(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
24. Juni 2021 (24.06.2021)

WIPO | PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2021/121646 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
H01M 2/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2020/000212

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. Dezember 2020 (17.12.2020)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
19000577.7 19. Dezember 2019 (19.12.2019) EP

(71) Anmelder: **CAPCO BIO GMBH**; Ramie-Str. 39, 79312 Emmendingen (DE). **ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG** [DE/DE]; Friedrichstrasse 39, 79098 Freiburg (DE).

(72) Erfinder: **NAZARENKO, Irina**; Am Ohrensbächle 22, 79286 Glottertal (DE). **KLAPPROTH, Holger**; Kehler Strasse 12, 79108 Freiburg (DE). **MARTIN, Arnold**; Ramie-Str. 39, 79312 Emmendingen (DE).

(74) Anwalt: **HUWER & PARTNER PATENT- UND RECHTSANWÄLTE PARTG MBB**; Schwaighofstrasse 1, 79100 Freiburg im Breisgau (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, IT, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

(54) **Title:** DETERMINING CAPSULE SPECIFICITY FOR SPECIFIC CELL TYPES

(54) **Bezeichnung:** BESTIMMUNG DER KAPSELSPEZIFITÄT FÜR SPEZIFISCHE ZELLTYPEN

(57) **Abstract:** The aim of the invention is to provide transfer capsules which are received by the target cell type and which permanently or transiently modify the target cell without thereby having toxic effects on the specific target cell type. The solution according to the invention consists in using monodisperse cores in order to produce polyelectrolyte nanocapsules with cell-specific sizes therefrom, wherein the sizes for hematopoietic cells range from 20-80 nm, preferably from 40-60 nm. The sizes of the particles must lie in a very narrow range in order to prevent toxic effects from occurring. In order to keep the toxicity of the nanocapsules low, it is additionally important to remove the nanoparticles around which the capsules (cores) have been produced prior to use. Methods for this purpose are known from the prior art (e.g. a removal using EDTA). Another aim of the invention is to stabilize the transfer capsules. The solution according to the invention consists in modifying the capsules, the layers, and/or the cargo to be packaged using functional groups, thereby allowing a stabilization and thus a long-term storage at room temperature. A third aim of the invention is to introduce the transfer capsules in a controlled manner. The solution according to the invention is to functionalize the layers via chemical modifications and/or supplement the layers with antibodies, proteins, or peptides.

(57) **Zusammenfassung:** Die Aufgabe der Erfindung ist damit die Bereitstellung eines von Transferkapseln die vom Zielzelltyp aufgenommen werden und die Zielzelle dauerhaft oder transient modifizieren, ohne dabei toxische Effekte auf die Zelle auszuüben. Die Erfindungsgemäße Lösung besteht in der Verwendung von monodispersen Kernen, um daraus Polyelektrolyt Nanokapseln mit zellspezifischen Größen herzustellen, wobei sich die Größen für hämatopoetische Zellen in einem Bereich von 20-80 nm befinden, bevorzugt in einem Bereich von 40-60 nm. Die Größen der Partikel müssen dabei in einem sehr engen Bereich sein, um zu verhindern, dass toxische Effekte auftreten. Um die Toxizität der Nanokapseln gering zu halten ist es zudem wichtig, die Nanopartikel, um die herum die Kapseln aufgebaut wurden (Kerne) vor der Verwendung zu entfernen. Verfahren dazu sind aus dem Stand der Technik bekannt (Z.B. Auflösen durch EDTA). Eine weitere Aufgabe ist die Stabilisierung der Transferkapseln. Die erfindungsgemäße Lösung besteht in der Modifikation der Kapseln, der Layer und/oder des zu verpackenden Cargos durch funktionelle Gruppen, was eine Stabilisierung und somit eine Langzeitlagerung bei Raumtemperatur ermöglicht. Die dritte Aufgabe ist das zielgerichtete Einbringen der Transferkapseln. Die erfindungsgemäße Lösung ist eine Funktionalisierung der Layer über chemische Modifikationen und/oder Ergänzung der Layer mit Antikörpern, Proteinen oder Peptiden.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2021/121646 A2

