



Neue Stammzellentherapie
 Erste deutsche Klinik behandelt degenerative Erkrankungen!
www.xcell-center.de/Therapie

Hilfe bei Haarausfall
 Haarausfall ist behandelbar. Infos zu verschiedenen Methoden beim Mann
www.prohair.ch

Strahlentherapie
 Das umfassende Standardwerk für Strahlenschutzbeauftragte.
Wekaservices.ch

Google-Anzeigen

Google-Anzeigen

Membran-Druckrohre
 alle Hersteller und Lieferanten
www.membrane-guide.com

In situ-Hybridisierung
 Alles über Sonden, Präparation und Technik. Buchen Sie Ihren Kurs!
PromoCell-Academy.de

Qualitäts-Basenpulver CH
 vom Naturarzt empfohlen
 CH-Shop für Qualitätsbewusste
www.refrischshop.ch

Shiatsu in Zürich
 Bei Stresssymptomen und Erschöpfung Praxis Römerschloss am Römerhof
www.shiatsu-yoga.ch

Bessere Konzentration
 Steigern Sie Ihre Konzentration und Denkleistung Ihres Gehirns
www.hirt-institut.ch

Dokumentenidentifikation	DE69332275T2 17.04.2003
EP-Veröffentlichungsnummer	0683669
Titel	VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN AUF DER BASIS EINES POLYMERS (POLOXAMER) ZUR ZELLREGENERATION
Anmelder	Arch Development Corp., Chicago, Ill., US
Erfinder	LEE, Raphael C., Chicago, US
Vertreter	Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679 München
DE-Aktenzeichen	69332275
Vertragsstaaten	AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE
Sprache des Dokument	EN
EP-Anmeldetag	12.02.1993
EP-Aktenzeichen	939059440
WO-Anmeldetag	12.02.1993
PCT-Aktenzeichen	PCT/US93/01327
WO-Veröffentlichungsnummer	0093015745
WO-Veröffentlichungsdatum	19.08.1993
EP-Offenlegungsdatum	29.11.1995
EP date of grant	04.09.2002
Veröffentlichungstag im Patentblatt	17.04.2003
IPC-Hauptklasse	A61K 31/77
IPC-Nebenklasse	A61P 39/00

Beschreibung[de]

Technisches Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Zusammensetzungen und deren Verwendung für die Herstellung von Medikamenten zur Prophylaxe und Behandlung einer Schädigung von Zellmembranen und daraus resultierender Verletzung von Gewebe, verursacht durch externe Quellen, die in der Lage sind, die Zellmembranintegrität zu zerstören. In besonderen Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung die Prophylaxe und/oder die Behandlung von Gewebeschäden auf der Ebene der Zellmembran, die durch Strahlung verursacht sind, und die Steigerung der Transfektionseffizienz, indem permeabilisierte Zellmembranen mit einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung umfassend ein oberflächenaktives Copolymer verschlossen werden, vorzugsweise durch Vorbehandlung oder gleichzeitige Behandlung von verletztem Gewebe oder permeabilisierten und transfizierten Zellen mit hochenergetischen Phosphatverbindungen.

Hintergrund der Erfindung

Die weit verbreitete klinische Verwendung von Strahlentherapie bei der Behandlung von Krebs und das steigende Interesse in der Medizin und den biologischen Wissenschaften an Methoden, die das Einbringen fremder Moleküle in lebende Zellen umfassen, haben überraschenderweise zu einem gemeinsamen Problem geführt, mit welchem sich die vorliegende Erfindung befasst. Dieses Problem umfasst die Schädigung von Zellmembranen in Form von Membranpermeabilisierung oder die Herstellung einzelner Öffnungen an zahlreichen Stellen in den Membranen der Zellen. Die Folgen der Membranpermeabilisierung sind zahlreich und umfassen Verlust von Zytoplasma und von einem Teil von dessen Inhalt, Zerstörung der Ionenkonzentrationsgradienten und Erschöpfung intrazellulärer Energiespeicher.

In der Strahlentherapie erleiden Zellen in normalem Gewebe innerhalb des Strahlenfelds häufig Zellmembranpermeabilisierung. Die permeabilisierten Zellen können danach sterben, und das Gewebe wird anschließend nekrotisieren. Im Labor umfasst die Methodik, die typischerweise verwendet wird, um fremde Moleküle in Zellen einzubringen, oft die bewusste Penneabilisierung der Membranen der Zellen, wobei die Öffnungen als Eintrittsstelle für die fremden Moleküle dienen. Wie erwähnt ist jedoch eine der Folgen der Penneabilisierung gleichzeitiger Austritt des Zellinhalts und ohne einige Mittel, um die Reparatur der Öffnungen zu verbessern, können Überlebensraten von Zellen oft unannehmbar niedrig sein.

Eine der schwerwiegenden Folgen der Zellmembranpermeabilisierung ist die merkliche Erschöpfung der intrazellulären Energiespeicher. Unter normalen Verhältnissen erhalten Zellen einen hohen Spiegel an ATP aufrecht, indem sie oxidierbare Substrate als Quellen von freier Energie verwenden. Im Anschluss an die Penneabilisierung würde eine große Menge an Energie für die Versuche der Zellen aufgewendet werden, die intrazellulären Ionengleichgewichte aufrecht zu erhalten, da Ionen sich durch die Öffnungen in der Zellmembran abwärts ihrer Konzentrationsgradienten bewegen. Da die intrazelluläre Ionenumgebung zerstört ist, sind die normalerweise stattfindenden intrazellulären Reaktionen, die die ATP-Speicher regenerieren, gehemmt, und da Energie-abhängige zelluläre Prozesse andauern, sowohl um die zelluläre Funktion zu erhalten als auch um zu versuchen, die Schädigung der Zelle zu reparieren, werden die ATP-Speicher der Zellen weiter erschöpft. Dies kann zu einem Unvermögen der Zellen führen, Makromoleküle, die für eine fortgesetzte zelluläre Funktion notwendig sind, zu synthetisieren, zu deren Unvermögen, die angemessenen Ionengradienten über die Membran wieder herzustellen und schließlich zu Zelltod.

