

(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  
29. Dezember 2011 (29.12.2011)

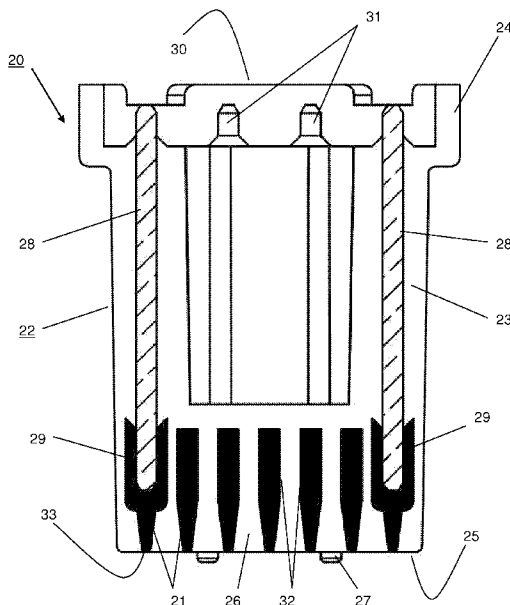
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2011/161092 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*C12M 1/42* (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/060312
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Juni 2011 (21.06.2011)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10006458.3 22. Juni 2010 (22.06.2010) EP
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **LONZA COLOGNE GMBH** [DE/DE]; Nattermannallee 1, 50829 Köln (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MÜLLER-HARTMANN, Herbert** [DE/DE]; Sülzburgstraße 88, 50937 Köln (DE). **WIRTH, Andreas** [DE/DE]; Im Feld 5, 49525 Lengerich (DE).
- (74) Anwalt: **REMUS, Alvaro**; Mörsenbroicher Weg 191, 40470 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: METHOD AND ELECTRODE ASSEMBLY FOR TREATING ADHERENT CELLS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND ELEKTRODENANORDNUNG ZUR BEHANDLUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN

Figur 7



(57) Abstract: The invention relates to an electrode assembly 20, in particular for applying at least one electric field to adherent cells, comprising at least two electrodes 21, each having at least one surface 32 which is arranged opposite the corresponding surface 32 of the other electrode 21, wherein an electrically insulating material 26 is arranged at least partially between the surfaces 32 of the electrodes 21. The solution according to the invention allows the electric field to be concentrated in the region of the cells to be treated such that a voltage pulse, or the current produced thereby, flows through the cells without the majority flowing away over the cells unused in the electrolyte. The invention further relates to a method for applying at least one electric field to adherent cells, in which the electric field is generated by applying a voltage to at least two electrodes, the electric field is concentrated on the side of the electrodes which faces the cells and/or is limited to the space between the cells and the side of the electrodes which faces the cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Elektrodenanordnung 20, insbesondere zur Beaufschlagung von adhären Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, die mindestens zwei Elektroden 21 umfasst, welche jeweils mindestens eine Fläche 32 aufweisen, die der entsprechenden Fläche 32 der jeweils anderen Elektrode 21 gegenüberliegend angeordnet ist, wobei zwischen den Flächen 32 der Elektroden 21 zumindest teilweise ein elektrisch isolierendes Material 26 angeordnet

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2011/161092 A1

---

ist. Durch diese erfindungsgemäße Lösung wird erreicht, dass das elektrische Feld im Bereich der zu behandelnden Zellen konzentriert werden kann, so dass ein Spannungsimpuls bzw. der hierdurch entstandene Strom durch die Zellen fließt, ohne dass ein Hauptteil davon ungenutzt im Elektrolyten über den Zellen abfließt. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Beaufschlagung von adhären Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, bei dem das elektrische Feld durch das Anlegen einer Spannung an mindestens zwei Elektroden erzeugt wird, das elektrische Feld an der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden konzentriert und/oder auf den Raum zwischen den Zellen und der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden begrenzt wird.

## **Verfahren und Elektrodenanordnung zur Behandlung von adhärenen Zellen**

### Hintergrund

Die Erfindung betrifft eine Elektrodenanordnung, insbesondere zur Beaufschlagung von adhärenen Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, die mindestens zwei Elektroden umfasst, welche jeweils mindestens eine Fläche aufweisen, die der entsprechenden Fläche der jeweils anderen Elektrode gegenüberliegend angeordnet ist. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Beaufschlagung von adhärenen Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, bei dem das elektrische Feld durch das Anlegen einer Spannung and mindestens zwei Elektroden erzeugt wird.

### Stand der Technik

Die Beaufschlagung von lebenden Zellen mit einem elektrischen Feld bzw. Spannungsimpuls, die so genannte Elektroporation bzw. Elektrotransfektion, wird seit Jahren auf Zellen in den verschiedensten Zuständen angewandt. Als Einzelzellen in Suspension in einer Pufferlösung, im adhärenen Zustand in einem Kulturgefäß, meist am Boden eines Kunststoffbehälters und in vivo, wo Zellen in der Regel im Gewebeverband in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Grundsätzlich werden bei der Elektroporation die Fremdmoleküle aus einer an die Zellen angepassten Pufferlösung oder einem Zellkulturmedium durch einen kurzzeitigen Stromfluss in die Zellen eingebracht, wobei durch die Wirkung der elektrischen Spannungsimpulse bzw. des dadurch entstehenden elektrischen Feldes und Stromflusses die Zellmembran für die Fremdmoleküle durchlässig gemacht wird. Die Zellsuspension befindet sich dabei häufig in einer sogenannten Küvette, d.h. einem schmalen, offenen Gefäß, dessen Probenraum zwei gegenüberliegende, parallele Elektroden in den Seitenwänden aufweist, welche zum Anlegen der elektrischen Spannung dienen. Durch die kurzzeitig entstehenden „Poren“ in der Zellmembran gelangen die biologisch aktiven Moleküle zunächst in das Zytoplasma, in dem sie ggf. bereits ihre zu

untersuchende Funktion ausüben können, und daraufhin unter bestimmten Bedingungen auch in den Zellkern. Durch das kurzzeitige Anlegen eines starken elektrischen Feldes, d.h. eines kurzen Spannungsimpulses mit hoher Stromdichte, können darüber hinaus auch Zellen, Zellerivate, subzelluläre Partikel und/oder Vesikel fusioniert werden. Bei dieser sogenannten Elektrofusion werden die Zellen beispielsweise zunächst durch ein inhomogenes elektrisches Wechselfeld in engen Membrankontakt gebracht. Durch das anschließende Anlegen eines elektrischen Feldimpulses kommt es dann zur Interaktion von Membranteilen, die schließlich zur Fusion führt. Für die Elektrofusion können dabei vergleichbare apparative Vorrichtungen verwendet werden, wie für die Elektroporation. Darüber hinaus können lebende Zellen durch elektrische Felder auch in einer ihre Eigenschaften verändernden Weise stimuliert werden.

Aus der WO 2005/056788 A1 ist beispielsweise ein Verfahren zur Elektroporation bekannt, bei dem Zellen auf einer mikroporösen Membran wachsen, die sich zwischen zwei parallel angeordneten Elektrodenflächen befindet.

Die US-A-5 134 070 beschreibt Anwendungen und Vorrichtungen zur Elektroporation von Zellen, die auf einer elektrisch leitenden Oberfläche wachsen, welche als Elektrode dient. Das Kulturgefäß wird von oben mit einer plattenförmigen Gegenelektrode abgedeckt, wobei ein Spalt gebildet wird, über den elektrische Entladungen möglich sind.

Aus der WO 2008/104086 A1 ist ferner eine Vorrichtung bekannt, bei der die Zellen auf co-planaren Elektrodenflächen wachsen. Der elektrische Kontakt zwischen den Elektroden wird über das Zellkulturmedium über den Zellen hergestellt, wobei die zwei Elektrodenbereiche durch eine isolierende Barriere getrennt sind, die aber trotzdem eine Elektrolytbrücke zwischen den Elektroden zulässt. Diese können beispielsweise aus Indiumzinnoxid bestehen, das als transparenter Halbleiter eine mikroskopische Analyse der Zellen ermöglicht.

Aus der WO 2009/131972 A1 ist eine Vorrichtung zur Elektroporation von Zellen bekannt, welche adhärent auf einer runden, scheibenförmigen Platte wachsen. Die Vorrichtung weist zwei parallel zueinander angeordnete Elektroden

auf, wobei eine Elektrode sich auf der konkaven Oberfläche eines außen liegenden Zylinders und die andere Elektrode sich auf der konvexen Oberfläche eines innen liegenden Zylinders befindet.

Aus der US 2009/0305380 A1 ist ferner eine Vorrichtung zur Elektroporation von Zellen bekannt, die auf einer festen Fläche immobilisiert sind. Das elektrische Feld, mit dem die Zellen beaufschlagt werden, wird durch eine Anordnung von Elektrodenpaaren erzeugt, die sich dicht nebeneinander liegend auf einer oberhalb der festen Fläche angeordneten Oberfläche befinden. Die Elektroden werden durch elektrische Bahnen gebildet, die auf die Oberfläche aufplattiert sind. Die beiden Elektroden eines Elektrodenpaars sind dabei so dicht nebeneinander angeordnet, dass sich nicht mehr als eine Zelle innerhalb des geringsten Abstandes zwischen den beiden Elektroden befinden kann.