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii)*

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

Bestimmung der Kapselspezifität für spezifische Zelltypen

Polyelektrolyt Nanokapseln als Transportmedium für Biomoleküle und „Small molecular compounds" in Zellen sind in der WO 002019020665 A1 beschrieben. Diese können durch die sog. Layer by Layer Technik um feste oder flüssige Kerne herum aufgebaut werden. Die Größe der Nanokapseln hängt dabei von der Größe der verwendeten Kerne ab. Für die Auswahl und die Effizienz der Aufnahme in spezifische Zellen ist neben der Oberflächengestaltung auch die Größe der Nanopartikel wichtig. In der WO 002019020665 A1 wird beschrieben, dass die Kapseln um Kerne aus Calciumcarbonat gebildet werden, wobei diese Kerne durch eine Fällungsreaktion aus einer Lösung vom Calciumnitrat und Natriumcarbonat gebildet werden. Diverse Hilfsmittel beeinflussen die Fällung und sorgen für verschiedene Größen der gefällten Calciumcarbonat-Kerne.

Ein Problem dabei ist, dass es eine sehr große Spanne in der Größenverteilung gibt, d.h. bei der Herstellung von Partikeln mit 60 nm entstehen auch Partikel mit über 100 nm und umgekehrt. Nun ist es aber für die erfolgreiche Anwendung bei bestimmten Zelltypen dieser Nanokapseln unerlässlich, dass die Größe der Partikel auf ca. 10- bis max 20 nm genau festgelegt werden kann, so dass die Aufnahme in ungewünschte Zellen reduziert werden kann. Denn hämatopoetische Zellen lassen sich vor allem mit Nanokapseln einer Größe von 20-60 nm transfizieren, und für Tumorzellen sind Größen von 100-200 nm bevorzugt. D.h., um unspezifische Wirkungen durch eine unspezifische Aufnahme zu vermeiden müssen die Nanokapseln die richtige Größe aufweisen.

Ein weiteres bedeutendes Problem im Stand der Technik besteht in der Toxizität von Partikeln über 100 nm für Zellen hämatopoetischen Ursprungs wie z.B. CD34+ hämatopoetische Vorläufer Zellen und T-Zellen. Solche Zellen lassen sich bisher nur durch die Verwendung von Viren transduzieren oder elektroporieren. Mit all den damit verbundenen Problemen.

Ein weiteres bedeutendes Problem im aktuellen Stand der Technik ist eine vergleichsweise geringe Stabilität der mit Cargo gefüllten Kapseln. Bisweilen haben sich nur siRNA-beladene Kapseln als äußerst stabil herausgestellt; andere Moleküle, vor allem mRNA und DNA sind in Kapseln instabil und verhindern eine Langzeitlagerung, die in der Degradation des genomischen Cargos und/oder der Kapselaggregation resultiert. Außerdem kommt es bei der Langzeitlagerung zu Diffusionseffekten bei small Molecules und chemotherapeutischen Medikamenten was eine effektive Anwendung dieser Stoffklassen zum momentanen Zeitpunkt ebenso nicht ermöglicht. Durch eine chemische Modifikation der Kapsel-Layer und/oder der RNAs oder DNA kann die

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Stabilität deutlich verbessert werden. Zudem kann über diese Modifikationen ein zell- bzw. organspezifisches Einbringen erreicht werden.
Die bisher im Bottom-up Verfahren hergestellten Partikel haben das Problem, dass sie eine breite Größenverteilung haben und der Herstellungsprozess sehr variabel ist. Für eine technische Herstellung von gleichbleibend großen Nanopartikeln ist das Verfahren deswegen nicht geeignet. Im Top-Down Vwerfahren hergestellte Partikel dagegen sind einfach und preiswert erhältlich, haben aber das Problem der uneinheitlichen Form.

Die erste Aufgabe der Erfindung ist damit die Bereitstellung einer Kapsel, die vom Zielzelltyp aufgenommen wird und die Zielzelle dauerhaft oder transient modifiziert, ohne dabei toxische Effekte auf den spezifischen Zielzelltyp auszuüben. Die zweite Aufgabe ist die Stabilisierung der Langzeitlagerung durch die oben angesprochenen chemischen Modifikationen.