- IPC
- A [Täglicher Lebensbedarf](#)
 - B [Arbeitsverfahren; Transportieren](#)
 - C [Chemie; Hüttenwesen](#)
 - D [Textilien; Papier](#)
 - E [Bauwesen; Erdbohren; Bergbau](#)
 - F [Maschinenbau; Beleuchtung; Heizung; Waffen; Sprengen](#)
 - G [Physik](#)
 - H [Elektrotechnik](#)

Anmelder
Datum

Patentrecherche

Ein System, in welchem eine solche Erschöpfung von ATP gut demonstriert wurde, ist in Tieren, die unter hämorrhagischem Schock leiden. Es wurde gezeigt, dass die Verabreichung von ATP-MgCl₂; vor, während und sogar nach einer Zeitspanne von schwerem Schock in Ratten eine günstige Wirkung auf das Überleben der Tiere hatte. Das ATP wurde zusammen mit MgCl₂; verabreicht, um die Chelatierung divalenter Kationen aus dem Gefäßsystem durch ATP, welches allein verabreicht wurde, zu verhindern. Außerdem hemmt MgCl₂; die Deaminierung und Dephosphorylierung von ATP. Somit ist durch Verabreichung äquimolarer Mengen von ATP und MgCl₂; eine höhere Konzentration von ATP für die Gewebe verfügbar, als wenn ATP allein verabreicht worden wäre. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die günstige Wirkung von ATP-MgCl₂; nicht durch Vasodilatation allein verursacht worden sein könnte, und es wurde postuliert, dass das verabreichte ATP eine Initialwirkung (priming effect) auf die intrazelluläre Synthese von ATP haben könnte (1).

Das tatsächliche Verfahren der Zellmembranreparatur in vivo bleibt unbekannt, obwohl Forscher einige Vorstöße in Richtung auf ein Verständnis der beteiligten Mechanismen gemacht haben. Es wurde sowohl durch in vitro als auch durch in vivo Studien impliziert, dass Calciumionen eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion und -reparatur haben (2, 3, 4). Membran- und Zytoskelettproteine, einschließlich Spektrin, Dystrophin und Aktin, sind vermutlich auch aktiv an der Aufrechterhaltung und Reparatur der Zellmembran in vivo beteiligt (4). Schließlich wurde auch angenommen, dass chemische Faktoren eine signalähnliche Rolle bei der Wundheilung auf der zellulären Ebene spielen könnten (4). Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung eines oberflächenaktiven Polymers zur Herstellung eines Medikaments zur Minimierung von Strahlungsinduzierter Schädigung mittels Prophylaxe oder mittels Potenzierung der Zellmembranreparatur durch Behandlung mit einem oberflächenaktiven Copolymer nach der Bestrahlung, wie auch ein Verfahren zum Verbessern von Membranreparatur und Transfektionseffizienz in vitro zur Verfügung.

A. Wirkungen von Strahlung auf Gewebe

Die Verwendung von Strahlentherapie zur Behandlung von Tumoren ist inzwischen eine gut etablierte und gut anerkannte klinische Praxis. Allerdings ist es auch gut etabliert, dass bei menschlichen Patienten, die mit Strahlung behandelt werden, schwere Komplikationen entstehen können. Es kann angenommen werden, dass normale Gewebe innerhalb eines Strahlentherapiefelds Strahleninduzierten Schaden erleiden, und die Wahrscheinlichkeit der Verletzung von normalem Gewebe ist dosisabhängig. Die Ablagerung von Strahlungsenergie ist zufällig und un stetig, und daher nähert sich das Abtöten von Zellen durch Strahlung einer Exponentialfunktion der Dosis an (5).

Es gibt zwei gemeinsame Gründe von Zelltod infolge von Bestrahlung mit ionisierender Strahlung; Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion aufgrund von Verletzung des genetischen Systems der Zelle und "Interphasen-Tod", welcher durch Schädigung der Membranen von Zellen in dem bestrahlten Gewebe verursacht wird. Bezüglich Ersterem weisen experimentelle Belege daraufhin, dass DNA das kritische Ziel ist. Diese Schädigung von DNA drückt sich aus, wenn eine Zelle versucht, sich mitotisch zu teilen; an einem Punkt in ihrem reproduktiven Leben wird die bestrahlte Zelle nicht in der Lage sein, Mitose zu durchlaufen, und wird daher als durch Bestrahlung sterilisiert betrachtet (5). Interphasen-Tod offenbart sich durch Gewebsödem und häufig durch Zellnekrose mit daraus resultierendem lokalem Schmerz, Fisteln, Geschwüren und in einigen Fällen bleibender Gewebeschädigung. Ein Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung beschäftigt sich mit der Prävention und/oder Behandlung von Interphasen-Tod.

Obwohl im Anschluss an Verletzung durch Strahlung natürlicherweise vorkommende Zellreparatur gezeigt wurde und trotz der Tatsache, dass der Umfang der Gewebsverletzung durch Veränderung der Größe, Zahl und Beschaffenheit von Strahlungsbehandlungen (in Grenzen) kontrolliert werden kann, ist ein verlässliches Mittel, wodurch Gewebeschaden verhindert oder repariert werden kann, bis heute noch zu entwickeln. Das Verabreichen von übermäßig zurückhaltenden Strahlentherapien kann die Menge an Schädigungen, die normales Gewebe erleidet, verringern, wird aber notwendigerweise die Zahl an Patienten, die ein Scheitern der Tumorkontrolle erleiden, erhöhen. Andererseits wird die Verwendung von überhöhten Strahlendosen die Zahl der Patienten, die Strahlungsinduzierte Verletzungen an normalem Gewebe erleiden, erhöhen (5). Daher besteht ein erheblicher Bedarf an einem prophylaktischen und/oder therapeutischen Mittel, um Membranschädigungen, die durch das Ausgesetztsein gegenüber Strahlung verursacht sind, zu reduzieren und/oder zu behandeln. Tatsächlich sollte besonders erwähnt werden, dass man erwarten kann, dass durch Unfall verursachte oder andere nicht-therapeutische Expositionen gegenüber Strahlung auch erhebliche Verletzung des Gewebes aufgrund von Zellmembranpermeabilisierung verursachen, und ein Verfahren zum Behandeln einer solchen Schädigung sollte auch als eine wichtige Entwicklung betrachtet werden.

8. Gesteigertes Überleben von Zellen und Transfektion im Anschluss an Membranpermeabilisierung

Es sind einige Techniken verfügbar, wodurch fremde Makromoleküle wie DNA oder Antisense-Moleküle zur Antisense-Therapie in eukaryotischen Zellen eingebracht werden können. Eine der gebräuchlichsten Methoden zur Inkorporation von exogenen Molekülen in lebende Zellen hängt von der Permeabilisierung der Zellmembran ab. Die Permeabilisierung der Zellmembran umfasst die Bildung von zahlreichen einzelnen Öffnungen in der Zellmembran und kann durch Verwendung von Detergenzien, durch Wechseln der osmotischen Bedingungen oder durch mechanische oder elektrische Mittel erreicht werden. Eine solche Permeabilisierung verursacht jedoch erhebliche Verletzung der Zelle und kann zu Zelltod führen, wodurch sie zu unannehmbar niedrigen Zellüberlebensraten im Anschluss an Transfektion oder Antisense-Therapie führt.

