



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 005 617 T2** 2007.12.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 696 958 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 005 617.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2004/042687**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 814 825.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/063295**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.07.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.2006**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 45/00** (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
531770 P 22.12.2003 US

(73) Patentinhaber:
Alcon Inc., Hünenberg, CH

(74) Vertreter:
Abitz & Partner, 81677 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(72) Erfinder:
LANDERS, Robert A., Arlington, Texas 76012, US;
PANG, Iok-Hou, Grand Prairie, Texas 75052, US

(54) Bezeichnung: **MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON GLAUKOMATÖSER RETINOPATHIE UND OPTISCHER NEURO-PATHIE**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet prophylaktischer Mittel und Therapeutika für Retinopathie und Optikus-Neuropathie, die in Zusammenhang mit einem Glaukom stehen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Glaukome sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche eine ähnliche Gruppe klinischer Symptome aufweisen, einschließlich Schädigung des Sehnervs und selektiver apoptotischer Tod von retinalen Ganglienzellen (RGC), was zu einem progressiven Verlust des Gesichtsfelds und Blindheit führt. Eine anomale Erhöhung des intraokularen Drucks (IOP) ist mit den meisten Glaukomformen assoziiert. Die einzige verfügbare Behandlung ist die Verringerung des IOP, entweder durch Medikamente oder einen Eingriff. Die Verringerung des IOP ist hinsichtlich der Verlangsamung der Entwicklung bestimmter Glaukomtypen und Verzögerung ihrer schädigenden Wirkungen wirkungsvoll. Nichtsdestoweniger korreliert der Verlust des Gesichtsfeldes bei Glaukompatienten nicht immer mit dem IOP und die Verringerung des IOP allein stoppt den Krankheitsfortschritt nicht vollständig. Dies impliziert, dass der Druck nicht der einzige Grund für Glaukom-Retinopathie und -Optikus-Neuropathie sein könnte. Zusätzliche Mechanismen tragen wahrscheinlich zum Krankheitsfortschritt bei. Glaukom-Retinopathie wird im Allgemeinen als funktionelle Störungen oder pathologische Veränderungen der Retina verstanden, insbesondere der Tod von RGC, welche bei Patienten oder Tieren mit einem Glaukom beobachtet werden. Glaukom-Optikus-Neuropathie bezieht sich auf funktionelle Störungen oder pathologische Veränderungen im Sehnerv, durch welchen Axons der RGC hindurchgehen.

[0003] Ein Querschnitt durch die Retina eines erwachsenen Menschen zeigt die folgenden Zellschichten, die in Richtung von der proximalen oder innersten Region (Glaskörper-Seite) bis zur distalen oder äußersten Region (Chorion-Seite) aufgeführt sind:

innere Grenzmembran,
Optikus-Faserschicht,
Ganglienzellschicht,
innere plexiforme Schicht,
innere Körnerschicht,
äußere plexiforme Schicht,
äußere Körnerschicht,
äußere Grenzmembran,
innere Segmente von Stäbchen und Zäpfchen,
äußere Segmente von Stäbchen und Zäpfchen,
retinales Pigmentepithel und
Choriocapillaris.

[0004] Das retinale Pigmentepithel und die Chorionkapillaren werden auf der Rückseite der Retina am nächsten zur Chorionmembran gefunden, während die innere Grenzmembran am nächsten zur Glaskörperkapsel liegt. Die Ganglienzellschicht sammelt den photorezeptiven Input und schickt den Input über myelinisierte Axone durch den Sehnerv zum Gehirn. Die Ganglienzellen sind die gefährdeten Zellen bei Glaukomen.

[0005] Molekulare Mechanismen, welche für den Beitrag zum Tod von RGC postuliert wurden, umfassen Glutamat-Toxizität, Entzug neurotropher Faktoren, Gefäßanomalie (Ischämie), reaktive Gliose und stickstoffoxid-induzierte Toxizität. Jedoch wird keiner dieser postulierten Mechanismen von Forschern auf dem Gebiet allgemein akzeptiert.

