(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Oktober 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/086134 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12N 15/87, A61K 48/00, 38/00, 47/00, G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01483

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. April 2002 (23.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 20 000.5 23. April 2001 (23.04.2001) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **AMAXA GMBH** [DE/DE]; Nattermannallee 1, 50829 Köln (DE).

(72) Erfinder; und

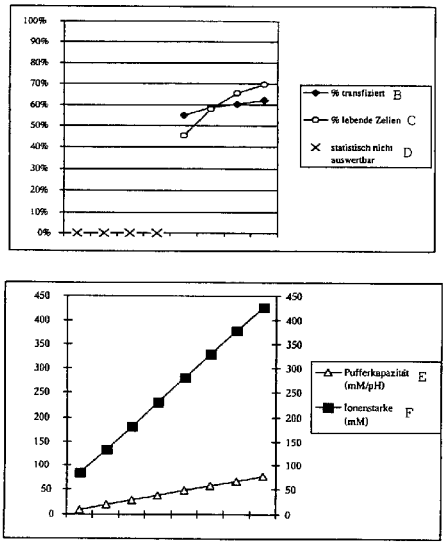
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **ROTHMANN, Kirsten** [DE/DE]; Remigiusstrasse 34a, 50937 Köln (DE). **WESSENDORF, Heike** [DE/DE]; Waisenhausgasse 48, D-50676 Köln (DE). **HELFRICH, Juliana** [DE/DE]; Höfestr. 27, 51103 Köln (DE). **THIEL, Corinna** [DE/DE]; Gravenreuthstrasse 6, 50823 Köln (DE). **RIEMEN, Gudula** [DE/DE]; Pater-Kolbe-Weg 7, 40764 Langenfeld (DE). **BROSTERHUS, Helmut** [DE/DE]; In der Rahrbach 20, 57399 Kirchundern

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

(54) **Title:** BUFFER SOLUTION FOR ELECTROPORATION AND A METHOD COMPRISING THE USE OF THE SAME

(54) **Bezeichnung:** PUFFERLÖSSUNG FÜR DIE ELEKTROPORATION UND VERFAHREN UMFASSEND DIE VERWENDUNG DERSELBEN

A Einfluss von Pufferkapazität und Ionenstärke auf die Transfektionseffizienz und die Überlebensrate von primären humanen Endothelzellen




A INFLUENCE OF BUFFERING CAPACITY AND IONIC STRENGTH ON THE TRANSFECTION EFFICIENCY AND SURVIVAL RATE OF PRIMARY HUMAN ENDOTHELIUM CELLS

B % transfected

C % living cells

D Cannot be statistically evaluated

E Buffering capacity (mM/pH)

F ionic strength (mM)

**(57) Abstract:** The invention relates to a buffer solution for suspending animal or human cells and for dissolving biologically active molecules in order to introduce said biologically active molecules into the cells using an electric current and to a method for introducing biologically active molecules into animal or human cells using an electric current and a buffer solution. The inventive buffer solution has a buffering capacity of at least 20 mmol $*l^{-1}*pH^{-1}$ and an ionic strength of at least 200 mmol $*l^{-1}$ during a change to the pH value from pH 7 to pH 8 and at a temperature of 25 °C. The use of a buffer solution of this type in the corresponding method allows biologically active molecules to be introduced into animal and human cells with a high degree of transfection efficiency and at the same time a low cell mortality. Different cell types, in particular dormant and actively dividing cells of low activity, can be successfully transfected in said buffer solution.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine Pufferlösung zu Suspendieren tierischer oder menschlicher Zellen und Lösen biologisch aktiver Molekülen zum Zwecke des Einbringens dieser biologisch aktiven moleküle in die Zellen mittels elektrischen Stroms sowie ein verfahren zum Einbringen von biologisch aktiven Molekülen in tierische oder menschliche Zellen mittels elektrischen Stroms, umfassend die Verwendung der Pufferlösung. Die erfindungsgemässe Pufferlösung weist bei einer Änderung des pH-Wertes von pH 7 nach pH 8 und einer Temperatur von 25°C eine Pufferkapazität von mindestens 20 mmol $*l^{-1}*pH^{-1}$ und einer lonenstärke von zumindest 200 mmol $*l^{-1}$ auf. Durch die Verwendung einer solchen Pufferlösung in dem entsprechenden Verfahren ist das Einbringen biologisch aktiver Moleküle intierische und menschliche Zellen mit hohen Transfektionseffizienzen bei gleichzeitig

*[Fortsetzung auf der nächsten Seite]*

WO 02/086134 A2

(DE). **MÜLLER-HARTMANN, Herbert** [DE/DE]; Klarastrasse 27, 50823 Köln (DE). **WEIGEL, Meike** [DE/DE]; Senistrasse 5, 51067 Köln (DE). **LORBACH, Elke** [DE/DE]; Eythstrasse 105, 51103 Köln (DE). **NIX, Michael** [DE/DE]; Redwitzstrasse 21, 50937 Köln (DE). **SIEBENKOTTEN, Gregor** [DE/DE]; Wilhelm-Waldeyerstrasse 14, 50937 Köln (DE).

**(74) Anwalt: REMUS, Alvaro**; Grafenberger Allee 76, 40237 Düsseldorf (DE).

**(81) Bestimmungsstaaten** *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten** *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

geringer Zellmortalität möglich. Es können in diesem Puffer verschiedene Zelltypen, insbesondere auch ruhende und schwach tielungsaktive Zellen, erfolgreich transfiziert werden.