Obwohl Verfahren beschrieben wurden, welche die nachteiligen Wirkungen der Permeabilisierung von Zellmembranen vermeiden oder reduzieren, leidet jedes an besonderen Beschränkungen. Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von Serum zu Zellen, die durch Verwendung von Stromstößen permeabilisiert wurden, das Überleben von Zellen sowie die Transfektionseffizienz erhöhten (7). Außerdem wurde gezeigt, dass, wenn Zellen ohne Membranpermeabilisierung transfiziert werden, die Verwendung von Lipopolyamin-umhülltem Plasmid die Transfektion ohne erhebliche schädliche Nebenwirkungen fördert (8, 9). Jedoch sind nicht alle Zellsysteme einer Transfektion ohne Permeabilisierung zugänglich und Serum kann Faktoren enthalten, welche mit experimentellen Protokollen wechselwirken könnten oder welche die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Demgemäß wäre ein Verfahren, durch das die Effizienz der Permeabilisierungsvermittelten Transfektion gesteigert werden könnte und das Überleben von Zellen durch Verwenden einer inerten Substanz, um die Transfektion und die Reparatur der Membran zu fördern, erhöht werden könnte, eine nützliche und einzigartige Entwicklung in molekularer Genetik, insbesondere in Zellsystemen, welche gegenüber viralen und chemischen Transfektionsmethoden resistent sind.

C. Biologische Anwendungen von oberflächenaktiven Copolymeren

Einige biomedizinische Anwendungen von oberflächenaktiven Copolymeren und insbesondere Poloxameren sind beschrieben worden. Diese beinhalten die Verwendung als Mittel zur Herstellung von stabilem und konzentriertem Antiserum, als Emulgator, als Benetzungsmittel in einer Formulierung zur antiseptischen Hautreinigung, als Verstärker von Arzneimittel- oder Antibiotikaspiegeln im Blut und als Instrument zur Untersuchung von Tumor-Metastasierung (1.0).

Speziell wurde Poloxamer 188 seit den fünfziger Jahren als Emulgator verwendet. Anfangs wurde es als Tensid verwendet, um rote Blutzellen in den Membran-Sauerstoffapparaten früher Modelle von Herz-Lungen-Überbrückungsmaschinen zu schützen, und es wurde gezeigt, dass es Hämolyse und Lipid-Embolie verhindert. Es wurde als Emulgator in Lebensmitteln, oralen Arzneimitteln und Kosmetika verwendet und ist ein FDA-zugelassener Lebensmittelzusatz. Es wurde gezeigt, dass Poloxamer 188 die Adhäsion von Fibrinogen an hydrophobe Oberflächen und die nachfolgende Adhäsion von Blutplättchen und roten Blutzellen blockiert. Es ist derzeit ein FDA-zugelassenes Tensid in dem synthetischen Blutersatzmittel Flusol (11). (Siehe auch U.S.-Patent No. 4,879,109,

U.S.-Patent No. 4,897,263 und U.S.-Patent No. 4,937,070, hierin eingeschlossen durch Referenz).

Wie erwähnt besteht ein besonderer Bedarf an einem sicheren und wirksamen Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Zellmembranschädigung, die durch Strahlung verursacht ist, und der Schädigung von Gewebe, welche sich daraus ergibt. Reduzierungen von therapeutischen Strahlendosen und in die Länge gezogene Strahlenbehandlungskuren sind nicht angemessen, da eine zu niedrige Dosis bei der Kontrolle von Tumorwachstum unwirksam sein kann und verlängerte Behandlung zu schwererer, chronischer Verletzung von normalem Gewebe führen kann (5). Strahlung kann schwere, nekrotisierende Gewebsverletzung aufgrund von Zellmembranpermeabilisierung verursachen, und es existiert momentan kein unmittelbar wirksames Verfahren, um solche Verletzungen zu verhindern oder zu behandeln. Die vorliegende Erfindung bezieht sich hierauf.

Außerdem besteht im Feld der molekularen Genetik ein erheblicher Bedarf an einem Mittel zum Erhöhen von Zell-Überlebensraten und der Wirksamkeit der Transfektion. Obwohl vorgeschlagen wurde, dass vollständiges ("whole serum"), undialysiertes Serum diese Funktion zumindest in einem gewissen Ausmaß (7) ausführen kann, kann vollständiges Serum biologische Aktivitäten besitzen, welche gegen seine Verwendung in vielen experimentellen Protokollen sprechen könnten. In einer besonderen Ausführungsform bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren, wobei ein biologisch inertes, oberflächenaktives Copolymer, insbesondere ein Poloxamer, wirksam ist zum Verstärken von Zell-überleben und Wirksamkeit der Transfektion.

US 5,041,288 bezieht sich auf ein Verfahren und Zusammensetzungen zum Behandeln von pathologischen hydrophoben Wechselwirkungen, in welchen akute Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation (Spalte 1, zweiter Absatz) vorkommen. Dieses Dokument befasst sich ausschließlich mit den "nachteiligen Wirkungen der löslichen Faser" (siehe z. B. Spalte 2, Zeilen 21-41), von welcher angenommen wird, dass sie eine wichtige Rolle bei der Pathologie einer Anzahl von Krankheiten, welche Gewebeschädigung erzeugen, oder bei chirurgischen Handgriffen spielt.

US 4,879,109 stellt sehr ähnliche Information zur Verfügung (vgl. Spalte 8, Zeilen 15-27) und beansprucht insbesondere Verfahren zur Verringerung von Gewebeschädigung, die durch Verbrennungen bei einem Tier oder Menschen verursacht wurden, einschließlich der Injektion eines oberflächenaktiven Copolymers.

Marquis, C. P. et al. (1989) Cytotechnology 2, 163-170, bezieht sich auf das Verhindern von Zellschädigung durch Scherkräfte, wie man sie durch Bewegung und Belüftung in Zellreaktoren antrifft. Dieses Dokument beschreibt speziell die Verwendung von Pluronic F-68, um Zellen in vitro zu schützen, die durch mechanische/hydrodynamische Stresskräfte geschädigt wurden.

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung erkennt die entscheidende Bedeutung des Aufrechterhaltens der Zellmembranintegrität, um Schädigung von Gewebe, insbesondere aufgrund von Strahlung, zu vermeiden oder um Überlebensraten von Zellen nach Membranpermeabilisierung in vitro zu verbessern. Die Erfindung umfasst die Verwendung eines oberflächenaktiven Copolymers, zum Beispiel eines Poloxamers, um die Schädigung von Gewebe zu minimieren oder den Heilungsprozess zu verbessern. In Fällen, in denen Zellen permeabilisiert werden, um die Zellen mit einem exogenen Makromolekül (z. B. DNA, Antisense-Moleküle, Proteine) zu transfizieren, enthält die vorliegende Erfindung auch die Erkenntnis, dass ein oberflächenaktives Copolymer auch die Wirksamkeit der Transfektion steigern kann. Die vorliegende Erfindung erkennt auch das Potenzial für gesteigerte Erholung von geschädigtem Gewebe, wenn man eine Zellmembranintegrität so schnell wie möglich wieder herstellen will. Daher enthält die Erfindung eine Sammlung von Ausführungsformen, wobei die Schädigung von Zellmembranen durch die Verwendung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die ein oberflächenaktives Copolymer enthalten, entweder minimiert oder schneller repariert werden kann.

