LR39	56,8	18,6	21,2
LR40	50,9	30,6	32,0
LR41	60,7	35,4	37,4
LR42	47,0	21,8	46,8
LR43	58,8	21,5	44,0
LR44	58,8	13,0	42,1
LR45	56,8	31,7	49,5
LR46	55,7	21,1	30,1
LR47	54,0	30,5	34,7
LR48	45,9	31,0	45,5
LR49	57,3	22,9	41,3
LR50	57,3	27,3	42,7
LR51	52,0	0*	0*
LR52	58,3	0*	0*
LR53	54,1	13,6	20,4
LR54	54,1	4,9	22,8
LR55	56,2	11,0	36,8
LR56	46,2	2,1*	39,1*
LR57	48,1	0*	31,1*

Verbindung	δ -Glu-Assay	G.K.-Ribose-Assay	BSA-Glucose-Assay
LR58	40,7	4,5*	49,0*
LR59	48,1	8,0	39,4
LR60	29,6	0*	47,8*
LR61	46,2	13,1	62,0
LR62	53,7	26,0	49,1
LR63	40,7	10,9	60,2
LR64	49	24,7	16,9
LR65	47	39,2	26,3
LR66	49	41,3	28,9
LR67	47	31,1	30,7
LR68	41,1	30,5	24,3
LR69	35,2	32,3	44
LR70	49	36,7	49,2
LR71	39,2	41,1	76,1
LR72	77,2	22,9	27,3
LR73	43,1	18,3	18,9
LR74	22,9	38,6	11,8
LR75	21,3	12,9	21,9
LR76	13,1	39,8	27,9
LR77	52,7	19,2	24,7
LR78	52,7	32,6	20,9
LR79	54,5	48,1	43,1
LR80	20	52,1	56,6
LR81	52,7	10,9	27,4
LR82	52,7	34	10,3
LR83	43,6	24,8	29
LR84	49	18,1	28,1
LR85	47,2	12,9	44,5
LR86	49	30,3	63
LR87	54,5	10,9	22,4
LR88	52,7	9,4	20,8
LR89	44,9	43	35,4
LR90	38,7	30,5	14,5
LR91	34,7	34,2	49,5
LR92	42,8	82,6	89,3

* Diese Verbindungen haben eine intrinsische Fluoreszenz, die mit dem Assay interferiert.

BEISPIEL 3

N-Acetylglycyllysine-methylester (G.K.-Peptid) – Ribose-Assay

[0039] Die Untersuchung der späten Glykosilierungsprodukte (AGEs) und der AGE-Inhibition durch die neuen Inhibitorverbindungen wurde durch Inkubation von G.K.-Peptid in Ribose in Gegenwart oder Abwesenheit einer der Verbindungen, gefolgt von der Bestimmung der im Verlauf der Glykosilierung und AGE-Bildung erzeug-

ten Chromophore durch Bestimmung ihrer spezifischen Fluoreszenz getestet. Das zur Untersuchung der Fähigkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Hemmung der Quervernetzung von N-Acetylglycyllysine-methylester in Gegenwart von Ribose verwendete Verfahren nach Nagaraj et al (1996) war wie nachfolgend beschrieben:

Stammlösungen:

0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, enthaltend NaN_3 0,2 g/l

GK-Peptid (Sigma) 80 mg/ml in 0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4

Ribose 800 mM (120 mg/ml) in 0,5 M Phosphat-Puffer

[0040] Gleiche Volumina (0,1 ml) der 3 Stammlösungen wurden miteinander vermischt, durch ein 0,2 Mikrometer-Filter (Corning) filtriert und unter aseptischen Bedingungen während 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inhibitorverbindungen wurden in einer Endkonzentration von 1 mMol/l zugegeben. Am Ende des Inkubationszeitraums wurden die Proben hinsichtlich ihrer spezifischen Fluoreszenz analysiert (Anregung 340 nm; Emission 420 nm). Die %-Hemmung durch verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurde wie oben beschrieben berechnet. Aminoguanidin mit 50 mM wurde als Positivkontrolle verwendet.

[0041] Die **Fig. 4A–B** zeigen die Hemmwirkungen einer Auswahl von Verbindungen zum Abblocken der spezifischen Fluoreszenz von Protein-AGE in diesen Einzeluntersuchungen unter Verwendung des G.K.-Peptid-Ribose-Assays. Die Ergebnisse für alle 92 Verbindungen sind in Tabelle 1 gezeigt. Die **Fig. 4A–B** zeigen die Ergebnisse eines Einzelassays, wohingegen die Daten in Tabelle 1 Durchschnittsergebnisse aus 3 Assays jeder Verbindung sind. Die aus den beiden obigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse (Beispiele 2 und 3) legen nahe, dass diese Art der Arzneimitteltherapie zur Verminderung der mit der Bildung später Glykosilierungsprodukte und Proteinquervernetzung assoziierten Krankheitssymptome von Nutzen ist.

BEISPIEL 4

Lysozymglucose- oder -fructose-Quervernetzungs-Assay

[0042] Lysozymglucose- oder -fructose-Quervernetzungs-Assays nach Taneda und Monnier (1994) sind in vitro-Assays, die zur Untersuchung der Hemmwirkung der Verbindungen auf von AGE abgeleiteten Quervernetzung und AGE-Protein-Komplexbildung durchgeführt werden. Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma) und Glucose oder Fructose in 0,2 g/L NaN_3 enthaltendem 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, wurden mit verschiedenen Testverbindungen gemischt, um eine Endkonzentration von 1 mMol/l Testverbindung, 100 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß und 200 mM Glucose oder 100 mM Fructose zu ergeben. Alle Proben wurden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C während 7 Tagen inkubiert. Nach 7 Tagen wurde jede Probe zur Bestimmung der von AGE abgeleiteten Quervernetzung und AGE-Bildung analysiert. Aliquots wurden auf 20% SDS-PAGE-Gelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen, einer Elektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau gefärbt.

BEISPIEL 5

ELISA-Assay

[0043] Ein spezielles ELISA-Verfahren (Al-abed et al., 1999) wurde zur Untersuchung der Fähigkeit der Testverbindungen zur Hemmung der Quervernetzung von glykosiliertem BSA (AGE-BSA) bezüglich einer mit Kollagen aus Rattenschwanzsehnen beschichteten Platte mit 96 Cavitäten (Biocoat Microtiter-Platten von Collaborative Research) verwendet. Die Quervernetzung von AGE-BSA an eine mit Rattenschwanzsehnen-Kollagen beschichtete Platte wurde mit und ohne Testverbindung in den gewünschten Konzentrationen durchgeführt. Nicht quervernetztes AGE-BSA wurde durch Waschen der Cavitäten entfernt. Das mit Schwanzsehnen-Kollagen auf der beschichteten Platte quervernetzte AGE-BSA wurde dann durch polyklonale, gegen AGE-RNase erzeugte Antikörper quantifiziert. Positive Ergebnisse im Assay zeigen, dass der Inhibitor in der Lage ist, die Menge an AGE-BSA zu verringern, die mit Kollagen Quervernetzungen ausbildet. Aminoguanidin wurde als Positivkontrolle verwendet.

[0044] Die unter Verwendung von fünf repräsentativen Verbindungen erzielten Ergebnisse sind in den **Fig. 11A–B** gezeigt. Die fünf Verbindungen (LR33, LR41, LR20, LR23 und LR62) gehören zu einer Anzahl starker Inhibitoren der AGE-Protein-Quervernetzung. Die Prozenzhemmung gegenüber der Kontrolle wurde für LR33 mit 61 %, für LR41 mit 27,4% für 1 mMol/l und für Aminoguanidin bei 50 mM mit 55,5% berechnet.

Ribonuklease-Ribose-Fluoreszenz – Inhibitions- und Quervernetzungs-Inhibitions-Assays

[0045] Ribonuklease A aus Rinderpankreas (RNase A) ist als Modellprotein zur Untersuchung der Proteinglykosylierung und AGE-Bildung sowie zur Kinetik der AGE-Bildung umfassend eingesetzt worden (Khalifah et al., 1996). RNase A hat den Vorteil, während der Glykosylierungsreaktion nicht auszufallen, wohingegen Lysozym während der Glykosylierung mit Ribose und Glucose ausfällt.

[0046] Beim RNase-Ribose-Assay wird die als Ergebnis der AGE-Bildung in Gegenwart oder Abwesenheit des Inhibitors erzeugte Fluoreszenz im Vergleich zu Aminoguanidin gemessen. Dieser Assay wird auch verwendet, um die Hemmwirkungen einer Verbindung auf die Protein-Quervernetzung und die durch SDS-PAGE gezeigte Bildung von Dimeren und Trimeren festzustellen.

[0047] Versionen dieses Assays sind sowohl mit als auch ohne Unterbrechung erfolgreich durchgeführt worden (Nagaraj et al., 1996). Bei den vorliegenden Versuchen hat sich jedoch das Verfahren mit Unterbrechung als besser erwiesen. In den vorliegenden Assays wurde durchweg Rinder-RNase A Typ 1-A (Sigma) verwendet.