[0006] Die PCT-Anmeldung Nr. PCT/US02/40457 von X. Gao et al., veröffentlicht als WO 03/051313, ermöglicht den Angaben zufolge eine Induktion eines Phase II-Entgiftungsenzyms durch Sulphoraphan in Human-Retina-Pigmentepithelzellen. Die US-Patentveröffentlichung Nr. 2002/0091087 von Y. Zhang et al. ermöglicht den Angaben zufolge eine Behandlung einer neurodegenerativen Erkrankung durch eine Verbindung, Sulforaphan, welche Glutathion oder ein Phase-II-Entgiftungsenzym im Rückenmarksgewebe erhöht, bei Alzheimer Krankheit und bei amyotroper Lateralsklerose. Retinale Pigmentepithelzellen unterscheiden sich von retinalen Ganglienzellen darin, dass die Ganglienzellen Neuronen sind und die retinalen Pigmentepithelzellen keine Neuronen sind. Ferner können biologische Reaktionen von Augengeweben, wie z.B. die Retina, auf bestimmte Therapeutika nicht aus den biologischen Reaktionen von Rückenmarksgeweben und Gehirngeweben vorausgesagt werden. Die zitierten Anmeldungen befassen sich nicht mit dem Schutz vor oder der Behandlung

gegen Verlust von retinalen Ganglienzellen (RGC) und Optikus-Neuropathie bei Glaukomen.

[0007] Es gibt kein gegen Glaukome gerichtetes, allgemein anerkanntes therapeutisches Verfahren, um Glaukom-Retinopathie und Glaukom-Optikus-Neuropathie zu behandeln. In Anbetracht der Folgen von Glaukomen auf die Gesundheit und der Unzulänglichkeiten bisheriger Behandlungsverfahren wäre es wünschenswert, ein verbessertes Behandlungsverfahren zu haben, welches Glaukom-Retinopathie und Glaukom-Optikus-Neuropathie betrifft.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Gemäß der vorliegenden Erfindung bietet ein Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein und der anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, welche zytotoxische Metaboliten entgiften und eliminieren, eine schützende oder therapeutische Wirkung hinsichtlich einer Verzögerung oder Verhinderung des Verlusts von retinalen Ganglienzellen und glaukomatöser Schädigung des Sehnerves. Wie hier verwendet, bedeutet „stimulatorische Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein“ ein Mittel, welches die Verfügbarkeit im oder den Transport von Nrf2 zum Kern erhöht. Die Translokation von Nrf2-Proteinen zum Kern erlaubt eine anschließende Erhöhung der Expression von Genprodukten, welche zytotoxische Metaboliten entgiften und eliminieren. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung stellen ein Behandlungsverfahren für Glaukom-Retinopathie und -Optikus-Neuropathie bei einem Individuum bereit, welches umfasst, dass dem Individuum eine wirksame Menge einer Zusammensetzung, umfassend ein Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein und einen annehmbaren Träger, verabreicht wird. Das Individuum kann ein Risiko für die Entwicklung von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie aufweisen oder Symptome von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie aufweisen.

[0009] Das Mittel der vorliegenden Erfindung, welches die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert, kann einen Michael-Additions-Akzeptor, Diphenol, Thiocarbamat, Chinon, 1,2-Dithiol-3-thion, butyliertes Hydroxyanisol, Flavonoid, ein Isothiocyanat, 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol, Ethoxychin, 3-Hydroxycumarin, Kombinationen davon oder ein pharmakologisch aktives Derivat oder Analogon davon umfassen. In einer Ausführungsform umfasst das Mittel ein Isothiocyanat, wie z.B. Sulforaphan, oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon. In einer anderen Ausführungsform umfasst das Mittel ein 1,2-Dithiol-3-thion, wie z.B. Oltipraz, oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon.

[0010] Die Verabreichung des Mittels, welches die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert, kann durch intraokuläre Injektion, Implantation einer Abgabevorrichtung zur langsamen Freisetzung oder eine topische, orale, intranasale Verabreichung, eine systemische Injektion oder andere systemische Verabreichungen erfolgen.

