

(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
22. Juni 2017 (22.06.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/103268 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 9/127 (2006.01) *B01F 3/08* (2006.01)
B01F 13/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/081743

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2016 (19.12.2016)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2015 226 018.6
18. Dezember 2015 (18.12.2015) DE

(71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG
E.V.** [DE/DE]; Hansastraße 27c, 80686 München (DE).

(72) Erfinder: **BLEUL, Regina**; Bangertstr. 16, 65207
Wiesbaden (DE). **THIERMANN, Raphael**; Bangertstr.
16, 65207 Wiesbaden (DE). **MASKOS, Michael**;
Schwester-Goswina-Str. 10, 55294 Bodenheim (DE).

(74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER MBB**;
Theresienhöhe 11a, 80339 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, 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, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)



WO 2017/103268 A1

(54) Title: CONTINUOUS PROCESS FOR THE PREPARATION OF VESICULAR OR DISC-SHAPED, SUPRAMOLECULAR NANOPARTICLES AND USES THEREOF

(54) Bezeichnung : KONTINUIERLICHES VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON VESIKULÄREN ODER SCHEIBENFÖRMIGEN, SUPRAMOLEKULAREN NANOPARTIKELN, UND VERWENDUNGEN HIERVON

(57) Abstract: The present invention relates to a process that can be carried out continuously for the preparation of vesicular or disc-shaped, supramolecular nanoparticles.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein kontinuierlich durchführbares Verfahren zur Herstellung von vesikulären oder scheibenförmigen supramolekularen Nanopartikeln.

Kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von vesikulären oder scheibenförmigen, supramolekularen Nanopartikeln, und Verwendungen hiervon

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein kontinuierlich durchführbares Verfahren zur Herstellung von vesikulären oder scheibenförmigen supramolekularen Nanopartikeln. Die Nanopartikel weisen eine Doppelmembran auf, die mindestens ein nicht-ionisches Tensid enthält. Das Verfahren beruht auf einer schnellen Mischung eines hohen Volumenstroms an Tensid mit einem hohen
10 Volumenstrom einer wasserhaltigen Flüssigkeit durch einen Mikromischer. Aufgrund des hohen Volumenstroms an Tensid können auf einfache Art und Weise und innerhalb kurzer Zeiträume große Mengen der uniformen Nanopartikel bereitgestellt werden. Ferner ist es mit dem Verfahren möglich, erstmals plättchenförmige Nanopartikel im Größenbereich von 20 bis 500 nm
15 herzustellen. Darüberhinaus ist das Verfahren geeignet, die Nanopartikel mit Wirkstoffen, Biomarkern und/oder kosmetischen Stoffen zu beladen. Es wird

die Verwendung der Nanopartikel in der Therapie von Krankheiten, in der Diagnose und auch in der Kosmetik vorgeschlagen.

5 Vesikel aus vorwiegend nicht-ionischen Tensiden werden als Niosomen bezeichnet. Sie sind die künstliche Variante der Liposomen (Vesikel aus Phospholipiden). Liposomen gehören zu den bislang ältesten und erfolgreichsten Wirkstoffträgersystemen und sind beispielsweise in Form von Doxil® bereits seit 1995 auf dem Markt. Bislang werden Liposomen jedoch verstärkt nur für hochpreisige und sehr spezifische Therapien (wie beispielsweise in der
10 Krebsterapie) eingesetzt, da ihre Herstellung aufwendig und teuer ist. Insbesondere bei der Anwendung als Wirkstoffträgersystem über verschiedene Administrationswege (transdermal, intravenös, ocular) spielt die exakte Größe der Vesikel eine wichtige Rolle, da sie unter anderem Einfluss auf die Biodistribution hat.

15 Die gängigen Herstellungsverfahren ermöglichen meist keine gute Kontrolle über die Größe der Vesikel. Ebenso entstehen neben unilamellaren Vesikeln oftmals multilamellare Vesikel. Dies hat zur Folge, dass gewöhnlicherweise ein nachfolgender Aufbereitungsschritt notwendig wird, um unilamellare Vesikel einer definierten Größenverteilung zu erzielen (z.B. Extrusion der multilamellaren Vesikel).

20 Niosomen sind im Vergleich zu Liposomen chemisch etwas stabiler (z .B. gegen Oxidation) und die Rohstoffe sind erheblich günstiger als bei ihren in der Natur vorkommenden Vorbildern, den Liposomen. Die Problematik der größenkontrollierten Herstellung ist jedoch für Niosomen in gleicher Weise gültig wie für Liposomen.

30 Die im Stand der Technik bekannten Herstellungsmethoden für Niosomen sind ähnlich der von Liposomen. Es gibt zum einen die Injektionsmethode. Hierfür wird in organischem Lösungsmittel gelöstes Tensid in eine erwärmte wässrige Lösung (mit Wirkstoff) injiziert. Ebenfalls bekannt ist eine direkte Injektion von einem erhitzten (flüssigen) reinen Tensid. Auch Mischungen aus verschiedenen Tensiden oder einer Mischung mindestens eines Tensids mit
35 Cholesterin in eine wässrige Phase sind hier möglich.

Ferner ist im Stand der Technik die Methode der Filmrehydratation bekannt. Hier wird das Tensid zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels wird ein dünner Film des Tensids auf einer Oberfläche erzeugt und nachfolgend der dünne Film in Wasser oder wässriger Lösung (mit Wirkstoff) rehydratisiert. Diese Methode ergibt jedoch relativ große uni- und multilamellare Vesikel mit breiter Größenverteilung.

Ein weiteres im Stand der Technik bekanntes Verfahren ist die „Reverse Phase Evaporation“. Hier wird das Tensid zunächst in einem organischen Lösungsmittel (vorzugsweise eine Mischung aus z.B. Ether und Chloroform) gelöst und die wässrige Phase (ggf. mit Wirkstoff) zugegeben. Das entstehende Zweiphasen-System wird homogenisiert (z.B. mittels Ultraschall) und die organische Phase anschließend unter erniedrigtem Druck verdampft, sodass in Wasser dispergierte Niosomen entstehen.

Darüberhinaus ist die Hochdruckhomogenisierung bekannt. In diesem Verfahren werden in einem ersten Schritt durch einfache Fällung Niosomen mit sehr großem Durchmesser hergestellt. Dazu wird das Tensidgemisch, bestehend aus mindestens einem nicht-ionischen Tensid und einer eventuellen Beladung, vollständig in einem geeigneten, vorzugsweise mit Wasser mischbaren, Lösungsmittel gelöst. Durch einfache Zugabe von Wasser in die Tensidlösung (ähnlich der Injektionsmethode) werden die Niosomen erzeugt. Durch die langsame und wenig kontrollierte Zugabe von Wasser erhält man jedoch Niosomen, die zum Einen sehr groß sein können und zum Anderen eine sehr breite Größenverteilungen aufweisen. Für viele Anwendungen ist daher eine weitere Aufbereitung der Niosomen zu einer definierteren Größenverteilung unumgänglich.

Zur weiteren Aufbereitung der Niosomen kann ein Hochdruckhomogenisator verwendet werden. Dieser presst die Niosomen-Lösung bei einer Temperatur höher als die Übergangstemperatur der Niosomen-Doppelschicht (z.B. 60 °C) durch einen Spalt. Der Energieeintrag in Form von starken Verwirbelungen und Scherkräften kann genutzt werden um unterschiedliche Größen und Größenverteilungen der Niosomen zu erhalten. Durch die hohen Drücke und Flussgeschwindigkeiten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass neben

der gewünschten Verkleinerung durch Scherung auch eine unerwünschte Vergrößerung der Niosomen durch Koaleszenz auftritt, also nicht immer die gewünschte, definierte Größenverteilung der Niosomen erzielt wird. Zudem sind die Einflussmöglichkeiten auf die Größenverteilung beschränkt und liefern meist Partikelgrößen mit einem PDI > 0,2. Letztlich ist es mit diesem Verfahren auch nicht möglich, Niosomen zu erzeugen, die Scherkraft-empfindliche Substanzen enthalten, was eine Beladung der Niosomen mit diversen therapeutisch wirksamen Proteinen unmöglich macht.

10 Ferner ist es im Stand der Technik bekannt, eine mechanische Extrusion zur weiteren Aufbereitung von multilamellaren Niosomen breiter Größenverteilung zu verwenden. Anders als bei der Hochdruckhomogenisierung verwendet man bei der Extrusion statt eines Spalts eine Membran mit definierter Porengröße. Durch das Hindurchpressen der Lösung durch die Membran limitiert die Porengröße der Membran die Maximalgröße der erzeugten Niosomen. Im Allgemeinen tritt hier nur eine Scherung durch die starre Membran auf, da keine hohen Scherkräfte und Flussgeschwindigkeiten innerhalb des Fluids auftreten. Kleinere Partikel, die bereits am Anfang in der Startlösung vorhanden sind, können die Membran einfach und unverändert passieren. Eine einheitliche Größenverteilung wird daher nur dann erreicht, wenn die eingesetzten Niosomen mindestens die Größe der Poren der Membran aufweisen. Diese Methode liefert dann zwar Niosomen definierter Größe und enger Größenverteilung, ist aber mit einem hohen Arbeits-, Material- und Zeitaufwand verbunden. Durch diese Nachteile eignet sich das Verfahren weniger für die großtechnische Herstellung von Niosomen, sondern vielmehr für die Herstellung von Niosomen im kleineren Labormaßstab (beispielsweise wenige Milliliter Niosomenlösung).

