



(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 11 2005 000 345 T5 2007.02.08

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/082387**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2005 000 345.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CN2005/000234**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.02.2005**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **09.09.2005**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **08.02.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 36/815 (2006.01)**
A61P 27/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
60/547,061 **25.02.2004** **US**

(71) Anmelder:
Versitech Ltd., Hong Kong, CN

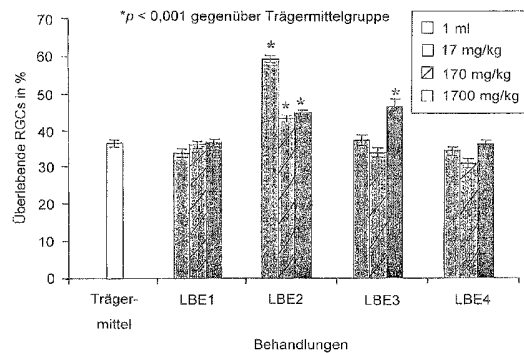
(74) Vertreter:
**Dr. Meyer-Dulheuer Patentanwaltskanzlei, 60325
Frankfurt**

(72) Erfinder:
**So, Kwokfai, Pokfulam, Hong Kong, CN; Yuen,
Waihung, Hong Kong, CN; Chang, Chuenchung
Raymond, Kowloon, Hong Kong, CN; Zee, S. Y.,
Pokfulam, Hong Kong, CN**

(54) Bezeichnung: **Verwendungen von Lycium barbarum Extrakten als neuroprotektive Mittel zur Behandlung der Degeneration von retinalen Ganglienzellen**

(57) Hauptanspruch: Verwendung eines Extraktes aus Lycium barbarum oder einer aktiven Fraktion daraus zur Herstellung eines Medikamentes zur Verminderung des Absterbens retinaler Ganglienzellen bei einem Patienten.

Fig. 1



Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung eines Extraktes aus *Lycium barbarum* oder einer aktiven Fraktion daraus als ein wirksames Mittel zur Verminderung des Absterbens von beschädigten oder unbeschädigten retinalen Ganglienzellen bei traumatischen Schäden von Säugern. Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Verwendung des genannten Extrakts zum Schutz von retinalen Ganglienzellen bei chronischen Schäden von Säugern. Als ein weiterer Aspekt wird das Mittel genutzt, um durch zelluläre Schädigungen bedingte Krankheiten zu behandeln, einschließlich von Glaukomen und anderen neurodegenerativen Erkrankungen.

Stand der Technik

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Glaukomatöse Optikus-Neuropathie ist weltweit eine der Hauptursachen für irreversible Erblindung, die zweithäufigste Ursache für irreversible Erblindung in den USA und die häufigste Ursache für Erblindung bei Schwarzen. 1996 wurde geschätzt, dass beinahe 66,8 Mio. Personen weltweit ein Glaukom haben und 6,7 Mio. Personen im Jahr 2000 an beidseitiger Blindheit erkranken werden (Quigley, 1996; Quigley & Pease, 1996). Nach einer Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 1997 beträgt die angenommene Anzahl von Glaukomfällen ungefähr 1,5 Mio. Nach einer von Foster und Johnson 2001 angefertigten Statistik haben schätzungsweise 9,4 Mio. Menschen im Alter von über 40 Jahren in China eine glaukomatöse Optikus-Neuropathie. Davon waren 5,2 Mio. (55%) auf mindestens einem Auge blind und 1,7 Mio. (18,1%) auf beiden Augen blind. Diese Neuropathie vermindert die Sehkraft allmählich und oft ohne Symptome, so dass Personen mit einem Glaukom im frühen Stadium nicht erkannt werden, bevor sie irreversibel erblinden. Bei einem Glaukom kann der Verlust der Sehkraft verhindert werden, wenn die Krankheit in einem sehr frühen Stadium erkannt und behandelt wird.

[0003] Die wichtigsten pathologischen Merkmale eines Glaukoms sind das Absterben der retinalen Ganglienzellen (RGCs) und das Schröpfen sowie eine Atrophie des Sehnervkopfes, was zum Verlust der Sehkraft führt (Leske, 1983; Osborne et al, 1999; Quigley & Green, 1979). Die RGCs erstrecken ihre Axone durch den Sehnerv in die Sehrinde über den Corpus geniculatum laterale im Thalamus (Mittelhirn) (Frost et al, 1979; So et al, 1978 und 1985; Woo et al, 1985). Ähnlich wie andere Neuronen des zentralen Nervensystems (CNS), sind RGCs nicht in der Lage,

sich zu regenerieren, wenn sie einmal beschädigt sind. Deshalb ist es sehr wichtig, bei jeder Art der Augenerkrankung, einschließlich des Glaukoms, die Degeneration der RGCs zu verhindern.

[0004] Das Absterben von retinalen Ganglienzellen beim glaukomatösen Patienten wird oft eine Folge der Erhöhung des intraokularen Drucks, auch wenn dies nicht für das Fortschreiten der Krankheit notwendig ist (Sarfazai, 1997). Deshalb zielen alle derzeitigen Therapien für glaukomatöse Patienten auf eine Erniedrigung des intraokularen Drucks (IOP) ab. Trotz ihrer weit verbreiteten Anwendung bei der Behandlung der glaukomatösen Optikus-Neuropathie sind okulare hypotensive Mittel bei der Behandlung eines Großteils der Personen mit glaukomatöser Optikus-Neuropathie nicht wirksam. Viele Personen mit glaukomatöser Optikus-Neuropathie haben einen normalen IOP. Anfänglich haben 30–50% der Personen mit einem Offenwinkelglaukom keine okulare Hypertonie und nicht weniger als 15–50% der Patienten mit glaukomatöser Optikus-Neuropathie haben keinen erhöhten IOP. Die Abwesenheit eines erhöhten IOPs bei einem Teil der Patienten mit glaukomatöser Optikus-Neuropathie bedeutet, dass es neben dem erhöhten intraokularen Druck mindestens eine weitere Ursache gibt, die zur Optikus-Neuropathie in Verbindung mit der glaukomatösen Optikus-Neuropathie beiträgt (Levin, 1997; Levin 1999). Deshalb wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um geeignete Behandlungsmethoden für glaukomatöse Optikus-Neuropathie-Patienten mit normalem oder hohem IOP sowie für verschiedene andere Optikus-Neuropathien, die nicht mit einem erhöhten IOP verbunden sind, zu entwickeln.

[0005] Alle bisher beschriebenen Ansätze können eine Verzögerung des fortschreitenden Verlusts der RGCs bewirken, aber können das Absterben dieser Neuronen nicht verhindern. Trotz der Verfügbarkeit von neuroprotektiven Substanzen, gibt es immer noch einen großen Bedarf für zusätzliche Verbindungen, die den Verlust an RGCs bei unterschiedlichen Augenerkrankungen einschließlich des Glaukoms wirksamer verhindern können.

[0006] Kenntnisse über die verantwortlichen Mechanismen für natürliche und experimentelle Optikus-Neuropathien, einschließlich der Durchtrennung von Axonen, Sehnervquetschungen und Sehnervischämien, könnten zur Entwicklung von geeigneten Behandlungen für glaukomatöse Optikus-Neuropathien und andere die Axone von retinalen Ganglienzellen betreffende Optikus-Neuropathien beitragen, einschließlich der Behandlung von ischämischen Optikus-Neuropathien, entzündlichen Optikus-Neuropathien, Druck-Optikus-Neuropathien und traumatischen Optikus-Neuropathien. Jede dieser Bedingungen löst wahrscheinlich Apoptose aus. Die Mechanismen die für die Anschaltung der Apoptose in reti-

nenen Ganglienzellen verantwortlich sind, wurden noch nicht eindeutig ermittelt. Es wird aber spekuliert, dass ein verminderter retrograder Transport von neurotrophen Faktoren, ein verminderter Gehalt an endogenen okularen Neurotrophinen oder eine aus einer Vielzahl weiterer Mechanismen der Auslöser für die Apoptose ist.

[0007] Eine Vielzahl von Tiermodellen wurde etabliert, um die pathogenen Bedingungen des Glaukoms, einschließlich okulärer Hypertonie, okulärer Ischämie und einer Sehnervdurchtrennung nachzubilden. Die Durchtrennung des Sehnervs wurde lange Zeit als ein Tiermodell genutzt, um das Überleben und die Regeneration von RGCs zu studieren (Cheung et al, 2002; Cho et al, 1999 und 2001; Lu et al, 2003; You et al, 2002). Diese traumatische Verletzung der RGCs trennt die Verbindung zwischen der Netzhaut und dem Gehirn, was zu einem permanenten Verlust der Sehkraft führt. Das Verständnis der Mechanismen für die Vorbeugung des irreversiblen Verlusts von RGCs mit Hilfe dieses Modells ist vorteilhaft für die Entwicklung von neuen therapeutischen Eingriffen bei verschiedenen Augenerkrankungen einschließlich des Glaukoms.

[0008] Weil ein erhöhter intraokularer Druck (IOP) einer der Risikofaktoren beim Glaukom ist, wurden neue Tiermodelle basierend auf okulärer Hypertonie unter Verwendung von Affen oder Nagern entwickelt (Garcia-Valenzuela et al, 1995; Laquis et al, 1998; McKinnon et al, 2002; Mittag et al, 2000; Morrison et al, 1997; Sawada und Neufeld, 1999; Ueda et al, 1998). Diese Modelle beinhalten die Injektion von hypertensiven Salzen, das Verätzen von Episkleralvenen, eine Laser-Photokoagulation im Trabekelwerk, die Injektion von S-Antigen und die Laser-Photokoagulation von limbischen Venen und Episkleralvenen. In diesen Studien wurde ein okuläres Hypertoniemodell der Photokoagulation von limbischen und Episkleralvenen mit einem Argonlaser genutzt (Ji et al, 2004; WoldeMussie et al, 2001 und 2002).