[0048] Bei dem Verfahren ohne Unterbrechung wurde RNase, 1 mg/ml, mit Ribose (0,2 M) bei 37°C in 0,02% Natriumazid enthaltendem 0,4 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, während 7 Tagen im Dunkeln inkubiert. Prospektive Hemmstoffe wurden zu Beginn der Inkubationsphase zur Reaktion gegeben. Alle Lösungen wurden durch Filtration durch ein 0,2 Micron-Filter (Corning) unter sterilen Bedingungen hergestellt. Am Ende der Inkubation wurden die Proben hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. (Anregung 330 nm; Emission 400 nm). Die %-Hemmung der AGE-Bildung wurde für verschiedene Inhibitor-Konzentrationen wie oben beschrieben berechnet.

[0049] Die RNase-Ribose-Assays mit Unterbrechung wurden wie folgt durchgeführt: RNase, 10 mg/ml, wurde mit Ribose (0,5 M) bei 37°C in einem 0,02 % Natriumazid enthaltenden 0,4 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, während 24 h in Abwesenheit der Inhibitor-Verbindung inkubiert. Die Glykosylierung wurde dann durch 1:100 Verdünnung der Reaktion in 0,4 M Phosphatpuffer und Zugabe des Inhibitors unter den gewünschten Bedingungen zu der Reaktion unterbrochen. Das Reaktionsgemisch wurde durch ein Filter von 0,2 Micron filtriert und während weiterer 4 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Am Ende der Inkubationsphase wurden die Proben hinsichtlich ihrer Fluoreszenz wie zuvor beschrieben analysiert und die %-Hemmung berechnet.

[0050] Zum Nachweis der Hemmwirkung der Testverbindung, wobei diese Hemmwirkung in der Hemmung der RNase-Quervernetzung und -Dimer-Trimer-Bildung besteht, wurden die Proben durch SDS-PAGE, wie zuvor beschrieben, analysiert. Bei den Glykosylierungs-Assays mit Unterbrechung wurden die Proben unter Verwendung von Centricon 10 (Amicon) konzentriert und dann auf die Gele aufgetragen.

[0051] Die obigen Beispiele weisen darauf hin, dass diese Arzneimitteltherapie zur Verminderung der mit der Bildung von nicht-enzymatischen Glykosylierungsprodukten (frühe und späte Produkte) und Protein-Quervernetzung assoziierten Krankheitssymptome von Nutzen ist. Die erfindungsgemäßen Verbindungen erwiesen sich in vitro als 10 bis 40mal stärkere Inhibitoren der AGE-Bildung im Vergleich zu Aminoguanidin, das sich bereits in Phase 2-3 der klinischen Studie zur Verhinderung von Diabetes-Komplikationen befindet. In früheren Studien haben sich diese Verbindungen als nicht-toxisch erwiesen. Sie können oral in verschiedenen Dosierungen in Abhängigkeit von der Aktivität des jeweiligen Agens in einer Einzelmengende oder in individuellen Mengen verabreicht werden. Zusätzlich können die Verbindungen auch parenteral oder rektal verabreicht werden.

[0052] Es versteht sich von selbst, dass die in dieser Patentanmeldung offenbarte Erfindung hinsichtlich der Einzelheiten zwar in der bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform offenbart wurde, diese Offenbarung aber nur als Veranschaulichung und nicht als Einschränkung gedacht ist, wie auch in Betracht gezogen wird, dass Modifikationen im Sinne der Erfindung und im Rahmen der folgenden Ansprüche dem Fachmann klar werden.

LITERATURLISTE

- Airaksinen K.E.J. et al. (1993), Cardiovas. Res. 27: 942-945.
Al-Abed et al. (1999), Methods in Enzymology 309: 152-172.
Boel E. et al. (1995), J. Diab. Compl. 9: 104-129.

- Booth A.A. et al. (1997), *J. Biol. Chem.* 272: 5430-5437.
- Brownlee M. et al. (1985), *Diabetes* 34: 938-941.
- Brownlee M. et al. (1986), *Science* 232: 1629-1632.
- Brownlee M. et al. (1991), *N. Engl. J. Med.* 318: 1315-1321.
- Bucala R. und Cerami A. (1992), *Adv. Pharmacol.* 21: 1-33.
- Bucala R. und Vlassara N. (1997), *Experimental Physiology* 82: 327-337.
- Bucala R. et al. (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 105-109.
- Bucala R. et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6434-6438.
- Bucala R. et al. (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9441-9445.
- Cameron N.E. et al. (1992), *Diabetologia* 35: 946-950.
- Corbett J.A. et al. (1992), *Diabetes* 41: 552-556.
- Dawnay A. und Millar D.J. (1998), *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44: 1081-1094.
- Duranay N. et al. (1999), *Eur. Arch. Psychiatn Clin. Neurosci.* 249 Suppl. 3: 68-73.
- Edelstein D. und Brownlee M. (1992), *Diabetes* 41: 26-29.
- Haitoglou C.S. et al. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 12404-12407.
- Hammes N. et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11555-11563.
- Harding JJ (1990), *Arch. Ophthalmol.* 108: 13-14.
- Hirsch J. et al. (1992), *Carbohydrate Res.* 232: 125-130.
- Horie K. et al. (1997), *J. Chm. Invest.* 100: 2995-3004.
- Ikeda K. et al. (1996), *Biochemistry* 35: 8075-8083.
- Itakura M. et al. (1991), *Life Science* 49: 889-897.
- Kato H. et al. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1035: 71-76.
- Kato S. et al. (1999), *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97: 260-266.
- Kennedy L. und Lyons T.J. (1997), *Metabolism* 46: 14-21.
- Khalifah R.G. et al. (1996), *Biochemistry* 35: 4645-4654.
- Kikuchi S. et al. (1999), *J. Neurosci. Res.* 57: 280-289.
- Kochakian M. et al. (1996), *Diabetes* 45: 1694-1700.
- Koschinsky T. et al. (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6474
- Lalezari I. et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6117-6121.
- Lalezari I. und Lalezari P. (1989), *J. Med. Chem.* 32: 2352-2357.
- Li YM, et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3902-3907.
- Lindsay M.R. et al. (1997), *Clin. Chem. Acta* 263: 239-247.
- Lucey M.D. et al. (2000), *J. Rheumatol.* 27: 319-323.
- Maillard L.C. (1916), *Ann. Chem.* 5: 258.
- Makita Z. et al. (1991), *N. Eng. J. Med.* 325: 836-842.
- Makita Z. et al. (1992), *Science* 258: 651-653.
- Makita Z. et al. (1994), *Lancet* 343: 1519-1522.
- Matsumoto K. et al. (1997), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24: 352-354.
- McPherson J.D. et al, (1988), *Biochemistry* 27: 1901-1907.
- Miyata T. et al. (1993), *J. Clin. Invest.* 92: 1243-1252.
- Monnier V. et al. (1986), *N. Engl. J. Med.* 314: 403-408.
- Munch G. et al. (1997), *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23: 134-143.
- Munch G. et al. (1998), *J. Neural. Transm.* 105: 439-461.
- Nagaraj R.H. et al. (1996), *J. Biol. Chem.* 271: 19338-19345.
- Nakamura S. et al. (1997), *Diabetes* 46: 895-899.
- Newkirk M.M. et al. (1998), *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44: 1129-1138.
- Nicholl I.D. und Bucala R. (1998), *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44: 1025-1033.
- Nicholls K. und Mandel T. (1989), *Lab. Invest.* 60: 486-491.
- Odani H. et al. (1999), *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 731: 131-140.
- Panagiotopoulos S. et al. (1998), *Atherosclerosis* 136: 125-131.
- Rahbar S. (1968), *Clin. Chem. Acta* 22: 296-298.
- Rahbar S. et al. (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36: 838-843.
- Rahbar S. et al. (1987), *Blood* 70 (Suppl. 1): 171.
- Rahbar S. et al. (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 651-656. 20
- Rahbar S. und Nadler J.L. (1999), *Clin. Chim. Acta* 287: 123-130.
- Requena J.R. et al. (1993), *Diabetes Res. Clin. Pract.* 19: 23-30.
- Sano N. et al. (1999), *Mech. Ageing Dev.* 107: 333-346.
- Sensi M. et al. (1993), *Diabetologia* 36: 797-801.
- Shibata N. et al. (1999), *Acta Neuropathol. (Berl.)* 97: 240-246.
- Silbiger S. et al. (1993), *Kidney Int.* 43: 853-864.

Soulis T. et al. (1997), Diabetologia 40: 1141-1151.
 Soulis-Liparota T. et al. (1991), Diabetes 40: 1328-1334.
 Takagi Y. et al. (1995), J. Diabetes Compl. 9: 87-91.
 Takayama F. et al. (1998), Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 44: 1101-1109.
 Taneda S. und Monnier VM (1994), Clin. Chem. 40: 1766-1773.
 Tilton R.G. et al. (1993), Diabetes 42: 221-232.
 Ulrich P und Zhang X (1997), Diabetologia 40: 5157-5159.
 Vasan S. et al. (1996), Nature 382: 275-278.
 Vlassara N. (1994), J. Lab. Clin. Med. 124: 19-30.
 Vlassara N. et al. (1994), Lab. Invest. 20: 138-151.
 Vlassara N. et al. (1995), Mol. Med. 1: 447-456.