Abhängig von der Natur der Verletzung und der Natur der Verwendung des Copolymers (d. h. ob die Verwendung prophylaktisch oder zur Behandlung einer Verletzung ist) kann die pharmazeutische Zusammensetzung, die das Copolymer enthält, intravenös, intramuskulär, subkutan oder topisch verabreicht werden. Außerdem enthält die vorliegende Erfindung eine dramatische und einzigartige Erkenntnis, dass hochenergetische Phosphatverbindungen den Nutzen, der sich aus der Membranreparatur ergibt, durch Wiederherstellen der zellulären metabolischen Funktionen verbessern können.

Die vorliegende Erfindung ist daher allgemein auf Prophylaxe und Behandlung von Gewebeschädigung gerichtet, die, zumindest teilweise, von der Permeabilisierung der Membranen der Zellen resultiert, welche das geschädigte Gewebe zusammensetzen. Die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung eines oberflächenaktiven Copolymers und, in einer bevorzugten Ausführungsform, ein Poloxamer, welches auch hochenergetische Phosphatverbindungen enthalten kann, welche den Heilungsprozess durch Wiederherstellen der zellulären Energiespeicher verbessern können, stellt eine bevorzugte Ausführungsform dar.

Demgemäß ist ein Gesichtspunkt der Erfindung auf die Verwendung einer Zusammensetzung für die Herstellung eines Medikaments zur Reduzierung von durch Strahlung verursachten Gewebeschädigungen gerichtet, wobei das bestrahlte Gewebe entweder vor, während oder nach Exposition gegenüber der Strahlungsquelle mit einer wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die ein oberflächenaktives Copolymer, wie in den Ansprüchen definiert, enthält, behandelt wird. Es kann tierisches oder menschliches Gewebe behandelt werden und die Exposition gegenüber der Strahlung kann entweder durch Unfall verursachte Exposition sein, experimentelle Exposition sein oder durch therapeutische Exposition während einer Strahlentherapie erfolgen. Die Art der Strahlung ist entweder ionisierend oder nicht-ionisierend und gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird eine hochenergetische Phosphatverbindung wie ATP-MgCl₂; oder Phosphocreatin in Kombination mit dem oberflächenaktiven Copolymer verabreicht. Die Verabreichung kann entweder intravenös, intramuskulär oder topisch sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das oberflächenaktive Copolymer ein Poloxamer mit einem Molekulargewicht von mindestens 2.000 und nicht mehr als 20.000 Dalton. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform hat die hydrophobe Gruppe des Poloxamers ein Molekulargewicht von ungefähr 950-4.000 Dalton und seine hydrophilen Gruppen bilden ungefähr 45-95 Gew.-% des Poloxamers. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die hydrophobe Gruppe ein Molekulargewicht von 1.750-3.500 Dalton und die hydrophilen Gruppen bilden ungefähr 50-90 Gew.-% des Poloxamers. Wie unten ausführlicher dargelegt wird, ist das Molekulargewicht des Poloxamers selbst und der hydrophoben Gruppe und das relative Gewicht der hydrophilen Gruppe entscheidend, um die physikalischen Eigenschaften des Poloxamers zu bestimmen, von denen die wichtigeren seine Löslichkeit in Wasser und seine Charakteristika beim Wechselwirken mit hydrophoben Gruppen in der Zellmembran beinhalten.

Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung ist spezifischer auf ein in vitro-Verfahren zur Erhöhung der Effizienz, mit der exogene Moleküle in Zellen eingebracht werden, gerichtet, wie in den Ansprüchen definiert. Vor, während oder nach Permeabilisierung und Transfektion werden die Zellen mit einer Zusammensetzung in Kontakt gebracht, die ein oberflächenaktives Copolymer um fasst. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das exogene Molekül, das in die Zelle transfiziert wird, DNA und gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Zusammensetzung, die das oberflächenaktive Copolymer enthält, auch eine hochenergetische Phosphatverbindung wie ATP- MgCl₂; oder Phosphocreatin.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

In einem sehr grob vereinfachten Modell der Membranreparatur könnte postuliert werden, dass bei Permeabilisierung (Öffnen an

zahlreichen Stellen) der Zellmembran sowohl die hydrophobe Region von Membranproteinen als auch die Enden der hydrophoben Komponenten der Lipid-Doppelschicht der Membran gegenüber den polaren, wässrigen Umgebungen der extrazellulären Flüssigkeit und des Zellzytoplasmas exponiert werden. Es könnte erwartet werden, dass Zytoskelettelemente, die typischerweise an oder nahe der inneren Schicht der Zellmembran angeordnet sind, derart reagieren, dass sie mindestens eine teilweise Barriere gegenüber dem Austritt von intrazellulären Organellen und Kompartimenten bilden. Dennoch würde man erwarten, dass Ionen sowohl aus der Zelle austreten als auch in die Zelle abwärts ihrer Konzentrationsgradienten eintreten und andere kleine Moleküle können vermutlich durch die durchgängigen Stellen durchtreten. Tatsächlich könnte man sich, wenn das Ausmaß der Schädigung der Zellmembran schwer wäre, vorstellen, dass eine erhebliche Menge von Zytoplasma, enthaltend Makromoleküle und kleine Organellen, aus der Zelle ausströmen könnte.

Es wäre zu erwarten, dass die Lipidmoleküle in der Membran-Doppelschicht, die den Öffnungen am nächsten liegen, auf die Exposition gegenüber der polaren Umgebung mit einer Umorientierung ihrer selbst reagieren, sodass ihre hydrophilen Kopfgruppen sich an der Stelle der Exposition der polaren Lösung zuwenden würden. Dies würde die hydrophoben Enden der Lipidmoleküle innerhalb der Membran von dem wässrigen intra- und extrazellulären Raum isolieren. Membranfusion und Reparatur der durchgängigen Stellen würde stattfinden, indem die neu gebildeten hydrophilen Ränder der durchgängigen Stellen sich in Nähe zueinander bewegen (8). Eine Methode, wodurch ein solcher Mechanismus verbessert werden könnte, besonders, wenn die Methode die Mittel zur Wiederherstellung der Energieladung der permeabilisierten Zellen zur Verfügung stellen würde, wäre ein Segen für die Behandlung und Prävention von Verletzungen umfassend, auf zellulärer Ebene, Zellmembranpermeabilisierung.