[0009] Lycium barbarum, eine kleine rote Beere, wird wegen ihrem Geschmack und ihrer generellen positiven Wirkung auf die Gesundheit in China geläufig als traditionelles Lebensmittel zum Kochen benutzt. Es wird außerdem als pflanzliche Medizin für die Therapie einer Vielzahl an Augenerkrankungen genutzt (Chinese Herbal Medicine Company, 1994; Lam und But, 1999). Die rote Farbe der Beeren wird durch Carotinoide bewirkt, von denen nur Zeaxanthin in der menschlichen Makula vorhanden ist. Obwohl Lycium barbarum in China seit Jahrhunderten mit erhofftem Nutzen für das Sehvermögen benutzt wurde, ist der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effektes immer noch unbekannt.

Aufgabenstellung

[0010] In der vorliegenden Erfindung wurde die Möglichkeit der Verwendung einer solchen Aktivität erkannt und die notwendigen Untersuchungen in diese Richtung durchgeführt. Es wurde gefunden, dass ein wässriger Extrakt von Lycium bar barum die Degeneration von RGCs bei verschiedenen Arten von Augenerkrankungen verhindern kann.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung eines Lycium barbarum Extraktes für die Verminderung des RGC-Absterbens bei einem Patienten, bestehend aus folgenden Schritten:

- a) Bereitstellung einer Menge des wirksamen Extraktes oder einer aktiven Fraktion daraus und
- b) Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge des Extraktes von Schritt (a) an mindestens einen Teil der RGCs des Patienten.

[0012] In einer bevorzugten Ausführungsvariante wird der Extrakt von Schritt (a) aus Lycium barbarum gewonnen.

[0013] Der wirksame Extrakt aus Schritt (a) wird vorzugsweise oral, auf die Haut oder als Injektion verabreicht, wobei die Verbindung in einer pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegt, die den wirksamen Extrakt in einer therapeutisch wirksamen Konzentration und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält, der für eine orale Applikation an dem Patienten geeignet ist.

[0014] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Verminderung des RGC-Absterbens bei einem Patienten mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die Zusammensetzung eine Menge des wirksamen Extraktes oder einer aktiven Fraktion von Lycium barbarum und pharmazeutisch verträgliche Salze davon in einer therapeutisch wirksamen Konzentration und mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

[0015] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren für die Verminderung des RGC-Absterbens bei einem Patienten, der für ein erhöhtes Absterben der RGCs anfällig ist, zur Verfügung zu stellen.

[0016] Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Verwendung zur Verminderung des RGC-Absterbens bei einem Patienten, der für ein erhöhtes Absterben der RGCs anfällig ist, zur Verfügung zu stellen.

[0017] Es ist von Vorteil, dass bereits bei anderen klinischen Indikationen gezeigt wurde, dass der Extrakt von Lycium barbarum relativ sicher und nicht toxisch für den Menschen ist.

[0018] Weitere Aufgaben, Vorteile und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0019] Fig. 1 zeigt die neuroprotektive Wirksamkeit von verschiedenen Fraktionen eines Lycium barbarum-Extraktes auf RGCs nach Sehnervdurchtrennung bei erwachsenen Hamstern (6–8 Wochen, 60–80 g),

[0020] Fig. 2 stellt die schützende Wirkung von LBE2 auf das Überleben von RGCs nach einer Sehnervdurchtrennung dar,

[0021] Fig. 3 zeigt den Verlust von RGCs in Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen, 250–280 g) mit einer Okularhypertonie,

[0022] Fig. 4 zeigt den intraokularen Druck (IOP) in SD-Ratten, die den LBE2 nach einer Laser-Photokoagulation erhalten haben,

[0023] Fig. 5 stellt die Veränderung des Körpergewichts erwachsener Hamster (6–8 Wochen, 60–80 g) vor und nach der Gabe von LBE2 in einem Nervdurchtrennungsmodell als chronischen Toxizitätstest dar. Das Körpergewicht von Hamstern wurde vor und 7 Tage nach der Verletzung bestimmt,

[0024] Fig. 6 gibt die Veränderung des Körpergewichts von Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen, 250–280 g) vor und nach der Gabe von LBE2 in einem okularen Hypertoniemodell als chronischem Toxizitätstest an. Das Körpergewicht der Ratten wurde vor der Laser-Photokoagulation bestimmt,

[0025] Fig. 7 zeigt die Veränderung des Körpergewichts von jungen Sprague-Dawley-Ratten (3–5 Wochen). Den Ratten wurde für 2 Wochen 10 g/kg LBE2 gegeben (n = 8 in jeder Gruppe). Die Veränderung des Körpergewichts der Ratten wurde vor und nach oraler Applikation von LBE2 aufgezeichnet und

[0026] Fig. 8 zeigt die Veränderung des Körpergewichts von Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen). Den Ratten wurde für 2 Wochen eine unterschiedliche Dosis von LBE2 gegeben (n = 8 in jeder Gruppe). Die Veränderung des Körpergewichts der Ratten wurde vor und nach oraler Applikation von LBE2 aufgezeichnet. Kein Tod eines Tieres wurde aufgezeichnet.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die Aktivität von Extrakten dieser Erfindung, einschließlich LBE2, bezüglich der Neuroprotektion wurde durch tägliche orale Applikation an Hamstern

nach Sehnervdurchtrennung sowie durch Kontrolle der Wirkung von LBE2 auf den Schutz von RGCs in Sprague-Dawley-Ratten mit okulärer Hypertonie untersucht.

[0028] Die vorliegende Erfindung wurde in Konsequenz der folgenden Untersuchungen erhalten:

- Untersuchung der Wirkung von vier verschiedenen Extrakten von Lycium barbarum auf beschädigte RGCs in Hamstern nach einer Sehnervdurchtrennung, um zu bestätigen, dass LBE2 von Lycium barbarum die maximale Neuroprotektion an RGCs bewirkt;
- Untersuchung der Neuroprotektion an beschädigten RGCs durch orale Gabe von verschiedenen Dosen LBE2 nach Sehnervdurchtrennung in Hamstern, zur Absicherung der Wirkung von LBE2 auf das Überleben von RGCs nach einer traumatischen Verletzung;
- Beobachtung des Anteils an RGC-Verlust in LBE2 behandelten Sprague-Dawley-Ratten mit okulärer Hypertonie und Vergleich dieser mit einer Kontrollgruppe, um den neuroprotektiven Effekt von LBE2 zu bestätigen;
- Vergleich der Veränderung des intraokularen Drucks (IOP) von mit Laser-Photokoagulation behandelten Sprague-Dawley-Ratten mit einer Kontrollgruppe mit oder ohne LBE2-Behandlung, um die Wirkung von LBE2 von Lycium barbarum auf die Verminderung des IOPs zu untersuchen;
- Bestimmung des Gewichts und der Mortalität von Tieren, um eine mögliche akute und chronische Toxizität von LBE2 auf Tiere unter Normalbedingungen, nach Sehnervdurchtrennung oder im okularen Hypertoniemodell zu untersuchen.

[0029] Die Dosen des erfindungsgemäßen LBE2s in den unten beschriebenen Experimenten variieren von 0,01 bis 1000 mg/kg bei täglicher oraler Applikation von Sprague-Dawley-Ratten und von 0,17 bis 1700 mg/kg bei Hamstern.

[0030] Das Absterben von retinalen Ganglienzellen (RGC), in Verbindung mit Bedingungen wie der glaukomatösen Optikus-Neuropathie, kann durch mehr als einen Mechanismus verursacht werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf diese, der Exzitotoxizität, durch reaktive Sauerstoffspezies bewirkte oder katalysierte Reaktionen oder durch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen. Diese Erfindung zeigt, dass der Extrakt von Lycium barbarum wirkungsvoll das Absterben von RGCs bei chronischen und traumatischen Verletzungen von Tieren verhindern kann, ohne die Stützung auf einen bestimmten Mechanismus des Absterbens.

[0031] Lycium barbarum ist eine bekannte traditionelle chinesische pflanzliche Medizin mit der Wirkung, dass sie „die Niere ernährt und die Essenz füllt, die Leber ernährt und die Augen aufhellt“. Es wurde

seit 2400 Jahren weit verbreitet als gesundheitsfördernde Nahrung gebraucht. Extrakte oder aktive Fraktionen von *Lycium barbarum* sind besonders wertvoll für die Verfahren der Erfindung.

[0032] Das hier verwendete „*Lycium barbarum*“ bezeichnet Extrakte von *Lycium barbarum* und ist auch als „fructus lycii“ und „Gou Qu Zi“ bekannt. Eine Verbindung, die eine ähnliche physiologische Wirkung bzw. ähnliche physiologische Wirkungen wie jene, die durch Gou Qui Zi in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung vermittelt wird, kann von Mitgliedern der botanischen Gruppe *Lycium* gewonnen werden, wobei diese Verbindungen bevorzugt aus der Gruppe umfassend *Fructus Lycii*; *Lycium barbarum* L.; *Lycium chinense* Mill; *Lycium turcomanicum* Turcz; *Lycium potaninii* Pojank; *Lycium dasystemum* Pojank; *Lycium europaeum* (non L.); *Lycium halimifolium* (Mill.); *Lycium lanceolatum* (Veillard); *Lycium megistocarpum* (Dun); *Lycium ovatum*; *Lycium subglobosum*; *Lycium trewianum* L. vu; *Lycium europeum*; *Lycium halamifolium*; *Lycium halmifolium*; *Lycium vulgare* gewonnen werden.