Patente

US-Patent 4 921 997
 US-Patent 5 093 367
 US-Patent 5 268 500
 US-Patent 5 292 935

Patentansprüche

1. Verwendung einer aus der Gruppe bestehend aus
 4-[3-(6-Chlor-2,4-(1H,3H)-chinazolindion)]phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Furoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Ethylcarbamato)phenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Cyclohexylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,3-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Carboxaldehydphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Naphthylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Methoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Chlor-3-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Methylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4,5-Trimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Chlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 N-4-(Nitrophthalimido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Thienylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4,5-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 L-Bis-[4-(4-chlorbenzamidophenoxyisobutyl)cystin],
 4-(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutylamidomethylcyclohexyl-4-carbonsäure,
 DL-N-4-[(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyl]pipecolinsäure,
 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyl-1-amidocyclohexan-1-carbonsäure,
 4-(4-Iodphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Dimethylaminophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4,6-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4,6-Trimethylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Chlorphenoxyacetamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Chlor-3-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Chlordiphenylharnstoff-4'-carbonsäure,
 4-(3,4-Dichlorphenylacetamido)phenoxyisobuttersäure,
 Diphenylharnstoff-4-carbonsäure,
 4-(2-Chlor-4-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Nicotinylamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Chlorphenoxyisobuttersäure,
 4-(Benzylsulfonamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,5-Dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 L-4-Chlorbenzoylphenylalanin,

2-Isopropyl-5-methylphenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Chlor-4-fluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Dichlorbenzamidoethyl)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido-2-chlor)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,6-Dichlor-4-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Difluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(N-Methyl-4-chlorbenzamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido)phenoxyessigsäure,
 4-(4-Chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Hydroxy-4-chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Hydroxy-3,5-dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Chlor-5-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Carboxyphenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Carboxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 2-Ureidophenoxyisobuttersäure,
 Harnstoff-1,3-bis-phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Morpholinosulfonylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-[(3,4-Dichlorphenylmethyl)-2-chlorphenylureido]phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-[(3,5-Dichlorbenzoylamino)methyl]phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4-Dichlorphenacylamino)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Benzylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Acetamidobenzoessäure,
 2-Chlor-4-acetamidobenzoessäure,
 4-Aminophenoxyisobuttersäure,
 4-Acetoxybenzoessäure,
 4-Hydroxybenzoessäure,
 2-Acetamidoterephthalsäure,
 5-Chlor-2-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetamido-5-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetoxy-5-hydroxybenzoessäure,
 2-Amino-5-hydroxybenzoessäure,
 2-(8-Chinolinoxyl)propionsäure,
 4-Aminobenzoylglycin,
 N-Guanylguanidino-N'-4-phenoxyessigsäure,
 2-(2,5-Dichlorphenoxy)propionsäure,
 4-Dimethylaminobenzoessäure,
 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoessäure,
 4-Sulfonamidobenzoessäure,
 2-Amino-4-chlorbenzoessäure,
 4-Hydroxyphenylbuttersäure,
 2-Methyl-4-chinolincarbonsäure,
 2-Methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 6-Brom-2-methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 4-Acetamidophenoxyessigsäure,
 1-(4-Chlorphenoxybutyrylamido)-1-cyclohexancarbonsäure,
 4-Chlorphenylaminocarbonyliminodiessigsäure,
 3-Chlor-4-nitrophenylureidophenoxyisobuttersäure,
 Methylenbis[4,4'-(2-chlorphenylureidophenoxyisobuttersäure)],
 N,N'-Bis(2-chlor-4-carboxyphenyl)formamidin und
 N,N'-Bis(2-carboxyphenyl)formamidin
 ausgewählten Verbindung und deren pharmazeutisch annehmbarer Salze zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines durch die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder Protein-Quervernetzung vermittelten Zustands.

2. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Verlangsamung schädlicher Wirkungen auf die Alterung eines Organismus, wobei diese Wirkungen die Bil-

derung von Glykosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung sind.

3. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Verlangsamung der Progression der bei einem Patienten durch Diabetes entstehenden Komplikationen, wobei diese Komplikationen durch die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung entstehen.

4. Verwendung einer aus der Gruppe bestehend aus

4-Acetamidobenzoessäure,
 2-Chlor-4-acetamidobenzoessäure,
 4-Aminophenoxyisobuttersäure,
 4-Acetoxybenzoessäure,
 4-Hydroxybenzoessäure,
 2-Acetamidoterephthalsäure,
 5-Chlor-2-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetamido-5-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetoxy-5-hydroxybenzoessäure,
 2-Amino-5-hydroxybenzoessäure,
 2-(8-Chinolinoxyl)propionsäure,
 4-Aminobenzoylglycin,
 N-Guanylguanidino-N'-4-phenoxyessigsäure,
 2-(2,5-Dichlorphenoxy)propionsäure,
 4-Dimethylaminobenzoessäure,
 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoessäure,
 4-Sulfonamidobenzoessäure,
 2-Amino-4-chlorbenzoessäure,
 4-Hydroxyphenylbuttersäure,
 2-Methyl-4-chinolincarbonsäure,
 2-Methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 6-Brom-2-methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 4-Acetamidophenoxyessigsäure,
 1-(4-Chlorphenoxybutyrylamido)-1-cyclohexancarbonsäure,
 4-Chlorphenylaminocarbonyliminodiessigsäure,
 3-Chlor-4-nitrophenylureidophenoxyisobuttersäure,
 Methylenbis[4,4'-(2-chlorphenylureidophenoxyisobuttersäure)],
 N,N'-Bis(2-chlor-4-carboxyphenyl)formamidin und
 N,N'-Bis(2-carboxyphenyl)formamidin

ausgewählten Verbindung und deren pharmazeutisch annehmbarer Salze zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Verlangsamung der Progression bei einem Patienten mit rheumatoider Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Urämie, Neurotoxizität oder Arteriosklerose.

5. Verfahren zur Verminderung des Verderbens der Proteine in Nahrungsmitteln, wobei dieses Verfahren das Mischen einer wirksamen Menge einer Verbindung oder einem pharmazeutisch annehmbaren Salz dieser Verbindung mit den Nahrungsmitteln umfaßt, worin die wirksame Menge die Bildung von Glycosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung inhibiert, wobei die Verbindung aus der Gruppe von Verbindungen nach Anspruch 1 ausgewählt ist.

6. Verbindung oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz dieser Verbindung, wobei die Verbindung aus der Gruppe bestehend aus

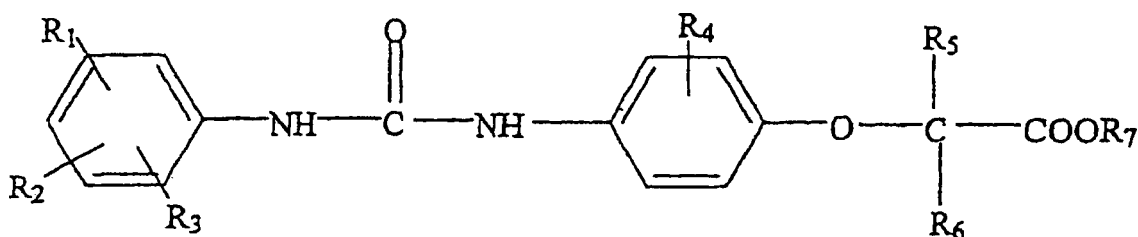
4-[3-(6-Chlor-2,4-(1H,3H)-chinazolindion)]phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Furoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Ethylcarbamato)phenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Cyclohexylureidophenoxyisobuttersäure,
 4-(2,3-Dichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Carboxaldehydphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Naphthylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Methoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,

4-(4-Chlor-3-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Methylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4,5-Trimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Chlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 N-4-(Nitrophthalimido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Thienylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4,5-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 L-Bis-[4-(4-chlorbenzamidophenoxyisobutyryl)cystin],
 4-(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyrylamidomethylcyclohexyl-4-carbonsäure,
 DL-N-4-[(3,4-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyryl]pipecolinsäure,
 4-(3,5-Dichlorphenylureido)phenoxyisobutyryl-1-amidocyclohexan-1-carbonsäure,
 4-(4-Iodphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Dimethylaminophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4,6-Trichlorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4,6-Trimethylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Chlorphenoxyacetamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Chlor-3-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Chlordiphenylharnstoff-4'-carbonsäure,
 4-(3,4-Dichlorphenylacetamido)phenoxyisobuttersäure,
 Diphenylharnstoff-4-carbonsäure,
 4-(2-Chlor-4-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Nicotinylamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Chlorphenoxyisobuttersäure,
 4-(Benzylsulfonamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,5-Dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 L-4-Chlorbenzoylphenylalanin,
 2-Isopropyl-5-methylphenoxyisobuttersäure,
 4-(3,4-Dimethoxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Chlor-4-fluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Dichlorbenzamidoethyl)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido-2-chlor)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,6-Dichlor-4-nitrobenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(3,5-Difluorphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(N-Methyl-4-chlorbenzamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Phenylureido)phenoxyessigsäure,
 4-(4-Chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Hydroxy-4-chlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Hydroxy-3,5-dichlorbenzoylcarboxamido)phenoxyisobuttersäure,
 4-(2-Chlor-5-nitrophenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-Carboxyphenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Carboxyphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 2-Ureidophenoxyisobuttersäure,
 Harnstoff-1,3-bis-phenoxyisobuttersäure,
 4-(4-Morpholinosulfonylphenylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-[(3,4-Dichlorphenylmethyl)-2-chlorphenylureido]phenoxyisobuttersäure,
 4-(3-Pyridylureido)phenoxyisobuttersäure,
 4-[(3,5-Dichlorbenzoylamino)methyl]phenoxyisobuttersäure,
 4-(2,4-Dichlorphenacylamino)phenoxyisobuttersäure,
 4-(Benzylureido)phenoxyisobuttersäure,
 2-Chlor-4-acetamidobenzoessäure,
 4-Aminophenoxyisobuttersäure,
 2-Acetamidoterephthalsäure,
 5-Chlor-2-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetamido-5-acetoxybenzoessäure,
 2-Acetoxy-5-hydroxybenzoessäure,
 2-Amino-5-hydroxybenzoessäure,
 2-(8-Chinolinoxyl)propionsäure,