A. Oberflächenaktive Copolymere

Oberflächenaktive Copolymere oder nicht-ionische Blockpolymer-Tenside sind oberflächenaktive Stoffe, die durch die sequenzielle Addition von zwei oder mehr Alkylenoxiden zu einer niedermolekularen, wasserlöslichen organischen Verbindung enthaltend ein oder mehrere aktive Wasserstoffe hergestellt werden. Es gibt vier Gruppen von oberflächenaktiven Copolymeren, die hinsichtlich der vorliegenden Erfindung von besonderer Bedeutung sind: die Poloxamere, die Meroxapole, die Poloxamine und die PLURADOT®-Polyole. Es gibt eine große Menge an gruppenübergreifender Variation bezüglich der Synthese der Polymere, obwohl in allen Synthesen die Oxyalkylierungsschritte in Gegenwart eines alkalischen Katalysators, im Allgemeinen Natrium- oder Kaliumhydroxid, durchgeführt werden. Der alkalische Katalysator wird dann neutralisiert und typischerweise aus dem Endprodukt entfernt.

Die Poloxamere werden synthetisiert durch die sequenzielle Addition von Propylenoxid, gefolgt von Ethylenoxid, zu Propylenglycol, welches im Fall der Poloxamere die wasserlösliche organische Komponente des Polymers bildet. Das innere Polyoxypropylenglycol ist der hydrophobe Teil des Poloxamers. Dies beruht auf der Tatsache, dass diese Gruppe sich von einem wasserlöslichen zu einem wasserunlöslichen Polymer wandelt, wenn das Molekulargewicht 750 Dalton übersteigt. Die Zugabe von Ethylenoxid in dem letzten Schritt macht das Molekül wasserlöslich.

Wie zuvor erwähnt, ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Verwendung eines Poloxamers mit einem Molekulargewicht von mindestens 2.000 und nicht mehr als 20.000 Dalton vorgesehen. Dieser Molekulargewichtsbereich ist wichtig zum Erhalt der geeigneten Löslichkeit des Poloxamers in Wasser, während jegliche potenzielle Toxizität minimiert oder eliminiert wird. Außerdem sollte die hydrophobe Gruppe des Poloxamers ein Molekulargewicht von ungefähr 950-4.000 Dalton haben und seine hydrophilen Gruppen sollten ungefähr 45- 95 Gew.-% des Poloxamers bilden. Mehr bevorzugt sollte die hydrophobe Gruppe ein Molekulargewicht von 1.750-3.500 Dalton haben und die hydrophilen Gruppen sollten 50-90 Gew.-% des Moleküls bilden. Wie unten ausführlicher besprochen sind, sind die relativen Mengen des hydrophilen Rests und des Molekulargewicht des hydrophoben Rests wiederum entscheidend für mehrere Eigenschaften des Poloxamers, einschließlich seiner Löslichkeit in Wasser und seiner Wechselwirkungen mit hydrophoben Gruppen, und die Bereiche, die in der vorliegenden Erfindung gelehrt werden, stellen die maximale derzeit bekannte Wirksamkeit zur Verfügung, während die Toxizität minimiert oder eliminiert wird.

Wenn die Reihenfolge der Zugabe der Alkylenoxide umgekehrt wird, wird die Meroxapol-Serie hergestellt. In dieser Serie ist Ethylenglycol der Initiator und im Gegensatz zu den Poloxameren, welche durch zwei primäre Hydroxylgruppen terminiert werden, haben die Meroxapole sekundäre Hydroxylgruppen an den Enden und der hydrophobe Rest ist aufgespalten, jede Hälfte an der Außenseite des Tensids.

Die Poloxamine werden aus einem Ethylendiamin-Initiator hergestellt. Sie werden unter Verwendung der gleichen sequenziellen Reihenfolge der Zugabe von Alkylenoxiden hergestellt, wie sie verwendet wird, um die Poloxamere zu synthetisieren. Strukturell unterscheiden sich die Poloxamine von den anderen Polymeren, indem sie vier Alkylenoxidketten haben statt zwei, da vier aktive Wasserstoffatome in dem Initiator vorhanden sind. Sie unterscheiden sich auch darin von den anderen Tensiden, dass sie zwei tertiäre Stickstoffatome enthalten, von denen mindestens eines in der Lage ist, ein quartäres Salz zu bilden. Die Poloxamine werden auch durch primäre Hydroxylgruppen terminiert.

Die PLURADOT®-Polyole können aus einem niedermolekularen, trifunktionellen Alkohol wie Glycerin oder Trimethylpropan hergestellt werden, welches zunächst mit einer Mischung von Propylen- und Ethylenoxiden, aber primär mit Propylenoxid, oxyalkyliert wird, um den hydrophoben Rest zu bilden. Dies wird gefolgt von Oxyalkylierung mit einer Mischung aus Ethylen- und Propylenoxiden, aber primär Ethylenoxid, um den hydrophilen Rest zu bilden. Diese Gruppe von Tensiden hat drei Ketten, eine mehr als die Poloxamer- und Meroxapol-Serie, aber eine weniger als die Poloxamin-Polymere.

Die hydrophilen und hydrophoben Ketten der oberflächenaktiven Copolymere haben jeweils einzigartige Eigenschaften, die zu den biologischen Aktivitäten der Substanzen beitragen. Im Hinblick insbesondere auf Poloxamere, kann das Molekül umso mehr Wasser binden, je länger die hydrophilen Polyoxyethylen-Ketten sind. Indem diese flexiblen Ketten stark hydriert werden, werden sie relativ inkompressibel und bilden eine Barriere gegenüber hydrophoben Oberflächen, die sich einander annähern. Die hydrophobe Komponente der Poloxamere ist typischerweise groß, schwach und flexibel.

In jeder der oberflächenaktiven Copolymer-Serien steigt die Löslichkeit des Moleküls in Wasser, wenn die Prozent von Ethylenoxid ansteigen oder das Molekulargewicht des hydrophoben Rests abnimmt. Von den vier Gruppen von Copolymeren weisen nur die Meroxapol-Polymere eine Löslichkeit in Mineralöl auf. Je höher die hydrophoben Molekulargewichte sind, desto weniger löslich wird das Copolymer in einem organischen Lösungsmittel sein, und das Gleiche trifft für diejenigen Polymere mit höherer Konzentration an Ethylenoxid oder Propylenoxid zu. Das Molekulargewicht des hydrophoben Rests wird auch die Benetzungszeit von jeder Spezies beeinflussen und das Ethylenoxid/Propylenoxid-Verhältnis des Moleküls wird die Schaumfähigkeit dieses Copolymers beeinflussen. Die Emulgierungseigenschaften eines Copolymers können mit hydrophoben Molekulargewichten korrelieren und die Toxizität nimmt mit ansteigendem Ethylenoxid/Propylenoxid-Verhältnis und ansteigendem Molekulargewicht des hydrophoben Rests ab.