[0011] In einer weiteren Ausführungsform des vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahrens wird bei dem Individuum Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie diagnostiziert und in einer anderen Ausführungsform der Erfindung hat das Individuum Symptome von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie.

Kurzbeschreibung der Zeichnung

[0012] Die Zeichnung demonstriert die Wirkung von Sulforaphan auf die glutamat-induzierte Toxizität bei kultivierten retinalen Ganglienzellen von adulten Ratten. Zellen wurden mit den angegebenen Verbindungen 3 Tage lang behandelt. Das Überleben wurde durch Zählen von Thy-1-positiven gesunden Zellen ermittelt. Das Sternchen * repräsentiert einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollwerten mittels Einweg-ANOVA-Analyse der Varianz zwischen den Gruppen und anschließenden Dunnett's Test.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Mitteln, welche die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metaboliten entgiften und eliminieren, stimulieren, in einer Zusammensetzung zur Behandlung von Glaukom-Retinopathie und -Optikus-Neuropathie.

[0014] Der Begriff „Behandlung von Glaukom-Retinopathie und -Optikus-Neuropathie“, wie hier verwendet,

bedeutet die Verzögerung oder Verhinderung der Entwicklung von, die Inhibierung des Fortschritts oder die Erleichterung von glaukomatöser Retinopathie oder Optikus-Neuropathie oder von Symptomen davon. Die Stimulation der nukleären Translokation von Nrf2-Protein und der anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metaboliten entgiften und eliminieren, wird zum Schutz von retinalen Ganglienzellen und zum Schutz des Sehnervs bereitgestellt.

[0015] Die nukleäre Translokation von Nrf2 wird in Zellen induziert, die bestimmten Elektrophilen und Oxidantien ausgesetzt sind. Gene, welche aufgrund der nukleären Translokation von Nrf2 induziert werden, liefern Entgiftungsenzyme, welche den Schutz gegen Elektrophile erhöhen und die Wiederherstellung oder den Abbau geschädigter Proteine fördern. Die Induktion dieser Enzyme wird auf der transkriptionalen Ebene reguliert und wird durch einen spezifischen Enhancer vermittelt, das Antioxidans-Response-Element oder ARE, welches im Promotor des für das Enzym codierenden Gens gefunden wird. Der Sequenz-Kontext des ARE, die Art der chemischen Inducer und der Zelltyp beeinflussen die Aktivität des Enhancers in einem speziellen Gen.

[0016] Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist ein Mitglied der NF-E2-Transkriptionsfaktorfamilie und ist verantwortlich für die Hochregulation der durch das Antioxidans-Response-Element (ARE) vermittelten Genexpression. Nrf2 induziert die Genexpression durch Bindung an die ARE (Antioxidans-Response-Element)-Region des Promotors, um die Gentranskription konstitutiv oder in Reaktion auf ein oxidatives Stresssignal zu aktivieren. Man nimmt an, dass Nrf2 unter normalen Bedingungen im Zytoplasma vorliegt, gebunden von einem Repressorprotein Keap1, ein zytoplasmatisches Protein, das am Aktin-Zytoskelett verankert ist. Ohne sich auf eine Theorie festlegen zu wollen, nehmen die Erfinder an, dass Mittel, welche eine stimulatorische Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein besitzen, mit der cysteinreichen intervenierenden Region eines zytosolischen Faktors Keap1 um die Wechselwirkung mit Nrf2 konkurrieren können (Dinkova-Kostova, A.T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:11908–11913 (2002)). Die Zerstörung des Nrf2-Keap1-Komplexes durch bestimmte Verbindungen wie Sulforaphan könnte Nrf2 für die Translokation in den Kern freisetzen, wo es mit anderen Transkriptionsfaktoren (d.h. Maf, c-Jun, etc.) auf ARE-Regionen von Genen heterodimerisieren kann, was zur Induktion von ARE-regulierter Genexpression führt.