N-Guanylguanidino-N'-4-phenoxyessigsäure,
 2-(2,5-Dichlorphenoxy)propionsäure,
 4-Dimethylaminobenzoessäure,
 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoessäure,
 2-Amino-4-chlorbenzoessäure,
 4-Hydroxyphenylbuttersäure,
 2-Methyl-4-chinolincarbonsäure,
 2-Methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 6-Brom-2-methyl-3,4-chinolindicarbonsäure,
 4-Acetamidophenoxyessigsäure,
 1-(4-Chlorphenoxybutyrylamido)-1-cyclohexancarbonsäure,
 4-Chlorphenylaminocarbonyliminodiessigsäure,
 3-Chlor-4-nitrophenylureidophenoxyisobuttersäure,
 Methylenbis[4,4'-(2-chlorphenylureidophenoxyisobuttersäure)],
 N,N'-Bis(2-chlor-4-carboxyphenyl)formamidin und
 N,N'-Bis(2-carboxyphenyl)formamidin
 ausgewählt ist.

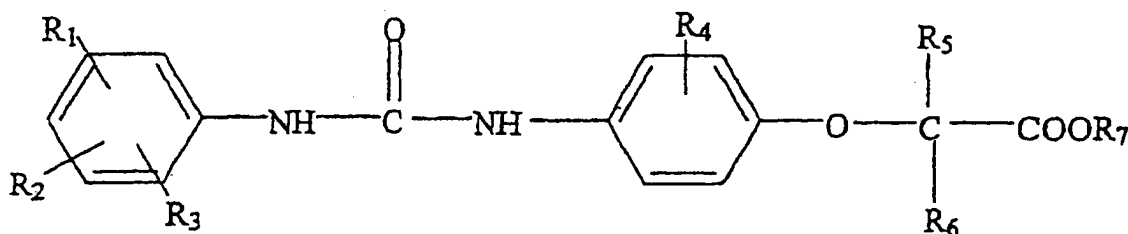
7. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine wirksame Menge einer Verbindung oder eines pharmazeutisch annehmbaren Salzes der Verbindung und einen pharmazeutischen Träger, wobei die Verbindung eine Verbindung nach Anspruch 6 ist.

8. Verwendung einer Verbindung der Formel



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ausgewählt sind, R_5 und R_6 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Alkyl, worin der Alkyl-anteil 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl ausgewählt sind, und R_7 Wasserstoff oder eine geradkettige oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salzes zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Inhibierung der Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder der Protein-Quervernetzung in einem Organismus.

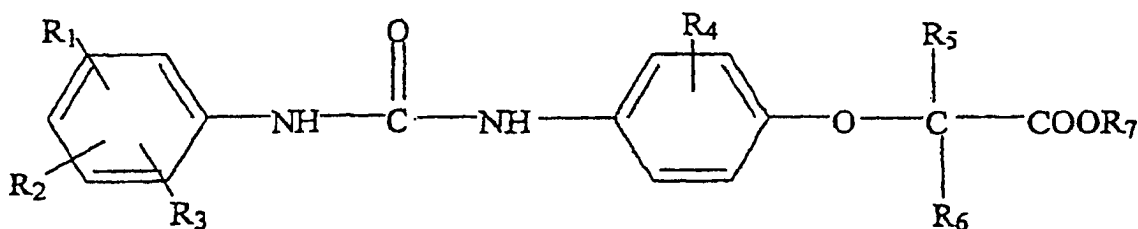
9. Verwendung einer Verbindung der Formel



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ausgewählt sind, R_5 und R_6 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Alkyl, worin der Alkyl-anteil 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl ausgewählt sind, und R_7 Wasserstoff oder eine geradkettige oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salzes zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der

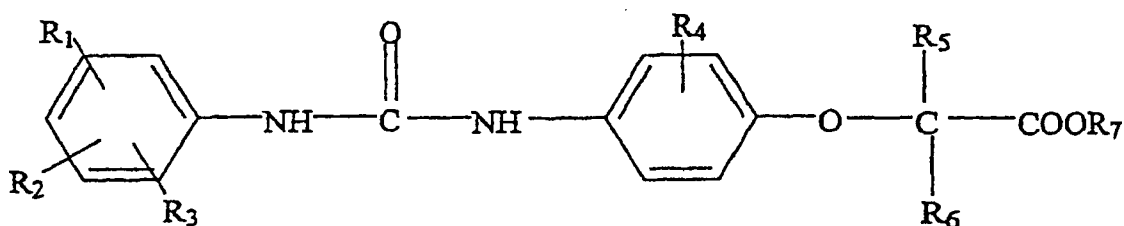
Verlangsamung schädlicher Wirkungen auf die Alterung eines Organismus, wobei diese Wirkungen die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung sind.

10. Verwendung einer Verbindung der Formel



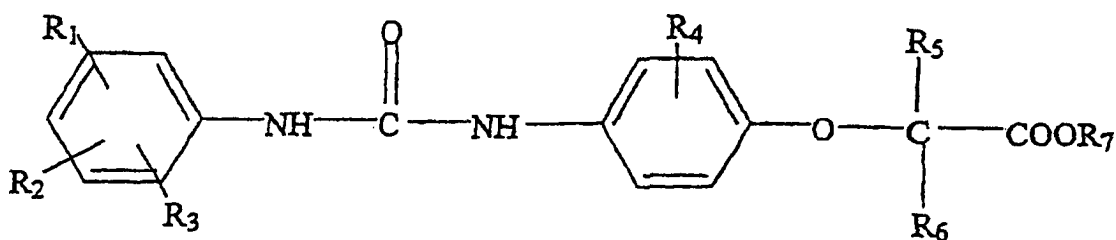
worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ausgewählt sind, R_5 und R_6 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Alkyl, worin der Alkyl-anteil 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl ausgewählt sind, und R_7 Wasserstoff oder eine geradkettige oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salzes zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Verlangsamung der Progression der bei einem Patienten durch Diabetes entstehenden Komplikationen, wobei diese Komplikationen durch die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung entstehen.

11. Verwendung einer Verbindung der Formel



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ausgewählt sind, R_5 und R_6 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Alkyl, worin der Alkyl-anteil 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl ausgewählt sind, und R_7 Wasserstoff oder eine geradkettige oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salzes zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung bei der Verlangsamung der Progression bei einem Patienten mit Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie und zur Verhütung der Verfärbung der Zähne.

12. Verfahren zur Verminderung des Verderbens von Proteinen in Nahrungsmitteln, wobei dieses Verfahren das Mischen einer wirksamen Menge einer Verbindung oder einem pharmazeutisch annehmbaren Salz dieser Verbindung mit den Nahrungsmitteln umfasst, worin die wirksame Menge die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten oder die Protein-Quervernetzung inhibiert, wobei die Verbindung die Formel hat:



worin R_1 , R_2 , R_3 und R_4 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aryl, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Alkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ausgewählt sind,

R_5 und R_6 gleich oder verschieden sein können und unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Halogen, geradkettigem oder verzweigt-kettigem Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Aralkyl, worin der Alkyl-anteil 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält, Cycloalkyl mit 3 bis 7 Kohlenstoffatomen und Aryl ausgewählt sind, und R_7 Wasserstoff oder eine geradkettige oder verzweigt-kettige Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