30 Darüberhinaus ist im Stand der Technik noch die sog. „bubble method“ bekannt. Hierbei werden durch Einleitung von Gasbläschen eines inerten Gases in eine grobe Dispersion von nicht-ionischen Tensiden Niosomen erhalten, die jedoch einen großen Durchmesser (Submikrometerbereich) und eine breite Größenverteilung aufweisen.

35 Ferner ist es bekannt, Niosomen über Selbstassemblierung in einem mikrofluidischen Chip bereitzustellen (siehe Lo et al., 2010, Langmuir, Band 26, Aus-

gabe 11, S. 8559-8566). Hierbei wird in einem mikrofluidischen Kanal in einem planaren Substrat aus PDMS oder Silizium das Tensidgemisch, bestehend aus einem nicht-ionischen Tensid, Cholesterol und Phospholipid, in einem guten Lösungsmittel mit Wasser bzw. wässrigem Puffer gemischt. Durch unterschiedliche Flussraten der in den Kanal aufgegebenen Fluide erhält man eine hydrodynamische Fokussierung und dadurch eine hohe Mischgeschwindigkeit des nicht-ionischen Tensids mit Wasser. Auf diese Weise lassen sich Niosomen einer Größe im Nanometerbereich und mit enger Größenverteilung erhalten (Durchmesser der Niosomen ist ca. 20 nm - 300 nm), wobei die Größe der Niosomen über das Verhältnis der Flussrate von Tensidgemisch zu Lösungsmittel steuerbar ist. Die Größenverteilung ist um bis zu 40% enger als in den oben genannten Bulk-Verfahren. Der Nachteil der hydrodynamischen Fokussierung ist jedoch, dass die Flussgeschwindigkeiten systembedingt nicht höher als 125 $\mu\text{l}/\text{min}$ sein können, da ansonsten die Mischgeschwindigkeit der Flüssigkeiten zu niedrig wird, um Niosomen definierter Größe bereitzustellen. Da somit ein „upscaling“ ohne Qualitätseinbußen nicht möglich ist, steht dieses Verfahren einer schnellen Bereitstellung von Niosomen im industriellen Maßstab entgegen. Ferner wird bei diesem Verfahren der zentrale Tensidstrom durch den flankierenden Lösungsmittelstrom stark eingeschnürt d.h. es muss deutlich mehr Lösungsmittelvolumen als Tensidvolumen pro Zeit fließen (z.B. 15 mal mehr), um eine Fokussierung des Tensidstroms zu bewirken bzw. aufrecht zu erhalten. Der deutlich schwächere Tensidstrom gegenüber dem Lösungsmittelstrom schränkt den erzielbaren Umsatz pro Mischstruktur und Zeit stark ein und steht einem ökonomischen „upscaling“ entgegen.

Ausgehend hiervon war es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, mit dem es möglich ist, auf einfache und schnelle Art und Weise große Mengen an Niosomen definierter Größe und einer engen Größenverteilung bereitzustellen. Zudem sollten Niosomen bereitgestellt werden, die sich hervorragend für eine therapeutische, diagnostische und kosmetische Verwendung eignen.

Die Aufgabe wird gelöst durch das Verfahren gemäß Anspruch 1, die plättchenförmige Nanopartikel gemäß Anspruch 16 und die Verwendung gemäß einem der Ansprüche 24 und 25.

Erfindungsgemäß wird ein kontinuierliches Verfahren bereitgestellt zur Herstellung von supramolekularen Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 20 nm bis 500 nm enthaltend eine Doppelmembran, wobei die Doppelmembran ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht, umfassend die Schritte

- 5 a) Bereitstellen einer ersten Flüssigkeit, die mindestens ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht;
- b) Bereitstellen einer zweiten Flüssigkeit, die Wasser enthält oder daraus besteht; und
- 10 c) Mischen der Flüssigkeiten aus a) und b) zu einem Gemisch in einem Mikromischer;

dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer eine erste Zuführung für die erste Flüssigkeit und eine zweite Zuführung für die zweite Flüssigkeit aufweist, wobei an der ersten Zuführung des Mikromischers die Flussrate der ersten Flüssigkeit auf $\geq 0,1$ mL/min eingestellt wird, wodurch in Schritt c) Nanopartikel gebildet werden, die eine Doppelmembran enthalten, wobei die Doppelmembran das nicht-ionische Tensid enthält oder daraus besteht.

15

Unter dem Begriff „Nanopartikel“ fallen erfindungsgemäß im Wesentlichen runde Nanopartikel („Niosomen“) als auch im Wesentlichen plättchenförmige Nanopartikel („Niodisks“). Als Durchmesser wird erfindungsgemäß die größte Ausdehnung der Nanopartikel in eine Raumrichtung d.h. die größte Querschnittsabmessung der Nanopartikel verstanden.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht eine kontinuierliche Herstellung als auch Beladung von Niosomen und Niodisks. Ferner ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, die Größe der hergestellten Niosomen bzw. Niodisks stufenlos einzustellen. Die Größe der Partikel lässt sich über die Auswahl der Ausgangssubstanzen, über die Konzentrationen, die Temperatur und insbesondere über die Gesamtflussrate steuern. Überraschenderweise wurde gefunden, dass bei sonst konstanten Bedingungen (Ausgangssubstanzen, Konzentration an Tensid und Temperatur sind konstant) eine Steuerung der Größe der hergestellten Nanopartikel allein über die Regelung der Gesamtflussrate (Flussrate von erster und zweiter Flüssigkeit zusammen) möglich ist.

25

30

35

In dieser Hinsicht wurde der Zusammenhang entdeckt, dass die bereitgestellten Nanodisks umso kleinere Durchmesser aufweisen, je höher die Gesamtflussrate bei ansonsten konstanten Parametern, insbesondere bei einem konstant bleibenden Verhältnis der Flussraten der beiden aufgegebenen Flüssigkeiten, ist. Beispielsweise ergaben sich für einen konkreten Mikromischer (CPMM R300 der Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH) bei einer Gesamtflussrate von

- 4 ml/min Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 200 nm;
- 6 mL/min Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 130 nm;
- 8 mL/min Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 85 nm; und
- 11 mL/min Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 70 nm.

Auch bei den so genannten SIMM V2 wurden ähnliche Zusammenhänge beobachtet.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist folgende Vorteile gegenüber den im Stand der Technik bekannten Herstellungsverfahren auf:

1. Es ist eine stufenlose Kontrolle der Größe der hergestellten Nanopartikel möglich;
2. Aufgrund eines hohen Tensid-Volumenstroms (großlumige Kanäle) kann auch reines, flüssiges Tensid eingesetzt werden d.h. das Verfahren kommt ohne Lösen des Tensids in einem organischen Lösungsmittel aus;
3. Das Verfahren kann bei Raumtemperatur und anders als die „bubble method“ auch ohne Gaseinwirkung durchgeführt werden d.h. es ist eine *in-situ*-Beladung der Nanopartikel auch mit hitzeempfindlichen und Gaseinwirkungs-empfindlichen Substanzen (z.B. Proteinen) möglich;
4. Das Verfahren erzeugt Nanopartikel mit einer engen Größenverteilung d.h. eine weitere Aufarbeitung der Nanopartikel ist nicht nötig. Dadurch wird Zeit gespart und eine *in-situ*-Beladung der Nanopartikel mit Substanzen, die gegenüber Aufarbeitungsverfahren wie Ultraschallbehandlung und/oder Extrusions empfindlich sind (z.B. Proteine), wird möglich; und
5. Es lassen sich erstmalig plättchenförmige Nanopartikel (Niodisks) bereitstellen, die einen Durchmesser von 20 bis 500 nm aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Nanopartikel (Niosomen bzw. Niodisks) einen Durchmesser zwischen 50 und 200 nm auf.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Mischung der ersten und zweiten Flüssigkeit in dem Mikromischer asymmetrisch. Dadurch erfolgt eine verbesserte Selbstorganisation des eingesetzten mindestens einen nicht-ionischen Tensids. Mit einer asymmetrischen Mischung ist eine Mischung mit einer unterschiedlichen Flussrate der ersten Flüssigkeit zur zweiten Flüssigkeit
10 gemeint.

Bevorzugt enthält der Mikromischer eine gemeinsame Abführung zur Ableitung des Gemisches der ersten und zweiten Flüssigkeit (nach Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens), wobei die gemeinsame Abführung optional
15 quer zu der Zuführung für die erste und/oder zweite Flüssigkeit angeordnet ist.