[0033] Die aktive Verbindung dieser Erfindung ist ein Heißwasserextrakt (d.h. ca. über 50°C), der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahiert werden können. Die aktive Verbindung ist polyanionisch, hat ein Molekulargewicht von weniger als 500 kDa und ist wenigstens in Methylenchlorid, Chloroform oder Toluol unlöslich. Sie wird bevorzugt aus *Lycium barbarum* extrahiert, kann aber auch in anderen Pflanzen der Familie Solanaceae vorhanden sein. Ausgehend von den in den Beispielen unten dargelegten Daten ist der Extrakt bevorzugt ein 50°C bis 100°C Wasserextrakt und besonders bevorzugt ein ungefähr 70°C Extrakt.

[0034] Der Extrakt oder die aktive Fraktion von *Lycium barbarum* wurde nach folgender Vorgehensweise isoliert. Als erstes wurden die getrockneten Früchte von *Lycium barbarum* mit Ethanol extrahiert, wobei ein Ethanolextrakt (LBE1) entstand. Nach Abtrennung und Verdampfung des Alkohols wurden die alkoholisch extrahierten Früchte getrocknet und mit heißem Wasser (70°C) aufgenommen, der entstehende Extrakt einkonzentriert und getrocknet und das Pulver als LBE2 bezeichnet. Der verbleibende Rückstand wurde unter Gewinnung des Pulvers LBE3 mit kochendem Wasser (100°C) weiter extrahiert. Der verbleibende Fruchtrückstand wurde über Nacht mit 5% NaOH inkubiert, gefolgt von einer Dialyse für 60 Stunden sowie einer Trocknung, wobei der entstehende Rückstand LBE4 genannt wurde.

[0035] Die erfindungsgemäßen Extrakte sind im Wesentlichen frei von in niedrigkettigen Alkoholen (C₁₋₅) löslichen Anteilen und beinhalten wasserlösliche Polysaccharide. LBE2 ist der am meisten bevorzugte Extrakt, aber jeder andere Extrakt, der aktives

LBE2 beinhaltet, kann verwendet werden, auch wenn erhöhte Mengen notwendig sein können, um das gleiche Niveau an Aktivität zu erreichen.

[0036] Die Erfindung ist auf folgende Glaukomtypen anwendbar, aber ist auf diese nicht beschränkt: primäres Offenwinkelglaukom, Normaldruckglaukom, Pigmentglaukom, Pseudoexfoliationsglaukom, akutes Winkelblockglaukom, absolutes Glaukom, chronisches Glaukom, kongenitales Glaukom, juveniles Glaukom, Engwinkelglaukom, chronisches Offenwinkelglaukom und *Glaucoma simplex*.

[0037] Der Begriff „Extrakt“ bezeichnet hier die Substanzen, die aus bestimmten Ausgangspflanzen oder Teilen davon (z.B. Früchte, Wurzeln, Rinde, Blätter) gewonnen wurden. Jede Methode der Extraktion, die Extrakte ergibt, bei denen die biologische Aktivität der Substanzen aus der Extraktquelle erhalten bleibt, kann für die Gewinnung der erfindungsgemäßen Extrakte verwendet werden. Vorzugsweise werden die Inhaltsstoffe der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung als eine wässrige Lösung extrahiert. Die Extraktion wird bevorzugt unter Bedingungen mit Normaldruck und bevorzugt bei erhöhten Temperaturen (bevorzugt in einem Bereich von 50°C bis 100°C, ganz besonders bevorzugt bei ungefähr 70°C) durchgeführt. Der Extrakt hat bevorzugt die Form von Pulver und die Einkonzentrierung zum Pulver wird bevorzugt durch Verdampfen erreicht. Selbstverständlich kann jede Methode oder Bedingung, die bekanntermaßen Extrakte mit vergleichbarer therapeutischer Wirksamkeit liefert, wie die mit der vorstehenden bevorzugten Extraktionsmethode gewonnenen Extrakte, zum Zweck dieser Erfindung genutzt werden.

[0038] Weiterhin bezeichnet das Wort „Extrakt“ auch die aktiven Inhaltsstoffe, welche aus Früchten oder anderen Teilen von *Lycium barbarum* oder anderen natürlichen Quellen gewonnen wurde, einschließlich, aber nicht beschränkt auf alle Varianten, Arten, Hybride oder Gattungen der Pflanze, unabhängig von der genauen Struktur der aktiven Inhaltsstoffe, der Methode der Aufbereitung oder der Methode der Isolation. Der Begriff „Extrakt“ soll auch Salze, Komplexe und/oder Derivate des Extraktes, der die oben beschriebenen geologischen Eigenschaften oder therapeutischen Indikationen besitzt, einschließen. Der Begriff „Extrakt“ soll ebenfalls synthetisch oder biologisch hergestellte analoge und homologe Verbindungen mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften umfassen, die gleiche oder ähnliche biologische Wirkungen wie die vorliegende Erfindung besitzen.

[0039] Die für die Verwendung hier vorgesehene aufgereinigte Zusammensetzung beinhaltet aufgereinigte Extraktfraktionen mit den hier beschriebenen Eigenschaften aus jeder Pflanze oder Art, vorzugs-

weise *Lycium barbarum*, in natürlicher oder veränderter Form und aus jeder Quelle, ob natürlich, synthetisch oder rekombinant.

[0040] So wie hier verwendet, meint „pharmazeutische Zusammensetzung“ eine Zusammensetzung, die therapeutisch wirksame Mengen der Verbindung oder Zusammensetzung enthält, die den erfindungsgemäßen Extrakt wie oben beschrieben mit geeigneten Verdünnungsmitteln, Konservierungsmitteln, Lösemitteln, Emulgatoren und/oder Trägern beinhaltet. Die physikalische Form einer solchen Zusammensetzung, d.h. fest, flüssig etc., ist erfindungsgemäß nicht eingeschränkt.

[0041] Mit einer „therapeutisch wirksamen Menge“ ist eine Menge eines *Lycium barbarum*-Extraktes gemeint, die ausreichend ist, um eine Degeneration von RGCs zu verhindern und um RGCs vor Degeneration zu schützen oder den Grad der Degeneration zu verzögern. Natürlich hängt es von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich z.B. der Größe, dem Alter und dem Zustand des Patienten sowie der Art der Verabreichung ab, was eine therapeutisch effektive Menge darstellt. Die Bestimmung der effektiven Dosen kann gut durch jemanden mit durchschnittlichen Kenntnissen auf dem Gebiet erfolgen.

[0042] Der Patient ist vorzugsweise ein Mensch, der sich in einem Zustand befindet oder für die Entwicklung eines solchen gefährdet ist, der mit RGC-Absterben einhergeht, einschließlich glaukomatöser Optikus-Neuropathie, ischämischer Optikus-Neuropathie, entzündlicher Optikus-Neuropathie, Druck-Optikus-Neuropathie und traumatischer Optikus-Neuropathie. Alle der oben genannten Bedingungen sind mit der Beschädigung der Axonen Region von RGCs an der gegenüberliegenden Seite des Zellkörpers verbunden.

[0043] Der *Lycium barbarum*-Extrakt wird das RGC-Absterben üblicherweise um mindestens 16% vermindern. Allerdings wird angenommen, dass bereits eine Verminderung des RGC-Absterbens von 10% oder 5% die Sehkraft des behandelten Patienten verlängert. Bei einem menschlichen Patienten kann die Reduktion des Absterbens der retinalen Ganglienzellen durch Hochrechnung aus funktionellen und strukturellen Assays bestimmt werden.

[0044] Funktionelle Assays beinhalten die Bewertung von Veränderungen der Sehkraft über die Zeit, insbesondere der Sehschärfe und des Sehfeldes. Es wird logischerweise geschlussfolgert, dass eine Verminderung der Rate des Absterbens von RGCs nach begonnener Behandlung mit einem *Lycium barbarum*-Extrakt mit einer Verminderung des Ausmaßes des Verlusts der Sehfunktion über die Zeit korrelieren könnte. Strukturelle Assays beinhalten die Darstellung und Vermessung des Sehnervkopfes oder der

Sehnervfaserschicht mit einem Ophthalmoskop oder einem anderen Gerät, um Papillentrophie, Papillenschwund oder den Verlust von Nervenfasern zu ermitteln.

[0045] In einer bevorzugten Ausführungsvariante wird eine therapeutisch wirksame Menge des *Lycium barbarum*-Extraktes auf die Haut eines menschlichen Patienten verabreicht, der Symptome für die Entwicklung einer die retinalen Ganglienzellen betreffenden Krankheit aufweist oder für die Entwicklung einer solchen Krankheit gefährdet ist. Andere Arten der Verabreichung können auch verwendet werden. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise für die Behandlung eines Patienten mit einer Fehlfunktion betreffend die Axone der retinalen Ganglienzellen, einschließlich ohne Einschränkung der glaukomatösen Optikus-Neuropathie, ischämischen Optikus-Neuropathie, entzündlichen Optikus-Neuropathie, Druckoptikus-Neuropathie und der traumatischen Optikus-Neuropathie.

[0046] Die pharmazeutisch verträgliche Form der Zusammensetzung beinhaltet einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Solche pharmazeutisch verträglichen Träger sind dem Fachmann sehr gut bekannt und nicht begrenzt. Weiterhin können solche pharmazeutisch verträglichen Träger wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Aufschlämmungen und Emulsionen sein. Beispiele für nicht wässrige Lösungsmittel sind Propylenglycol, Polyethylenglycol, Pflanzenöle wie Olivenöl und injizierbare organische Ester wie Ethylester. Wässrige Träger schließen Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Emulsionen oder Aufschlämmungen, einschließlich Salze und gepufferte Medien, ein. Parenterale Transportmittel umfassen eine Natriumchloridlösung, Ringer's Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Laktat oder Öle. Intravenöse Trägermittel umfassen Flüssigkeits- und Nahrungsergänzungsmittel, Elektrolytergänzungsmittel, wie solche, die auf Ringer's Dextrose basieren, und ähnliches. Konservierungsmittel und andere Zusätze können auch vorhanden sein, wie z. B. antibiotische, antioxidative, kolonierende Mittel, inerte Gase und ähnliches.