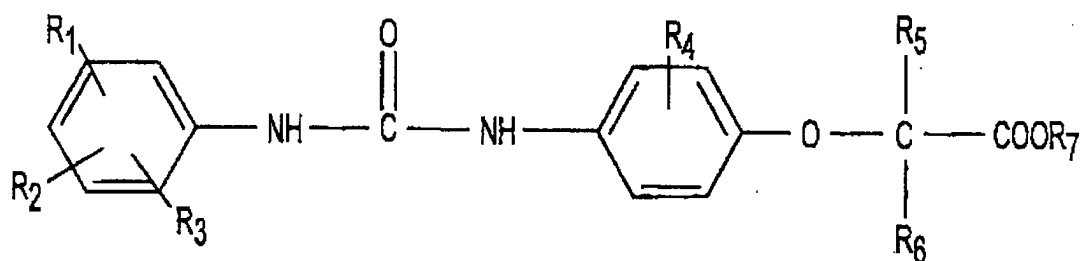


FIG. 1

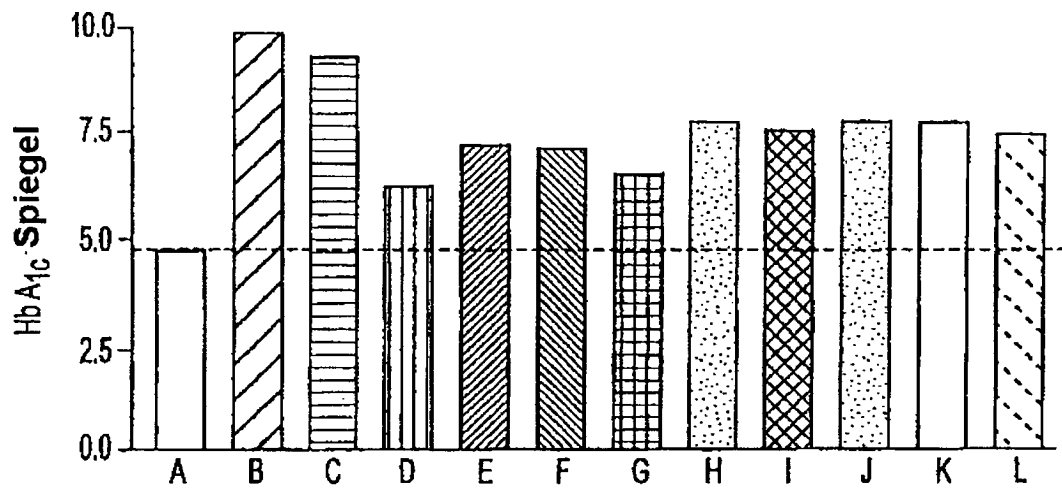


FIG. 2A

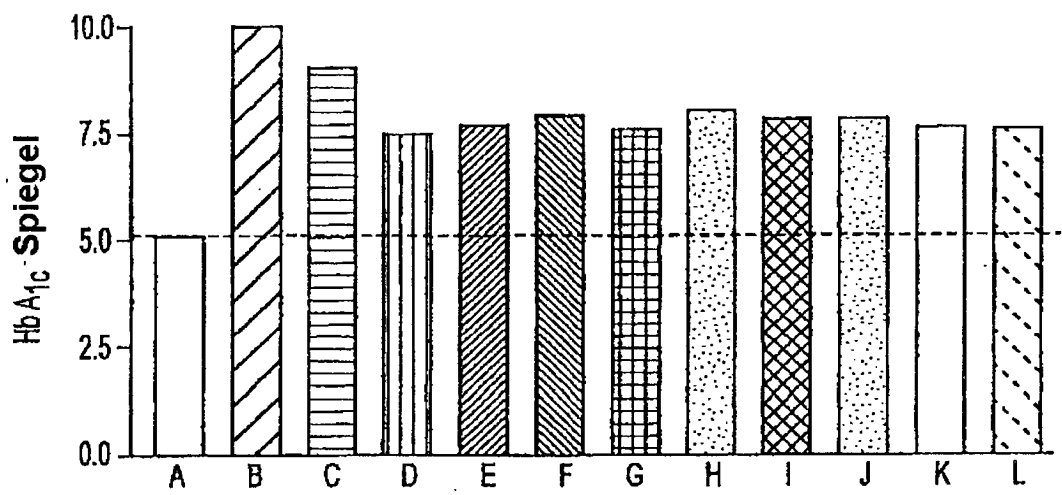


FIG. 2B

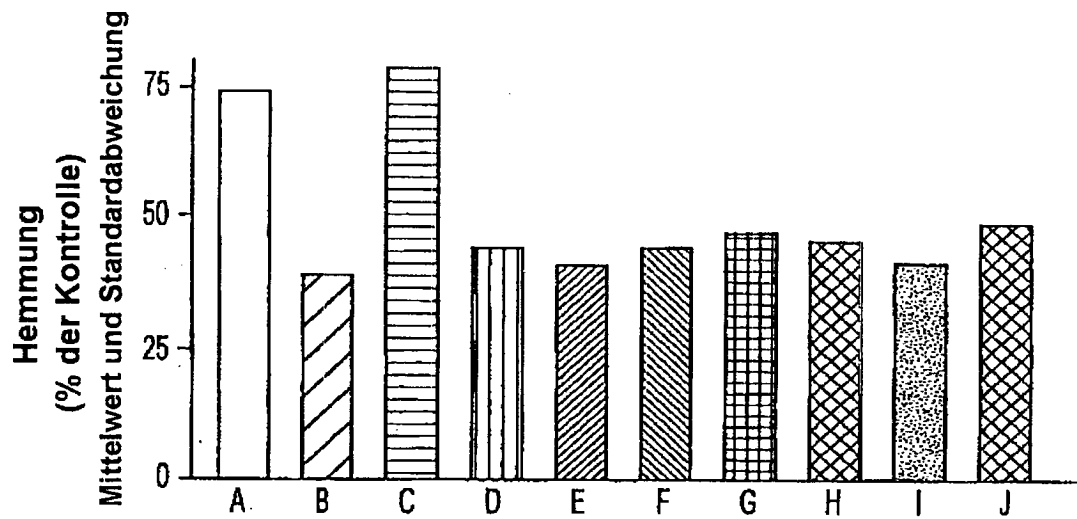