[0017] Enzyme und Proteine, die mit diesem Nrf2/ARE-Signalweg exprimiert werden, besitzen chemisch vielfältige zellschützende Eigenschaften und bilden eine Verteidigung gegen toxische Metabolite und Xenobiotika. Enzyme und Proteine, von denen bekannt ist, dass sie über den Nrf2/ARE-Signalweg exprimiert werden, umfassen Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, NADP(H)-Chinonoxido-reduktase, γ -Glutamylcysteinylsynthetase, Chaperon/Stressreaktions-Proteine und Ubiquitin/Proteasom-Proteine.

[0018] Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein umfassen beispielsweise:

Michael-Additions-Akzeptoren (z.B. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen), wie z. B. Diethylmaleat oder Dimethylfumarat;
 Diphenole, wie z. B. Resveratrol,
 butylierte Hydroxyanisole, wie z. B. 2(3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisol,
 Thiocarbamate, wie z.B. Pyrrolidindithiocarbamat,
 Chinone, wie z.B. tert-Butylhydrochinon,
 Isothiocyanate, wie z.B. Sulforaphan, dessen Vorläufer Glucosinolat, Glucoraphanin oder Phenethylisothiocyanat (PEITC),
 1,2-Dithiol-3-thione, wie z.B. Oltipraz,
 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol,
 Ethoxychin,
 Cumarine, wie z.B. 3-Hydroxycumarin,
 Flavonoide, wie z.B. Quercetin oder Curcumin,
 Diallylsulfid,
 Indol-3-carbinol,
 Epigallo-3-catechingallat,
 Ellaginsäure,
 Kombinationen davon, oder ein pharmazeutisch aktives Derivat oder Analogon davon.

[0019] Ein Michael-Akzeptor ist ein Molekül, das ein Alken in Nachbarschaft zu einer elektronenziehenden Gruppe aufweist. Die elektronenziehende Gruppe ist gewöhnlich ein Carbonyl, kann jedoch auch eine Nitril- oder Nitrogruppe sein. Obwohl chemisch verschieden, sind diese Verbindungen Elektrophile und haben das Vermögen, mit nukleophilen Sulfhydrylgruppen zu reagieren. Ein „pharmakologisch aktives Derivat davon“ ist ein Agens, welches strukturell mit irgendeiner der obigen Verbindungen mit stimulatorischer Aktivität hinsicht-

lich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein verwandt ist und davon ableitbar ist, und kann beispielsweise ein Ester, ein Amid oder ein Salz davon sein. Ein „pharmakologisch aktives Analogon davon“ ist ein Agens, welches strukturell irgendeiner der obigen Verbindungen mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein ähnlich ist, jedoch sich im Aufbau leicht unterscheidet, wie z.B. durch den Ersatz eines Atoms durch ein Atom eines anderen Elements oder durch die Gegenwart einer speziellen funktionellen Gruppe. In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Sulforaphan, Oltipraz oder ein pharmakologisch aktives Analogon davon oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon in einem Behandlungsverfahren von Glaukom-Optikus-Neuropathie oder Glaukom-Retinopathie bereit.

[0020] Sulforaphan (Produkt-Nr. S6317, Sigma-Aldrich) induziert bekanntermaßen beispielsweise Chinonreduktase, Glutathion-S-Transferase und Glutathionreduktase. Enzyminduktion wurde in verschiedenen Zelllinien beobachtet, einschließlich retinalen Pigmentepithelzellen von humanen Erwachsenen (Zhang, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:2399–2403 (1992)). Sulforaphan-Analoga umfassen beispielsweise 6-(Isothiocyanato-2-hexanon), exo-2-Acetyl-6-isothiocyanatonornobornan, exo-2-(Isothiocyanato-6-methylsulfonylnornobornan), 6-Isothiocyanato-2-hexanol, 1-(Isothiocyanato-4-dimethylphosphonylbutan), exo-2-(1-Hydroxyethyl)-5-isothiocyanatonornobornan, exo-2-Acetyl-5-isothiocyanatonornobornan, 1-(Isothiocyanato-5-methylsulfonylpentan), cis-3-(Methylsulfonyl)(cyclohexylmethylisothiocyanat) und trans-3-(Methylsulfonyl)(cyclohexylmethylisothiocyanat).