[0047] Zusammensetzungen für die kontrollierte oder anhaltende Freisetzung beinhalten eine Komposition in lipophilen Speichern (z.B. Fettsäuren, Wachs, Öle). Die Erfindung umfasst auch spezielle Zusammensetzungen, die mit Polymeren (z.B. Polyoxameren, Polyoxaminen, Polyethylenglycol) beschichtet sind und einen Extrakt, der an Antikörper gekoppelt ist, die gegen gewebespezifische Rezeptoren, Liganden oder Antigene gerichtet sind oder einen Extrakt der an Liganden gewebespezifischer Rezeptoren gekoppelt ist. Andere Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen schließen Partikel, Schutzbeschichtungen, Proteaseinhibitoren oder Permeationsbeschleuniger für verschiedene

Routen der Applikation mit ein, einschließlich parenteral, pulmonal, nasal und oral. Geeignete Hilfsstoffe sind z.B. Wasser, Salz, Dextrose, Glycerol, Ethanol oder ähnliches und Kombinationen daraus. Weiterhin kann die Zusammensetzung bei Bedarf geringe Menge an Hilfssubstanzen, wie Feuchtigkeitsmittel oder emulgierende Mittel sowie Mittel für das Puffern des PH-Wertes beinhalten, die die Wirksamkeit des aktiven Inhaltsstoffes verstärken.

[0048] Der aktive Extrakt kann in einer therapeutischen Zusammensetzung als neutralisierte pharmazeutisch verträgliche Salzformen formuliert sein. Pharmazeutisch verträgliche Salze beinhalten die zu den Säuren korrespondierenden Salze, welche mit anorganischen Säuren wie z.B. hydrochlorige Säure oder Phosphorsäure oder solchen organischen Säuren wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Mandelsäure und ähnlichem gebildet werden. Von den freien Carboxylgruppen gebildete Salze können auch von anorganischen Basen, wie z.B. Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Kalzium- oder Eisenhydroxiden und solchen organischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und ähnlichen, erhalten werden.

[0049] Bei den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen wird eine therapeutisch wirksame Dosis der aktiven Komponente verwendet. Wie auf diesem Gebiet allgemein bekannt ist, wird eine Menge auf der Grundlage von Eigenschaften des Patienten (Alter, Gewicht, Geschlecht, Zustand, Komplikationen, andere Erkrankungen etc.) ausgewählt. Außerdem wird die Durchführung weiterer Routinestudien spezifischere Informationen bezüglich einer angemessenen Dosierung für die Behandlung unter verschiedenen Bedingungen bei verschiedenen Patienten ergeben und ein durchschnittlich ausgebildeter Anwender ist unter Berücksichtigung des therapeutischen Zusammenhangs, dem Alter und des generellen Gesundheitszustandes des Patienten in der Lage, eine geeignete Dosierung zu bestimmen. Im Allgemeinen sollte die Dosis für eine intravenöse Injektion oder Infusion niedriger als eine Dosis für eine intraperitoneale, intramuskuläre oder andere Route der Verabreichung sein. Der Dosierungsplan kann in Abhängigkeit von der Halbwertszeit der Zirkulation und der verwendeten Zusammensetzung variieren. Die Zusammensetzungen werden in einer Art und Weise passend zur Dosisformulierung in der therapeutisch wirksamen Menge verabreicht. Die exakten Mengen der für die Verabreichung benötigten aktiven Inhaltsstoffe hängen vom Urteilsvermögen des Praktikers ab und sind für jede Person individuell. Geeignete Dosen reichen aber von ungefähr 0,01 mg/kg bis 1700 mg/kg, bevorzugt von ungefähr 0,01 bis 1000 mg/kg und ganz besonders bevorzugt ungefähr 10 mg/kg der aktiven Inhaltsstoffe pro Kilogramm Körpergewicht einer Person pro Tag und hängen von der Route der Verabreichung ab. Geeignete Durchfüh-

rungen für die anfängliche Verabreichung sind ebenfalls verschieden und können durch eine anfängliche Verabreichung charakterisiert sein, gefolgt von wiederholten Dosen mit ein oder mehrstündigen Abständen mit anschließender Injektion oder anderer Verabreichung. Alternativ ist eine kontinuierliche intravenöse Infusion angedacht, die zur Aufrechterhaltung einer Konzentration von 10 Nanomolar bis 10 Mikromolar im Blut ausreichend ist.

[0050] Die Erfindung wird durch die in den Beispielen unten gezeigten Daten verdeutlicht. Die Beispiele unten zeigen, dass ein Extrakt von *Lycium barbarum* axotomisierte RGCs vor dem Zelltod schützen kann. Da eine axonale Verletzung von RGCs mit den meisten Optikus-Neuropathien, einschließlich der glaukomatösen Optikus-Neuropathie, der entzündlichen Optikus-Neuropathie, der Druck-Optikus-Neuropathie und der traumatischen Optikus-Neuropathie, in Verbindung gebracht wird, kann logischerweise geschlossen werden, dass die RGCs einer Person, die eine dieser Umstände entwickelt oder gefährdet dafür ist, durch die Behandlung mit dem Extrakt *Lycium barbarum* geschützt wird. Die folgenden Beispiele werden gezeigt, um die bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung vollständig darzustellen und sie sollten aber in keiner Weise derart ausgelegt werden, dass sie den breiten Bereich der Erfindung einschränken.

Ausführungsbeispiel

Tiere

[0051] Die experimentellen Vorgehensweisen entsprechen der Richtlinie der National Institutes of Health, U.S.A. für den Schutz und Umgang mit Labortieren. Es wurden alle Bemühungen unternommen, um die Anzahl der verwendeten Tiere und deren Leiden zu minimieren.

Beispiel 1 – Wirkung von *Lycium barbarum*-Extrakten auf Schädigungen von RGCs in einem Sehnervdurchtrennungsmodell

[0052] Die neuroprotektive Wirkung von vier von *Lycium barbarum* isolierten Extrakten wurde untersucht. Ausgewachsene Hamster (6–8 Wochen, 60–80 g) erhielten eine Sehnervdurchtrennung des rechten Auges, wohingegen das linke Auge zu Kontrollzwecken intakt blieb. Alle Sehnerven wurden mit einem Abstand von 1,5 mm von der Papille durchtrennt. Unmittelbar nach der Verletzung wurden die RGCs retrograd durch Verwendung eines Fluorogold (FG) bezeichneten Farbstoffs markiert. Die RGCs im linken Auge wurden zwei Tage vor dem Töten der Tiere durch die gleiche Methode markiert. Sieben Tage nach der Läsion wurden die Hamster unter Vollnarkose eingeschläfert (eine letale Dosis von Pentobarbital-Natrium). Die Netzhaut wurde mit 4% Para-

formaldehyd fixiert und in vier Quadranten geteilt: superior, inferior, nasal und temporal. Die gesamte Netzhaut wurde dann auf Objektträger aufgetragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die markierten RGCs wurden entlang der Mittellinie eines jeden Quadranten beginnend von der Papille bis zur Außengrenze der Retina in 500 µm Intervallen unter einem Okularnetz von 200 × 200 µm gezählt. Die Anteile der überlebenden RGCs nach unterschiedlichen Behandlungen wurden durch Vergleich der Anzahl der überlebenden RGCs in den verletzten Augen mit der gegenüberliegenden Augen dargestellt.

[0053] In der mit dem Trägermittel behandelten Gruppe waren 7 Tage nach der Sehnervdurchtrennung 36,3 ± 0,92% überlebende RGCs erhalten (**Fig. 1**). Alle vier aus *Lycium barbarum* isolierten Extrakte, LBE1, LBE2, LBE3 und LBE4 wurden mit Konzentrationen von 17, 170 und 1700 mg/kg Körpergewicht mit 5 Tieren pro jeder Gruppe getestet. Den Tieren wurden die Extrakte täglich mit einer transnasalen Magensonde vom ersten Tag der Verletzung bis zum Einschlafen gegeben. LBE1 förderte das Überleben von RGCs nach Sehnervdurchtrennung bei allen getesteten Konzentrationen nicht (17 mg/kg: 33,7 ± 1,05%; 170 mg/kg: 35,9 ± 0,95%; 1700 mg/kg: 36,4 ± 1,0%). Die Behandlung mit 17 mg/kg LBE2 schützte 59,0 ± 0,88% der RGCs vor Beschädigung, während LBE2 bei anderen getesteten Konzentrationen eine geringere Überlebensrate der RGCs förderte (170 mg/kg: 42,9 ± 0,59%; 1700 mg/kg: 44,6 ± 0,79%). Die Verabreichung einer niedrigen Konzentration von LBE2 fördert das Überleben von RGCs nicht (17 mg/kg: 37 ± 1,54%; 170 mg/kg: 33,5 ± 1,14%), während LBE3 bei 1700 mg/kg 46,3 ± 1,98% der RGCs auf der Retina nach einer Sehnervdurchtrennung lebend erhält. Die Behandlung mit LBE4 schützte RGCs bei keiner getesteten Konzentration vor Schädigung (17 mg/kg: 34,0 ± 1,06%; 170 mg/kg: 30,8 ± 1,15%; 1700 mg/kg: 35,8 ± 1,13%). Ausgewachsene Hamster wurden für 7 Tage nach dem Läsionsexperiment am Leben gelassen. Unter diesen vier Fraktionen hatten die mit LBE2 behandelten Hamster den höchsten Anteil an überlebenden RGCs. Die oben genannten Daten sind als prozentuale Anteile der überlebenden RGCs im Vergleich mit den GesamtRGCs der nicht operierten linken Augen ausgedrückt (Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Einweg-ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test bewertet. Unterschiede wurden als signifikant angezeigt für ein *p < 0,001.