Das Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, dass in Schritt c) das Mischen der Flüssigkeiten zu einem Gemisch innerhalb eines Zeitraums von ≤ 5
20 sek, bevorzugt ≤ 2 sek, besonders bevorzugt ≤ 1 sek, erfolgt, wobei insbesondere mit einem Mikromischer gemäß DIN EN ISO 10991:2010-03 gemischt wird. Insbesondere bestehen der Mikromischer oder die den Mischraum begrenzenden (Wand-) Strukturen im Wesentlichen aus Edelstahl und/oder anderen inerten Materialien, wie z.B. Kunststoff (bevorzugt PEEK), Keramik, Metalle, Metalllegierungen und/oder Glas. Dies hat den Vorteil, dass ein breites
25 Spektrum an Tensiden und Lösungsmitteln eingesetzt werden kann, ohne eine zerstörende Wirkung auf den Mikromischer auszuüben. Ferner sind durch die mechanischen Eigenschaften von Metallen, Metalllegierungen, wie z. B. Edelstahl, auch sehr hohe Flussraten der Flüssigkeiten möglich, ohne den Mischer zu zerstören und Metalle und viele Metalllegierungen, wie z. B. Edelstahl, weisen zudem gute Wärmeübertragungseigenschaften auf, falls eine Temperierung vorteilhaft oder nötig ist. Auch eine Autoklavierung und/oder Reinigung ist mit diesen beständigen Materialien möglich.
30

35 Bevorzugt weist der Mikromischer einen oder mehrere Mischräume auf, die jeweils eine oder mehrere sich quer oder nicht parallel (z.B. schräg stehende)

zur Hauptströmungsrichtung (= primäre Strömungsrichtung über den gesamten Mischraum) erstreckende Strukturen enthalten, wobei die Strukturen bevorzugt eine Abmessung im Bereich von Mikrometern bis wenigen Millimetern (z.B. 1 µm bis 10 mm) aufweisen und besonders bevorzugt dazu geeignet sind, eine Flüssigkeitslamellenbildung und abwechselnd benachbarte Anlage-
5 sind, eine Flüssigkeitslamellenbildung und abwechselnd benachbarte Anlage-
rung der Flüssigkeitslamellen zu initiieren. Insbesondere sind die Strukturen (auch Mikrostrukturen genannt) in Stromrichtung abwärts der ersten und zweiten Zuführung und bevorzugt in Stromrichtung aufwärts der Abführung angeordnet. Im Falle von mehreren Mischräumen pro Mischer weist jeder
10 Mischraum bevorzugt Zuführungen und eine Abführung auf, wobei diese Zuführungen von einer Gesamtzuführung zum Mikromischer oder mehreren Einzelzuführungen zum Mischer gespeist werden können. Die Abführung aus dem Mischer kann bei mehreren Mischräumen über eine Gesamtabführung erfolgen, der zuvor alle Abführungen der einzelnen Mischräume zugeführt
15 werden, oder über einzelne Abführungen aus dem Mischer. Im Falle der Nutzung eines Mixers mit mehreren Mischräumen sind die im Folgenden verwendeten Formulierungen „Zuführung des Mikromischer“ zu verstehen als Zuführung zum Mischraum und gleichlautend im Zusammenhang mit der Abführung.

20 Im Falle des so genannten Slit-Interdigital-Micromixer (SIMM) zerteilen die interdigitalen Strukturen den Strom der ersten und zweiten Flüssigkeit in je mindestens zwei Teilströme und lagern die entstehenden Lamellen der Flüssigkeiten benachbart zueinander an. Die Mischung und Partikelbildung erfolgt
25 im Anschluss an diese (interdigitalen) Strukturen durch die Anlagerung der Lamellen der beiden Flüssigkeiten. Das resultierende Gemisch kann schließlich über eine Abführung den Mikromischer verlassen.

30 Der in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Mikromischer kann einen

- a) „split-recombine“-Mikromischer, bevorzugt einen „ramp-up/ramp-down“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen „caterpillar“-Mikromischer;
- b) Multilaminations-Mikromischer, bevorzugt einen „interdigital channel array“-Mikromischer und/oder „interdigital disk array“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen „slit“-Mikromischer, „triangular“-Mikromischer
35 und/oder „star laminator“-Mikromischer; und/oder

c) „jet collision“-Mikromischer, bevorzugt einen „tilted jets“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen „impinging jet“-Mikromischer; enthalten oder daraus bestehen. Technische Einzelheiten zu den aufgeführten Mikromischern sind im Stand der Technik bekannt und wurden u.a. beispielweise von der Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH vielfach beschrieben und gezeigt. Im Falle des Multilaminationsmischers bzw. „split-recombine“-Mikromischers sind die zugeführten Flüssigkeiten insbesondere durch Mikrostrukturen im Mischräum in eine Vielzahl benachbarter Fluidlamellen aufgespalten und alternierend zueinander angeordnet. In Betracht kommen unter anderem Mikromischer des Typs Caterpillar Split and Recombine Mixer (CPMM), Superfocus Interdigital Micro Mixer (SFIMM), Star Laminator (StarLam) oder Slit Interdigital Micro Mixer (SIMM) der ehemaligen Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, IMM, jetzt Fraunhofer ICT-IMM (z.B. IMM-Mischer mit der Bezeichnung CPMM-300 oder SIMM-V2).

In dem Verfahren kann der Mikromischer so betrieben werden, dass

- i) an der ersten Zuführung des Mikromischers, insbesondere einer ersten Zuführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers, die Flussrate der ersten Flüssigkeit $\geq 0,2$ mL/min, bevorzugt $\geq 0,4$ mL/min, besonders bevorzugt $\geq 0,8$ mL/min, insbesondere ≥ 1 mL/min; und/oder
- ii) an der zweiten Zuführung des Mikromischers, insbesondere einer zweiten Zuführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers, die Flussrate der zweiten Flüssigkeit ≥ 1 mL/min, bevorzugt ≥ 2 mL/min, besonders bevorzugt ≥ 4 mL/min, insbesondere ≥ 8 mL/min; und/oder
- iii) das Verhältnis der Flussrate der zweiten Flüssigkeit zur Flussrate der ersten Flüssigkeit $\leq 14:1$, bevorzugt $\leq 12:1$, besonders bevorzugt $\leq 10:1$, insbesondere $\leq 8:1$, wobei vorteilhafterweise das besagte Verhältnis während des Verfahrens konstant gehalten wird; und/oder
- iv) an einer Abführung des Mikromischers, insbesondere einer Abführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers (optional einer gemeinsamen Abführung), die Flussrate von ≥ 1 mL/min, bevorzugt ≥ 2 mL/min, besonders bevorzugt ≥ 4 mL/min, insbesondere ≥ 8 mL/min; beträgt.

Das mindestens eine nicht-ionische Tensid kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Polyoxyethylenalkohol, Polyoxyethylenester,

Polyoxyethylenether, Polyoxyethylenglykoether, Polyoxyethylenalkylether, Alkylethoxylat, Sorbitanfettsäureester, Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester, Polyoxyethylenfettsäureether und Mischungen hiervon, bevorzugt Sorbitanmonostearat, Polyoxyethylen-Sorbitanmonostearat
5 Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat, Polyoxyethylen-Sorbitanmonooleat, Polyoxyethylencetylether und Mischungen hiervon.

Die erste Flüssigkeit kann das mindestens eine nicht-ionische Tensid in einer Konzentration von ≥ 5 g/L, bevorzugt 10 bis 300 g/L, bevorzugt 20 bis 200 g/L,
10 besonders bevorzugt 30 bis 100 g/L, insbesondere 40 bis 60 g/L, enthalten.

Die erste Flüssigkeit (und/oder zweite Flüssigkeit), bevorzugt die erste Flüssigkeit, kann mindestens eine weitere oberflächenaktive Substanz enthalten, bevorzugt

- 15 a) ein weiteres nicht-ionisches Tensid; und/oder
b) ein kationisches Tensid, besonders bevorzugt Stearylamin und/oder Cetylpyridiniumchlorid; und/oder
c) ein anionisches Tensid, besonders bevorzugt Dicetylphosphat, Phosphatidsäure und/oder Cholsäure; und/oder
20 d) ein amphoter Tensid, besonders bevorzugt ein Betain und/oder Sultain; und/oder
e) ein Lipid, besonders bevorzugt ein Phospholipid; und/oder
f) Cholesterin, besonders bevorzugt derivatisiertes Cholesterin, insbesondere ethoxyliertes Cholesterin.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der mindestens einen weiteren oberflächenaktiven Substanz um Cholesterin, besonders bevorzugt derivatisiertes Cholesterin, insbesondere ethoxyliertes Cholesterin. Es wurde gefunden, dass sich Cholesterin bzw. ein Derivat hiervon als
30 mindestens eine weitere oberflächenaktive Substanz besonders gut dafür eignet, sphärische Nanopartikel (Niosomen) mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bereitzustellen.

Die Konzentration der mindestens einen weiteren oberflächenaktiven Substanz kann 2 bis 80 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 50 Gew.-%, besonders bevorzugt
35 10 bis 40 Gew.-%, in Bezug auf das Gesamtgewicht des mindestens einen

nicht-ionischen Tensids, betragen.

Die erste Flüssigkeit kann ferner

- 5
- i) mindestens ein organisches Lösungsmittel, bevorzugt ein organisches, mit Wasser-mischbares Lösungsmittel, besonders bevorzugt ein Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholen (besonders bevorzugt Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und/oder Methanol), Aceton, Tetrahydrofuran, Dioxan, Acetonitril und/oder Dimethylsulfoxid; und/oder
- 10
- ii) überkritisches CO₂;
enthalten.