[0021] Verabreichungsmodus: Die Mittel der vorliegenden Erfindung können direkt an das Auge abgegeben werden (beispielsweise topische Augentropfen oder Salben; Vorrichtungen zur langsamen Abgabe im Bindehautsack oder implantiert neben der Lederhaut oder innerhalb des Auges; periokulare, konjunktivale, subtenonale, intrakamerale, intravitreale oder intrakanalikuläre Injektionen) oder systemisch (beispielsweise: orale, intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Injektionen; parenterale, dermale oder nasale Abgabe), unter Anwendung von Techniken, die Fachleuten wohlbekannt sind. Es wird ferner in Betracht gezogen, dass die Mittel der vorliegenden Erfindung in einem intraokularen Einsatz oder in Implantat-Vorrichtungen formuliert sein können.

[0022] Individuum: Ein Individuum, das hinsichtlich Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie wie hier beschrieben behandelt wird, kann ein Mensch sein oder ein anderes Lebewesen, das ein Risiko zur Entwicklung von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie trägt oder Symptome von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie aufweist.

[0023] Formulierungen und Dosierung: Die Mittel der vorliegenden Erfindung können als Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen (Dispersionen) in einem geeigneten ophthalmischen Träger verabreicht werden. Es folgen Beispiele möglicher Formulierungen, die von dieser Erfindung umfasst werden.

	Menge in Gew.-%
Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein stimuliert	0,01-5; 0,01 – 2,0; 0,5 – 2,0
Hydroxypropylmethylcellulose	0,5
Natriumchlorid	0,8
Benzalkoniumchlorid	0,01
EDTA	0,01
NaOH/HCl	bis pH 7,4
Gereinigtes Wasser	bis 100 %

	Menge in Gew.-%
Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein stimuliert	0,00005–0,5; 0,0003–0,3; 0,0005–0,03; 0,001
Phosphatgepufferte Salzlösung	1,0
Benzalkoniumchlorid	0,01
Polysorbat 80	0,5
Gereinigtes Wasser	bis 100 %

	Menge in Gew.-%
Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein stimuliert	0,001
Einbasisches Natriumphosphat	0,05
Zweibasisches Natriumphosphat (wasserfrei)	0,15
Natriumchlorid	0,75
Dinatrium-EDTA	0,05
Cremophor EL	0,1
Benzalkoniumchlorid	0,01
HCl und/oder NaOH	pH 7,3–7,4
Gereinigtes Wasser	bis 100 %

	Menge in Gew.-%
Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein stimuliert	0,0005
Phosphatgepufferte Salzlösung	1,0
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	4,0
Gereinigtes Wasser	bis 100 %

[0024] In einer weiteren Ausführungsform werden die ophthalmischen Zusammensetzungen so formuliert, dass eine intraokulare Konzentration von etwa 0,1–100 nanomolar (nM) oder in einer weiteren Ausführungsform 1–10 nM bereitgestellt wird. Peak-Plasmakonzentrationen von bis zu 20 mikromolar können für die systemische Verabreichung erreicht werden. Topische Zusammensetzungen werden der Oberfläche des Auges ein- bis viermal pro Tag nach dem routinemäßigen Ermessen eines geschulten Kliniker verabreicht. Der pH-Wert der Formulierung sollte 4–9 oder 4,5 bis 7,4 betragen. Systemische Formulierungen können z.B. etwa 10 mg bis 1000 mg, etwa 10 mg bis 500 mg, etwa 10 mg bis 100 mg oder bis 125 mg des Mittels enthalten, welches die nukleäre Translokation des Nrf2-Proteins und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert.