Die Firma BTX vertreibt mit dem PetriPulser<sup>®</sup> eine Anordnung von abwechselnd gepolten planparallelen Elektrodenplatten, die senkrecht auf adhären in einem Kulturgefäß wachsende Zellen aufgebracht werden kann. Dabei tauchen die Elektroden in den Kulturüberstand ein, wobei sich die Zwischenräume zwischen den einzelnen Elektrodenplatten mit dem Kulturmedium füllen. Ein wesentlicher Nachteil dieser Anordnung liegt darin, dass der Großteil des Stromes über das über den Zellen befindliche zellfreie Kulturmedium abfließt. Das Feld ist aber nur wirksam im Randfeld am Boden des Gefäßes, wo sich die Zellen befinden, so dass unnötig hohe Ströme zu erbringen sind. Ferner muss von einer hohen Mortalität der Zellen durch pH-Wert-Änderungen und hohen Strom ausgegangen werden. Darüber hinaus muss die Spannungsversorgung für lang anhaltende Spannungsimpulse sehr groß ausgelegt werden, um diese großen Ströme und damit Ladungsmengen und Leistungen zu erbringen. Zudem muss ein großes Volumen aufgebracht werden, das für die Elektroporation geeignet ist und das zu transfizierende Substrat in ausreichend hoher Konzentration enthält, wodurch auch die Menge an Substrat entsprechend höher liegt.

#### Beschreibung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Elektrodenanordnung und ein Verfahren zu schaffen, die eine effiziente Behandlung von adhärenen Zellen mit einem elektrischen Feld ermöglichen, ohne zu hohe Stromdichten zu benötigen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Elektrodenanordnung der eingangs genannten Art gelöst, bei der zwischen den Flächen der Elektroden zumindest teilweise ein elektrisch isolierendes Material angeordnet ist. Durch diese erfindungsgemäße Lösung wird erreicht, dass das elektrische Feld im Bereich der zu behandelnden Zellen konzentriert werden kann, so dass ein Spannungsimpuls bzw. der hierdurch entstandene Strom durch die Zellen fließt, ohne dass ein Hauptteil davon ungenutzt im Elektrolyten über den Zellen abfließt. Hierdurch kann einerseits die Vorrichtung zur Impulserzeugung sparsam dimensioniert werden und andererseits können in dem Medium stärkere Veränderungen des pH-Wertes vermieden werden, die ansonsten durch große geflossene Ladungsmengen infolge von Elektrolyse erzeugt würden. Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ferner gewährleistet, dass eine räumlich möglichst gleichmäßig verteilte elektrische Behandlung über die Kulturfläche erfolgt und Bereiche mit nicht-behandelten Zellen minimiert werden. Dabei sind der prozentuale Anteil von erfolgreich behandelten (beispielsweise transfizierten) Zellen und die Überlebensrate sowie, bei Verwendung von DNA oder mRNA, das Expressionsniveau pro Zelle vergleichbar mit den entsprechenden Werten bei der Elektroporation von Zellen in Suspension. Mittels der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung wird also eine effiziente Behandlung von adhärenen Zellen mit einem elektrischen Feld ermöglicht.

In vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung ist vorgesehen, dass diese mindestens drei, vorzugsweise mindestens 4 oder 5, insbesondere 6 bis 12, Elektroden umfasst.

Wenn die Elektroden platten- oder stiftförmig ausgebildet sind, können möglichst viele Elektroden auf engem Raum angeordnet werden, so dass ein besonders homogenes elektrisches Feld erzeugt werden kann. In alternativer Ausgestaltung der Erfindung können also Plattenelektroden durch Reihen von

Metallstiften ersetzt werden. Wenn diese Reihen von elektrisch gekoppelten Stiften ausreichend eng angeordnet sind, können sie bezüglich des erzeugten elektrischen Feldes durchgehende Plattenelektroden ersetzen. „Ausreichend eng“ heißt in diesem Zusammenhang, dass der Abstand gleich gepolter benachbarter Stifte kleiner oder maximal gleich dem Abstand der entgegengesetzt gepolten Reihen von Stiften ist. Die Verwendung einer solchen Anordnung ist besonders vorteilhaft, da die Herstellung von Elektrodenanordnungen durch Einlegen von Metallstiften oder Drähten bzw. Drahtstücken in ein Spritzgusswerkzeug und anschließende Umspritzung, beispielsweise mit einem thermoplastischen Polymer, weit verbreitet und daher das Fertigungsverfahren von vielen Herstellern gut beherrschbar ist.

In weiterer vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung ist vorgesehen, dass die Flächen Seitenflächen planparallel angeordneter Elektrodenplatten sind.

Vorzugsweise können die Flächen durch das isolierende Material vollständig voneinander getrennt sein. Dies wird in vorteilhafter Weise vorzugsweise dadurch erreicht, dass der von den Flächen der Elektroden begrenzte Raum zwischen den Elektroden vollständig von dem isolierenden Material ausgefüllt ist.

Das isolierende Material ist in vorteilhafter Ausgestaltung der Erfindung ein thermoplastisches Polymer, vorzugsweise Polyvinylchlorid, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen und/oder Polycarbonat. Die Elektroden bestehen vorzugsweise aus Metall und/oder einem elektrisch leitenden Kunststoff.

In vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung ist vorgesehen, dass die Elektrodenanordnung an mindestens einer den Zellen zugewandten Seite mindestens einen Abstandhalter aufweist, der verhindert, dass die Elektroden unmittelbar mit den Zellen in Berührung kommen. Durch den oder die Abstandhalter wird gewährleistet, dass ein Mindestabstand zwischen den Elektroden und den Zellen eingehalten wird und/oder ein definierter Abstand zwischen den Elektroden und den Zellen eingestellt werden kann.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung ist vorgesehen, dass die Elektrodenanordnung zum Einsetzen in mindestens ein zumindest teilweise mit Flüssigkeit gefülltes Gefäß vorgesehen ist, vorzugsweise ein Gefäß, an dessen Bodenfläche lebende Zellen anhaften, und dass das isolierende Material beim Einsetzen in das Gefäß zumindest einen Teil der Flüssigkeit verdrängt. Hierdurch können die Elektroden nah an die zu behandelnden Zellen gebracht und das Volumen der Flüssigkeit, die sich über den Zellen befindet, minimiert werden.

Die Elektroden sind vorzugsweise zumindest teilweise an der Unterseite einer Halterung angeordnet. Diese Halterung kann beispielsweise derart ausgebildet sein, dass sie in ein Reaktionsgefäß eingesetzt oder auf dieses aufgesetzt werden kann, so dass die Elektroden mit dem Innenraum des Reaktionsgefäßes in Kontakt stehen. Das Reaktionsgefäß kann dabei beispielsweise eine einzelne Küvette oder Zellkulturschale oder vorzugsweise Teil einer Multiwell-Platte sein. Die erfindungsgemäße Elektrodenanordnung wird vorzugsweise zum Beaufschlagen von adhärennten Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, insbesondere zur Elektroporation von adhärennten Zellen, vorzugsweise in Form mindestens einer Eintauchelektrodevorrichtung, verwendet. Die erfindungsgemäße Elektrodenanordnung in Form einer Eintauchelektrodevorrichtung ermöglicht in vorteilhafter Weise die Transfektion von adhärennt wachsenden Zellen, wobei die Elektrodenvorrichtung vor und nach der Transfektion aus dem Medium entfernbar ist. Dabei kann auf einfache Weise die maximale Flexibilität in Bezug auf das verwendete Zellkultursystem sichergestellt werden, insbesondere die Kompatibilität mit möglichst vielen Kultursystemen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß ferner durch ein Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, bei dem das elektrische Feld an der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden konzentriert und/oder auf den Raum zwischen den Zellen und der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden begrenzt wird. Durch diese erfindungsgemäße Lösung wird erreicht, dass ein Spannungsimpuls bzw. der hierdurch entstandene Strom durch die Zellen fließt, ohne dass ein Hauptteil davon ungenutzt im Elektrolyten über den Zellen abfließt. Hierdurch kann einerseits die Vorrichtung zur Impulserzeugung sparsam dimensioniert



niert werden und andererseits können in dem Medium stärkere Veränderungen des pH-Wertes vermieden werden, die ansonsten durch große geflossene Ladungsmengen infolge von Elektrolyse erzeugt würden. Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird ferner gewährleistet, dass eine räumlich möglichst gleichmäßig verteilte Transfektion über die Kulturfläche erfolgt und Bereiche mit nicht-transfizierten Zellen minimiert werden. Dabei sind der prozentuale Anteil von transfizierten Zellen und die Überlebensrate sowie, bei Verwendung von DNA, mRNA, siRNA oder anderen exprimierbaren Nukleinsäuren, der Grad der Beeinflussung der Expression pro Zelle vergleichbar mit den entsprechenden Werten bei der Elektroporation von Zellen in Suspension. Mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens wird also eine effiziente Behandlung von adhären-ten Zellen mit einem elektrischen Feld ermöglicht.

In vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass das elektrische Feld auf den Raum zwischen den Zellen und einer freiliegenden Stirnseite der Elektroden begrenzt wird. Die Konzentrierung und/oder Begrenzung des elektrischen Feldes wird vorzugsweise dadurch erreicht, dass elektrisch isolierendes Material zwischen den Elektroden platziert wird.

In vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ferner vorgesehen, dass die Elektroden mit einer freiliegenden Stirnseite in mindestens ein Gefäß eingebracht werden, an dessen Bodenfläche die Zellen anhaften.

In besonders vorteilhafter Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, dass die Wirkung des elektrischen Feldes auf die Zellen durch Einstellen des Abstands zwischen den Zellen und den Elektroden optimiert wird. Auf diese Weise entsteht über den zu behandelnden Zellen ein homogenes und ausreichend starkes elektrisches Feld, was sich sehr positiv auf die Effizienz der Behandlung auswirkt. So kann beispielsweise die Transfektionseffizienz bei der Elektrotransfektion von Zellen durch Einstellen des Abstandes zwischen den Elektroden und den Zellen optimiert werden.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand der Abbildungen beispielhaft näher erläutert.

### Kurze Beschreibung der Abbildungen

Figur 1 zeigt (a) eine schematische Seitenansicht einer Elektrodenanordnung gemäß dem Stand der Technik, (b) eine beispielhafte schematische Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung und (c) eine schematische Draufsicht auf die Unterseite einer weiteren beispielhaften Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung.