Optional enthält die erste Flüssigkeit kein organisches Lösungsmittel oder gar kein Lösungsmittel.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erste und/oder zweite Flüssigkeit

- a) mindestens eine organische Wirksubstanz, bevorzugt ein Wirkstoff zur Behandlung einer Krankheit, besonders bevorzugt ein Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitamin, Protein, Peptid, Lipid, DNA, RNA, organisches Molekül mit einer Masse ≤ 500 Da und Mischungen hiervon; und/oder
- 20
- b) mindestens eine anorganische Wirksubstanz, bevorzugt eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus magnetischer Substanz, paramagnetischer Substanz und Mischungen hiervon, besonders bevorzugt Eisenoxid, Manganoxid und Mischungen hiervon.
- 25

Die Konzentration der mindestens einen organischen Wirksubstanz und/oder mindestens einen anorganischen Wirksubstanz kann ≥ 1 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, insbesondere 15 bis 30 Gew.-%, in Bezug auf das Gesamtgewicht des mindestens einen nicht-ionischen Tensids, betragen.

30

Die zweite Flüssigkeit kann

- 35
- a) eine Puffersubstanz, bevorzugt Citrat, Phosphat, Carbonat, Cacodylat, Acetat, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-

piperazinethanesulfonsäure, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und/oder 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure; und/oder
b) einen osmotisch aktiven Hilfsstoff, bevorzugt Natriumchlorid und/oder Mannit;
5 enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch gekennzeichnet sein, dass während des Verfahrens mindestens eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 10 i) Rezeptor für einen Ligand (z.B. ein Transmembranrezeptor);
ii) Ligand für einen Rezeptor (z.B. ein Ligand für einen Transmembranrezeptor); und
iii) Mischungen hiervon;

15 zumindest bereichsweise in die Doppelmembran der Nanopartikel eingebaut wird, bevorzugt durch Zugabe der mindestens einen Substanz in einem der Schritte a) bis c). Durch diese Maßnahme kann das Targeting der Nanopartikel zu einem bestimmten biologischen Target (z.B. Rezeptor und/oder Ligand an der Oberfläche einer biologischen Zelle) verbessert werden.

20 In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann in dem Schritt a), b) und/oder c), bevorzugt in den Schritten a) bis c), auf eine Temperatur von 10 °C bis 100 °C, bevorzugt 15 bis 80 °C, besonders bevorzugt 20 bis 50 °C, insbesondere 20 °C bis 40 °C, temperiert werden. Die Temperatur wird je nach verwendetem Tensid gewählt und bevorzugt auch im Hinblick auf die mindestens eine organi-
25 sche Wirksubstanz und/oder anorganische Wirksubstanz bzw. den in die Doppelmembran einzubauenden Rezeptor und/oder Liganden.

In einem weiteren Schritt nach Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens können die Nanopartikel aufgereinigt werden, bevorzugt über Diafiltration,
30 Ultrafiltration, Gelfiltration und/oder Evaporation. Besonders bevorzugt werden die Nanopartikel von nicht an die Nanopartikel gebundenen Substanzen, insbesondere mindestens einem organischen Lösungsmittel, befreit. Eine Aufreinigung von wasserlöslichen Komponenten erfolgt bevorzugt über Gelfiltration.

35

5 Erfindungsgemäß werden zudem plättchenförmige Nanopartikel bereitgestellt, die eine Doppelmembran enthalten, wobei die Doppelmembran ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht, dadurch gekennzeichnet, dass die plättchenförmigen Nanopartikel einen Durchmesser von 20 bis 500 nm aufweisen.

10 Die plättchenförmigen Nanopartikel können einen Durchmesser von 30 bis 200 nm, bevorzugt 50 bis 150 nm aufweisen. Die Dicke der Scheiben beträgt für gewöhnlich weniger als 10 nm, kann jedoch durch Einlagerung hydrophober Agenzien zu einem gewissen Grad beeinflusst werden. Folglich weisen die erfindungsgemäßen plättchenförmigen Nanopartikel bevorzugt eine Dicke von 1 bis 20 nm, bevorzugt eine Dicke von 2 bis 10 nm auf.

15 Der Durchmesser der Nanopartikel kann mit dynamischer Lichtstreuung und/oder cryogener Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) bestimmt werden. Bevorzugt wird der Durchmesser mit cryogener Transmissionselektronenmikroskopie bestimmt, da dieses Verfahren gerade bei plättchenförmigen Nanopartikeln die wahren Werte für die größte Querschnittsabmessung einzelner Nanopartikel liefert.

20 Die Nanopartikel können ≥ 1 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, insbesondere 15 bis 30 Gew.-%, in Bezug auf das Gesamtgewicht des mindestens einen nicht-ionischen Tensids, mindestens eine organische Wirksubstanz und/oder mindestens eine anorganische Wirksubstanz enthalten, wobei die mindestens eine organische Wirksubstanz und/oder mindestens eine anorganische Wirksubstanz bevorzugt zumindest bereichsweise in der Doppelmembran der Nanopartikel angeordnet ist.

30 Die plättchenförmigen Nanopartikel sind bevorzugt durch das erfindungsgemäße Verfahren herstellbar.

35 Insbesondere eignen sich die erfindungsgemäßen Nanopartikel zur Verwendung in der Medizin, bevorzugt zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, besonders bevorzugt

- a) zur Applikation von einem Wirkstoff, besonders bevorzugt zur topischen Applikation von einem Wirkstoff, besonders bevorzugt zur transdermalen Applikation von einem Wirkstoff; und/oder
- b) zum Targeting von einem Wirkstoff; und/oder
- 5 c) zur Freisetzung von einem Wirkstoff;

in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers. Hierbei enthält der Wirkstoff bevorzugt einen Impfstoff und/oder ein Biotherapeutikum oder besteht daraus. Insbesondere handelt es sich bei der Behandlung um die Behandlung von Krebs, einer

10 inflammatorischen Erkrankung, einer Erkrankung des Immunsystems und/oder eine neurodegenerative Erkrankung. Der Vorteil der Niodisks ist hierbei, dass sie im Vergleich zu Niosomen eine wesentlich größere ebene Kontaktfläche exponieren (Oberseite und Unterseite der Niodisks), was eine Andockung an biologische Zellen (vor allem solchen mit ebenfalls ebener

15 Oberfläche, wie z.B. Epithelzellen) erleichtert und verstärkt.

Ferner eignen sich die erfindungsgemäßen Nanopartikel zur Verwendung in der Behandlung von Krebs, in der Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen und/oder in der Impfung.

20

Darüberhinaus wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Nanopartikel in einem Diagnostizierverfahren vorgeschlagen bevorzugt in einem Diagnostizierverfahren, das am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen wird, insbesondere in einem Diagnostizierverfahren, in dem die Nanopartikel einen Biomarker enthalten. Die Nanopartikel sind beispielsweise als Kontrastmittel geeignet, wenn sie z.B. magnetische Nanopartikel als anorganische Wirksubstanz enthalten.

25

Ferner wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Nanopartikel in der Kosmetik vorgeschlagen.

30

Es kommt darüberhinaus eine Verwendung der erfindungsgemäßen Nanopartikel

- a) zur Verkapselung mindestens einer Substanz; und/oder
- 35 b) zum Targeting mindestens einer Substanz; und/oder
- c) zur Freisetzung mindestens einer Substanz; und/oder

d) Herstellung eines Kompositmaterials;
in Betracht.

5 Hierbei ist die mindestens eine Substanz bevorzugt ein Biomarker und es handelt sich bei der Verwendung optional um eine *in-vitro*-Verwendung. Hervorragend sind die Nanopartikel zur Freisetzung von mindestens einer Substanz geeignet geeignet, wenn sie z.B. magnetische Nanopartikel enthalten (Freisetzung wird über Magnetismus gesteuert).

10 Anhand der nachfolgenden Figuren und Beispiele soll der erfindungsgemäße Gegenstand näher erläutert werden, ohne diesen auf die hier dargestellten spezifischen Ausführungsformen einschränken zu wollen.

15 Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens. Die erste Flüssigkeit 1 enthält nicht-ionisches Tensid und n-Propanol als Lösungsmittel. Die zweite Flüssigkeit 2 enthält nur Wasser. Die erste und zweite Flüssigkeit 1, 2 werden jeweils mit einer bestimmten Flussrate über eine Pumpe in einen Mikromischer 3 gepumpt. Als Mikromischer 3 wird ein Multilaminations-Mikromischer (genauer: „split-and-recombine“-
20 Mikromischer) eingesetzt. Nach der Passage des Mikromischers 3 erfolgt die Separation der Nanopartikel 5 von dem organischen Lösungsmittel n-Propanol 6 über mindestens eine Reinigungsvorrichtung 4 (Ultrafiltrations-, Gelfiltrations- und/oder Evaporationsvorrichtung). Die Separation erfolgt hier kontinuierlich im direkten Anschluss, kann aber separat in einem weiteren Schritt
25 erfolgen.

30 Figur 2 zeigt eine Cryo-TEM-Aufnahme von über das erfindungsgemäße Verfahren herstellbare Nanopartikel (hier: Niosomen). Es sind vesikuläre Strukturen zu erkennen, die vorwiegend unilamellar, jedoch aufgrund der recht hohen Ausgangskonzentration auch zum Teil bilamellar sind. In der Lichtstreuung wurde für diese Probe ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von 112 nm ermittelt.