[0025] Eine „wirksame Menge“ bezieht sich auf diejenige Menge des Mittels, welche in der Lage ist, die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, zu stimulieren. Eine solche Induktion der Genexpression bietet eine Verteidigung gegen die Toxizität reaktiver Elektrophile sowie anderer toxischer Metabolite. Deshalb wird ein Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, welche zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert, zum Schutz gegen Zytotoxizität bereitgestellt. Ein solcher Schutz verzögert oder verhindert den Ausbruch von Symptomen bei einem Individuum mit einem Risiko zur Entwicklung von Glaukom-Optikus-Neuropathie oder Glaukom-Retinopathie. Die wirksame Menge einer Formulierung kann beispielsweise von solchen Faktoren wie dem Alter, der Rasse und dem Geschlecht des Individuums oder der Schwere der Optikus-Neuropathie abhängen. In einer Ausführungsform wird das Mittel topisch dem Auge verabreicht und erreicht die retinalen Ganglienzellen in einer therapeutischen Dosis und lindert damit den Krankheitsprozess der Retinopathie oder Optikus-Neuropathie.

[0026] Während die genaue Dosierung dem Ermessen des Klinikers überlassen ist, wird bzw. werden die resultierende(n) Lösung(en) vorzugsweise verabreicht, indem ein Tropfen einer jeden Lösung in jedem Auge ein- bis viermal täglich oder wie vom Kliniker verordnet verabreicht wird.

[0027] Annehmbare Träger: Ein ophthalmisch annehmbarer Träger bezieht sich auf diejenigen Träger, welche höchstens wenig oder keine Augenreizung verursachen, erforderlichenfalls eine geeignete Konservierung bie-

ten, und ein oder mehrere Mittel der vorliegenden Erfindung, welche(s) die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert(en), in einer homogenen Dosierung abgeben. Für die ophthalmische Abgabe kann ein Mittel, welches die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert, mit ophthalmisch annehmbaren Konservierungsmitteln, Cosolventien, oberflächenaktiven Mitteln, Viskositätsverstärkern, Penetrationsverstärkern, Puffern, Natriumchlorid oder Wasser kombiniert werden, um eine wässrige sterile ophthalmische Suspension, Lösung oder viskose oder semiviskose Gele oder andere Typen fester oder halbfester Zusammensetzung, wie z.B. eine Salbe, zu bilden. Formulierungen einer ophthalmischen Lösung können hergestellt werden, indem das Mittel in einem physiologisch annehmbaren isotonen wässrigen Puffer gelöst wird. Ferner kann die ophthalmische Lösung ein ophthalmisch annehmbares oberflächenaktives Mittel einschließen, um die Lösung des Mittels zu unterstützen. Viskositätsaufbauende Verbindungen, wie z. B. Hydroxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Methylcellulose, Polyvinylpyrrolidon oder dergleichen, können den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zugegeben werden, um die Retention der Verbindung zu verbessern.

[0028] Um eine sterile ophthalmische Salbenformulierung herzustellen, wird das Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein und die anschließenden Erhöhungen von Genprodukten, die zytotoxische Metabolite entgiften und eliminieren, stimuliert, mit einem Konservierungsmittel in einem geeigneten Vehikel, wie z.B. Mineralöl, flüssiges Lanolin oder weißes Petrolatum, kombiniert. Sterile ophthalmische Gelformulierungen können hergestellt werden durch Suspension des Mittels in einer hydrophilen Base, hergestellt aus der Kombination von beispielsweise CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC) oder dergleichen gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren für andere ophthalmische Formulierungen. Beispielsweise kann VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) für die intraokulare Injektion verwendet werden. Andere Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können penetrationsverstärkende Materialien, wie z. B. CREMOPHOR® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) oder TWEEN® 80 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Sigma Aldrich), enthalten, falls die Mittel der vorliegenden Erfindung wenig in das Auge eindringen.

Beispiel 1

Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein

[0029] Gefäßendothelzellen, wie z.B. Rinderaorta-Endothelzellen (BAEC, VEC Technologies, Rensselaer, NY), werden dazu verwendet, diejenigen Agentien zu bestimmen, die Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein besitzen. Beispielsweise werden konfluente Monoschichten von Rinderaorta-Endothelzellen Kandidatenmitteln in Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 1% fötalem Rinderserum bis zu 24 Stunden lang ausgesetzt. Zellysate, zytosolische Extrakte und Kernextrakte werden hergestellt und Immunoblots durchgeführt und quantifiziert wie beschrieben in Buckley, B.J., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 307:973–979 (2003)). Mittel, welche die Menge des in der Kernfraktion nachgewiesenen Nrf2 im Vergleich zu Kontrollzellen ohne Mittel erhöhen, werden dann hinsichtlich Aktivität in einem Retina-Ganglienzell-Toxizitätsassay wie im Beispiel 2 ausgeführt getestet.