Figur 2 zeigt fluoreszenzmikroskopische Bilder der Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in HeLa-Zellen, die (a) zum einen mit einer Elektrodenanordnung gemäß dem Stand der Technik und (b) zum anderen mittels einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung behandelt wurden.

Figur 3 zeigt Balkendiagramme des Vergleichs einer Elektrodenanordnung gemäß dem Stand der Technik (St. d. T.) mit einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung (erfind. Vorr.), wobei (a) zum einen der Anteil transfizierter Zellen und (b) zum anderen die Überlebensrate der Zellen jeweils in Prozent dargestellt sind (AD-035 = Nummer der elektrischen Parameter für adhärenente Zellen, Nucleofector<sup>®</sup>, Lonza).

Figur 4 zeigt eine perspektivische Ansicht der Unterseite einer beispielhaften Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung.

Figur 5 zeigt eine weitere perspektivische Ansicht der Elektrodenanordnung gemäß Figur 4, wobei in dieser Darstellung die innen liegenden Teile der Elektroden und die Kontaktelemente sichtbar sind.

Figur 6 zeigt eine perspektivische Ansicht der Oberseite der Elektrodenanordnung gemäß Figur 4.

Figur 7 zeigt einen Längsschnitt durch die Elektrodenanordnung gemäß den Figuren 4 bis 6.

Figur 8 zeigt in einem Balkendiagramm die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Abstand der Elektroden einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung zu den auf der Kulturfläche anhaftenden Zellen bei drei unterschiedlich starken Spannungsimpulsen (x-Achse: Abstand [mm], y-Achse: Transfektionseffizienz [%], A-5 = schwacher Spannungsimpuls, K-19 = mittelstarker Spannungsimpuls, AX-19 = starker Spannungsimpuls).

### Beschreibung beispielhafter und bevorzugter Ausführungsformen

Figur 1 zeigt (a) eine schematische Seitenansicht einer Elektrodenanordnung 1 gemäß dem Stand der Technik mit freiliegenden Elektroden 2 und (b) eine beispielhafte schematische Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 10 mit elektrisch isolierendem Material 11 zwischen den Elektroden 12. Die Elektrodenanordnung 1 gemäß dem Stand der Technik, die im Prinzip dem PetriPulser<sup>®</sup> der Firma BTX entspricht, besteht aus drei planparallel angeordneten Elektroden 2, die in den Innenraum 3 eines Gefäßes 4 hineinragen und auf der Bodenfläche 5 des Gefäßes 4 aufliegen (Figur 1a). Auf der Bodenfläche 5 können lebende Zellen anhaften und wachsen (adhärente Zellen). Der Innenraum 3 ist mit einer Flüssigkeit gefüllt, beispielsweise einem Zellkulturmedium oder einer anderen an die Zellen adaptierten Lösung, wobei diese Flüssigkeit auch den freien Raum 6 zwischen den Elektroden 2 ausfüllt. Jede Elektrode 2 ist also vollständig von der Flüssigkeit umgeben. Da die Flüssigkeit elektrisch leitend ist, fließt beim Anlegen einer Spannung an die Elektroden 2 ein Großteil des Stroms über die Flüssigkeit zwischen den Elektroden 2 ab (siehe Pfeile), so dass bei der Verwendung einer nicht-permanenten Spannungsquelle, d. h. beispielsweise der Entladung eines Kondensators, die Spannung sehr schnell abfällt und somit das elektrische Feld über die Zeit geschwächt ist. Nur ein Teil des Stroms fließt über die Bodenfläche 5, so dass die biologische Wirkung des Stromflusses gering ist.

Die erfindungsgemäße Elektrodenanordnung 10 umfasst drei planparallel angeordneten Elektroden 12, die in den Innenraum 13 eines Gefäßes 14 hineinragen (Figur 1b). Das Gefäß 14 umfasst eine Bodenfläche 15, auf der lebende Zellen anhaften und wachsen können (adhärente Zellen). Der Innenraum 13 ist mit einer Flüssigkeit gefüllt, beispielsweise einem Zellkulturmedium oder einer anderen an die Zellen adaptierten Lösung. Der Raum zwischen den Elektroden 12 ist vollständig mit einem elektrisch isolierenden Material 11 ausgefüllt, so dass beim Anlegen einer Spannung an die Elektroden 12 kein Strom über den zwischen den Elektroden 12 liegenden Raum abfließen kann. Der gesamte Strom fließt bei der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 10 durch den Raum zwischen den Elektroden 12 und der Bodenfläche 15, so dass hier bei der Verwendung einer nicht-permanenten Spannungsquelle (z. B. Kondensator) die Spannung langsamer abfällt und somit die Feldstärke für die Behandlung der Zellen über die Zeit höher ist. Hierdurch kann einerseits die Vorrichtung zur Impulserzeugung sparsam dimensioniert werden und andererseits können in der Flüssigkeit stärkere Veränderungen des pH-Wertes vermieden werden, die ansonsten durch große geflossene Ladungsmengen infolge von Elektrolyse erzeugt würden.

Erfindungsgemäß können also beispielsweise planparallele Elektroden 12 durch isolierendes Material 11 getrennt sein, so dass die leitenden Oberflächen der Elektroden 12 nur nach unten (in Richtung der Bodenfläche 15 bzw. der darauf haftenden Zellen) frei sind und mit der Umgebung in elektrischem Kontakt stehen. Durch die volle Ausdehnung des isolierenden Materials 11 im Bereich zwischen den jeweils gegenüberliegend angeordneten Flächen 16 der planparallelen Elektroden 12, oder zumindest in dem für die Flüssigkeit offenen Bereich zwischen Elektroden, in dem diese parallele Linien beschreiben, ist das elektrische Feld fokussierbar bzw. der Strom auf den angestrebten Wirkungsbereich begrenzbare. Es ist ferner von besonderem Vorteil, dass eine Fokussierung des elektrischen Feldes im Bereich der adressierten Zellen bzw. eine Begrenzung des elektrischen Stromes auf den Wirkungsbereich nun auch bei Verwendung von planparallelen Elektroden 12 möglich ist, was über die Zeit konstante und stabilere Feldstärken und Stromdichten in dem adressierten Bereich zwischen den Elektroden 12 und der Bodenfläche 15 ermöglicht. Geeignete isolierende Mate-

rialien hierfür sind beispielsweise Platten oder Formspritzkörper aus gängigen, vorzugsweise thermoplastischen, Kunststoffen, wie beispielsweise Polyvinylchlorid, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen oder Polycarbonat. Durch den erfindungsgemäßen Aufbau kann der Abfluss von Strom über die sich jeweils gegenüberliegenden Flächen 16 der planparallelen Anteile der Elektroden 12 verhindert und somit Spannungsimpulse mit konstantem Strom erzeugt werden. Eine erfindungsgemäße Anordnung kann also beispielsweise pro Reaktion, je nach Fläche des Kulturbodens mit den zu behandelnden Zellen, mit einer oder mehreren aufeinander folgenden Impulsentladungen geringerer Energie/Ströme beschickt werden, um die nötigen Leistungen pro Entladung zu begrenzen.

Es kann beispielsweise ein Elektroden-Isolator-Sandwich verwendet werden, bei dem die Elektroden abwechselnd gepolt sind. Bei einer solchen Anordnung ist das Feld in den Bereichen unterhalb der aktiven Elektroden praktisch nicht vorhanden und daher nicht auf die dort vorzufindenden Zellen wirksam, die unterhalb der aktiven Elektroden liegen. Diese Bereiche befinden sich in unmittelbarer Nähe eines elektrischen Leiters (der Elektroden) und daher außerhalb eines nennenswerten Feldes. Daher sollten die Elektroden möglichst dünn sein (beispielsweise 50pm) und die annähernd gesamte zellbewachsene Bodenfläche von der Elektrodenanordnung mit aktiven Bereichen aus Elektroden-Isolator-Kombinationen bedeckt sein. Aktive Bereiche sind hier die Bereiche unterhalb des isolierenden Materials zwischen entgegengesetzt gepolten Elektroden. Hierdurch sind insbesondere im Querschnitt runde Geometrien der Elektrodenanordnung vorteilhaft, die so dimensioniert sind, dass sie in gängige Zellkulturgefäße nach ANSI-SBS-Standard (American National Standards Institute - Society for Biomolecular Sciences) passen.

Figur 1 c zeigt eine schematische Draufsicht auf die Unterseite einer weiteren beispielhaften Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 17 mit stiftförmigen Elektroden 18. Da die Elektroden 18 jeweils einen runden Querschnitt aufweisen, umfasst praktisch deren jeweilige gesamte Umfangsfläche Flächen, die den entsprechenden Flächen der anderen Elektroden 18 gegenüberliegend angeordnet sind. Der Raum zwischen den stiftförmigen

Elektroden 18 ist bei dieser Ausführungsform daher vollständig mit einem elektrisch isolierenden Material 19 ausgefüllt, so dass nur die Stirnflächen der Elektroden 18 an deren Unterseite frei liegen und mit der Umgebung in elektrischem Kontakt stehen. Alle Elektroden 18 sind folglich jeweils auf ihrer gesamten Umfangsfläche elektrisch gegeneinander isoliert, so dass kein Strom über den Raum zwischen den Elektroden 18 abfließen kann. Der gesamte Strom fließt also auch bei der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 17 durch den Raum zwischen den Elektroden 18 und den (hier nicht sichtbaren) Zellen, so dass bei der Verwendung einer nicht-permanenten Spannungsquelle (z. B. Kondensator) die Spannung nur langsam abfällt und somit die Feldstärke für die Behandlung der Zellen über die Zeit sehr hoch ist.