FIG. 3A

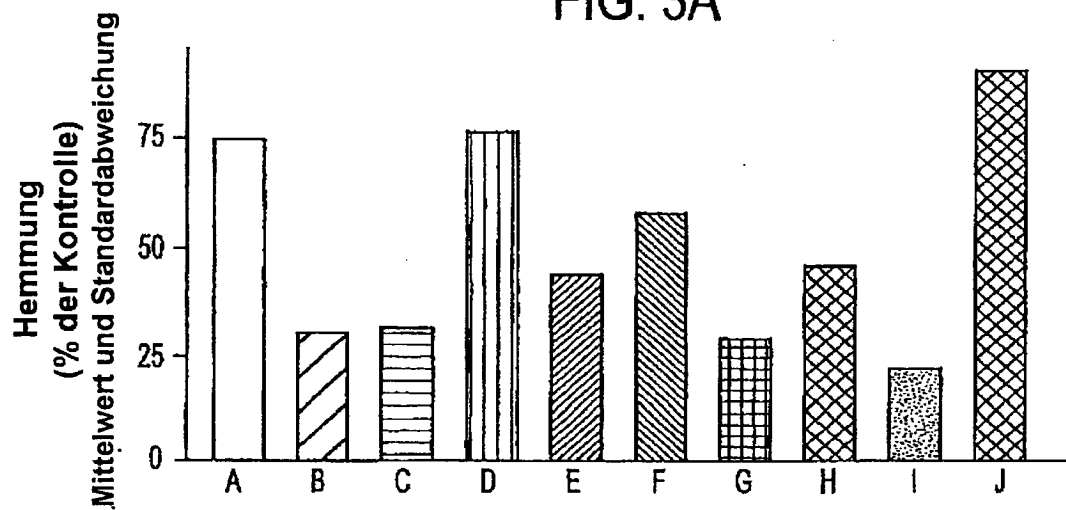


FIG. 3B

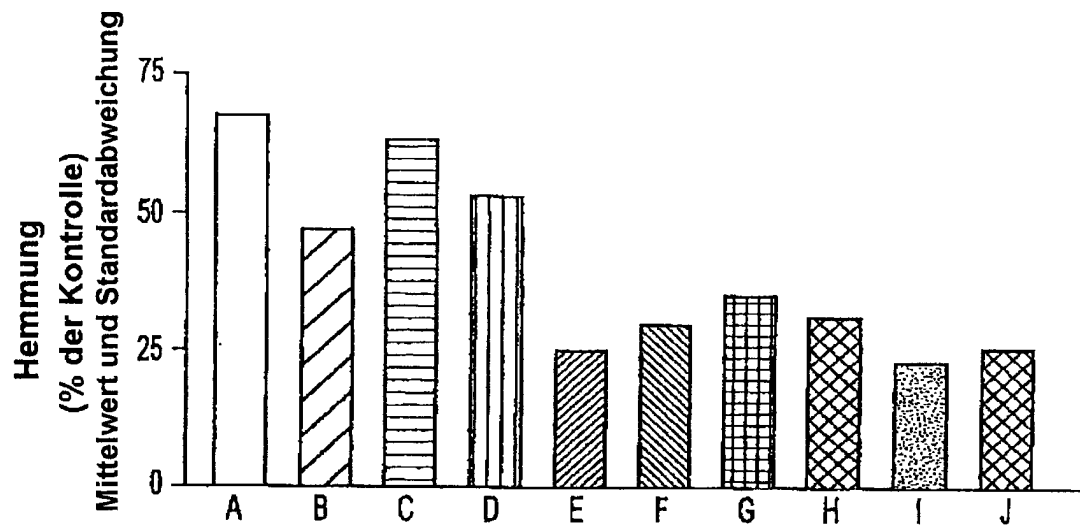


FIG. 4A

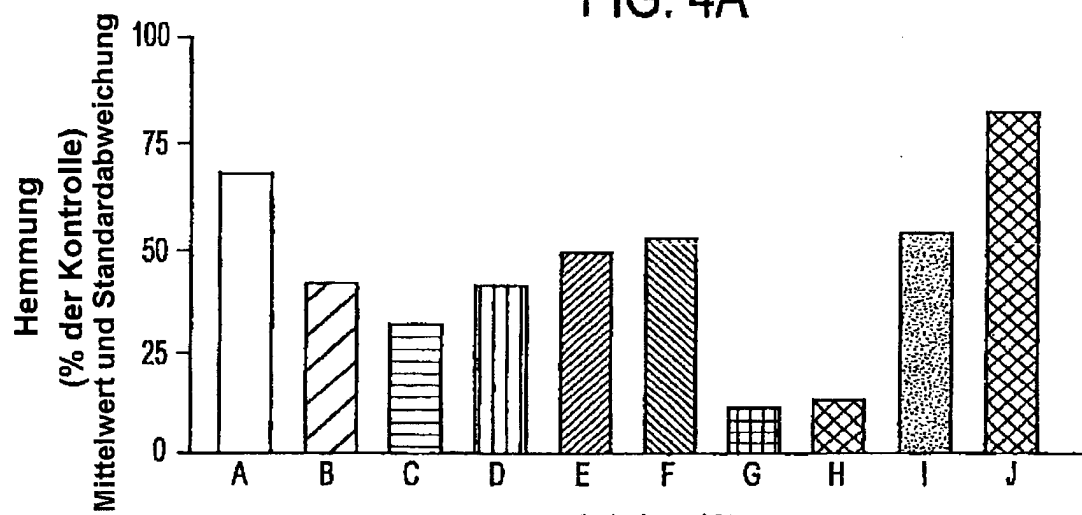


FIG. 4B

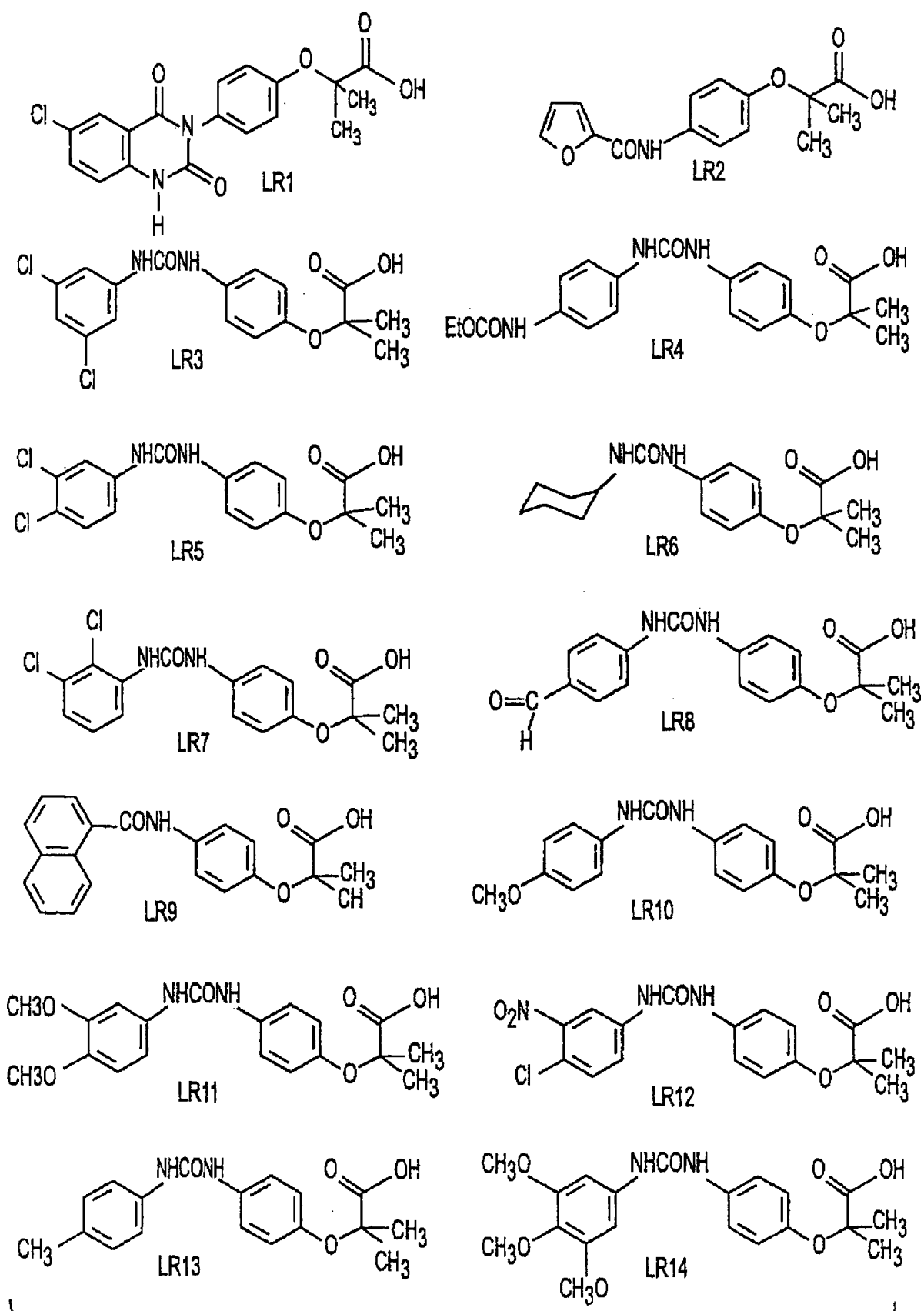