Alle vier nicht-ionischen Serien sind ähnlich darin, dass sie ihre Wasserlöslichkeit von Wasserstoffbrücken-Bildung zwischen vielen Sauerstoffatomen auf dem Copolymer und Protonen im Wasser ableiten. Wenn die Temperatur einer Lösung, die ein nicht-ionisches Tensid enthält, angehoben wird, werden die Wasserstoffbindungen aufgebrochen und das Copolymer kristallisiert aus der Lösung aus. Für Poloxamere erstreckt sich der 1% Kristallisationspunkt zum Beispiel von einem niedrigsten Wert von 14°C zu einem höchsten Wert von 100°C, wobei letztere Zahl der Kristallisationspunkt für die hydrophilsten Polymere ist. Die Poloxamine sind strukturell ähnlich zu den Poloxameren und ihr Kristallisationspunkt erstreckt sich ähnlich weit. Andererseits haben die Meroxapole einen viel engeren Kristallisationspunkt-Bereich und die PLURADOT®-Polymere haben den niedrigsten maximalen

Kristallisationspunkt, im Wesentlichen verursacht durch ihren niedrigeren Ethylenoxidgehalt.

Obwohl andere postuliert haben, dass die Fähigkeit des modifizierten Poloxamers 188, Einzelmolekül-Micellen zu bilden, beim Reduzieren der adhäsiven Eigenschaften der geschädigten Zellmembranen eine Rolle spielen könnte, ist die gegenwärtige Erfindung die erste, die erkennt, dass oberflächenaktive Copolymere in der Lage sind, Zellmembranpermeabilisierung zu verhindern oder zu minimieren und permeabilisierte Membranen zu reparieren. Es wurde vorgeschlagen, dass die hydrophobe zentrale Domäne des Polymers an die hydrophoben Kopfgruppen der Lipid-Doppelschicht binden könnte, wenn diese Gruppen nach Entfernen der externen Schicht der Membran exponiert werden. Es wurde postuliert, dass die Art und Weise, in welcher das Poloxamer gefaltet ist, wenn diese Bindung stattfindet, bei der Wiederherstellung einer nicht-adhäsiven Zelloberfläche hilft. Die vorliegende Erfindung erkennt jedoch, dass Poloxamere überraschenderweise nicht nur in der Lage sind, eine nicht-adhäsive Oberfläche wieder herzustellen, sondern tatsächlich vollständige Durchdringungen der gesamten Membran- Doppelschicht zu reparieren oder die Reparatur zu verbessern.

8. Behandlung von Verletzungen durch Strahlung

Gemäß einem Gesichtspunkt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung eines oberflächenaktiven Copolymers entweder vor, während oder nach Exposition gegenüber Strahlung verabreicht. Exposition gegenüber Strahlenquellen verursacht bekanntermaßen Zellmembranschädigung. Ein solcher Schaden manifestiert sich typischerweise selbst durch Verursachen von Gewebsödemen und häufig Zellnekrose mit daraus resultierender dauerhafter Gewebsschädigung. Insbesondere ionisierende Strahlung, welche die in der Krebstherapie am häufigsten verwendete Art von Strahlung ist, ist eine Form von Strahlung, die aus subatomaren Teilchen (zum Beispiel Protonen, Neutronen oder Elektronen) oder elektromagnetischen Wellen besteht, welche direkt oder indirekt während ihrer Passage durch Materie (zum Beispiel menschliches Gewebe) in der Lage ist, Ionisierung (den Verlust oder Gewinn von Elektronen) hervorzurufen. Die Quelle der Strahlenexposition könnte etwas anderes sein als eine therapeutische Quelle; es könnte eine durch Unfall verursachte Exposition am Arbeitsplatz oder durch ein Kernkraftwerk sein. Dennoch bezieht sich die bevorzugte Ausführungsform der Erfindung auf prophylaktische Behandlung von Krebspatienten mit dem oberflächenaktiven Copolymer vor der therapeutischen Exposition gegenüber einer ionisierenden Strahlenquelle.

Es wird erwartet, dass Injektion einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ein sterilisiertes Poloxamer in einem geeigneten pharmakologischen Träger in einer Dosis von zwischen 1 mg pro ml Blutvolumen bis 5 mg pro ml Blutvolumen, zu einer Minimierung von Schädigung aufgrund einer Exposition gegenüber Strahlung führt, wenn die Injektion vor der Exposition stattfindet, oder zu einer schnellen Umkehr von Zellmembranpermeabilisierung führt, wenn die Injektion während oder so bald wie möglich nach Exposition gegenüber der Strahlenquelle stattfindet. Das Poloxamer hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von mindestens 2.000, aber nicht mehr als 20.000 Dalton und das Gesamt- Molekulargewicht des hydrophoben Teils ist ungefähr 950-4.000 Dalton. Die hydrophilen Gruppen bilden ungefähr 45-95 Gew.-% des Poloxamers. Mehr bevorzugt hat der hydrophobe Rest ein Molekulargewicht von ungefähr 1.750-3.500 Dalton und die hydrophilen Gruppen bilden ungefähr 50-90 Gew.-% des Poloxamers. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden 1% w/v ATP und 1% w/v MgCl₂; mit dem Poloxamer zusammen verabreicht. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform werden ungefähr 10% w/v Phosphocreatin, ein Phosphorsäurederivat von Creatin, welches eine energiereiche Phosphatbindung enthält, anstelle von ATP-MgCl₂; als die hochenergetische Phosphatverbindung verwendet. Intramuskuläre Injektion ist auch geeignet, bei einer Poloxamer- Konzentration von 1-10% w/v und, in einer bevorzugten Ausführungsform, ATP in einer Konzentration von 1% w/v und MgCl₂; in einer Konzentration von 1% w/v oder Phosphocreatin in einer Konzentration von ungefähr 10% w/v.

Für topische Verabreichung wird das Poloxamer in einem pharmakologisch geeigneten Substrat in einer Konzentration von 1-10% w/v vorgelegt (dargeboten? ist vorhanden?) und in einer bevorzugten Ausführungsform sind ATP und MgCl₂; zusammen mit dem Poloxamer in einer geeigneten Konzentration von jeweils 1% w/v und 1% w/v vorhanden. Phosphocreatin in einer Konzentration von ungefähr 10% w/v könnte als eine Alternative zu ATP und MgCl₂; verwendet werden. Das sterile Substrat, enthaltend das Poloxamer und die hochenergetische Phosphatverbindung, wird auf den geschädigten Bereich aufgebracht, in geeigneter Weise mit sterilen Verbänden umwickelt und wenn nötig wiederholt verwendet. In Fällen, in denen zweifache Verabreichung benötigt wird, könnte sowohl die topische Verabreichung als auch die intravenöse Verabreichung gegebenenfalls mit der anderen Form der Verabreichung ergänzt werden.