Die erfindungsgemäßen Kapseln bestehen in der Verwendung von monodispersen Nanopartikeln, um daraus Polyelektrolyt Nanokapseln mit zellspezifischen Größen und nach Bedarf chemisch modifiziert herzustellen, wobei sich die Größen für hämatopoetische Zellen in einem Bereich von 20-80 nm befinden, bevorzugt in einem Bereich von 40-60 nm, für Epithelzellen und nicht hämatopoetische Zellen von 60-280 nm wie in WO0020199020665 beschrieben. Die Größen der Partikel müssen dabei in einem sehr engen Bereich sein, um zu verhindern, dass toxische Effekte auftreten. Bioabbaubare Polymere, z.B. Dextran und poly-L-Arginin, die für Kapselaufbau benutzt werden, können nach Bedarf chemisch modifiziert werden (durch die Anbindung der Funktionalgruppen, wie z.B. Kohlenwasserstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff-, Schwefel- oder Phosphat-beinhaltende funktionelle Gruppen; Verfahren dazu sind aus dem Stand der Technik bekannt), um die spontane Aggregation und die spontane Cargo-Diffusion der Kapseln zu verhindern und die Stabilität der Kapsel zu verbessern. Um die Toxizität der Nanokapseln gering zu halten ist es zudem in manchen Fällen vorteilhaft, die Nanopartikel, um die herum die Kapseln aufgebaut wurden (sogenannte Kerne) vor der Verwendung zu entfernen. Verfahren dazu sind aus dem Stand der Technik bekannt (z.B. Auflösen durch EDTA)

Eine hinreichend enge Größenselektion lässt sich mit dem durch Fällung gewonnenen Kerne nicht effizient durchführen, da die Verteilung der Größe sehr breit ist. Im Rahmen dieser Erfindung werden Nanopartikel und Nanokapseln mit einer engen definierten Größenverteilung von ±15 nm oder wahlweise ±25% um den Mittelwert, bevorzugt ±10 nm (oder±20% um den Mittelwert) als monodispers bezeichnet.

Das Problem der Größe der Kerne lässt sich auch überraschenderweise nicht allein durch die Verwendung größensortierter mechanisch erzeugter Nanopartikel lösen. So lassen sich durch das Mahlen von Calciumcarbonat in Kugelmühlen Nanopartikel einer Größe von 15-60 nm Größe erzeugen und dann durch Fraktionieren (durch Sedimentation bzw. Zentrifugation) einheitliche Fraktionen erzeugen (±10 nm). Diese Partikel können dann im Layer-by-Layer Verfahren mit Polymeren beschichtet werden. Die uneinheitliche Form dieser Partikel ist aber störend, da die Sortierung der Partikel dadurch gestört wird. Erst die weitere Aufreinigung dieser Partikel, etwa durch Cross-Flow Filtration nach der Auflösung der Kerne ermöglicht eine ausreichend genaue Größenselektion.

Nanokapseln lassen sich durch die bekannte Layer-by-Layer Methode herstellen. Zwischen die Layer lassen sich Moleküle wie chemotherapeutische Medikamente, small Molecules und Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine einbringen, die dann in der Zelle freigesetzt werden können. So lassen sich z.B. chimäre T-Zell Rezeptoren durch Einbringen von mit DNA beladenen Nanokapseln in T-Zellen erzeugen. Auch lassen sich RNA Moleküle in Zellen einführen, um nur eine transiente Modifikation der Zellen zu erzeugen. Zudem können alle genannten Moleküle und Makromoleküle entweder einzeln oder in jeder erdenklichen Kombination eingebracht werden. Diese Eigenschaft ermöglicht beispielsweise die Transfektion von CRISPR/Cas Komplexen. Die genannten chemischen Modifikationen können sowohl für die Kapselpolymere als auch für das Cargo verwendet werden, um die Stabilität und folglich die Freisetzung in den Zielzellen zu regulieren.