FIG. 5

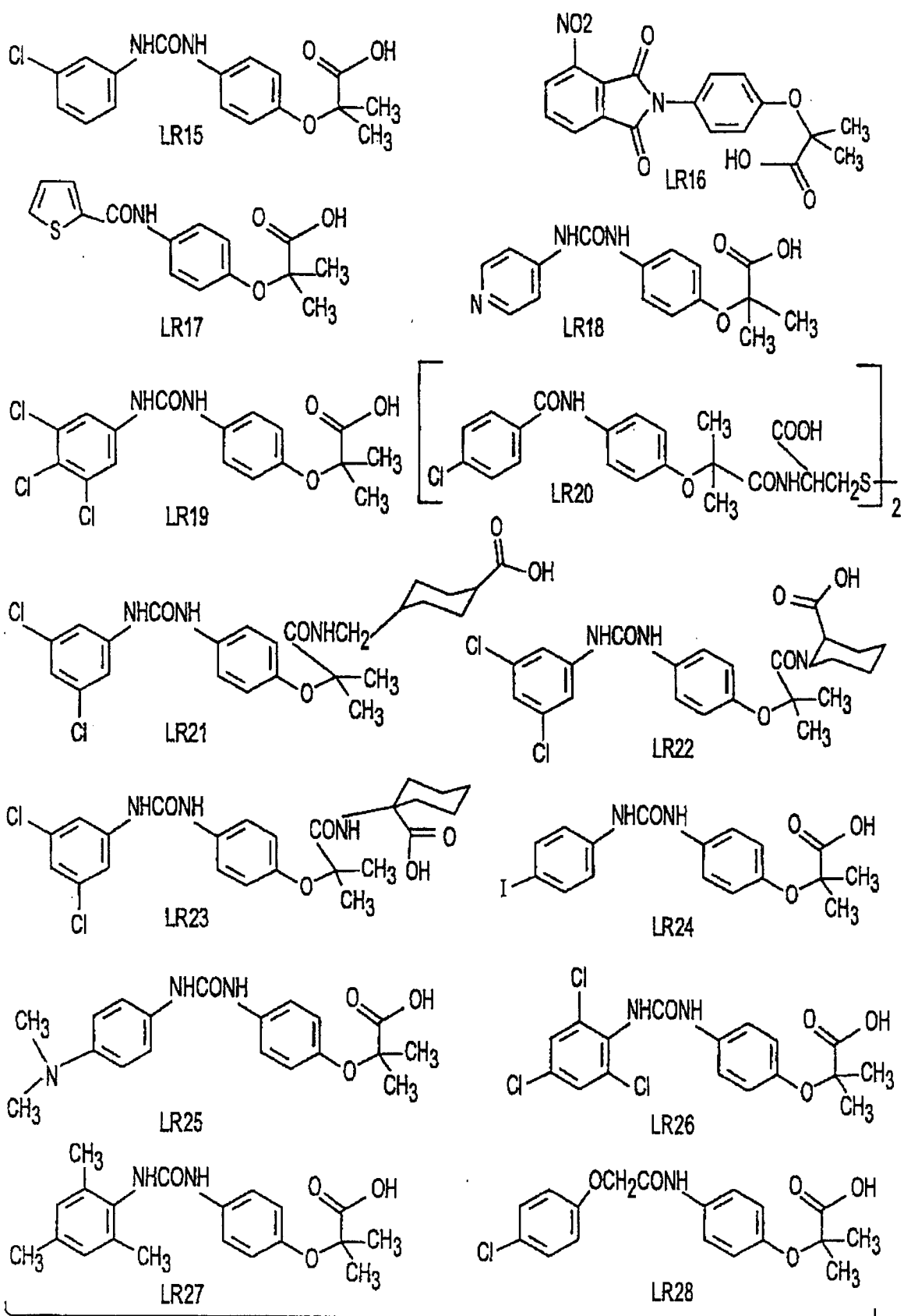


FIG. 6

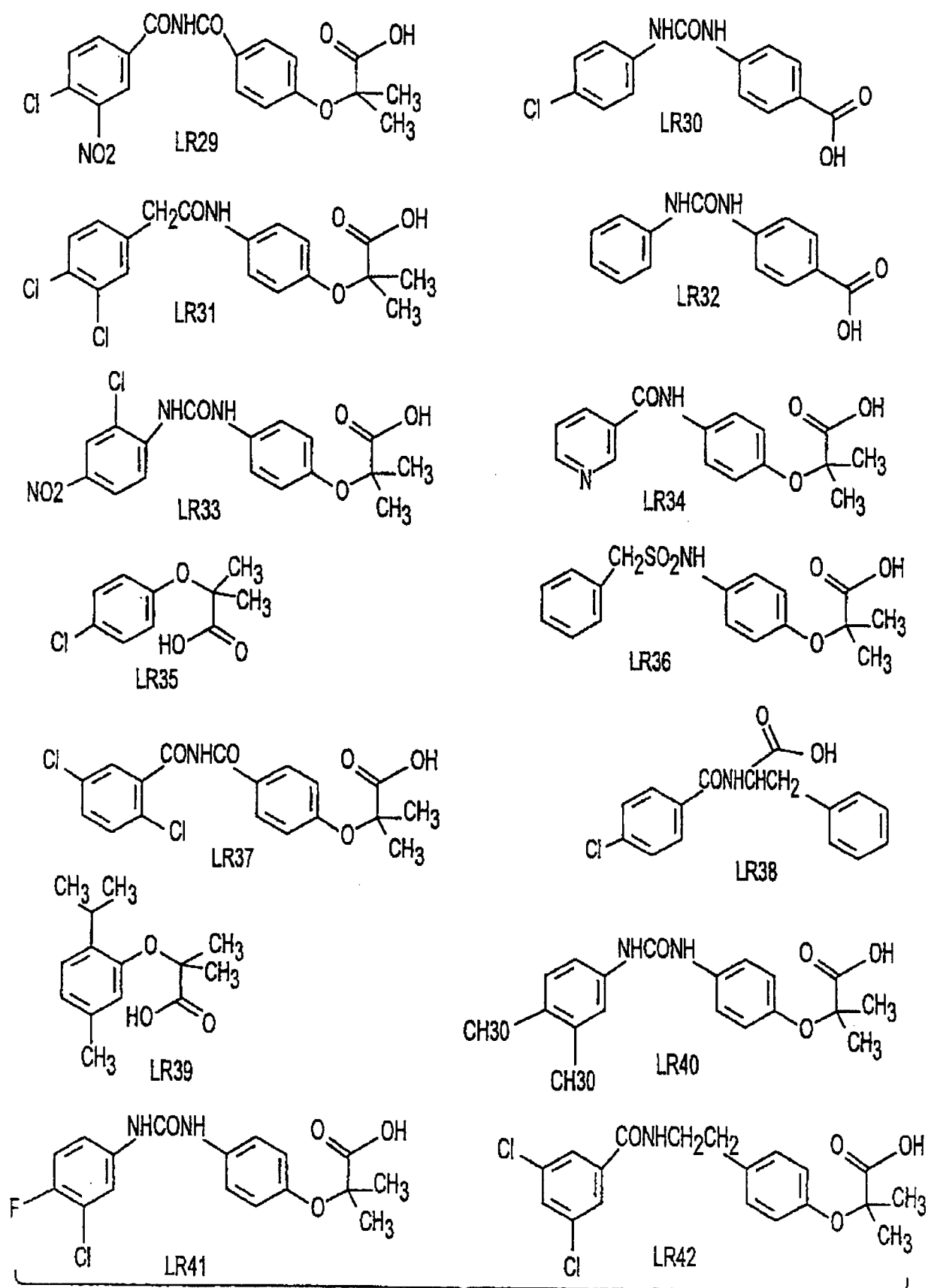


FIG. 7

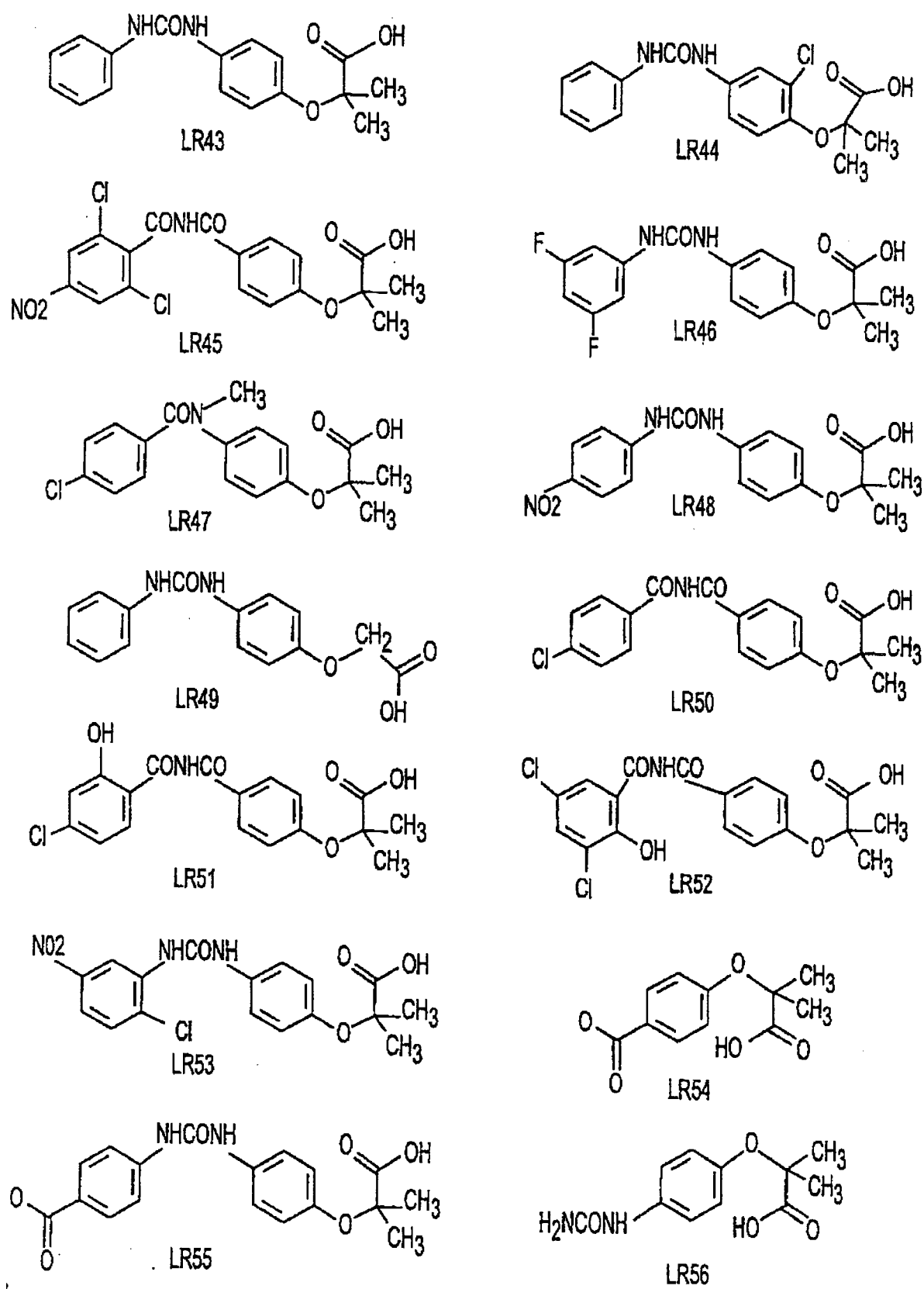


FIG. 8