Beispiel 2 – Neuroprotektion von beschädigten RGCs durch Verabreichung von LBE2 nach Sehnervdurchtrennung

[0054] Unmittelbar nach Sehnervdurchtrennung wurde ausgewachsenen Hamstern (6–8 Wochen,

60–80 g) täglich LBE2 (im Bereich von 0,17 bis 1700 mg/kg) bis zum Zeitpunkt der Einschläferung gegeben (n = 5 in jeder Gruppe). RGCs wurden mit FG markiert. Markierte RGCs wurden entlang eines jeden Quadranten der Retina (superior, inferior, nasal und temporal) gezählt. In der Kontrollgruppe der Hamster, welches das Trägermittel erhielt, waren sieben Tage nach der Sehnervdurchtrennung 31,3 ± 0,87% der RGCs erhalten (**Fig. 2**). In der Gruppe der Hamster, die 17 mg/kg LBE2 bekamen, war der Anteil der Überlebensrate an RGCs auf 59,0 ± 0,88% erhöht. Die Erhöhung der Konzentration von LBE2 auf 170 und 1700 mg/kg war nicht so wirksam wie bei 17 mg/kg (42,9 ± 0,59% und 44,6 ± 0,79%). Die Verminderung der Konzentrationen von LBE2 auf 0,17 und 1,7 mg/kg löste keine schützenden Wirkungen auf RGCs nach Schädigung aus (0,17 mg/kg: 36,3 ± 0,92%; 1,7 mg/kg: 37,9 ± 0,70%). Deshalb wurde festgestellt, dass 17 mg/kg LBE2 27,7% der RGCs 7 Tage nach Sehnervdurchtrennung im Vergleich mit der Kontrolle am Leben erhalten können und somit wurde 17 mg/kg als optimale Dosis in diesem Experiment angenommen. Ausgewachsene Hamster (6–8 Wochen, 60–80g) wurden für 7 Tage nach dem Läsionsexperiment am Leben gelassen. Die Daten sind als prozentuale Anteile der RGCs im Vergleich mit der Gesamtanzahl an RGCs der nicht operierten Augen ausgedrückt (Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert). Die statistische Signifikanz wurde durch einen Einweg-ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni post hoc Test ermittelt. Unterschiede wurde für *p < 0,01 und *p < 0,001 als signifikant anerkannt.

Beispiel 3 – Neuroprotektion von LBE2 auf RGCs in einem okularen Hypertoniemodell mit Sprague-Dawley-Ratten

[0055] Die neuroprotektive Wirkung von verschiedenen Dosen von LBE2 wurde unter Verwendung eines okularen Hypertoniemodells von Sprague-Dawley (SD)-Ratten mit 6 Ratten in jeder Gruppe untersucht. Ausgewachsene SD-Ratten (10–12 Wochen, 250–280 g) wurden in verschiedene Gruppen aufgeteilt und bekamen täglich das Trägermittel (Kontrolle) oder LBE2 (in einem Bereich von 0,01 mg/kg bis 1000 mg/kg) für 1 Woche. Eine Woche später erhielten die Ratten eine Photokoagulation in ihrem rechten Auge, während das linke Auge zu Kontrollzwecken intakt blieb. Die Ratten erhielten weiterhin entweder das Trägermittel oder LBE2 bis zum Einschlafen. Die Argonlaser-Photokoagulation wurde an den limbischen Venen und 3 Episkleralvenen (2 superior und 1 inferior im Temporalgebiet) unter einem Operationsmikroskop durchgeführt. In der ersten Laseroperation wurden 120–140 Laserpunkte (1000 µV, 0,1 s) an der limbischen und an den Episkleralvenen gesetzt. Um die okuläre Hypertonie aufrecht zu erhalten, wurde eine zweite Laseroperation mit 60–120 Punkten zur Vermeidung von jedweder vaskulärer Wiederverbindung durchgeführt. Der intraokulare

Druck (IOP) wurde unter Verwendung eines handgehaltenen Tonometers gemessen, um die hypertensive Bedingung zu verfolgen. Das IOP-Niveau wurde vor der Laser-Photokoagulation (als Basalniveau) und 3 Tage nach jeder Laser-Photokoagulation (als post-operativer IOP-Wert) bestimmt.

[0056] Vier Tage vor dem Töten der Tiere wurden die RGCs retrograd mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorogold (FG) markiert und auf die superior Colliculi auf beiden Seiten des Mittelhirns der Ratten platziert. Die Ratten wurden für 2 Wochen nach der ersten Laser-Photokoagulation gehalten und mit einer Überdosis an Betäubungsmittel (Ketamin und Xylazin) eingeschläfert. Die Augen wurden entfernt und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Der fixierte Augapfel wurde in zwei Hälften geteilt. Der Superioranteil beinhaltete die Papille und 2 mm Sehnerv wurden für weitere Analysen belassen. Die Inferiornetzhaut wurde ausgebreitet auf mit Gelatine beschichtete Glasobjektträger aufgebracht. FG-markierte RGCs wurden bei 400-facher Vergrößerung gezählt. Sieben benachbarte Bereiche ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$) mit einem Abstand von $500 \mu\text{m}$ (von der Papille bis zum Rand) entlang eines jeden Quadranten wurden genommen. Insgesamt 21 vordefinierte Bereiche wurden gezählt, was ungefähr 3,0 bis 3,8% der Gesamtfläche der Netzhaut ausmacht (Laquis et al, 1998). FG-markierte RGCs, die kondensierte oder fragmentierte Kerne zeigten, wurden ausgeschlossen (Nickells, 1999). Die Gesamtanzahl der lebenden RGCs in den vordefinierten Bereichen des verletzten Auges wurde mit der Anzahl in dem gegenüberliegenden Auge verglichen. Die Daten sind als relativer prozentualer Verlust von FG-markierten RGCs im verletzten Auge in Bezug auf das gegenüberliegende intakte Auge dargestellt (Verlust von FG-markierten RGCs in % im Verhältnis zum gegenüberliegenden Auge, Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert).

[0057] In dem okularen Hypertoniemodell gingen $17,0 \pm 1,1\%$ der RGCs in den verletzten Augen der Trägermittel behandelten Kontrollratten 2 Wochen nach der Läsion verloren (**Fig. 3**). Tägliche Behandlung mit LBE2 mit entweder 0,01, 0,1, 1, 10, 100 oder 1000 mg/kg zeigte Neuroprotektion in Bezug auf RGC-Überleben. Kein RGC-Verlust wurde in Ratten nach der Gabe von 10 mg/kg LBE2 ($0 \pm 0,9\%$, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle) festgestellt. Auch LBE2 schützte bei einer Konzentration von 1 mg/kg oder 100 mg/kg alle RGCs vor Laser-Photokoagulation induzierter Schädigung (1 mg/kg: $1,0 \pm 1,6\%$, $*p < 0,001$; 100 mg/kg: $2,4 \pm 1,7\%$, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit 1, 10 oder 100 mg/kg LBE2 behandelten Ratten. Die Behandlung mit anderen Konzentrationen von LBE2 war beim Schutz der RGCs vor okulärer Hypertonie (0,01 mg/kg: $8,6 \pm 1,1\%$; 0,1 mg/kg: $5,5 \pm 0,5\%$; 1000 mg/kg: $10,3 \pm 0,55\%$) nicht so wirksam wie die oben genannten Do-

sen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für dieses Experiment eine Dosis von 1 – 10 mg/kg LBE2 als Optimum erkannt. Die Daten sind als prozentualer Anteil des RGC-Verlusts verglichen mit der Gesamtanzahl an RGCs des nicht operierten linken Auges (Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert), $*p < 0,01$ und $*p < 0,001$ wurden als signifikant nach einem Einweg-ANOVA gefolgt von einem multiplen Bonferroni Vergleichstest bezeichnet.

Beispiel 4 – Änderung im intraoculären Druck (IOP) in einem okularen Hypertoniemodell von Sprague-Dawley-Ratten

[0058] Bei ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen, 250–280g) wurde durch Laser-Photokoagulation eine okuläre Hypertonie bewirkt. In allen Gruppen wurde das rechte Auge der Ratten mit einem Argonlaser photokoaguliert, während deren linke Augen als gegenüberliegende Kontrolle nicht operiert wurden. Die Argonlaser-Photokoagulation wurde an den limbischen Venen und an den 3 Episkleralvenen (2 superior und 1 inferior) durchgeführt. Die Ratten wurden täglich mit entweder dem Trägermittel (Kontrolle) oder LBE2 mit Konzentrationen im Bereich von 0,01 mg/kg bis 1000 mg/kg von einer Woche vor der Laser-Photokoagulation bis zum Töten der Tiere behandelt ($n = 6$ in jeder Gruppe). Der intraokulare Druck (IOP) wurde mit einem in der Hand gehaltenen Tonometer vor der Laser-Photokoagulation und 3 Tage nach jeder Laseroperation gemessen, um die hypertensive Bedingung zu verfolgen. Vor der Laserbehandlung war der Ausgangs-IOP beider Augen bei $14,6 \pm 0,4$ mmHg (**Fig. 4**). Die okuläre Hypertonie wurde durch zwei Laseranwendungen induziert, eine am Tag 7 und eine am Tag 14. Die Ratten wurden am Tag 21 getötet. Das Niveau des IOPs der verletzten Augen verblieb nach zwei Laseranwendungen auf einem hohen Niveau ($22,6 \pm 1,1$ mmHg bis $24,6 \pm 0,7$ mmHg). Die okuläre Hypertonie blieb somit erhalten und war ungefähr 1,7-fach höher als bei den gegenüberliegenden (intakten) Augen. Der erhöhte IOP war auch noch bei den mit 0,01, 0,1, 1, 10, 100 oder 1000 mg/kg LBE2 behandelten Gruppen von Ratten in einem Bereich von $20,8 \pm 0,3$ mmHg bis $26,3 \pm 1,2$ mmHg vorhanden. Das erhöhte IOP-Niveau war so hoch wie das der Trägermittel behandelten Kontrollratten. Diese Ergebnisse zeigten, dass die LBE2-Behandlung den erhöhten IOP nicht vermindert. Die Behandlung durch Laser-Photokoagulation induzierte ein Ansteigen des intraokulären Drucks bis auf ungefähr 20 mmHg. Während mit LBE2 behandelte Ratten eine Verminderung des RGC-Verlusts zeigten, war das hohe IOP-Niveau durch LBE2 nicht beeinflusst. Die Daten wurden durch einen Einweg-ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Kramer post hoc test abgesichert.