Beispiel 2

Schutz von Rattenretina-Ganglienzellen durch ein Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein

[0030] Kultivierte neuronale Rattenretina-Zellen werden mit einem Mittel, das die nukleäre Translokation von Nrf2-Protein stimuliert, für 1 bis 24 Stunden kombiniert, dann wird die Kombination Peroxid ausgesetzt. Das Überleben der neuronalen Retinazellen im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne Peroxid zeigt an, dass das Mittel einen Schutz vor dem Oxidationsmittel bietet.

[0031] Neuronale Retinazellen von neugeborenen Ratten werden isoliert und kultiviert wie in Pang, I-H, et al. beschrieben (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40:1170–1176 (1999)). „Neurale Retina-“ bezieht sich auf die Retina ohne das Retina-Pigmentepithel. Somit enthält die Kultur eine gemischte Population von Retinazelltypen. In Kürze, neugeborene Sprague-Dawley-Ratten, 2–5 Tage alt, werden betäubt und eine 2-mm-Medianöffnung wird in der Kopfhaut unmittelbar kaudal zum Sinus transversus vorgenommen. Retinale Ganglienzellen werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff, Di-I(1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat), einem lipophilen Tracer, der einheitlich Neuronen markiert (Molecular Probes, Eugene, OR), selektiv retrograd markiert. Die Spitze der Injektionsnadel (30 ga) wird 6 mm unterhalb der Schädeloberseite inseriert und eine 5-µl-Di-I-Lösung in den Colliculus superior injiziert. Die Di-I-Lösung enthält 3 mg/mL Di-I in 90% Ethanol und

10% Dimethylsulfoxid. Die Wunde wird mit einem Tropfen von flexiblem Collodion bedeckt.

[0032] Zwei bis vier Tage nach der Di-I-Injektion werden die Ratten betäubt und durch Enthauptung getötet. Deren Augäpfel werden entnommen und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nährmischung F12 (1:1; DMEM/F12, Gibco, Gaithersburg, MD) platziert. Die Retina aus jedem Auge wird abgelöst und isoliert. Retinazellen werden mit einer Lösung, die 10 mg Papain (34 Einheiten/mL), 2 mg DL-Cystein (3,3 mM) und 2 mg Rinderserumalbumin (0,4 mg/mL) in 5 ml DMEM/F12 enthält, 25 Minuten lang bei 37°C dissoziiert und dann dreimal mit 5 mL RGC-Medium (DMEM, ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum, 4 mM Glutamin, 100 Einheiten/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) gewaschen. Die Retinastücke werden durch mehrmalige Passage durch eine Einmalpipette trituriert, bis die Zellen dispergiert sind. Die Zellsuspensionen (etwa 3×10^6 Zellen/mL) werden in mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasbodenkulturschalen platziert. Die Zellen werden mit 95% Luft/5% CO₂ bei 37°C kultiviert.

[0033] Die Schutzwirkungen eines Mittels mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein werden bestimmt, indem die Kulturen mit dem Kandidatenmittel 1–24 Stunden lang behandelt werden und dann 300 µM H₂O₂ zugegeben werden. Kultivierte RGCs werden durch Di-I-Fluoreszenz identifiziert. Das Überleben von RGCs wird durch Auszählen der Anzahl von verbleibenden Zellen mit D-I-Fluoreszenz bestimmt. Mittel, welche das Überleben von retinalen Ganglienzellen im Vergleich zu einer Kontrolle verbessern, werden für den Schutz der RGCs vor einer zytotoxischen Schädigung bereitgestellt und eignen sich für die Behandlung von Glaukom-Optikus-Neuropathie.