Primäre Zellen sind Zellen die dem Körper entnommen wurden und nicht durch Kultivierung ihre gewebespezifischen Eigenschaften verloren haben. Primäre Zellen sind beispielsweise, aber nicht ausschließlich, Stammzellen, Keimzellen, hämatopoetische Zellen, Tumorzellen, oder auch mesenchymale Stammzellen, Gewebezellen *in vivo* und *ex vivo*.

Als Stammzellen werden allgemein Körperzellen bezeichnet, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Je nach Art der Stammzelle und ihrer Beeinflussung haben sie das Potenzial, sich in jegliches Gewebe (embryonale Stammzellen) oder in bestimmte festgelegte Gewebetypen (adulte Stammzellen/ Vorläufer) zu entwickeln.

Geeignete Polymere um Lagen (layer) der Nanokapseln aufzubauen sind Polykationen und Polyanionen, die abwechselnd die Lagen der Nanokapseln bilden. Durch die gegensätzliche Ladung könne die Polymere die Lagen durch Selbstorganisation ausbilden. Nach der Ausbildung jeder Schicht ist dabei der unverbrauchte Anteil der Polymere von den Nanokapseln abzutrennen.

Polymere im Sinne der Erfindung umfassen neben klassischen Polymeren und Copolymerem auch Biopolymere wie z.B. Makromoleküle mit geordnetem Aufbau aus Aminosäuren, Nukleinsäuren und Poly- bzw. Oligosaccharide.

Beispiele für Polykationen sind:

- polyethylenimine (PEI),
- chitosan (CS),
- poly(L-lysine) (PLL),
- Poly(amido amine)s (PAA),
- Oligolysine
- poly- (l) -ornithine (PLO)
- (poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDAC)
- Histidin und lysinreiche Peptide und Proteine z.B. Cys-Gly-Ala-Gly-Pro-(Lys)3-Arg-Lys-Val-Cys

Beispiele für Polyanionen sind:

- poly(methacrylic acid) (PMA)
- poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP).
- tannic acid (TA)
- poly(2-n-propyl-2-oxazoline)s (PnPropOx)
- Poly(1-vinylimidazole)
- poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)
- dextran sulfate,
- polyethylene glycol,
- bovine serum albumin,
- Human serum albumin
- Protamine sulfate
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)

Substanzen die zur Stabilisierung der Nukleinsäuren eingesetzt werden können, sind Substanzen die mit den Nukleinsäuren in den Kapseln zusammen aufgebracht werden oder Substanzen die durch Inkubation mit den fertigen Kapseln in die Kapseln und in das Lumen der Kapseln diffundieren und dort bis zum Eintritt der Kapseln in die Zellen zumindest teilweise verweilen. Beispiele für solche Substanzen sind:

- Protamine sulfate
- Cell penetrating peptide
- Glutation
- TAT protein
- RNAse Inhibitoren
- DNAse Inhibitoren

Beispiele für Nanopartikel, die als Kerne für die Herstellung von Nanokapseln geeignet sind:

- Eisen Nanopartikel (inklusive Magnetite)
- Silica Nanopartikel
- Kommerziell erhätliche $CaCO_3$ Nanopartikel
- Andere Carbonat-Nanopartikel wie $MgCO_3$
- Vesikel
- Gold Nanopartikel
- Latex Nanopartikel

Die Oberfläche der Nanopartikel kann durch weitere Gruppen modifiziert sein, um die Penetration der Zielzellen zu verbessern. Solche Gruppen sind z.B. Folsäuregruppen, COOH-Gruppen, NH_3-Gruppen. Diese Gruppen bieten sich auch zur Biokonjugation an um spezifische Bindemoleküle wie z.B. Liganden und Rezeptoren inklusive Antikörper daran zu binden.