Zu Versuchszwecken wurde eine erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. Elektrodenanordnung aus wechselnden Lagen von Aluminiumfolien und 2 mm-Isolatormaterial erstellt. Die verklebte Vorrichtung wurde als Anpassung an die runden Geometrien der Kulturgefäße (6-well, 12-well, 24-well) abgeschliffen und am oberen Ende durch elektrisches Verbinden jeweils jeder zweiten Elektrode auf zwei elektrische Anschlüsse verschaltet. Im Anschluss wurde die Vorrichtung entweder an einer horizontalen Linearschiene befestigt oder direkt händisch in eine Kulturvertiefung eingeführt, in der adhärent Zellen (hier HeLa-Zellen) wachsen. Der Einfachheit halber wurde die Versuchsvorrichtung in diesem Fall mit den Elektroden auf den Kulturboden aufgesetzt, so dass von einem Abstand zwischen Zellen und Elektrodenaufbau von <math><1\text{ mm}</math> ausgegangen werden kann. Das Kulturmedium in dem Gefäß wurde zuvor durch 1 ml einer Mischung von Lösungen (Nucleofector<sup>®</sup> Cell Line Solution R, Lonza) mit Plasmid-DNA (pmaxGFP<sup>®</sup>, Lonza, 2 µg/100 µl) ersetzt. Die alternierend zusammengeschalteten Elektrodenfolien wurden daraufhin über einen Nucleofector<sup>®</sup> der Firma Lonza mit verschiedenen Testimpulsen beschickt, die im Bereich von Pulsen liegen, die auch bei der Verwendung von Einzelküvetten mit 100 µl Volumen zur Anwendung kommen. Im Anschluss wurde die Vorrichtung aus der Kulturvertiefung wieder entfernt und das Elektrolyt wieder durch Medium ersetzt, um die Zellen weiter kultivieren zu können. Der Einfachheit halber wurde das Lösung-DNA-Gemisch in verschiedenen Vertiefungen wieder verwendet. Analog wurde mit dem PetriPulser<sup>®</sup> der Firma BTX verfahren, nur dass auf-

grund der fehlenden Isolatoren zwischen den Elektroden zur Erzeugung eines vergleichbaren Füllstandes nach Einführen der Elektrodevorrichtung 2 ml des gleichen Lösung-DNA-Gemischs eingefüllt wurde. Die Zellen wurden nach einem Tag mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei Verwendung des PetriPulsers<sup>®</sup> der Firma BTX mit annähernd gleichem Elektrodenabstand, also gleichen Voraussetzungen für die Generierung des elektrischen Feldes, sind nur sehr sporadisch überhaupt transfizierte Zellen zu finden (Figur 2a). Darüber hinaus wurden hier Fehlermeldungen zur Überstromabschaltung beobachtet, was einen Hinweis darauf liefert, dass der PetriPulser<sup>®</sup> aufgrund des nicht begrenzten Stromflusses durch offene Zwischenräume zwischen den Elektrodenplatten für die Erzeugung ausreichend hoher elektrischer Felder nicht geeignet ist. Dagegen konnten unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung 30 – 45 % der Zellen transfiziert werden (GFP-Expression, Figur 2b). Es ist also klar ersichtlich, dass der erfindungsgemäße Aufbau adhärente Zellen effizient transfizieren kann.

Im Anschluss wurden die Zellen auf Überleben, Morphologie und die Expression der eingebrachten genetischen Information untersucht. Fig. 3 zeigt einen Vergleich von Zellen, die zum einen mittels der zu Figur 2b beschriebenen erfindungsgemäßen Vorrichtung und zum anderen mit dem PetriPulser<sup>®</sup> der Firma BTX entsprechend dem zu Figur 2a beschriebenen Verfahren transfiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung mit hoher Effizienz und unter Wahrung einer hohen Viabilität und morphologischen Integrität transfizierbar waren (Figuren 3a und 3b). Die Ergebnisse lagen im von der Größenordnung her gleichen Bereich wie Vergleichsdaten mit existierenden Protokollen für diese Zellen bei der Transfektion in Suspension. Nach der Behandlung mit dem PetriPulser<sup>®</sup> konnte zwar eine etwas höhere Überlebensrate festgestellt werden, jedoch keine nennenswerte Transfektion (Figuren 3a und 3b).

Figur 4 zeigt eine perspektivische Ansicht der Unterseite einer beispielhaften Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 20. Die Elektrodenanordnung 20 umfasst sieben Elektroden 21, welche im Folgenden in Bezug auf die Figuren 5 und 7 noch näher beschrieben sind. Die Elektroden 21

sind in einer Halterung 22 angeordnet, die im Wesentlichen zylinderförmig ausgebildet ist. Die Halterung 22 umfasst einen Grundkörper 23 und einen am oberen Ende des Grundkörpers 23 angeordneten Randbereich 24, wobei der Außendurchmesser des Randbereichs 24 größer als der Außendurchmesser des Grundkörpers 23 ist, so dass der Randbereich 24 nach außen über den Grundkörper 23 hinausragt. Die Elektroden 21 sind zum größten Teil innerhalb des Grundkörpers 23 angeordnet und liegen mit ihrer unteren Stirnfläche 33 an der Unterseite 25 der Halterung 22 frei, so dass sie mit der Umgebung in Kontakt stehen. Die einzelnen Elektroden 21 sind jeweils durch ein isolierendes Material 26 elektrisch voneinander getrennt, wobei das isolierende Material 26 in diesem Ausführungsbeispiel den Raum zwischen den einzelnen Elektroden 21 vollständig ausfüllt. Das isolierende Material 26 zwischen den sich jeweils gegenüberliegenden Flächen der Elektroden 21 gewährleistet, dass beim Anlegen einer Spannung an die Elektroden kein Strom über den Raum zwischen den Elektroden 21 abfließen kann, wenn die Elektroden 21 in eine elektrisch leitende Flüssigkeit eingetaucht sind. Das isolierende Material 26 bewirkt vielmehr, dass beim Anlegen einer Spannung an die Elektroden 21 Strom über die Stirnflächen 33 der Elektroden 21 fließt und sich ein elektrisches Feld unterhalb der Unterseite 25 der Halterung 22 bildet. Da keine nennenswerten Ströme über den Raum zwischen den Elektroden 21 abfließen können, fällt die Spannung bei der Entladung eines Kondensators oder einer anderen nicht-permanenten Spannungsquelle nur langsam ab, so dass über die Zeit konstante und stabile Ströme fließen, die ein für die meisten biologischen Verfahren, beispielsweise die Elektrotransfektion, ausreichend starkes elektrisches Feld über die Zeit der Entladung erzeugen. Die Elektrodenanordnung 20 ist insbesondere dafür vorgesehen, in ein zumindest teilweise mit Flüssigkeit gefülltes Gefäß, beispielsweise ein Reaktionsbehältnis, eine Zellkulturschale oder ein „Well“ einer Multiwell-Platte, eingesetzt zu werden, wobei dieses Gefäß eine Bodenfläche aufweist, an der lebende Zellen anhaften können. Die adhärennten Zellen auf der Bodenfläche des Gefäßes sind üblicherweise mit einer geeigneten Flüssigkeit, beispielsweise einem Zellkulturmedium oder einer an die gewünschte elektrische Behandlung adaptierten Lösung, bedeckt, wobei die Elektrodenanordnung 20 beim Einsetzen in das Gefäß zumindest einen Teil dieser Flüssigkeit verdrängt. Damit die Elektroden 21 mit ihren Stirnflächen 33 nicht direkt auf der Bodenflä-



che des Gefäßes und damit auf den Zellen aufliegen, weist die Unterseite 25 der Halterung 22 vier Abstandhalter 27 auf, die einen ausreichenden Abstand der Elektroden 21 zur Bodenfläche des Gefäßes gewährleisten.

Figur 5 zeigt eine perspektivische Ansicht der Elektrodenanordnung 20 gemäß Figur 4, wobei in dieser Darstellung die innen liegenden Teile der Elektroden 21 sichtbar dargestellt sind. Es wird in dieser Darstellung deutlich, dass die Elektroden 21 im Wesentlichen plattenförmig ausgebildet sind, wobei die Dicke der Elektrodenplatten sich in Richtung der Unterseite 25 der Halterung 22 verringert. Die freiliegenden Stirnflächen 33 der Elektroden 21, die mit der Flüssigkeit in dem Gefäß in Kontakt stehen, sind also wesentlich schmaler als die innerhalb des Grundkörpers 23 angeordneten Teile der Elektroden 21. Dies hat den Vorteil, dass der Bereich unterhalb der jeweiligen Elektrode 21, innerhalb dessen eine effektive elektrische Behandlung der Zellen aufgrund des zu schwachen elektrischen Feldes nicht möglich ist, minimiert wird. Am gegenüberliegenden Ende müssen die Elektroden 21 dagegen eine größere Dicke aufweisen, da sie hier zur Herstellung eines ausreichenden elektrischen Kontakts effektiv kontaktiert werden müssen. Der elektrische Kontakt zu der jeweils verwendeten Spannungsquelle wird hierbei im vorliegenden Ausführungsbeispiel über stiftförmige Kontaktelemente 28 hergestellt, die in verdickte Bereiche 29 der Elektroden 21 eingesetzt sind. Die Kontaktelemente 28 werden jeweils an ihrem dem Bereich 29 gegenüberliegenden Ende mittels einer geeigneten Kontaktvorrichtung elektrisch mit einer Spannungsquelle verbunden. Bei der Spannungsquelle kann es sich beispielsweise um einen oder mehrere Kondensatoren handeln, der bzw. die die kontrollierte Abgabe von Spannungsimpulsen ermöglicht bzw. ermöglichen. Die erzeugten Spannungsimpulse werden über die Kontaktelemente 28 an die Elektroden 21 weitergeleitet, so dass an der Unterseite der Elektroden 21, d. h. unterhalb der Unterseite 25 der Halterung 22, ein elektrisches Feld entsteht, welches aufgrund des isolierenden Materials 26 zwischen den Elektroden 21 auf den Raum zwischen den Zellen und der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden 21 begrenzt bzw. fokussiert ist.