Beispiel 5 – Chronischer Toxizitätstest von LBE2 in Hamstern mit einer Sehnervdurchtrennung

[0059] Um die mögliche chronische Toxizität von LBE2 bei ausgewachsenen Hamstern (6–8 Wochen, 60–80g) in dem Sehnervdurchtrennungsmodell zu untersuchen, wurde das Körpergewicht und die Mortalität der Hamster vor und 7 Tage nach der Sehnervdurchtrennung aufgezeichnet (n = 8 in jeder Gruppe). Die Daten sind als Änderung des Körpergewichts vor und 7 Tage nach der Läsion dargestellt (Fig. 5). Da das Körpergewicht der Hamster, welche verschiedene Dosen von LBE2 erhalten hatten, bei keiner getesteten Konzentration beeinflusst wurde und bei keinem Hamster zum Tode führte, scheint LBE2 keinerlei chronische Toxizität zu besitzen. Die Daten wurden von 3 unabhängigen Experimenten erhalten.

Beispiel 6 – Chronischer Toxizitätstest von LBE2 in einem okularen Hypertoniemodell von Sprague-Dawley-Ratten

[0060] Das Körpergewicht und die Mortalität von ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen, 250–280 g), welche LBE2 oral von 7 Tage vor der Induktion einer okularen Hypertonie bis zu 14 Tagen danach erhalten, wurden aufgezeichnet, um die mögliche chronische Toxizität von LBE2 zu untersuchen (n = 6 in jeder Gruppe). Der Anstieg des Körpergewichts der Ratten, die LBE2 erhalten haben, war vergleichbar zu dem der Trägermittel behandelten Kontrollratten (Fig. 6). Die Mortalität durch die LBE2-Behandlung war nicht signifikant verändert im Vergleich zu jener der Kontrollgruppe. Das verdeutlicht, dass die orale Einnahme von LBE2 keine offensichtlichen Nebenwirkungen hat. Während der Behandlung mit LBE2 und nach erhaltener Laser-Photokoagulation wurden die Ratten für 2 Wochen gehalten und das Körpergewicht vor dem Töten bestimmt. Nach diesen Daten wird das Körpergewicht der Ratten durch die Behandlung mit LBE2 nicht beeinflusst.

Beispiel 7 – Chronischer Toxizitätstest von LBE2 an normalen jungen Sprague-Dawley-Ratten

[0061] Um zu untersuchen, ob LBE2 irgendeine toxische Wirkung bei normalen jungen Sprague-Dawley-Ratten besitzt (4 Wochen), wurde Ratten 10g/kg von LBE2 für 2 Wochen gegeben (n = 8 in jeder Gruppe). Die Veränderung des Körpergewichts der Ratten wurde vor und nach oraler Verabreichung von LBE2 aufgezeichnet sowie die Anzahl der verstorbenen Ratten dokumentiert. Die Daten wurden von drei unabhängigen Experimenten erhalten. Die Ergebnisse (Fig. 7) zeigen keine signifikante Veränderung des Körpergewichts der Ratten nach Gabe des Extraktes, was auf keine chronische Toxizität schließen lässt.

Beispiel 8 – Akuter Toxizitätstest von LBE2 in normalen Sprague-Dawley-Ratten

[0062] Die akute Toxizität für LBE2 wurde unter Verwendung des LD₅₀-Wertes als Standard untersucht. Normale ausgewachsene Sprague-Dawley-Ratten (10–12 Wochen, 250–280 g) wurden in Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder Trägermittel oder verschiedene Dosen von LBE2 (0,01 mg/kg, 1000 mg/kg und 10000 mg/kg). 24 Stunden nach oraler Verabreichung wurde die Anzahl der toten Ratten in jeder Gruppe gezählt. Die Ergebnisse (Fig. 8) zeigen keine signifikante Veränderung des Körpergewichts der Ratten, die mit dem Extrakt behandelt wurden, und es konnte keine Mortalität festgestellt werden, was auf das Fehlen einer akuten Toxizität schließen lässt.

[0063] An der vorliegenden Erfindung können verschiedene Änderungen und Modifikationen vorgenommen werden, ohne den Sinn und den Bereich dieser zu verlassen. Die dargestellten Ausführungsformen sind zur weiteren Erläuterung der Erfindung gedacht und sollen diese nicht einschränken.

REFERENZEN

- Cheung ZH, So KF, Lu Q, Yip HK, Wu W, Shan JJ, Pang PK and Chen CF (2002): Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts. *J. Neurotrauma* 19:369–78.
- Chinese Herbal Medicine Company (1994). *Chinese Traditional Formulation of Herbal Medicine*, 1598–1608 Scientific Publication Shanghai, China.
- Cho KS, Chan PM, So KF, Yip HK and Chung SK (1999). Ciliary neurotrophic Factor promotes the regrowth capacity but not the survival of intraorbitally axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Neuroscience* 94:623–8.
- Cho KS, Chung SK, Yip HK and So KF (2001). Differential effects of intravitreal optic nerve and sciatic nerve grafts on the survival of retinal ganglion cells and the regeneration of their axons. *J Neurocytol* 30:983–91.
- Frost DO, So KF and Schneider GE (1979). Postnatal development of retinal projections in Syrian hamsters: a study using autoradiographic and anterograde degeneration techniques. *Neuroscience* 4:1649–77.
- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J and Sharma S (1995). Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma., *Exp Eye Res* 61:33–44.
- Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J and So KF (2004). CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci* 19:265–272.
- Lam KW and dBut P (1999). The content of zeaxanthin in Gou Qi Zi a potential health benefit to improve visual acuity. *Food Chem* 67:173–176.

Laquis S, Chaudhary P and Sharma S (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res* 784:100–104.

Laquis S, Chaudhary P and Sharma SC (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res* 784:100–4.

Leske MC (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. Am J Epidemiol* 118:166–91.

Levin, (1997). *Current Opinion in Ophthalmology* 8:9–15.

Levin, (1999). *Mediguide to Ophthalmology* 8:1–5.

Lu Q, Cui Q, Yip HK and So KF (2003). C-Jun expression in surviving and regenerating retinal ganglion cells: effects of intravitreal neurotrophic supply. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5342–8.

McKinnon SJ, Lehman DM, Tahzib NG, Ransom NL, Reitsamer HA, Liston P, LaCasse E, Li Q, Korneluk RG and Hauswirth WW (2002). Baculoviral IAP repeat-containing-4 protects optic nerve axons in a rat glaucoma model. *Mol Ther* 5:780–7.

Mittag TW, Danias J, Phorene G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM and Tatton WG (2000). Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3451–3459.

Morrison J, Moore C, Deppmeier L, Gold B, Meshul C and Johnson E (1997). A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64:85–96.

Nickells RW (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1:S151–61.

Osborne NN, Wood JP, Chidlow G, Bae JH, Melena J and Nash MS (1999). Ganglion cell death in glaucoma: what do we really know" *Br J ophthalmol* 83:980–6.

Quigley HA and Green WR (1979). The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage; clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86:1803–30.

Quigley HA and Pease ME (1996). Change in the optic disc and nerve fiber layer estimated with the glaucoma-scope in monkey eyes. *J Glaucoma* 5:106–16.

Quigley HA (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 80:389–93.

Sawada A and Neufeld A (1999). Confirmation of the rat model of chronic moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 69:525–531.

So KF, Campbell G and Lieberman AR (1985). Synaptic organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the adult hamster. An electron microscope study using degeneration and horseradish peroxidase tracing techniques. *Anat Embryol (Berl)* 171:223–34.

So KF, Schneider GE and Frost DO (1978). Postnatal development of retinal projections to the lateral geniculate body in Syrian hamsters. *Brain Res* 142:343–52.

Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T,

Abe H and Ozawa H (1998). Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *J Jpn J Ophthalmol* 42:337–344.

WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M and Wheeler LA (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2849–55.

WoldeMussie E, Yoles E, Schwartz M, Ruiz G and Wheeler LA (2002). Neuroprotective effect of memantine in different retinal injury models in rats. *J Glaucoma* 11:474–80.

Woo HH, Jen LSA and So KF (1985). The postnatal development of retinocollicular projections in normal hamsters and in hamsters following neonatal monocular enucleation: a horseradish peroxidase tracing study. *Brain Res* 352:1–13.

You SW, Bedi KS, YIP HK and So KF (2002). Axonal regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve pre-lesions and attachment of normal or predegenerated peripheral nerve grafts. *Vis Neurosci* 19:661–8.

Zusammenfassung:

Verwendungen von *Lycium barbarum* Extrakten als neuroprotektive Mittel zur Behandlung der Degeneration von retinalen Ganglienzellen

[0064] Die Erfindung bezieht sich auf eine Verwendung eines Extraktes aus *Lycium barbarum* oder einer aktiven Fraktion daraus zur Herstellung eines Medikamentes zur Verminderung des Absterbens retinaler Ganglienzellen bei einem Patienten.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Extraktes aus *Lycium barbarum* oder einer aktiven Fraktion daraus zur Herstellung eines Medikamentes zur Verminderung des Absterbens retinaler Ganglienzellen bei einem Patienten.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein Extrakt einer Pflanze aus der Familie der Solanaceae ist.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein Heißwasserextrakt von *Lycium barbarum* ist, der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahierbar sind.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt polyanionisch ist, ein Molekulargewicht von weniger als 500 kDa besitzt und wenigstens in Methylendichlorid, Chloroform oder Toluol unlöslich ist.
5. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch ge-

kennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein 50–100°C Wasserextrakt von *Lycium barbarum* ist, der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahierbar sind.