35 Figur 3 zeigt die Möglichkeit der größenkontrollierten Herstellung von Nanopartikeln (hier: Niosomen) durch das erfindungsgemäße Verfahren. Dargestellt ist der z-gemittelte hydrodynamische Radius (ermittelt aus der dynami-

5 schen Lichtstreuung) der Niosomen in Abhängigkeit von der Gesamtflussrate bei der Herstellung im Mikromischer. Es wird deutlich, dass bei ansonsten konstanten Bedingungen (Ausgangskonzentration, Temperatur, Mischverhältnis) die Größe der Niosomen über die Variation der Gesamtflussrate eingestellt werden kann.

10 Figur 4 zeigt eine Cryo-TEM-Aufnahme von erfindungsgemäßen Nanopartikeln (Niodisks). Mit dem Pfeil ist eine Tensidscheibe exemplarisch gekennzeichnet. Die Durchmesser, der hier abgebildeten Scheiben liegen bei ca. 50 - 120 nm. In der dynamischen Lichtstreuung wurde für diese Probe ein mittlerer hydrodynamischer kugeläquivalenter Durchmesser von 132 nm ermittelt.

15 Figur 5 zeigt die Möglichkeit der größenkontrollierten Herstellung von Nanopartikeln (hier: Niodisks) durch das erfindungsgemäße Verfahren. Dargestellt ist der z-gemittelte hydrodynamische Radius (ermittelt über dynamische Lichtstreuung) der Niodisks in Abhängigkeit von der Gesamtflussrate bei der Herstellung im Mikromischer. Es wird deutlich, dass bei ansonsten konstanten Bedingungen (Ausgangskonzentration, Temperatur, Mischverhältnis) die Größe der Niodisks über die Variation der Gesamtflussrate eingestellt werden kann.

20 Figur 6 zeigt drei Cryo-TEM Aufnahmen von erfindungsgemäßen Niodisks, welche die gleiche Probe unter verschiedenen Verkippungen der Probe im Cryo-TEM-Halter abbilden. Durch die Verkippung wird der Scheibencharakter der Nanopartikel bewiesen. Beispielhaft ist mit dem Pfeil ein bestimmtes Nanopartikel gekennzeichnet, das in den drei Abbildungen aus unterschiedlichen Perspektiven dargestellt ist (linkes Bild: 0° Verkippung, mittleres Bild 10° Verkippung, rechtes Bild 30° Verkippung).

30 Beispiel 1 – Herstellung von Niosomen über das erfindungsgemäße Verfahren

Ausgangslösung A: 45 g/L Span-60 und 15 g/L Cholesterol in n-Propanol.

Ausgangslösung B: entgastetes Wasser.

35 Alle Ausgangslösungen wurden auf 50 °C vorgeheizt, die Partikelbildung erfolgte bei 50 °C. Pumpe A wurde mit 5 ml/min, Pumpe B mit 0,63 ml/min be-

trieben. Die aufgefangene Probe wurde anschließend zur Entfernung des Restgehaltes an n-Propanol gegen Wasser dialysiert.

5 Bei gleichbleibenden Konditionen, nur durch Variation der Gesamtflussrate, lässt sich auch hier der mittlere hydrodynamische Durchmesser nahezu stufenlos einstellen (siehe Fig. 3).

Beispiel 2 – Herstellung von Niodisks über das erfindungsgemäße Verfahren

10 Ausgangslösung A: 45 g/L Span-60 in n-Propanol.
Ausgangslösung B: entgastes Wasser.

15 Alle Ausgangslösungen wurden auf 50 °C vorgeheizt, die Partikelbildung erfolgte bei 50 °C. Pumpe A wurde mit 7,2 ml/min, Pumpe B mit 0,9 ml/min betrieben. Die aufgefangene Probe wurde anschließend zur Entfernung des Restgehaltes an n-Propanol gegen Wasser dialysiert.

Bei gleichbleibenden Konditionen, nur durch Variation der Gesamtflussrate, lässt sich der mittlere hydrodynamische kugeläquivalente Radius nahezu stufenlos einstellen (siehe Fig. 5).

20 In die Niodisks können problemlos (vor allem hydrophobe) Substanzen eingebaut werden. So konnten beispielsweise unproblematisch Niodisks mit 20 Gew.-% (bezogen auf die Tensidkonzentration) Vitamin-A-Palmitat hergestellt werden.

Patentansprüche

5

1. Kontinuierliches Verfahren zur Herstellung von supramolekularen Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 20 nm bis 500 nm enthaltend eine Doppelmembran, wobei die Doppelmembran ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht, umfassend die Schritte

10

a) Bereitstellen einer ersten Flüssigkeit, die mindestens ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht;

b) Bereitstellen einer zweiten Flüssigkeit, die Wasser enthält oder daraus besteht; und

15

c) Mischen der Flüssigkeiten aus a) und b) zu einem Gemisch in einem Mikromischer;

dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer eine erste Zuführung für die erste Flüssigkeit und eine zweite Zuführung für die zweite Flüssigkeit aufweist, wobei an der ersten Zuführung des Mikromischers die Flussrate der ersten Flüssigkeit auf $\geq 0,1$ mL/min eingestellt wird, wodurch in Schritt c) Nanopartikel gebildet werden, die eine Doppelmembran enthalten, wobei die Doppelmembran das nicht-ionische Tensid enthält oder daraus besteht.

20

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) das Mischen der Flüssigkeiten zu einem Gemisch innerhalb eines Zeitraums von ≤ 5 sek, bevorzugt ≤ 2 sek, besonders bevorzugt ≤ 1 sek, erfolgt, wobei insbesondere mit einem Mikromischer gemäß DIN EN ISO 10991:2010-03 gemischt wird.

25

3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer einen oder mehrere Mischräume aufweist, die jeweils eine oder mehrere sich quer oder nicht parallel zur Hauptströmungsrichtung erstreckende Strukturen enthalten, wobei die Strukturen bevorzugt eine Abmessung im Bereich von Mikro-

30

metern bis wenigen Millimetern aufweisen und besonders bevorzugt dazu geeignet sind, eine Flüssigkeitslamellenbildung und abwechselnd benachbarte Anlagerung der Flüssigkeitslamellen zu initiieren.

- 5 4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer
- a) eine gemeinsame Abführung zur Ableitung des Gemisches der ersten und zweiten Flüssigkeit enthält, wobei die gemeinsame Abführung bevorzugt quer zu der Zuführung für die erste und/oder zweite Flüssigkeit angeordnet ist; und/oder
- 10 b) eine oder mehrere sich quer zur Strömungsrichtung erstreckende Mischstrukturen aufweist, die bevorzugt eine Abmessung im Bereich von Mikrometern bis wenigen Millimetern aufweisen und besonders bevorzugt dazu geeignet sind, die erste und/oder zweite Flüssigkeit in eine Richtung quer zur Strömungsrichtung abzulenken.
- 15 5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer einen
- a) „split-recombine“-Mikromischer, bevorzugt einen „ramp-up/ramp-down“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen
- 20 „caterpillar“-Mikromischer; und/oder
- b) Multilaminations-Mikromischer, bevorzugt einen „interdigital channel array“-Mikromischer und/oder „interdigital disk array“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen „slit“-Mikromischer, „triangular“-Mikromischer und/oder „star laminator“-
- 25 Mikromischer; und/oder
- c) „jet collision“-Mikromischer, bevorzugt einen „tilted jets“-Mikromischer, besonders bevorzugt einen „impinging jet“-Mikromischer;
- enthält oder daraus besteht.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikromischer so betrieben wird, dass
- 5
- i) an der ersten Zuführung des Mikromischers, insbesondere einer ersten Zuführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers, die Flussrate der ersten Flüssigkeit $\geq 0,2$ mL/min, bevorzugt $\geq 0,4$ mL/min, besonders bevorzugt $\geq 0,8$ mL/min, insbesondere ≥ 1 mL/min; und/oder
- 10
- ii) an einer zweiten Zuführung des Mikromischers, insbesondere einer zweiten Zuführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers, die Flussrate der zweiten Flüssigkeit ≥ 1 mL/min, bevorzugt ≥ 2 mL/min, besonders bevorzugt ≥ 4 mL/min, insbesondere ≥ 8 mL/min; und/oder
- 15
- iii) das Verhältnis der Flussrate der zweiten Flüssigkeit zur Flussrate der ersten Flüssigkeit $\leq 14:1$, bevorzugt $\leq 12:1$, besonders bevorzugt $\leq 10:1$, insbesondere $\leq 8:1$; und/oder
- 20
- iv) an einer Abführung des Mikromischers, insbesondere einer Abführung einer oder mehrerer Mischräume des Mikromischers, die Flussrate von ≥ 1 mL/min, bevorzugt ≥ 2 mL/min, besonders bevorzugt ≥ 4 mL/min, insbesondere ≥ 8 mL/min; beträgt.
7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Flüssigkeit ein nicht-ionische Tensid enthält, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
- 25
- Polyoxyethylenalkohol, Polyoxyethylenester, Polyoxyethylenether, Polyoxyethylenglykolether, Polyoxyethylenalkylether, Alkylethoxylat, Sorbitanfettsäureester, Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester, Polyoxyethylenfettsäureether und Mischungen hiervon, bevorzugt Sorbitanmonostearat, Polyoxyethylen-Sorbitanmonostearat
- 30
- Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat, Polyoxyethylen-Sorbitanmonooleat, Polyoxyethylencetylether und Mischungen hiervon.