Die erfindungsgemäße Elektrodenanordnung 20 wird vorzugsweise im Spritzgussverfahren hergestellt. Dabei werden zunächst die Kontaktelemente 28 in

ein geeignetes Spritzgusswerkzeug eingelegt und dann mit einem elektrisch isolierenden Polymer umspritzt. In einem zweiten Schritt wird dann ein elektrisch leitendes Polymer eingespritzt, das die Elektroden 21 bildet. Alternativ können die Elektroden auch aus einem Metall, vorzugsweise Aluminium, bestehen. Bei dieser Ausführungsform werden zunächst die Metallelektroden in das Spritzgusswerkzeug eingelegt und dann von einem elektrisch isolierenden Polymer umspritzt. Bei dieser Ausführungsform weisen die Metallelektroden vorzugsweise nach oben hinausragende Fortsätze auf, über welche die Elektroden elektrisch kontaktiert werden können.

Figur 6 zeigt eine perspektivische Ansicht der Oberseite 30 der erfindungsgemäßen Elektrodenanordnung 20 gemäß Figur 4. Es wird hier deutlich, dass die Kontaktelemente 28 nach oben aus dem Grundkörper 23 herausragen. Die Kontaktelemente 28 sind also bis auf die freiliegenden Enden 31 vollständig von dem elektrisch isolierenden Material des Grundkörpers 23 umgeben. Über die freiliegenden Enden 31 können die Kontaktelemente 28 mittels einer geeigneten Vorrichtung elektrisch mit einer Spannungsquelle verbunden werden.

Figur 7 zeigt einen Längsschnitt durch die Elektrodenanordnung 20 gemäß den Figuren 4 bis 6. In dieser Darstellung wird deutlich, dass sich der Durchmesser der Elektroden 21 in Richtung der Unterseite 25 des Grundkörpers 23 verjüngt, so dass die Fläche unterhalb der Elektroden 21, innerhalb der sich nur ein unzureichendes elektrisches Feld ausbildet, minimiert wird. Am entgegengesetzten Ende der Elektroden 21 befindet sich der Bereich 29 mit vergrößerter Dicke, in den jeweils die Kontaktelemente 28 eingesetzt bzw. eingespritzt sind. Diese besonders vorteilhafte Ausgestaltung gewährleistet einen ausreichenden elektrischen Kontakt zwischen den Kontaktelementen 28 und den Elektroden 21, so dass eine effektive Weiterleitung der Spannungsimpulse von der Spannungsquelle bis zu den Elektroden 21 sichergestellt ist. Wenn die Elektrodenanordnung 20 in ein mit Flüssigkeit gefülltes Gefäß, an dessen Bodenfläche lebende Zellen anhaften, eingesetzt wird, sorgen die Abstandhalter 27 dafür, dass ein optimaler Abstand zwischen der Unterseite der Elektroden 21 und den zu behandelnden Zellen eingestellt wird. Da der Raum zwischen den einander jeweils gegenüber liegenden Flächen 32 der Elektroden 21 mit dem isolierenden Mate-

rial 26 vollständig ausgefüllt ist, gelangt keine Flüssigkeit zwischen die Flächen 32 der Elektroden 21, so dass kein Strom über den Bereich zwischen den Flächen 32 der Elektroden 21 abfließen kann. Auf diese Weise wird beim Anlegen einer Spannung an die Elektroden 21 das elektrische Feld an der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden 21 konzentriert und auf den Raum zwischen den Zellen und den Elektroden 21 begrenzt bzw. fokussiert. Auf diese Weise können die Zellen sehr effektiv und unter relativ geringem Energieaufwand behandelt werden. Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt darin, dass die Elektrodenanordnung 20 beim Einsetzen in das Gefäß einen Teil der Flüssigkeit verdrängt, da keine Zwischenräume zwischen den Elektroden 21 vorhanden sind. Aus diesem Grund muss das Gefäß nur mit einer geringen Menge Flüssigkeit gefüllt sein, wodurch für die Behandlung benötigte Lösungen und Substanzen eingespart und somit Kosten reduziert werden können.

Figur 8 zeigt die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Abstand der Elektroden zu den zu behandelnden Zellen jeweils mit unterschiedlich starken Spannungsimpulsen. Transfektion bedeutet in diesem Zusammenhang das Einbringen von Nukleinsäuremolekülen (hier DNA) in lebende Zellen mittels elektrischer Spannungsimpulse. Während bei relativ hohen Spannungen (AX-19) nur eine geringe Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Abstand zwischen den Elektroden und den Zellen vorliegt, zeigt sich bei schwachen Spannungsimpulsen (A-5), dass die Transfektionseffizienz um so größer wird, je geringer der Abstand zwischen den Elektroden und den Zellen ist. Mittelstarke Spannungsimpulse (K-19) zeigen dagegen ein Optimum bei mittelgroßen Abständen. Es wird also deutlich, dass der Abstand zwischen den Elektroden und den Zellen einen in Abhängigkeit von der Stärke der Spannungsimpulse mehr oder weniger großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat.

Bezugszeichenliste

- |    |                       |
|----|-----------------------|
| 1  | Elektrodenanordnung   |
| 2  | Elektroden            |
| 3  | Innenraum             |
| 4  | Gefäß                 |
| 5  | Bodenfläche           |
| 6  | Raum                  |
| 10 | Elektrodenanordnung   |
| 11 | isolierendes Material |
| 12 | Elektroden            |
| 13 | Innenraum             |
| 14 | Gefäß                 |
| 15 | Bodenfläche           |
| 16 | Fläche                |
| 17 | Elektrodenanordnung   |
| 18 | Elektroden            |
| 19 | Isolierendes Material |
| 20 | Elektrodenanordnung   |
| 21 | Elektroden            |
| 22 | Halterung             |
| 23 | Grundkörper           |
| 24 | Randbereich           |
| 25 | Unterseite            |
| 26 | isolierendes Material |
| 27 | Abstandhalter         |
| 28 | Kontaktelemente       |
| 29 | Bereich               |
| 30 | Oberseite             |
| 31 | Ende                  |
| 32 | Fläche                |
| 33 | Stirnfläche           |

## Patentansprüche

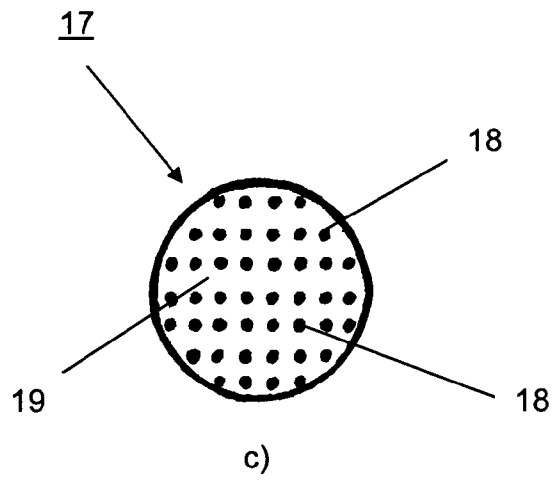
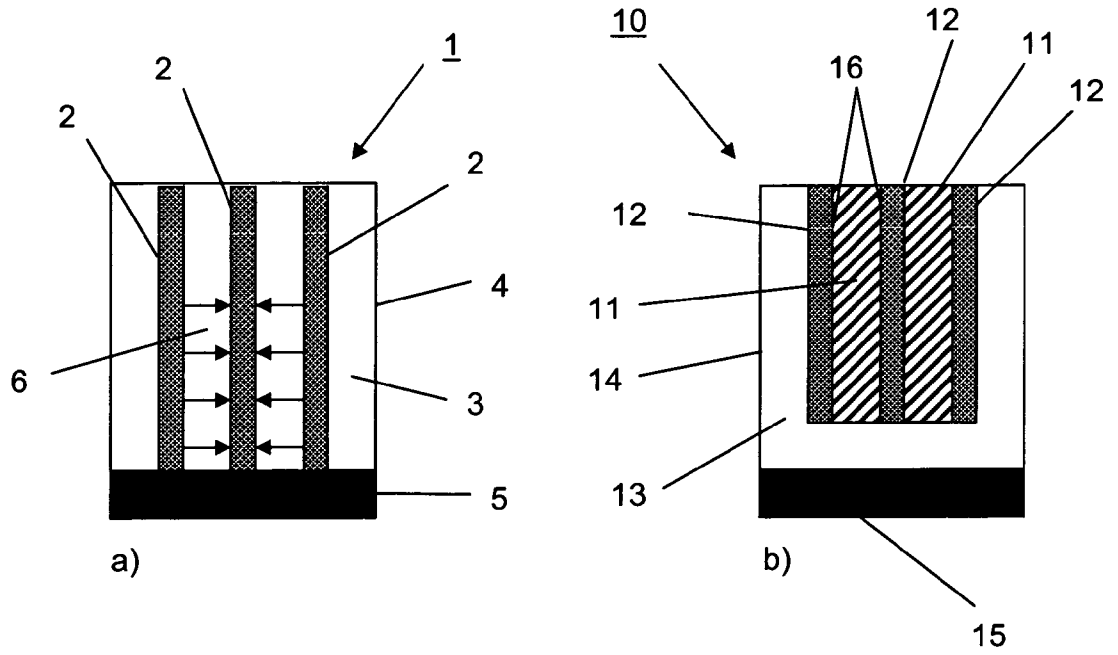
1. Elektrodenanordnung (10, 17, 20), insbesondere zur Beaufschlagung von adhären Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, die mindestens zwei Elektroden (12, 18, 21) umfasst, welche jeweils mindestens eine Fläche (16, 32) aufweisen, die der entsprechenden Fläche (16, 32) der jeweils anderen Elektrode (12, 18, 21) gegenüberliegend angeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen den Flächen (16, 32) der Elektroden (12, 18, 21) zumindest teilweise ein elektrisch isolierendes Material (11, 19, 26) angeordnet ist.
2. Elektrodenanordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens drei, vorzugsweise mindestens 4 oder 5, insbesondere 6-12, Elektroden (12, 18, 21) vorgesehen sind.
3. Elektrodenanordnung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (12, 18, 21) platten- oder stiftförmig ausgebildet sind.
4. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Flächen (16, 32) Seitenflächen planparallel angeordneter Elektrodenplatten sind.
5. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Flächen (16, 32) durch das isolierende Material (11, 19, 26) vollständig voneinander getrennt sind.
6. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der von den Flächen (16, 32) der Elektroden (12, 18, 21) begrenzte Raum zwischen den Elektroden (12, 18, 21) vollständig von dem isolierenden Material (11, 19, 26) ausgefüllt ist.
7. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das isolierenden Material (11, 19, 26) ein

thermoplastisches Polymer ist, vorzugsweise Polyvinylchlorid, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen und/oder Polykarbonat.

8. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (12, 18, 21) aus Metall und/oder einem elektrisch leitenden Kunststoff bestehen.
9. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrodenanordnung (10, 17, 20) an mindestens einer den Zellen zugewandten Seite mindestens einen Abstandhalter (27) aufweist.
10. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrodenanordnung (10, 17, 20) zum Einsetzen in mindestens ein zumindest teilweise mit Flüssigkeit gefülltes Gefäß (14) vorgesehen ist, vorzugsweise ein Gefäß (14), an dessen Bodenfläche (15) lebende Zellen anhaften, und dass das isolierende Material (11, 19, 26) beim Einsetzen in das Gefäß (14) zumindest einen Teil der Flüssigkeit verdrängt.
11. Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (12, 18, 21) zumindest teilweise an der Unterseite (25) einer Halterung (22) angeordnet sind.
12. Elektrodenanordnung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Halterung (22) derart ausgebildet ist, dass sie in ein Reaktionsgefäß eingesetzt oder auf dieses aufgesetzt werden kann, so dass die Elektroden (12, 18, 21) mit dem Innenraum des Reaktionsgefäßes in Kontakt stehen.
13. Elektrodenanordnung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsgefäß Teil einer Multiwell-Platte ist.

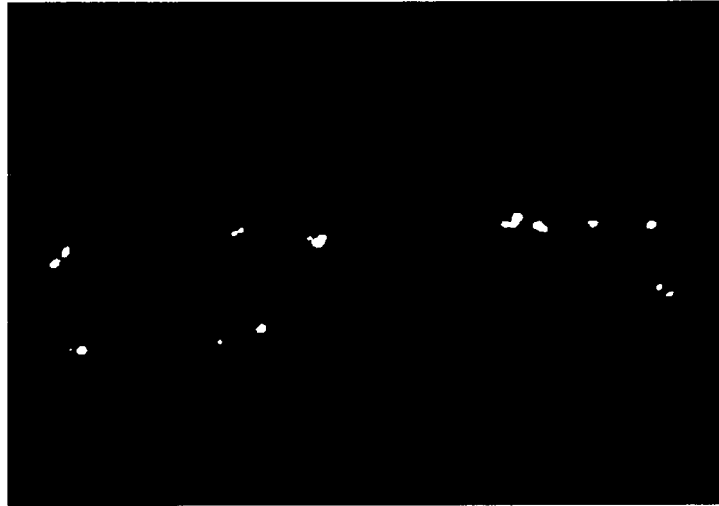
14. Verwendung der Elektrodenanordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum Beaufschlagen von adhärenen Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, insbesondere zur Elektroporation von adhärenen Zellen, vorzugsweise in Form mindestens einer Eintauchelektroden-vorrichtung.
15. Verfahren zur Beaufschlagung von adhärenen Zellen mit mindestens einem elektrischen Feld, bei dem das elektrische Feld durch das Anlegen einer Spannung an mindestens zwei Elektroden (12, 18, 21) erzeugt wird, **dadurch gekennzeichnet**, dass das elektrische Feld an der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden (12, 18, 21) konzentriert und/oder auf den Raum zwischen den Zellen und der den Zellen zugewandten Seite der Elektroden (12, 18, 21) begrenzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das elektrische Feld auf den Raum zwischen den Zellen und einer freiliegenden Stirnseite der Elektroden (12, 18, 21) begrenzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass zur Konzentrierung und/oder Begrenzung des elektrischen Feldes elektrisch isolierendes Material (11, 19, 26) zwischen den Elektroden (12, 18, 21) platziert wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden (12, 18, 21) mit einer freiliegenden Stirnseite in mindestens ein Gefäß (14) eingebracht werden, an dessen Bodenfläche (15) die Zellen anhaften.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkung des elektrischen Feldes auf die Zellen durch Einstellen des Abstands zwischen den Zellen und den Elektroden (12, 18, 21) optimiert wird.

Figur 1

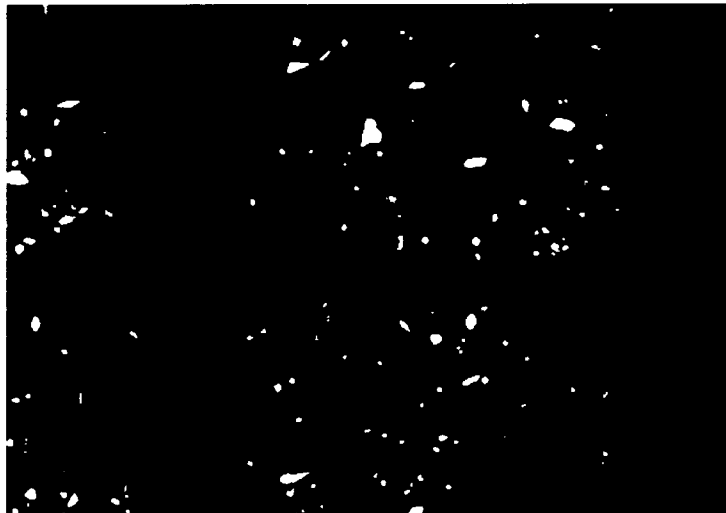




**Figur 2**

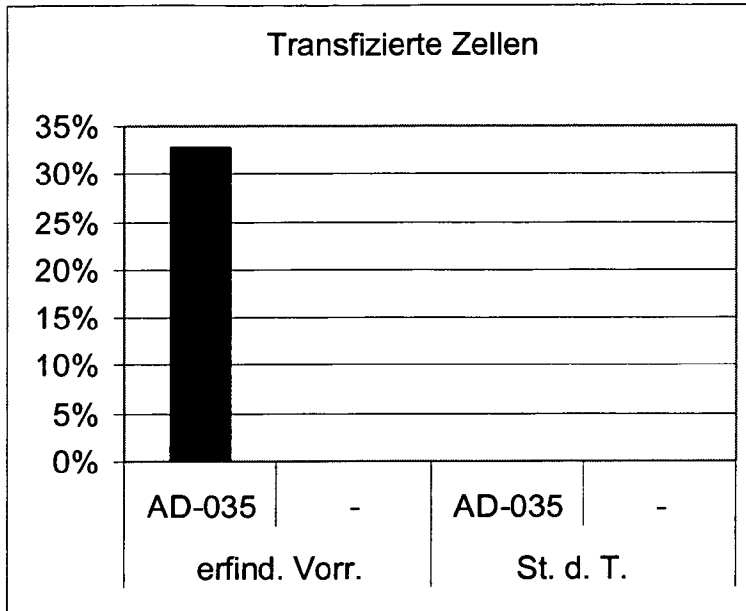


a)

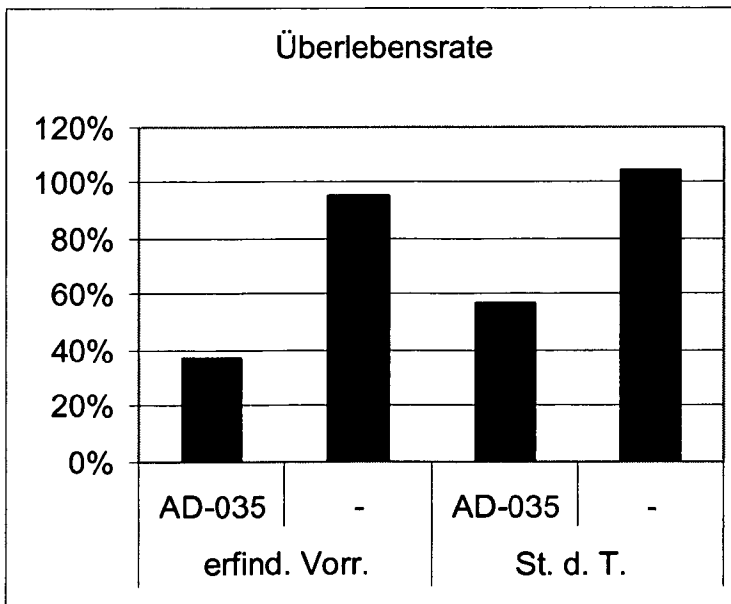


b)