6. Verwendung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein etwa 70°C Wasserextrakt von *Lycium barbarum* ist, der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahierbar sind.

7. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament einen pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst.

8. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament intravenös, intrakranial, intracerebral, subkutan, intramuskulär, intranasal oder intraperitoneal verabreicht wird.

9. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Patient ein Mensch ist.

10. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament täglich verabreicht wird.

11. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament oral verabreicht wird.

12. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament auf die Haut verabreicht wird.

13. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Patient ein Mensch mit einem Glaukom ist oder bei diesem der Verdacht auf ein Glaukom besteht.

14. Verwendung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein 50–100°C Wasserextrakt von *Lycium barbarum* ist, der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahierbar sind.

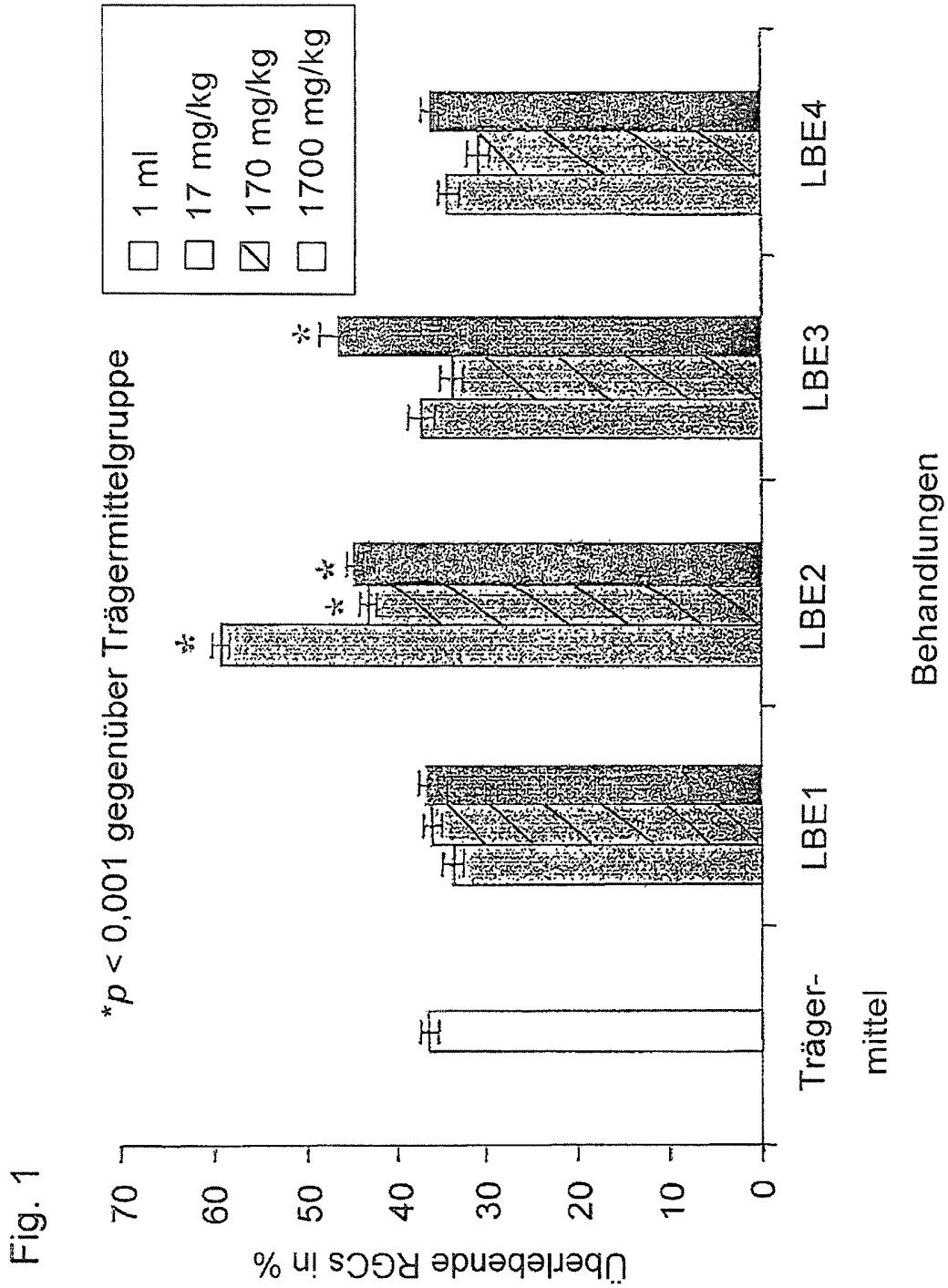
15. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die tägliche Dosis des Medikaments bei oraler Applikation etwa 0,01–1700 mg *Lycium barbarum* Extrakt/kg beträgt.

16. Verwendung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der *Lycium barbarum* Extrakt ein etwa 70°C Wasserextrakt von *Lycium barbarum* ist, der im Wesentlichen frei von Verbindungen ist, die mit kurzkettigen Alkoholen extrahierbar sind.

17. Verwendung gemäß Anspruch 16, wobei das Medikament oral oder auf die Haut verabreicht wird.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