Beispiel 1: Fraktionieren von Calciumcarbonat Nanopartikeln

Calciumcarbonat Nanopartikel wurden von SkySpring Nanomaterials erworben. Die durchschnittliche Partikelgröße betrug 15-40nm. Mit den Partikeln wurde eine 10 mg/ml Suspension in PBS erstellt. Um die Partikel zu vereinzeln wurde für 5 Minuten Ultraschall angewendet. Diese wurden dann durch fraktioniertes Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge nach Größen aufgereinigt. Es wurden 2 ml Suspension mit bei 500 RCF, 1000 RCF, 2000 RCF 5000 RFC, 10000 RCF, 15000 RFC und 20000 RCF zentrifugiert. Dabei wurde mit der niedrigsten RCF begonnen, der Überstand abgenommen und mit der nächst höheren RCF zentrifugiert. Das Pellet der Zentrifugation wurde anschließend vermessen. Die 500 RCF Fraktion wurde verworfen (Partikel waren aggregiert oder zu groß).

Beispiel 2: Herstellung der Polyelektrolyt Nanokapseln

Um die Nanopartikel zu beschichten wurde Dextransulfat (als Natriumsalz) und Poly-L-Arginin hydrochlorid verwendet wie in der WO 002019020665 A1 beschrieben. Zwischen die Lagen können dabei eine oder mehrere Nukleinsäuren (plus zusätzliche Biomoleküle) eingebracht werden. Die Nukleinsäuren haften durch elektrostatische Bindung an die Kapselwand, so daß das Inkubieren der Kapseln mit den Biomolekülen ausreichend ist. Das Verfahren ist in der WO002019020665A1 beschrieben.

Diese konnten chemisch modifiziert werden, um die Stabilität bei der Lagerung und die Abbauzeit in der Zelle zu verändern. Chemische Modifikationen durch die Anwendung einer oder

verschiedenen funktionelle Gruppen, wie z.B. Hydrocarbone, Sauerstoff-haltige, Stickstoff-haltige Gruppen, Sulfur (S/SH)-, N/ NH - und andere P-haltige Gruppen wurden eingebracht und getestet. Die chemischen Modifikationen zeigten in ersten Versuchen, daß eine Lagerung für einen größeren Zeitraum gewährleistet werden konnte. Darüber hinaus konnten die Kapseln nun auch für einen Zeitintervall bei Raumtemperatur gelagert werden, was insbesondere für den Transport (Fracht) eine massive Erleichterung darstellt, in dem es Kosten und der administrative Aufwand (Stichtwort Zollregularien bei Trockeneis und Kühlprodukten) senken wird.

Beispiel 3: Aufreinigung der fertigen Nanokapseln durch Tangentialflussfiltration

Fertige Nanokapseln wurden dann zur Entfernung der eventuell vorhandenen größeren Nanokapseln mit einem KrosFlo Research IIi System mit einem 50 nm Filtermodul aufgereinigt. Partikel mit einer Größe von mehr als 50 nm wurden zurückgehalten. Dazu wurden 50 ml einer 10mg/ml Suspension der Nanokapseln in PBS hergestellt. Diese wurde nach Anweisungen des Herstellers filtriert.

Beispiel 4 Auftrennung nach asymmetrischer Fluss- Feldflussfraktionierung (AF4):

Fertige Nanokapseln wurden dann zur Entfernung der eventuell vorhandenen größeren Nanokapseln mit einem Eclipse AF4 von Wyatt Technology aufgereinigt. Partikel wurden dabei nach Ladung und Größe aufgetrennt. Dazu wurden 50 ml einer 10mg/ml Suspension der Nanokapseln in PBS hergestellt. Diese wurde nach Anweisungen des Herstellers separiert.

Beispiel 5: Transfektion von primären Zellen

Vor allem für hämatopoetische Zellen sind Nanokapseln mit einer Größe von 40-80 nm deutlich vorteilhafter. Protein, DNA, mRNA, miRNA und siRNA wurden als Cargo für Nanokapsel der Größe 50 nm bis 80 nm verwendet. CD 34+ hematopoetische Stammzellen, CD4+ und CD8+ T Zellen wurden mit den Kapseln für 48 Stunden inkubiert. Dabei wurden 10 Kapseln/Zelle verwendet. Das erfolgreiche Einbringen wurde mittels Konfokalmikroskopie im Falle der fluoreszenzmarkierten Kapseln und PCR kontrolliert.