**Figur 3**

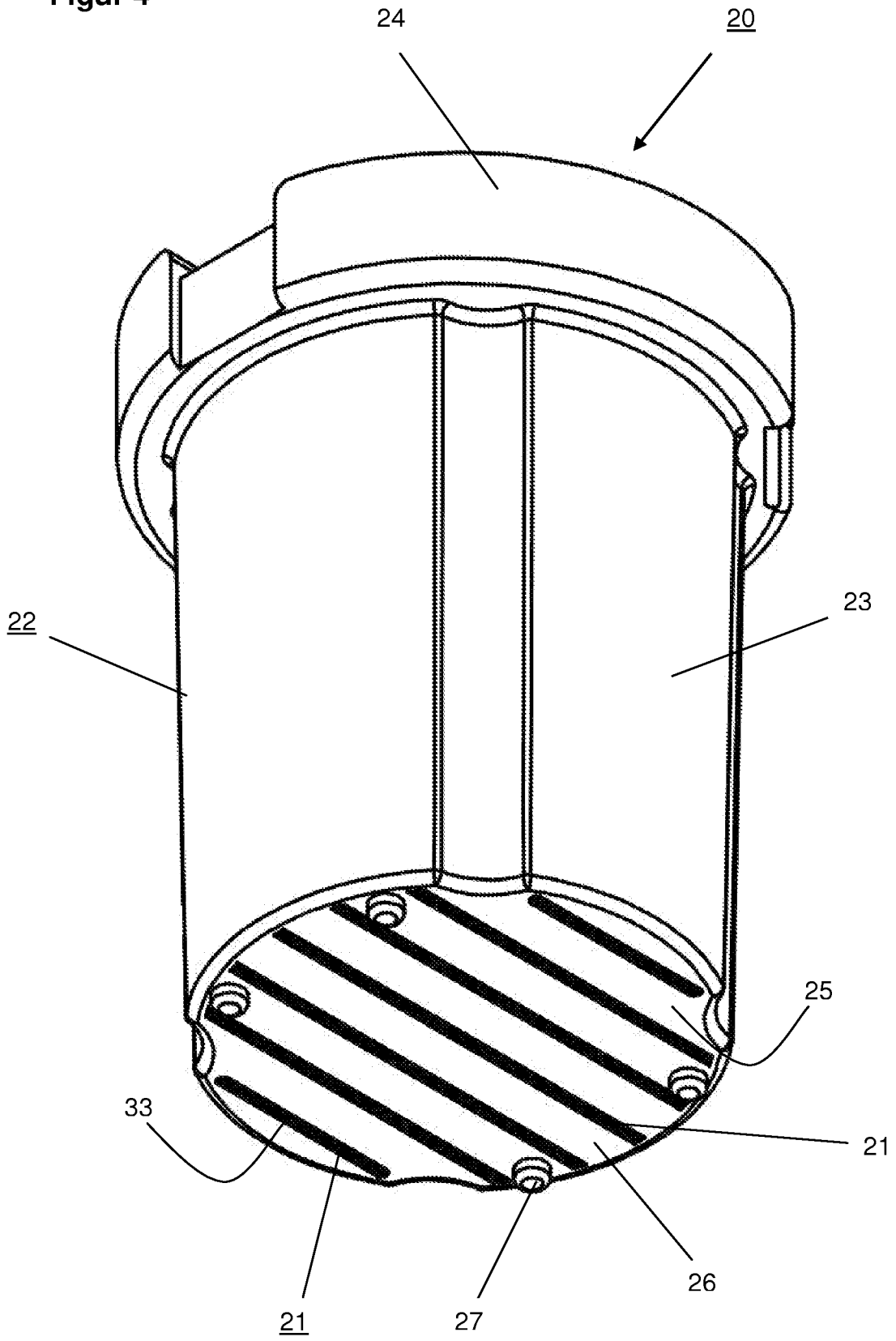


a)

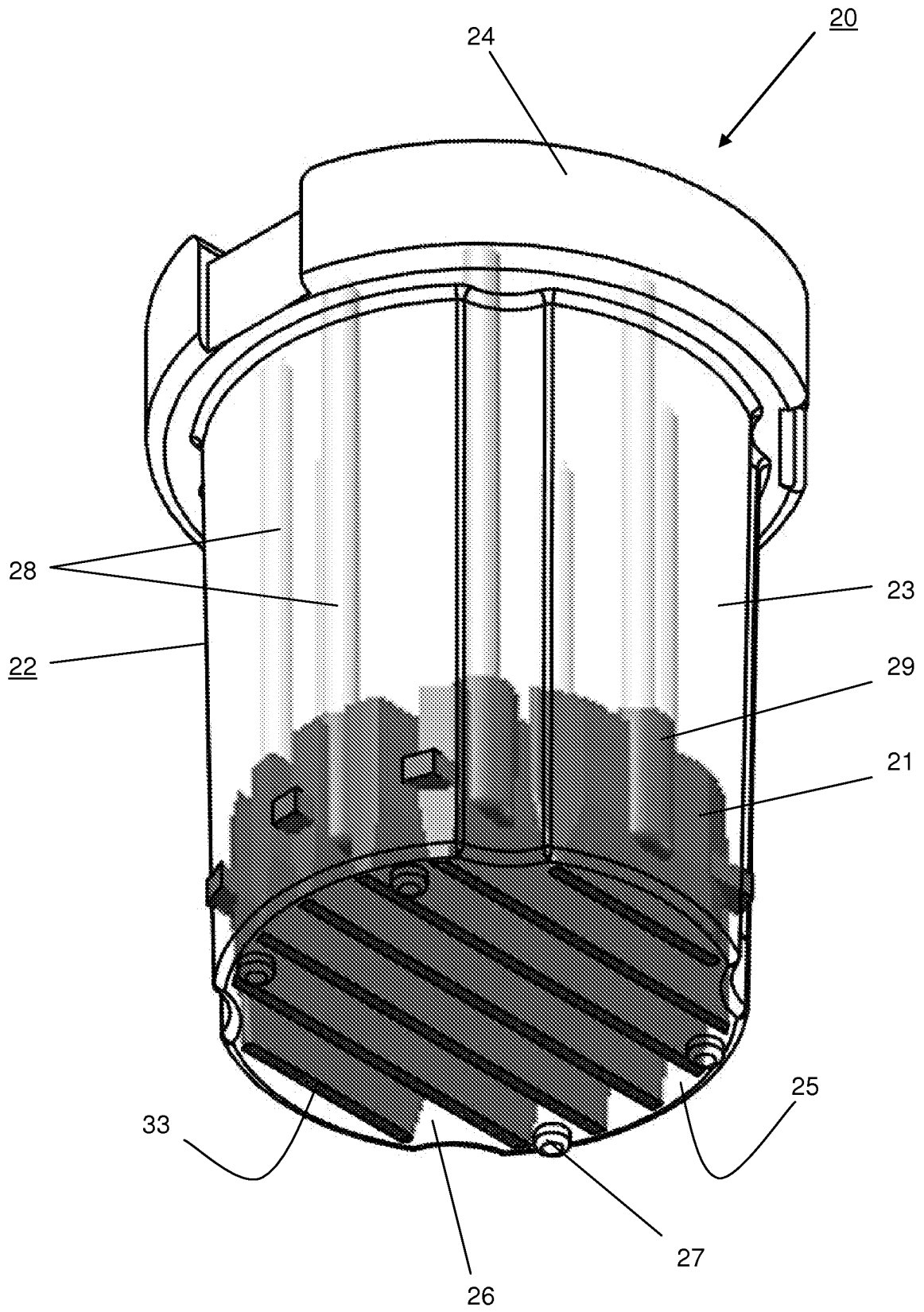


b)