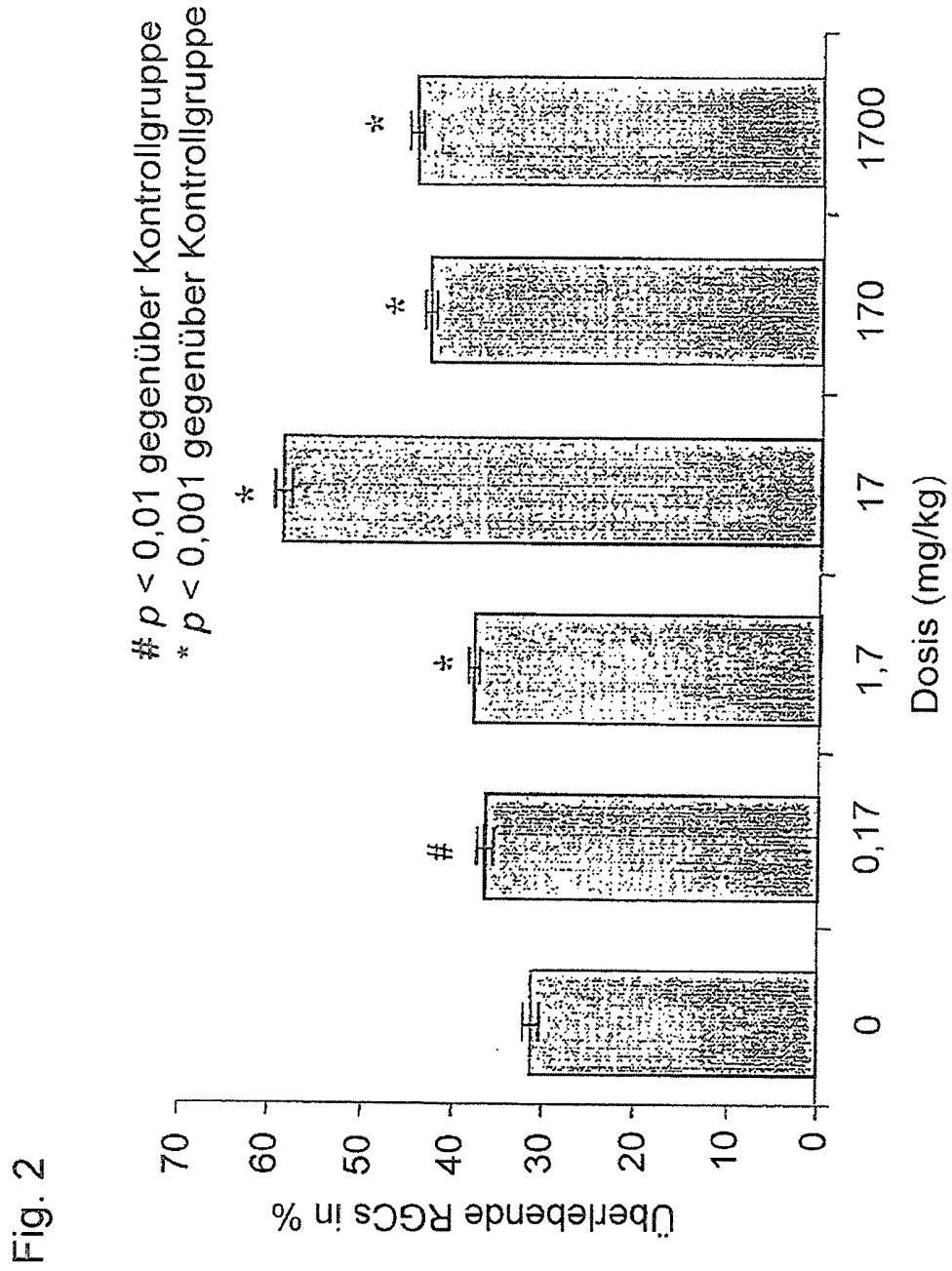
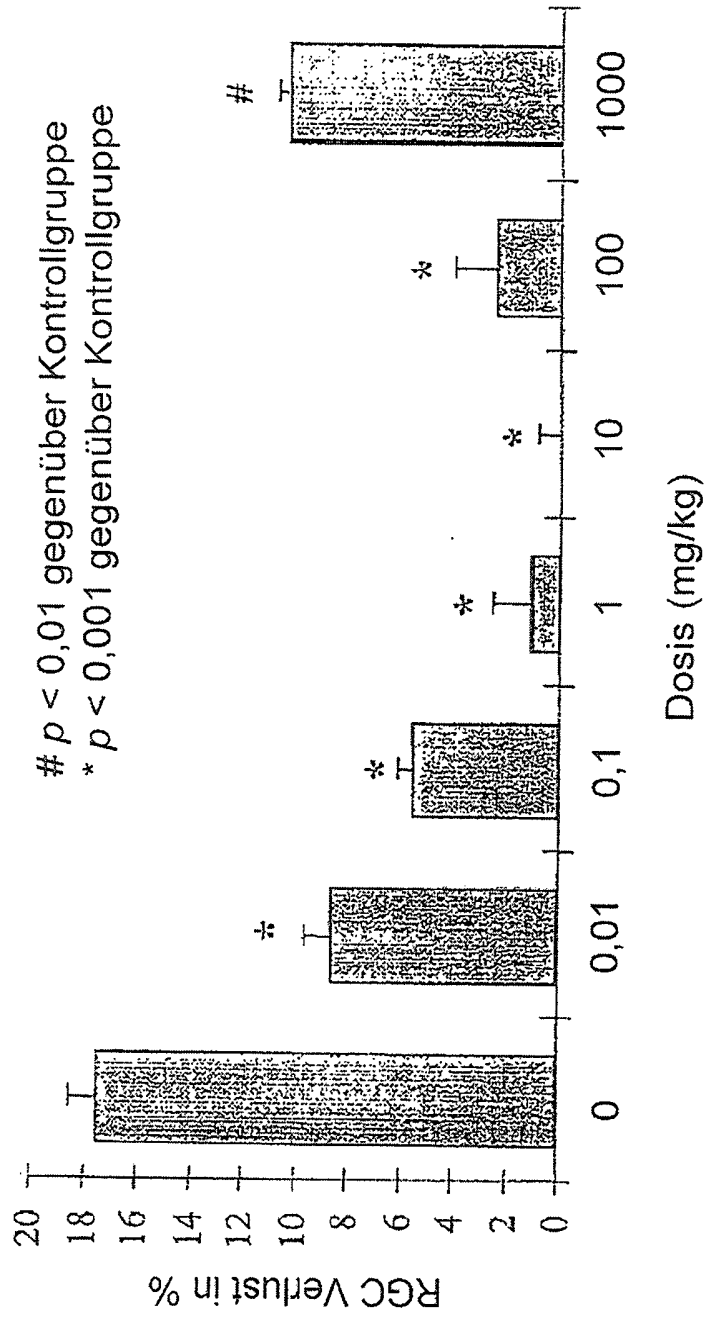
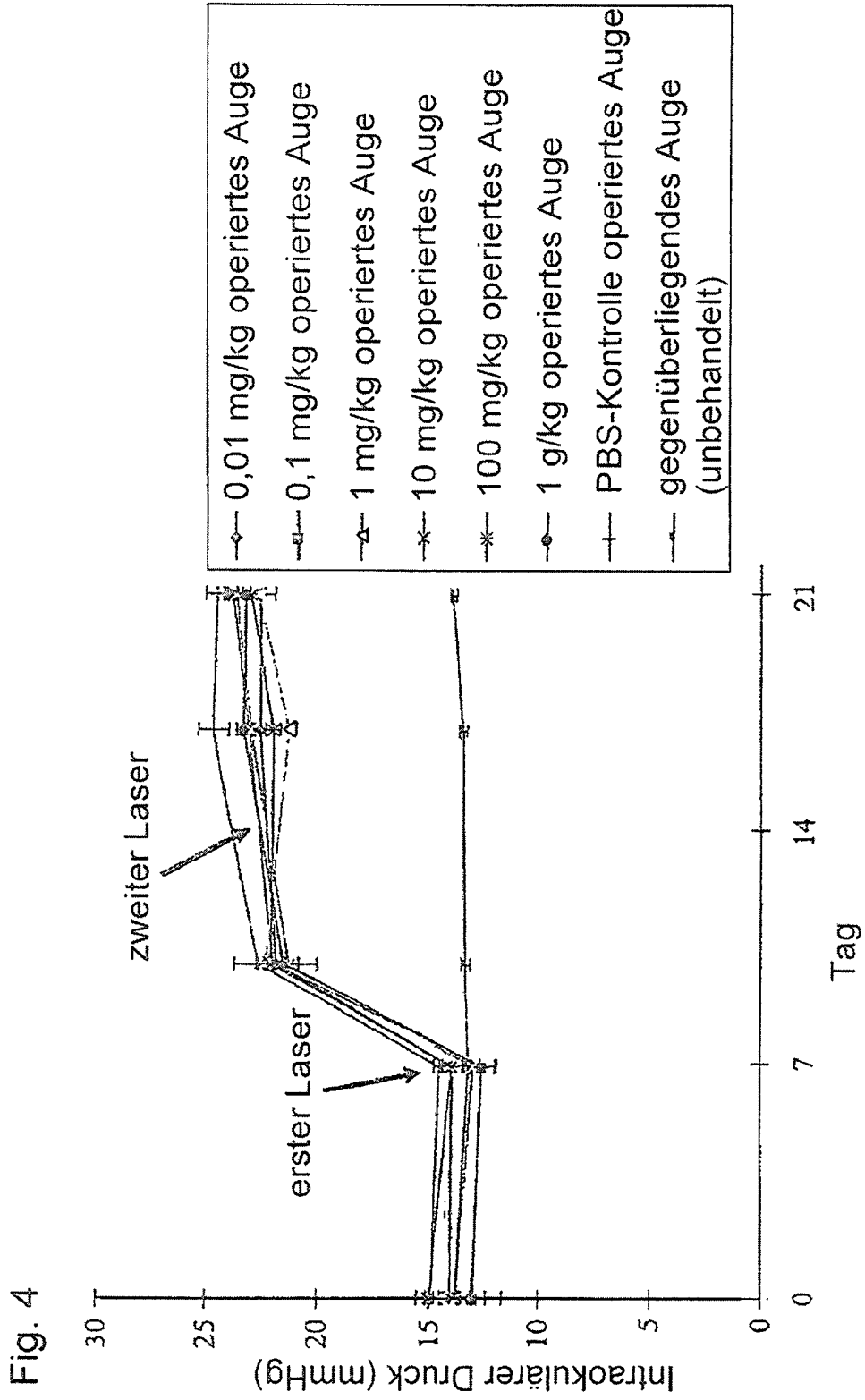


Fig. 3





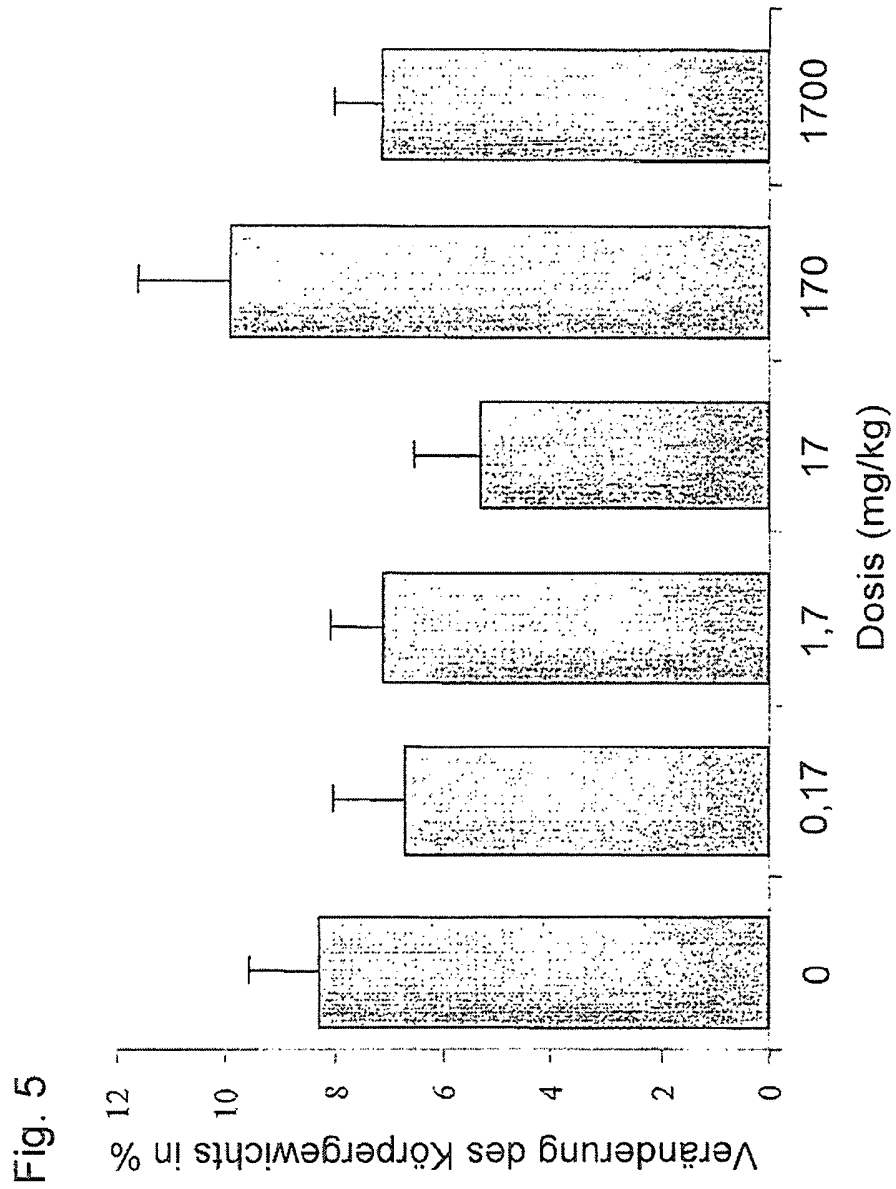


Fig. 6