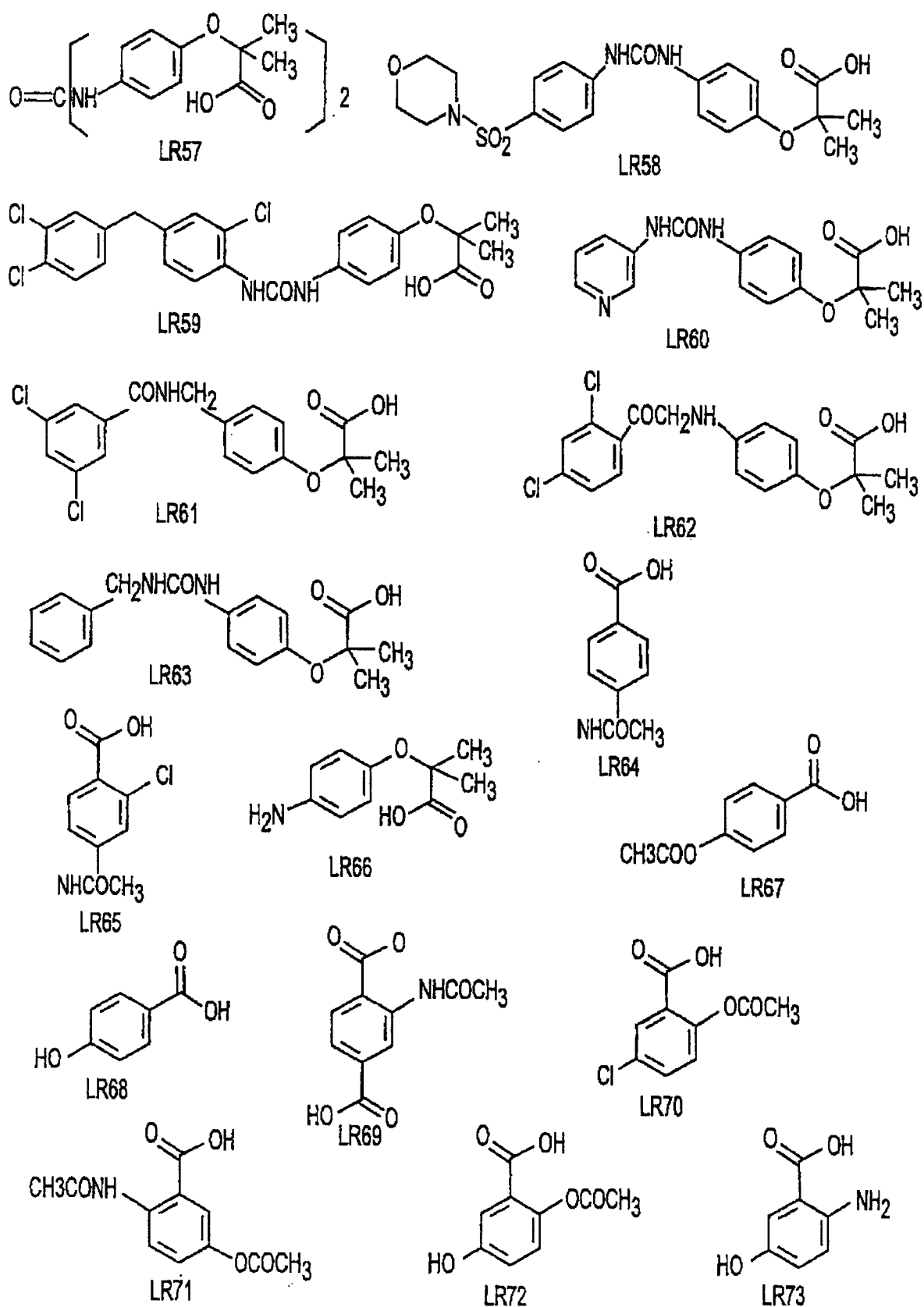


FIG. 9

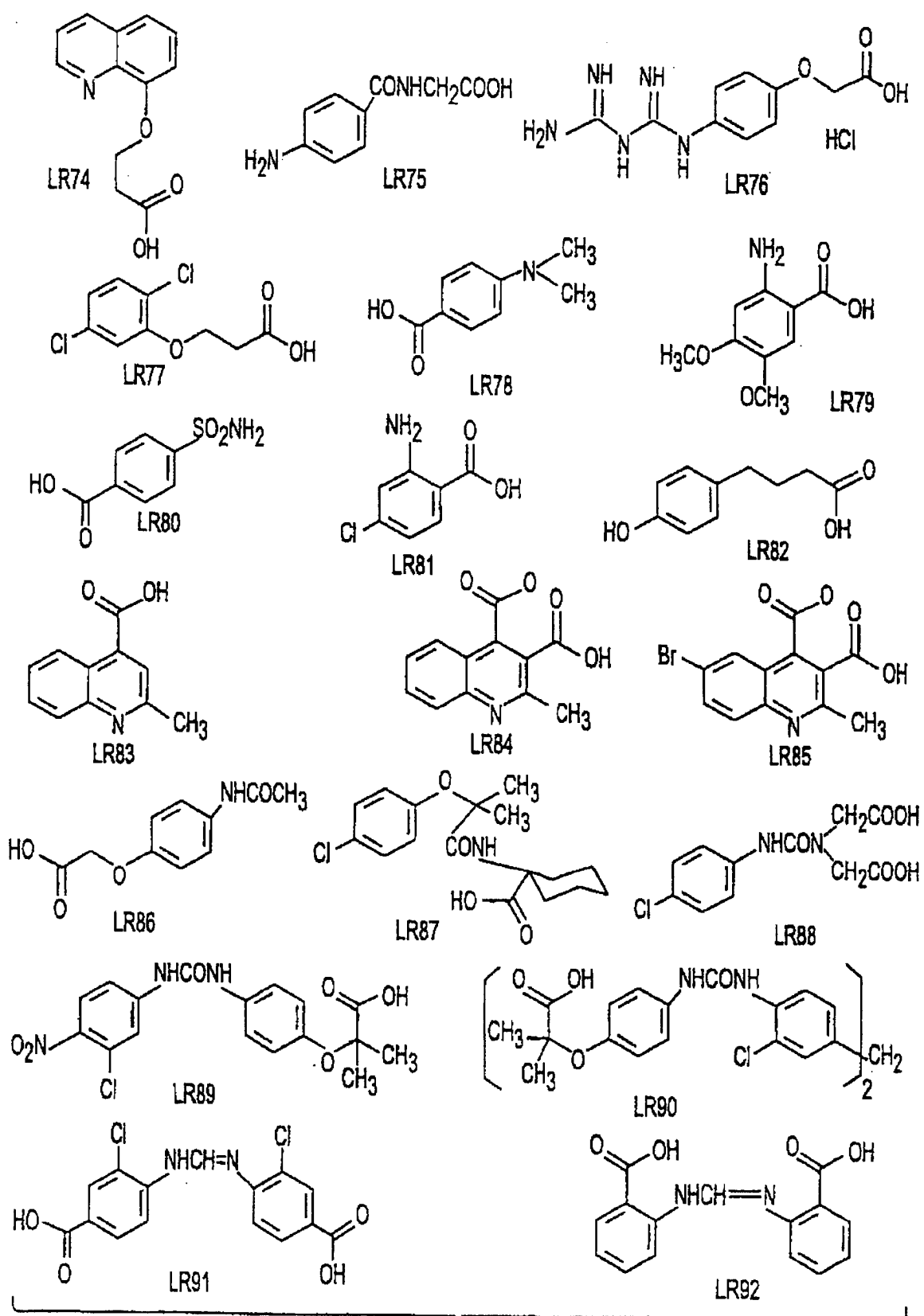


FIG. 10

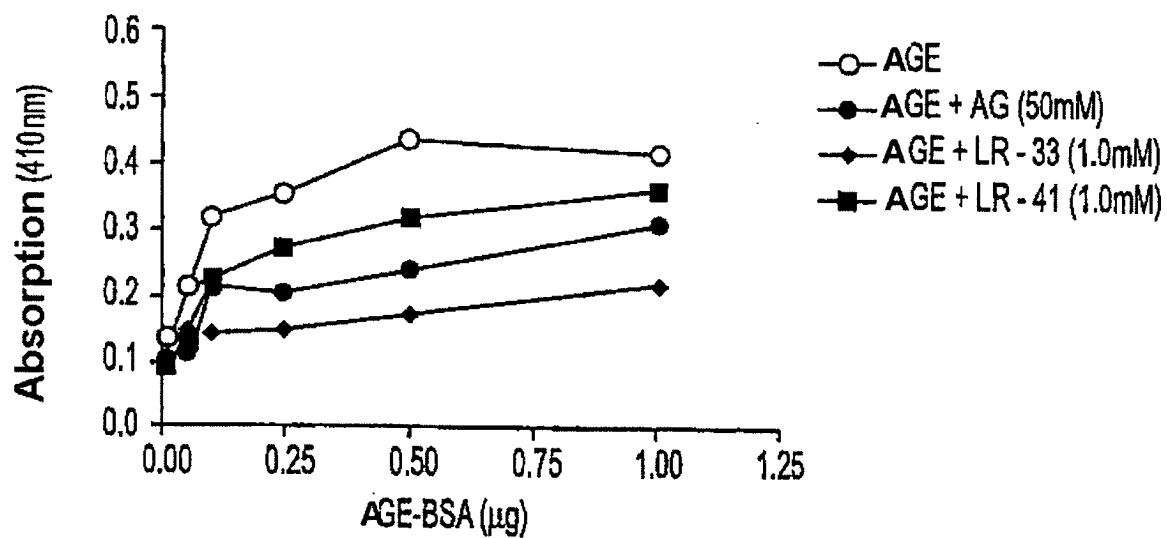


FIG. 11A

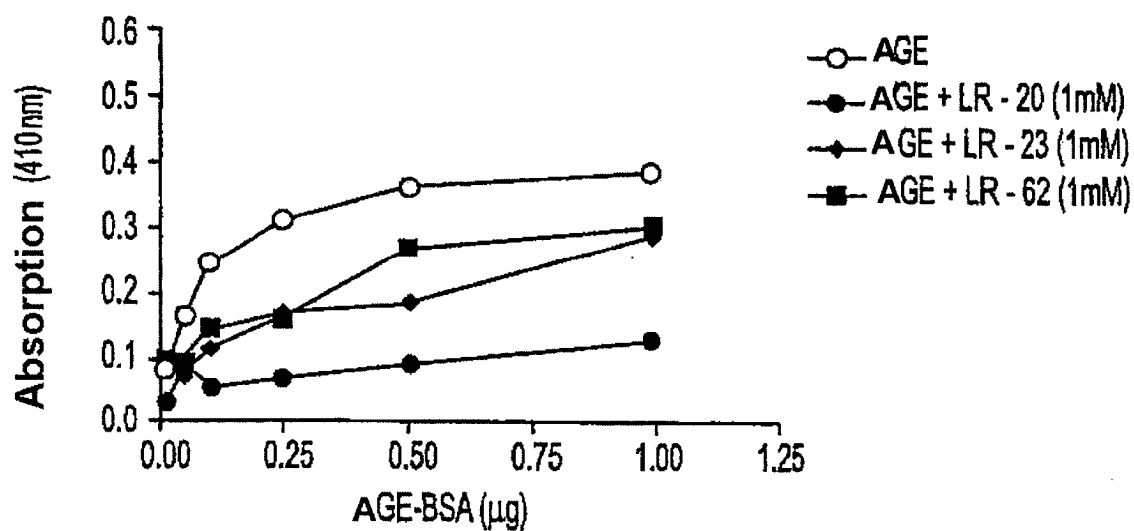


FIG. 11B