- 5 8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Flüssigkeit nicht-ionisches Tensid in einer Konzentration von ≥ 5 g/L, bevorzugt 10 bis 300 g/L, bevorzugt 20 bis 200 g/L, besonders bevorzugt 30 bis 100 g/L, insbesondere 40 bis 60 g/L, enthält oder daraus besteht.
- 10 9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Flüssigkeit mindestens eine weitere oberflächenaktive Substanz enthält, bevorzugt
- 15 a) ein weiteres nicht-ionisches Tensid; und/oder
- b) ein kationisches Tensid, besonders bevorzugt Stearylamin und/oder Cetylpyridiniumchlorid; und/oder
- c) ein anionisches Tensid, besonders bevorzugt Dicetylphosphat, Phosphatidsäure und/oder Cholsäure; und/oder
- 20 d) ein amphoterer Tensid, besonders bevorzugt ein Betain und/oder Sultain; und/oder
- e) ein Lipid, besonders bevorzugt ein Phospholipid; und/oder
- f) Cholesterin, besonders bevorzugt derivatisiertes Cholesterin, insbesondere ethoxyliertes Cholesterin;
- 25 enthält, wobei die Konzentration der mindestens einen weiteren oberflächenaktiven Substanz 2 bis 80 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 50 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 30 Gew.-%, in Bezug auf das Gesamtgewicht des mindestens einen nicht-ionischen Tensids, beträgt.
- 30 10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Flüssigkeit
- i) mindestens ein organisches Lösungsmittel, bevorzugt ein organisches, mit Wasser-mischbares Lösungsmittel, besonders bevorzugt ein Lösungsmittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkoholen, besonders bevorzugt Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol, und/oder Methanol, Aceton, Tetrahydrofuran, Dioxan, Acetonitril, Dimethylsulfoxid; und/oder

ii) überkritisches CO₂;

enthält, wobei die erste Flüssigkeit optional kein organisches Lösungsmittel oder gar kein Lösungsmittel enthält.

5 11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste und/oder zweite Flüssigkeit

10 a) mindestens eine organische Wirksubstanz, bevorzugt ein Wirkstoff zur Behandlung einer Krankheit, besonders bevorzugt ein Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Vitamin, Protein, Peptid, Lipid, DNA, RNA, organisches Molekül mit einer Masse ≤ 500 Da und Mischungen hiervon; und/oder

15 b) mindestens eine anorganische Wirksubstanz, bevorzugt eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus magnetischer Substanz, paramagnetischer Substanz und Mischungen hiervon, besonders bevorzugt Eisenoxid, Manganoxid und Mischungen hiervon;

20 enthält, wobei die Konzentration der mindestens einen organischen Wirksubstanz und/oder mindestens einen anorganischen Wirksubstanz ≥ 1 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, insbesondere 15 bis 30 Gew.-%, in Bezug auf das Gesamtgewicht des mindestens einen nicht-ionischen Tensids, beträgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Flüssigkeit

25 a) eine Puffersubstanz, bevorzugt Citrat, Phosphat, Carbonat, Cacodylat, Acetat, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonsäure, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und/oder 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure; und/oder

b) einen osmotisch aktiven Hilfsstoff, bevorzugt Natriumchlorid und/oder Mannit;

30 enthält.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass während des Verfahrens mindestens eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 5 i) Rezeptor für einen Ligand;
- ii) Ligand für einen Rezeptor; und
- iii) Mischungen hiervon;
- zumindest bereichsweise in die Doppelmembran der Nanopartikel eingebaut wird, bevorzugt durch Zugabe der mindestens einen Substanz in einem der Schritte a) bis c).
14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Schritt a), b) und/oder c), bevorzugt in den Schritten a) bis c), auf eine Temperatur von 10 °C bis 100 °C, bevorzugt 15 bis 80 °C, besonders bevorzugt 20 bis 50 °C, insbesondere 20 °C bis 40 °C, temperiert wird.
15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel in einem weiteren Schritt nach Schritt c) aufgereinigt werden, bevorzugt über Diafiltration, Ultrafiltration, Gelfiltration und/oder Evaporation, wobei die Nanopartikel besonders bevorzugt von nicht an die Nanopartikel gebundenen Substanzen, insbesondere mindestens einem organischen Lösungsmittel, befreit werden.
- 20
16. Plättchenförmige Nanopartikel enthaltend eine Doppelmembran, wobei die Doppelmembran ein nicht-ionisches Tensid enthält oder daraus besteht, dadurch gekennzeichnet, dass die plättchenförmigen Nanopartikel einen Durchmesser von 20 bis 500 nm aufweisen.
- 25
17. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die plättchenförmigen Nanopartikel
- i) einen Durchmesser von 30 bis 200 nm, bevorzugt 50 bis 150 nm; und/oder
- 30 ii) eine Dicke von 1 bis 20 nm, bevorzugt eine Dicke von 2 bis 10 nm;

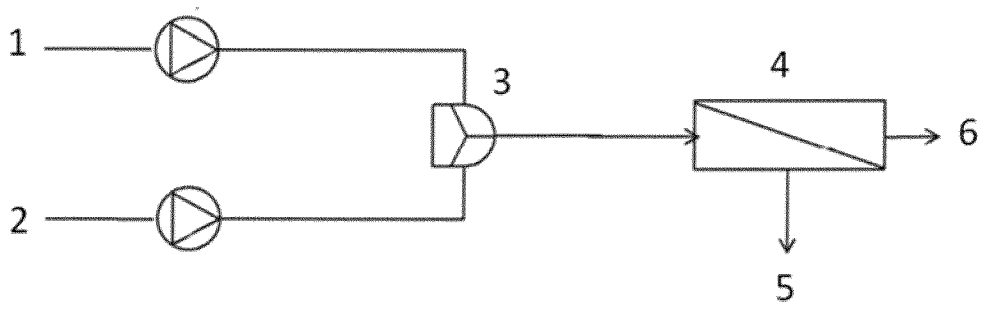
aufweisen.

- 5 18. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 oder 17, wobei der Durchmesser das Ergebnis einer Messung mit dynamischer Lichtstreuung und/oder cryogener Transmissionselektronenmikroskopie ist, bevorzugt das Ergebnis einer Messung mit cryogener Transmissionselektronenmikroskopie.
- 10 19. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel ≥ 1 Gew.-%, bevorzugt 5 bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 60 Gew.-%, insbesondere 15 bis 40 Gew.-%, in Bezug auf die Gesamtmenge des mindestens einen nicht-ionischen Tensids, mindestens einer organischen Wirksubstanz und/oder mindestens einer anorganischen Wirksubstanz enthalten, wobei die mindestens eine organische Wirksubstanz und/oder mindestens eine anorganische Wirksubstanz bevorzugt zumindest bereichsweise in der Doppelmembran der Nanopartikel angeordnet ist.
- 15 20. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 herstellbar sind.
- 20 21. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Verwendung in der Medizin, bevorzugt zur Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, besonders bevorzugt
- 25 a) zur Applikation von einem Wirkstoff, besonders bevorzugt zur topischen Applikation von einem Wirkstoff; und/oder
- b) zum Targeting von einem Wirkstoff; und/oder
- c) zur Freisetzung von einem Wirkstoff;
- 30 in einem Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, wobei der Wirkstoff bevorzugt ein Impfstoff und/oder Biotherapeutikum enthält oder daraus besteht und es sich bei der Behandlung insbesondere um die Behandlung von Krebs, einer inflammatorischen Erkrankung, einer Er-