Beispiel 3

Schutz von Rattenretina-Ganglienzellen durch Sulforaphan vor einer glutamat-induzierten Toxizität

[0034] Adulte Sprague-Dawley-Ratten wurden mittels CO₂-Betäubung getötet. Die Augen wurden enukleiert und in NEUROBASAL™-Medium (Gibco, Gaithersburg, MD) platziert. Die Retina aus jedem Auge wurde abgelöst und isoliert. Retinazellen wurden durch Kombination von bis zu 20 Retinas mit 5 mL Papainlösung, enthaltend 10 mg Papain, 2 mg DL-Cystein und 2 mg Rinderserumalbumin in 5 ml NEUROBASAL™-Medium, 25 Minuten lang bei 37°C dissoziiert, dann dreimal mit 5 mL RGC-Medium (NEUROBASAL™-Medium, ergänzt wie im Beispiel 2 angegeben und mit 1% fötalem Kalbsserum) gewaschen. Die Retinastücke wurden trituriert, indem sie durch eine feuergeglättete Einmalpipette mehrmals hindurchgezogen wurden, bis die Zellen dispergiert waren. Die Zellsuspension wurde auf einem mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten 8-Mulden-Kulturträger aufgebracht. Glutamat und Glutamat mit Sulforaphan wurden vorbestimmten Mulden zugegeben. Die Zellen wurden dann bei 95% Luft/5% CO₂ bei 37°C für drei Tage kultiviert.

[0035] Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Zellen fixiert und hinsichtlich Thy-1, einem RGC-Marker, durch Immunozytochemie markiert. Das Zellüberleben wurde quantitativ bestimmt durch manuelles Auszählen von Thy-1-positiven gesunden Zellen in jeder Mulde. Die resultierenden Daten sind in der Zeichnung dargestellt und demonstrieren, dass die Behandlung der RGC mit Glutamat (100 µM) für drei Tage eine 40–60%ige Verringerung der überlebenden Zellen verursachte. Die Behandlung der Zellen mit Sulforaphan (0,5 µM) verhinderte eine solche Toxizität. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Sulforaphan vor Schädigungen der retinalen Ganglienzellen schützt.

[0036] Die hier zitierten Referenzen sind in dem Ausmaß, in dem sie beispielhafte Verfahrensdetails oder andere Details zusätzlich zu den hier angegebenen liefern, durch die Bezugnahme spezifisch inkorporiert.

[0037] Wie hier verwendet und soweit nicht anders angegeben, sollen die Begriffe „ein“ und „eine“ „genau ein(e)“, „mindestens ein(e)“ oder „ein(e) oder mehrere“ bedeuten.

Patentansprüche

1. Verwendung einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, umfassend ein Mittel mit stimulatorischer Aktivität hinsichtlich der nukleären Translokation von Nrf2-Protein und einen annehmbaren Träger, zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie bei einem Individuum.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei bei dem Individuum die Gefahr der Entwicklung von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie besteht.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Individuum Symptome von Glaukom-Retinopathie oder -Optikus-Neuropathie aufweist.

4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Mittel einen Michael-Additions-Akzeptor, Diphenol, Thiocarbamat, Chinon, 1,2-Dithiol-3-thion, butyliertes Hydroxyanisol, Flavonoid, ein Isothiocyanat, 3,5-Di-tert.-butyl-4-hydroxytoluol, Ethoxychin, ein Cumarin, Kombinationen davon oder ein pharmakologisch aktives Derivat oder Analogon davon umfasst.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Mittel ein Isothiocyanat oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Isothiocyanat Sulforaphan oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Mittel ein 1,2-Dithiol-3-thion oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das 1,2-Dithiol-3-thion Oltipraz oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

9. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Mittel ein Flavonoid oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei das Flavonoid Quercetin oder ein pharmakologisch aktives Derivat davon umfasst.

11. Verwendung nach irgendeinem vorhergehenden Anspruch, wobei das Medikament für die intraokulare Injektion, für die Implantation einer Abgabevorrichtung zur langsamen Freisetzung oder für die topische, orale oder intranasale Verabreichung bereitete wird.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei das Medikament für die intraokulare Verabreichung bereitete wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