C. Verstärkung der Wirksamkeit der Transfektion

Zellen in Kultur können durch osmotische Zerstörung, durch die Verwendung von Detergenzien oder durch mechanische Zerstörung permeabilisiert werden. Solche Permeabilisierung kann zur Fusion von Zellen durchgeführt werden, um Heterokarya, Hybridome oder hybride Embryonen herzustellen; um Proteine oder andere Makromoleküle in Zellmembranen einzubringen; um die Abgabe von Arzneimitteln zu verbessern; oder um Plasmide oder fremde DNA zur Gen-Transfektion in lebende Zellen einzubringen.

Die vorliegende Erfindung ist auch auf eine Methode zur Erhöhung der Effizienz gerichtet, mit der exogene Moleküle in vitro in Zellen eingebracht werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform würden Zellen einer Membranpermeabilisierung und Transfektion mit DNA unterzogen werden. Ein Medium enthaltend 0,1 mg/ml Pluronic F-68 oder Poloxamer 1107 ist ausreichend, um die Wirksamkeit der Transfektion zu steigern sowie die Überlebensrate der Zellen zu erhöhen. Die Wirksamkeit der Transfektion wird weiter gesteigert, wenn das Medium zusätzlich zu dem Pluronic F-68 oder Poloxamer 1107 eine hochenergetische Phosphatverbindung enthält, die in der Lage ist, die Energieladung der Zellen wieder herzustellen, zum Beispiel 1% w/v ATP und 1% MgCl₂; oder 10% w/v Phosphocreatin.

Die folgenden Beispiele werden vorgestellt, um bevorzugte Ausführungsformen und Verwendungen der vorliegenden Erfindung zu beschreiben und sind nicht dazu gedacht, die vorliegende Erfindung zu beschränken, es sei denn, dass es in den hieran angehängten Ansprüchen anders dargelegt ist.

BEISPIEL 1

Das vorliegende Beispiel offenbart ein vorgeschlagenes Verfahren zur Verhinderung oder Minimierung von Zellmembranpermeabilisierung und daraus folgender Gewebsschädigung in einem Patienten, der Behandlungen mit ionisierenden Strahlen gegen Krebs erhält. Für die Zwecke dieses Beispiels stellt sich der Patient im Anschluss an die chirurgische Entfernung eines Halstumors mit positiven Lymphknoten in den mittleren und unteren zervikalen Regionen und Anzeichen, dass die Krankheit die Kapsel der Lymphknoten durchbrochen hat, vor.

Der Patient wird in der üblichen Weise für die Behandlung vorbereitet. Für die Zwecke dieses Beispiels wird angenommen, dass der Patient mindestens eine 200 rad Teildosis fünfmal pro Woche über acht Wochen erhält. Es wird vorgeschlagen, dass 1-5 mg/ml Blutvolumen steriles, Millipore-filtriertes Poloxamer 188 oder 1107 (erhältlich von BASF Co., Parsippany, NJ) oder RheothRX (eine Formulierung von Poloxamer 188 erhältlich von CytRx® Corp., Atlanta, GA) in einem pharmazeutisch geeigneten Träger (z. B. steriles Wasser oder gepufferte Saline) unmittelbar vor der Verabreichung der Strahlendosis in eine geeignete Vene injiziert wird.

Alternativ kann die pharmazeutische Zusammensetzung von Poloxamer 188 oder 1107 intramuskulär injiziert werden, wieder unmittelbar vor der Verabreichung der Strahlendosis. Im Fall von entweder intravenöser oder intramuskulärer Injektion kann die pharmazeutische Zusammensetzung des Poloxamers zusätzlich 1% w/v ATP und 1% w/v MgCl₂ oder 10% w/v Phosphocreatin

enthalten, sodass die Heilung von jeglicher Membranschädigung, die stattgefunden haben könnte, durch Wiederaufladen der zellulären Energiespeicher verbessert werden kann.

In Abhängigkeit von der Behandlungsgeschichte des jeweiligen Patienten kann normales Gewebe, das während einer Strahlentherapie geschädigt wurde, auch unter Verwendung einer geeigneten pharmazeutischen Zusammensetzung enthaltend ein Poloxamer behandelt werden. Ein Patient, der sich mit Weichteil-Nekrose mit lokalem Schmerz, Fisteln oder Geschwüren vorstellt, muss durch intravenöse Injektion von 1 bis 5 mg/ml Blutvolumen an sterilem, Millipore-filtriertem Poloxamer 188 oder 1107 in einem pharmazeutisch geeigneten Träger behandelt werden. In Abhängigkeit von der Schwere der Nekrose, der Menge und Intensität der Strahlentherapie, die noch durchzuführen ist, und der Antwort des Individuums auf die Poloxamer-Behandlungen kann die Injektion, wie angemessen, täglich wiederholt werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung des Poloxamers kann auch 1% w/v ATP und 1% w/v $MgCl_2$; oder 10% w/v Phosphocreatin enthalten, um durch die Wiederherstellung und den Erhalt der Energieladung der Zelle die Reparatur der Zellmembran zu verbessern.

Wahlweise werden 1 bis 10% w/v Poloxamer 188 oder 1107 in einer pharmazeutisch geeigneten sterilen Salbe (z. B. einer Öl-in-Wasser-artigen Emulsionsbasis) suspendiert oder in sterilem Wasser in einem Aerosol-Behälter zur direkten topischen Verabreichung auf das verletzte Gewebe. Die Stelle der Verletzung würde dann mit geeigneten Verbänden bandagiert und die Poloxamer-Suspension gegebenenfalls wiederholt aufgetragen werden. Außerdem könnte die Poloxamer-Suspension zur topischen Verabreichung auch eine hochenergetische Phosphatverbindung zum Wiederaufladen der zellulären Energiespeicher und zur weiteren Verbesserung der Zelleparatur enthalten. Phosphocreatin (10% w/v) oder ATP (1% w/v) und $MgCl_2$ (1% w/v) sind Beispiele von bevorzugten hochenergetischen Phosphatverbindungen. In Abhängigkeit von der Schwere und Tiefe der Gewebsverletzung könnten das Poloxamer und die hochenergetischen Phosphatverbindungen dem gleichen Patienten sowohl parenteral als auch topisch zusammen verabreicht werden. Auf diese Weise können tiefe Gewebsverletzungen durch parenterale Verabreichung und Oberflächenläsionen direkt durch topische Verabreichung behandelt werden. Dosierungs- und Verabreichungsschemata brauchen in Fällen, wenn orale Verabreichung angezeigt ist, nicht verändert zu werden.