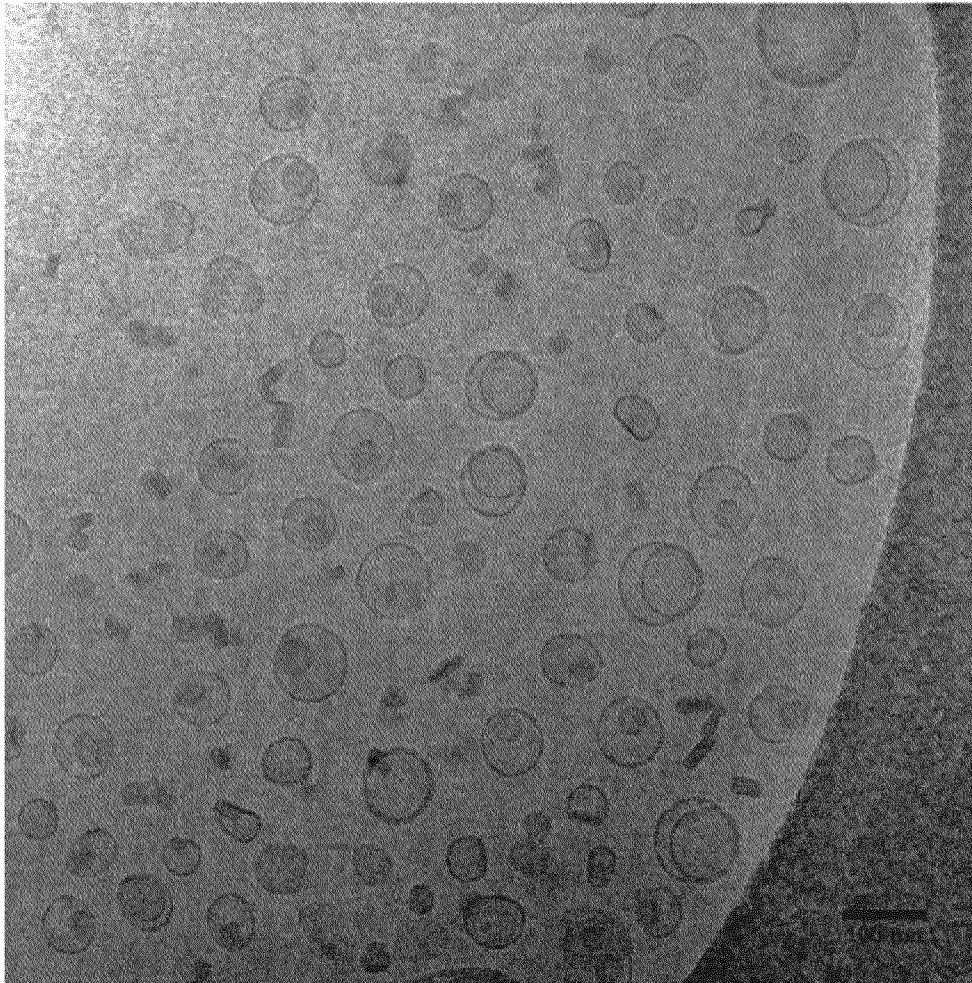
krankung des Immunsystems und/oder eine neurodegenerative Erkrankung handelt.

- 5
22. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Verwendung in der Behandlung von Krebs, in der Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen und/oder in der Impfung.
- 10
23. Plättchenförmige Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Verwendung in einem Diagnostizierverfahren, bevorzugt in einem Diagnostizierverfahren, das am menschlichen oder tierischen Körper vorgenommen wird, insbesondere an einem Diagnostizierverfahren, in dem die Nanopartikel einen Biomarker enthalten.
24. Verwendung der Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20 in der Kosmetik.
- 15
25. Verwendung der Nanopartikel gemäß einem der Ansprüche 16 bis 20
- a) zur Verkapselung mindestens einer Substanz; und/oder
 - b) zum Targeting mindestens einer Substanz; und/oder
 - c) zur Freisetzung mindestens einer Substanz; und/oder
 - d) Herstellung eines Kompositmaterials;
- wobei die mindestens eine Substanz bevorzugt ein Biomarker ist und es sich bei der Verwendung optional um eine *in-vitro*-Verwendung handelt.
- 20