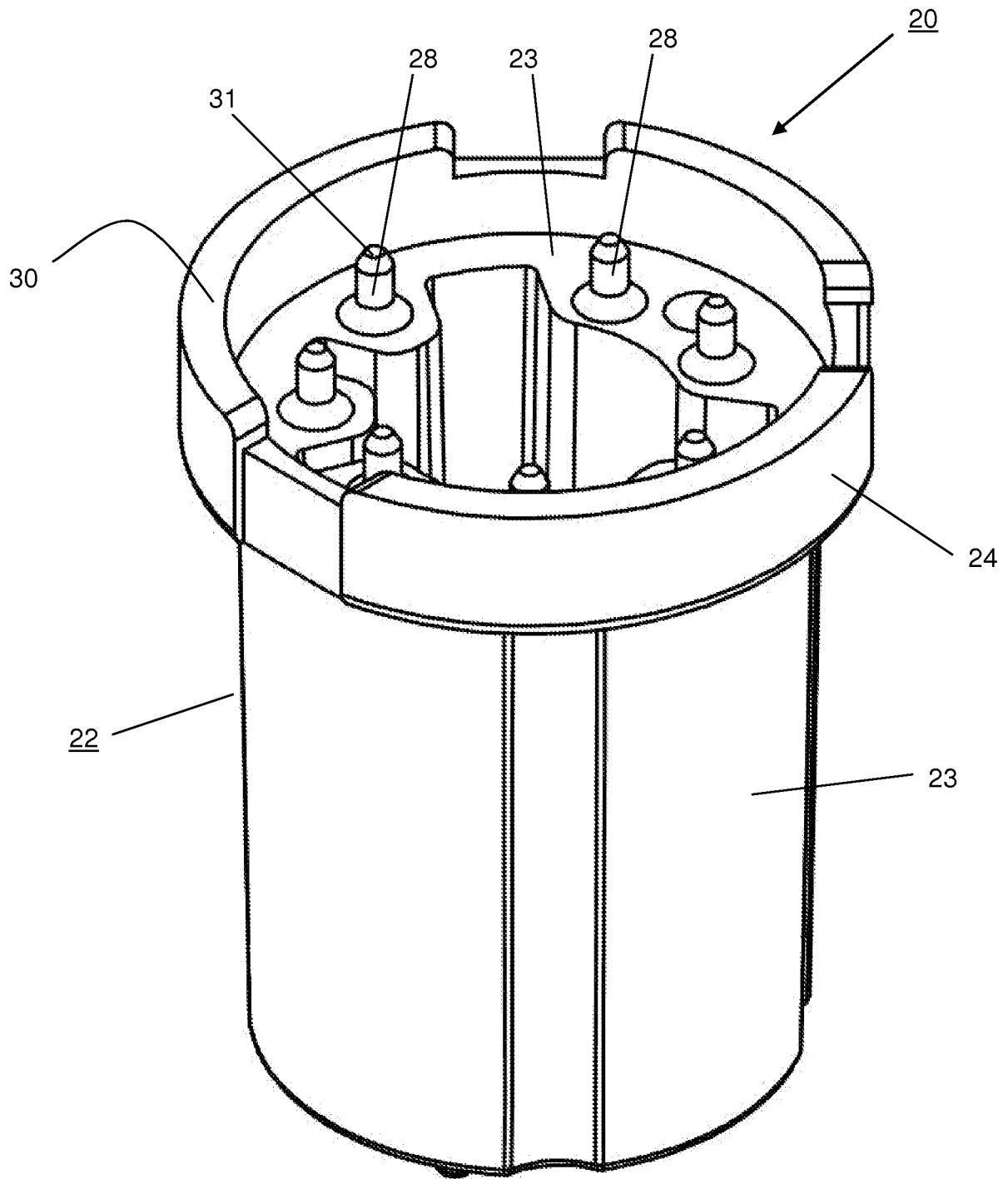
Figur 4



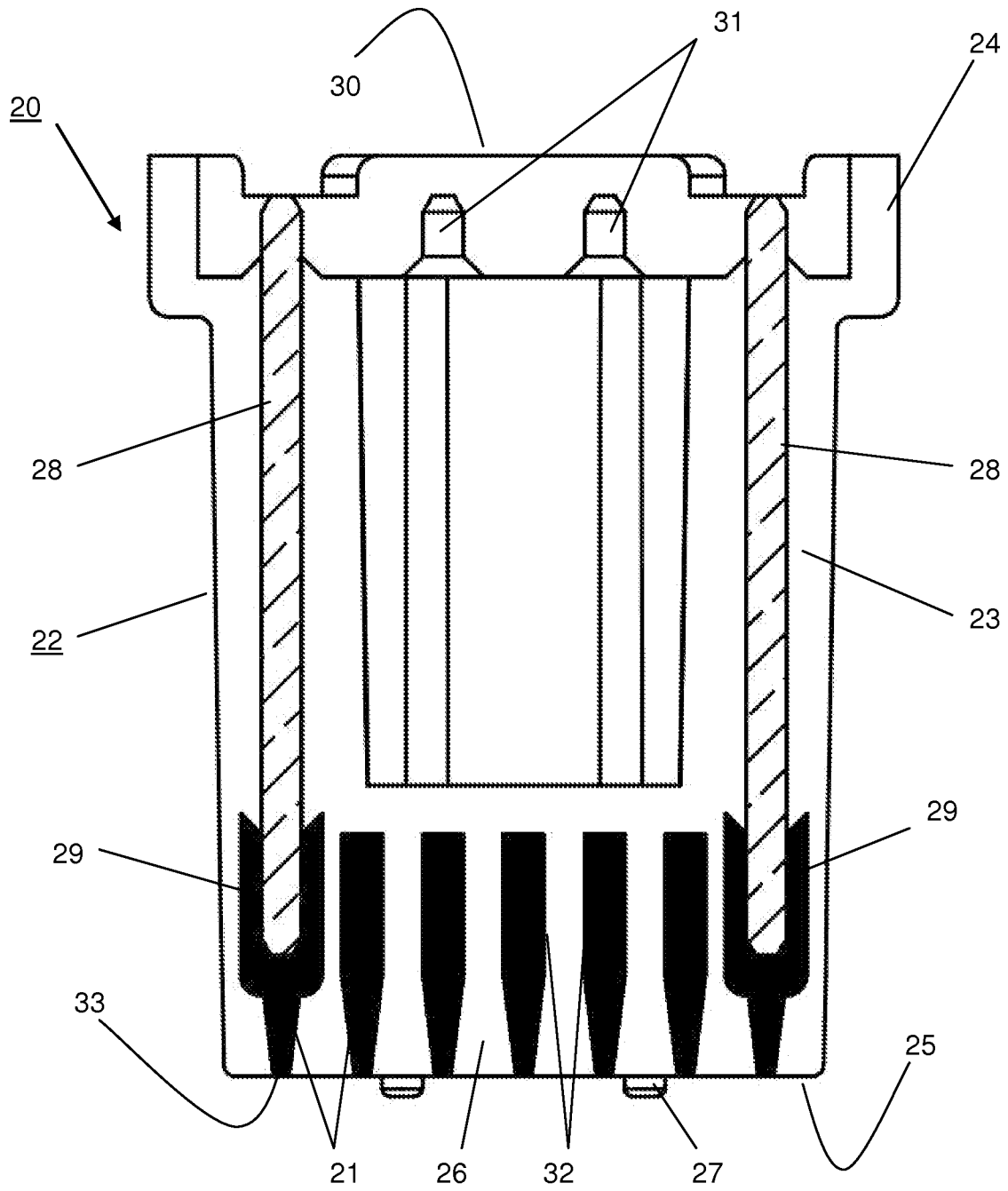
Figur 5



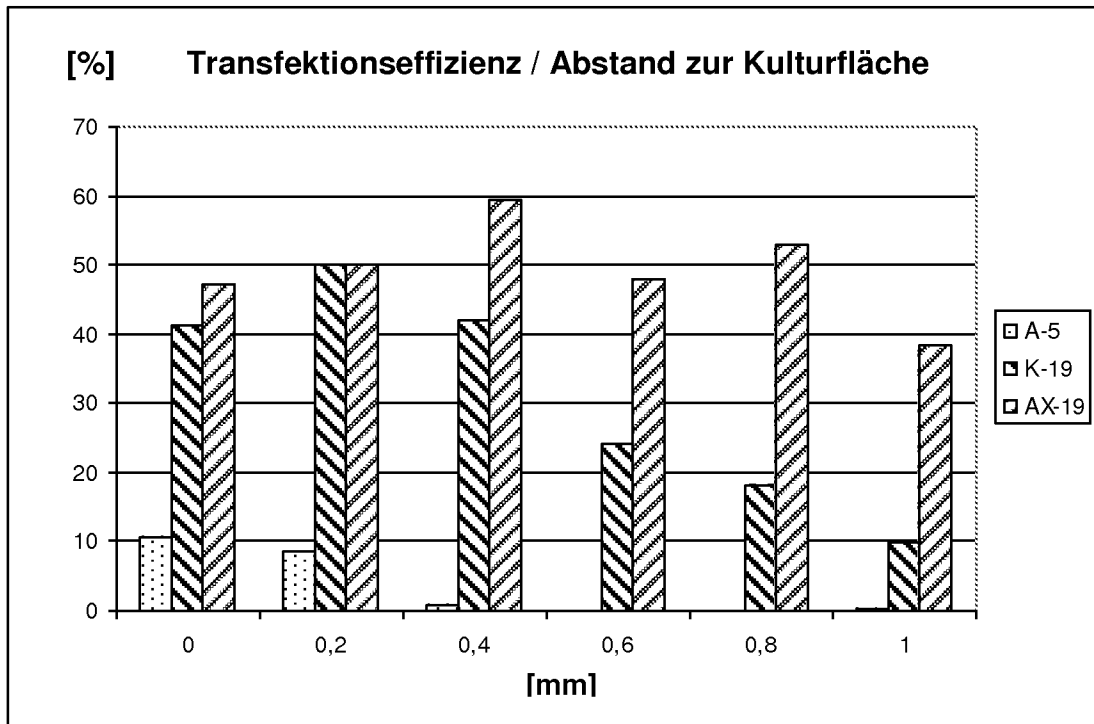
Figur 6



Figur 7



**Figur 8**



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/060312

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12M1/42 C12M3/00  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12M A61N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, WPI Data, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 352 853 B1 (KING JEFFREY S [US] ET AL) 5 March 2002 (2002-03-05) column 3; claims; figures -----	1-4,8, 10-19
A	US 2009/305380 A1 (RAGSDALE CHARLES W [US]) 10 December 2009 (2009-12-10) the whole document -----	1,14,15
A	DATABASE WPI Week 200449 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-514495 XP002610220, & JP 2004 202086 A (TEIKOKU SEIYAKU KK) 22 July 2004 (2004-07-22) abstract -----	1,14,15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  30 September 2011	Date of mailing of the international search report  11/10/2011
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Böhm, Ingo
--	--------------------------------------



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/060312

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6352853	B1	05-03-2002	NONE
-----			
US 2009305380	A1	10-12-2009	CA 2723595 A1 19-11-2009
			EP 2285955 A1 23-02-2011
			JP 2011520448 A 21-07-2011
			WO 2009140161 A1 19-11-2009
-----			
JP 2004202086	A	22-07-2004	NONE
-----			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 INV. C12M1/42 C12M3/00  
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 C12M A61N C12N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 352 853 B1 (KING JEFFREY S [US] ET AL) 5. März 2002 (2002-03-05) Spalte 3; Ansprüche; Abbildungen -----	1-4,8, 10-19
A	US 2009/305380 A1 (RAGSDALE CHARLES W [US]) 10. Dezember 2009 (2009-12-10) das ganze Dokument -----	1,14,15
A	DATABASE WPI Week 200449 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-514495 XP002610220, & JP 2004 202086 A (TEIKOKU SEIYAKU KK) 22. Juli 2004 (2004-07-22) Zusammenfassung -----	1,14,15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. September 2011

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/10/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Böhm, Ingo

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/060312

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6352853	B1	05-03-2002	KEINE
-----			
US 2009305380	A1	10-12-2009	CA 2723595 A1 19-11-2009
			EP 2285955 A1 23-02-2011
			JP 2011520448 A 21-07-2011
			WO 2009140161 A1 19-11-2009
-----			
JP 2004202086	A	22-07-2004	KEINE
-----			