BEISPIEL 2

Das vorliegende Beispiel offenbart ein Verfahren zur Erhöhung von Zellüberlebensraten im Anschluss an in vitro-Permeabilisierung von Zellmembranen. Die Permeabilisierung kann entweder durchgeführt werden, um exogene Makromoleküle in die permeabilisierten Zellen einzubringen, wie zum Beispiel bei dem Einbringen von Antisense-Molekülen bei der Antisense-Therapie, oder um Zellen mit exogener DNA zu transfizieren.

Für die Zwecke dieses Beispiels werden Zellen einer murinen myelomonocytischen Leukämie-Zelllinie in einem modifizierten McCoy's 5A-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (HyClone) bei 37°C und 5% CO_2 ; in der Luft gezüchtet. Zellen werden in HeBS-Puffer bestehend aus 20 mM Hepes pH 7,05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 ; und 6 mM Dextrose resuspendiert. Die Zelldichte für die Permeabilisierung ist ungefähr $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml und Plasmid-DNA in supercoiled (verdrillter) Form wird in einer Endkonzentration von 50 ug/ml zugefügt. Permeabilisierung kann mechanisch (z. B. durch Ultraschall), unter Verwendung eines Detergens (z. B. SDS oder Triton X-100) oder durch Ändern der osmotischen Bedingungen des Mediums durchgeführt werden.

Nachdem Permeabilisierung und Transfektion für ungefähr 5-10 Minuten stattgefunden haben, werden 0,1-1,0 mg/ml Poloxamer 188 oder 1107 zu dem Medium hinzugefügt, um sowohl Membranreparatur und damit Zellüberleben als auch die Transfektionseffizienz zu verbessern. Zusätzlich wird eine hochenergetische Phosphatverbindung zu dem Medium mit dem Poloxamer hinzugefügt, sodass die Energiespeicher der permeabilisierten Zellen wieder aufgeladen werden. Dies wird weiter die Reparatur und das Überleben verbessern. Phosphocreatin in einer Konzentration von 10% w/v oder 1% w/v ATP und 1% w/v $MgCl_2$; können für diesen Zweck zugefügt werden.

Anspruch[de]

1. Verwendung einer Zusammensetzung umfassend

eine Menge eines oberflächenaktiven Copolymers, ausgewählt aus Poloxamer, Meroxapol, Poloxamin und PLURADOT®-Polyol,

die, durch Stabilisation von zellulären Membranen oder Verringerung der Membranpermeabilität, wirksam ist. Strahlenschaden an tierischem Gewebe zu reduzieren,

zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung einer Schädigung von tierischem Gewebe aufgrund von Strahlung, wobei das Medikament dem Gewebe entweder vor, während oder nach der Exposition des Gewebes gegenüber einer Strahlenquelle, verabreichbar ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das oberflächenaktive Copolymer ein Poloxamer mit einem Molekulargewicht von zwischen etwa 2.000 und etwa 20.000 Daltons ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Strahlung ionisierende Strahlung ist; oder wobei die Strahlung nicht-ionisierende Strahlung ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zusammensetzung an einen Menschen verabreichbar ist.

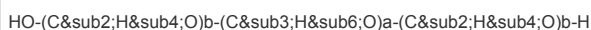
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der Mensch ein Patient ist, der im Begriff ist, sich einer Strahlentherapie zu unterziehen, und wobei eine wirksame Menge der Zusammensetzung dem Patienten vor, während oder nach der Therapie verabreichbar ist.

6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der Mensch ein Patient ist, der sich einer Strahlentherapie unterzogen hat und als Folge davon Schaden an nichterkrankten Geweben erlitten hat, und wobei eine wirksame Menge der Zusammensetzung dem Patienten verabreichbar ist, um das beschädigte, nichterkrankte Gewebe zu behandeln und weiteren Schaden an dem nichterkrankten Gewebe zu verhindern oder zu minimieren.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung des Weiteren eine hochenergetische Phosphatverbindung umfaßt; insbesondere wobei die hochenergetische Phosphatverbindung ATP- $MgCl_2$; umfaßt; oder wobei die hochenergetische Phosphatverbindung Phosphokreatin umfaßt.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung dem Subjekt intravenös, intramuskulär oder topisch verabreichbar ist, um das betroffene Gewebe zu behandeln.

9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Poloxamer die folgende allgemeine Formel hat:



wobei a eine ganze Zahl ist, sodass der von $(C_{3n}H_{6n}O)_a$ dargestellte, hydrophobe Rest ein Molekulargewicht von ungefähr 950 bis 4.000 hat und b eine ganze Zahl ist, sodass der durch $(C_2H_4O)_b$ dargestellte, hydrophile Rest ungefähr 45 bis 95 Gewichts% des Poloxamers bildet.

10. In-vitro-Verfahren zur Erhöhung der Effizienz, mit der exogene Makromoleküle in lebende Zellen eingebracht werden, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Permeabilisieren der Membranen der Zellen;

(b) Exponieren der Zellen gegenüber den exogenen Makromolekülen; und

(c) entweder vor, während oder nach der Durchführung der Schritte (a) und (b), Verabreichen einer Zusammensetzung an die lebenden Zellen, umfassend eine Menge eines oberflächenaktiven Copolymers, ausgewählt aus Poloxamer, Merxapol, Poloxamin und PLURADOT®-Polyol, die wirksam ist, die Membranen der Zellen zu stabilisieren oder ihre Permeabilisierung zu verringern.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die exogenen Makromoleküle DNA- Moleküle umfassen und wobei die DNA-Moleküle in die Zellen durch Transfektion eingebracht werden; oder wobei die exogenen Makromoleküle Antisense-Moleküle umfassen, insbesondere wobei die exogenen Makromoleküle Antisense-Moleküle umfassen und wobei die Antisense-Moleküle in die lebenden Zellen durch Transfektion eingebracht werden.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei das oberflächenaktive Copolymer ein Poloxamer mit einem Molekulargewicht von zwischen etwa 2.000 und etwa 20.000 Daltons ist.

Bechterew Bekämpfen?

100% natürliche Hilfe bei
Bechterew Schnell und Dauerhaft.
Alle Infos
www.AVogel.ch/Morbus+Bechterew

Erfinder mit guten Ideen?

Wir vermarkten Ihre Ideen große
und kleine Erfindungen
www.Erfinder.at

Fluoreszenz-Mikroskope

3D-Analyse in Echtzeit Keine
Dunkelkammer erforderlich
www.digitalmikroskop.de

1 Monat bis 16kg abnehmen

Schnell abnehmen ohne Jojo-
Effekt Mit 100% Geld-zurück-
Garantie!
slim.Slim-Line.info

Google-Anzeigen

Copyright © 2008 Patent-De Alle Rechte vorbehalten. eMail: info@patent-de.com