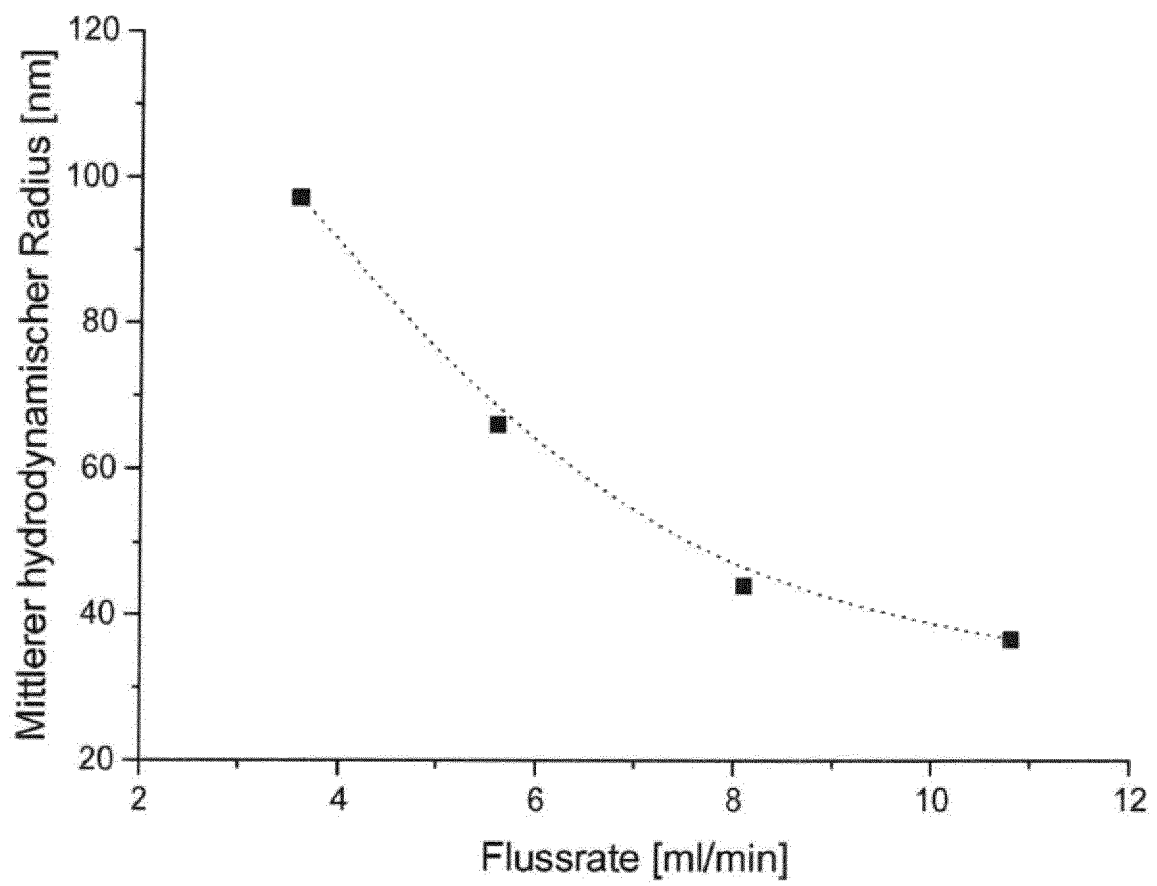
Figur 1



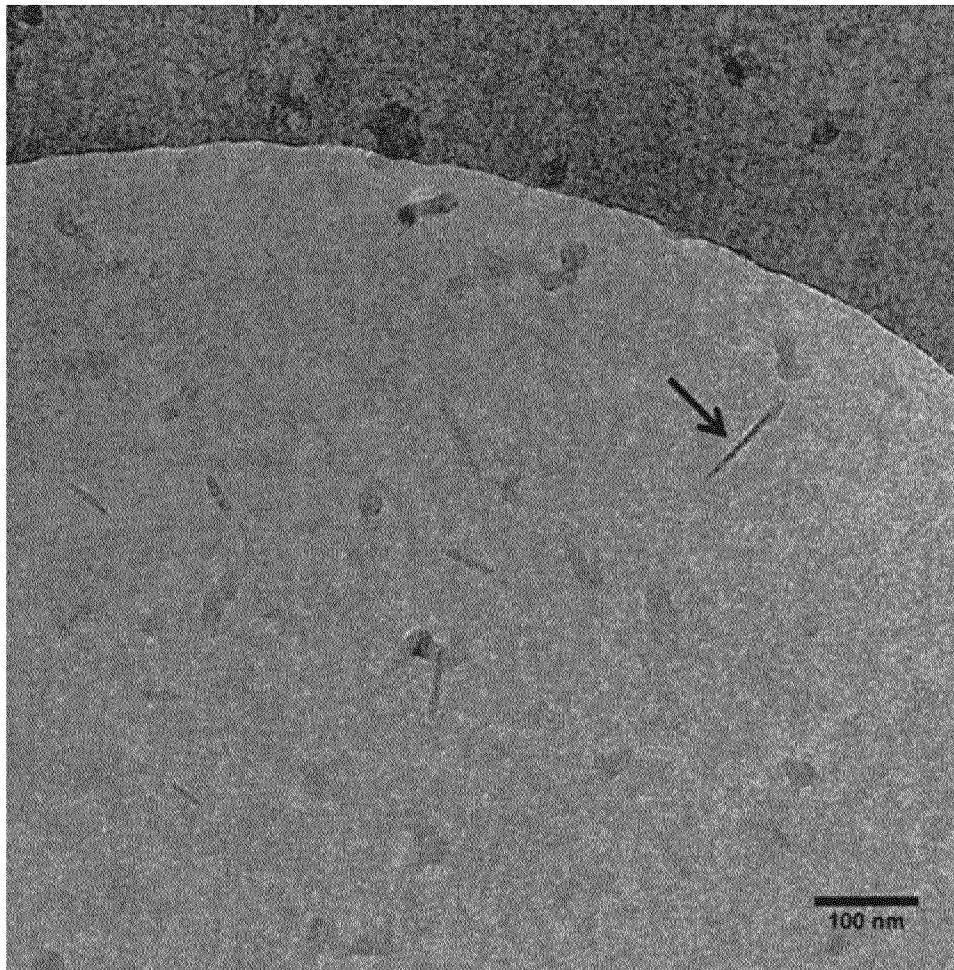
Figur 2



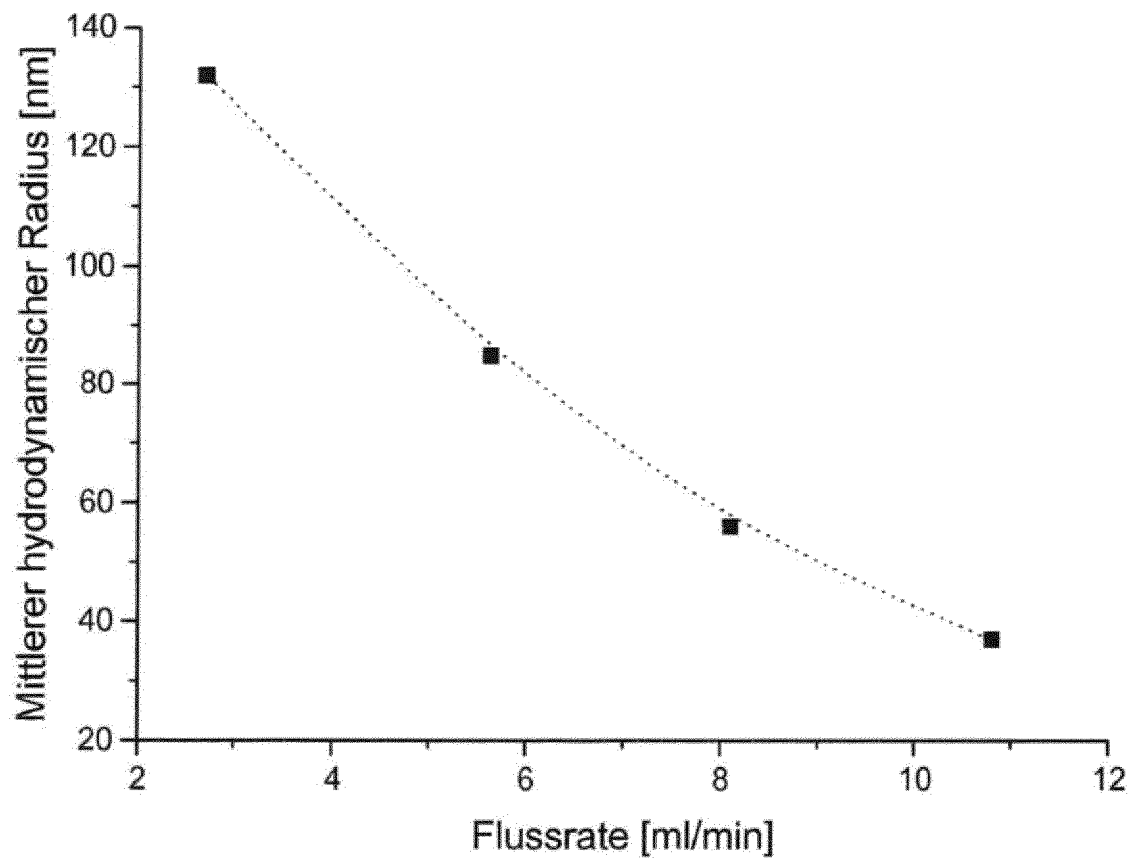
Figur 3



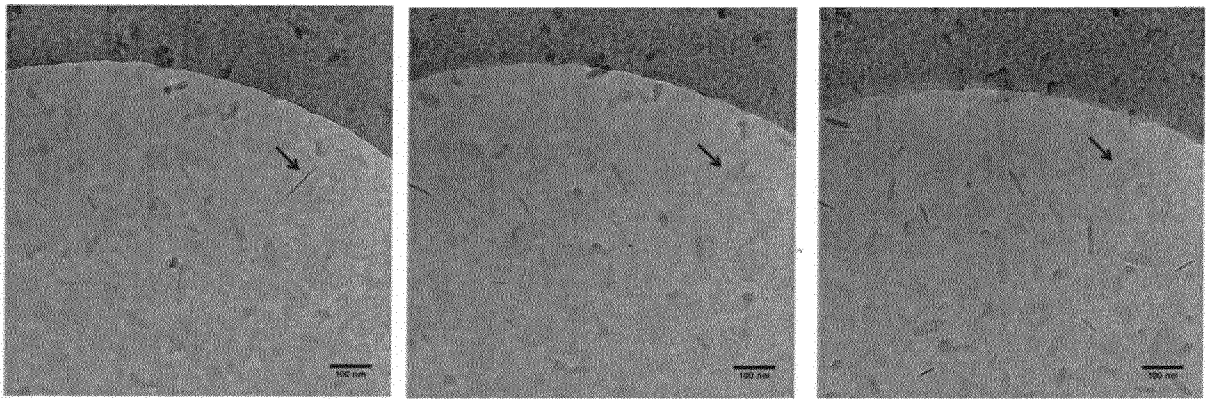
Figur 4



Figur 5



Figur 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/081743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K9/127 B01F13/00 B01F3/08
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)
A61K B01F B01J
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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/059922 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]) 2 May 2013 (2013-05-02) page 10, paragraph 3 - paragraph 7; claims 1, 2, 11, 25-30, 38-59, 68, 69, 86-90 -----	1-25
A	US 2004/228882 A1 (QIU DONGMING [US] ET AL) 18 November 2004 (2004-11-18) paragraph [0090] - paragraph [0098]; claims 1, 9, 10, 26-32 -----	1-25
A	EP 1 180 062 B1 (SCHERING AG [DE]) 10 March 2004 (2004-03-10) claims 1, 2, 5-14, 17, 24; examples ----- -/--	1-25

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 application or patent 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 18 April 2017	Date of mailing of the international search report 02/05/2017
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 Couckuyt, Philippe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/081743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GANNU P. KUMAR ET AL.: "Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery, an overview", ACTA PHARMACEUTICA SINICA B, vol. 1, no. 4, 30 September 2011 (2011-09-30), pages 208-219, XP002768337, Zusammenfassung; page 210, paragraph 3 - page 211, paragraph 3.9</p> <p>-----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/081743

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013059922	A1	02-05-2013	CA 2853316 A1 02-05-2013
			EP 2770980 A1 03-09-2014
			EP 3069785 A1 21-09-2016
			JP 2015502337 A 22-01-2015
			US 2014328759 A1 06-11-2014
			US 2016214103 A1 28-07-2016
			WO 2013059922 A1 02-05-2013

US 2004228882	A1	18-11-2004	CA 2747874 A1 02-12-2004
			CN 1822893 A 23-08-2006
			EP 2266684 A2 29-12-2010
			EP 2266685 A2 29-12-2010
			US 2004228882 A1 18-11-2004

EP 1180062	B1	10-03-2004	AT 261337 T 15-03-2004
			AU 5804300 A 18-12-2000
			DE 19925184 A1 30-11-2000
			DK 1180062 T3 05-07-2004
			EP 1180062 A1 20-02-2002
			ES 2216907 T3 01-11-2004
			JP 2003500202 A 07-01-2003
			PT 1180062 E 31-08-2004
			WO 0072955 A1 07-12-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A61K9/127 B01F13/00 B01F3/08 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A61K B01F B01J		
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, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2013/059922 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]) 2. Mai 2013 (2013-05-02) Seite 10, Absatz 3 - Absatz 7; Ansprüche 1, 2, 11, 25-30, 38-59, 68, 69, 86-90 -----	1-25
A	US 2004/228882 A1 (QIU DONGMING [US] ET AL) 18. November 2004 (2004-11-18) Absatz [0090] - Absatz [0098]; Ansprüche 1, 9, 10, 26-32 -----	1-25
A	EP 1 180 062 B1 (SCHERING AG [DE]) 10. März 2004 (2004-03-10) Ansprüche 1, 2, 5-14, 17, 24; Beispiele ----- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 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 18. April 2017		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 02/05/2017
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 Couckuyt, Philippe

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GANNU P. KUMAR ET AL.: "Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery, an overview", ACTA PHARMACEUTICA SINICA B, Bd. 1, Nr. 4, 30. September 2011 (2011-09-30), Seiten 208-219, XP002768337, Zusammenfassung; Seite 210, Absatz 3 - Seite 211, Absatz 3.9</p> <p>-----</p>	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/081743

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2013059922 A1	02-05-2013	CA 2853316 A1	02-05-2013
		EP 2770980 A1	03-09-2014
		EP 3069785 A1	21-09-2016
		JP 2015502337 A	22-01-2015
		US 2014328759 A1	06-11-2014
		US 2016214103 A1	28-07-2016
		WO 2013059922 A1	02-05-2013
US 2004228882 A1	18-11-2004	CA 2747874 A1	02-12-2004
		CN 1822893 A	23-08-2006
		EP 2266684 A2	29-12-2010
		EP 2266685 A2	29-12-2010
		US 2004228882 A1	18-11-2004
EP 1180062 B1	10-03-2004	AT 261337 T	15-03-2004
		AU 5804300 A	18-12-2000
		DE 19925184 A1	30-11-2000
		DK 1180062 T3	05-07-2004
		EP 1180062 A1	20-02-2002
		ES 2216907 T3	01-11-2004
		JP 2003500202 A	07-01-2003
		PT 1180062 E	31-08-2004
		WO 0072955 A1	07-12-2000