Beispiel 6: Transfektion von weiteren primären Zellen

Für embryonale Stammzellen, sowie für induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) wurden Nanokapseln mit der Größe von 50-120 nm hergestellt. Protein, DNA, mRNA, miRNA und siRNA wurden als Cargo für Nanokapseln der Größe 50 bis 120 nm verwendet. Embryonale Stammzellen und iPS-Zellen wurden mit den Kapseln für 48 Stunden inkubiert. Dabei wurden 20 Kapseln/Zelle verwendet. Das erfolgreiche Einbringen wurde mittels Konfokalmikroskopie im Falle der fluoreszenzmarkierten Kapseln und PCR kontrolliert.

Beispiel 7: Stabilisierung und Lagerung bei Raumtemperatur (RT) von Kapseln.
Für alle in den vorherigen Beispielen aufgeführten Kapseln wurden weitere Modifikationen an den Kernen oder an den Layern durch Einbringen von funktionellen Gruppen wie Hydrocarbone, Sauerstoff-haltige, Stickstoff-haltige Gruppen, Sulfur (S/SH)-, N/ NH – und andere P-haltige Gruppen durchgeführt, wodurch eine Stabilisierung der Kapseln und somit das gewünschte Ziel der Lagerung bei RT erreicht werden konnte.

Beispiel 8: Beeinflussung des natürlichen Abbaus der Kapseln
Über die in Beispiel 2 und 7 eingeführten Modifikationen von funktionellen Gruppen am Kern, sowie an den Layern konnte der natürliche Abbau der Kapseln nach Einbringen in die jeweilige Zielzelle beeinflusst werden. Hierfür ergaben sich Abbauzeiten pro Layer bei 4 Stunden beispielsweise in mesenchymalen- und Tumorzelllinien, sowie Abbauzeiten von 24 Stunden in Zellen von hämatopoetischen Ursprungs.

Beispiel 9: zielgerichtetes Einbringen: mit Hilfe von AK, Peptide, Proteine
Zur weiteren Spezifizierung des zielgerichteten Einbringens von Cargo in gewünschte Zielzellen, wurde in die außenliegenden Layer der Kapseln entsprechende Antikörper, Peptide oder Proteine eingebracht

Beispiel 10: Stabilisierung von Kapseln mit small Molecules als Cargo
Um die Kapseln, welche mit small molecules oder chemotherapeutischen Medikamenten beladen sind zu stabilisieren wurden die small Molecules oder chemotherapeutischen Medikamente in den Kapseln mittels Click-Chemie immobilisiert und somit Diffusionseffekte verhindert.

Ansprüche:

1. Nanokapseln geeignet zum Einbringen von Zielmolekülen von primären Zellen und Stammzellen, dadurch gekennzeichnet, dass
   - die Kapseln aus mindestens zwei biodegradierbaren Lagen bestehen
   - zwischen diesen mindestens zwei Lagen sich mindestens eine Nukleinsäure, Protein und/oder small Molecule, oder anderes Zielmolekül befindet
   - die Nanopartikel-Kerne eine fest definierte Größe mit einer Varianz von maximal 25% aufweisen
   - ebenso können die Nanopartikel- Kerne zusätzlich zu der Größe nach Ladung aufgetrennt werden
   - nach Bedarf kann die Kapseloberfläche und/oder einzelne Layer innerhalb der Kapsel mit funktionellen Gruppen modifiziert werden.
   - ebenso können Cargo-Elemente zwischen den Layern oder die Layer selber modifiziert werden.

   .

2. Nanopartikel-Kerne gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel einer festen Größe aus dem Größenbereich von 20-80 nm ausgewählt werden.

3. Nanopartikel-Kerne gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel aus dem Größenbereich von 30-60 nm ausgewählt werden

4. Verfahren zum Einbringen von Cargo in primäre Zellen oder Zelllinien, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanokapseln mit Zellen in Kontakt gebracht werden, wobei
   - die Nanopartikel-Kerne eine fest definierte Größe mit einer Varianz von maximal 25% aufweisen
   - die Nanokapseln aus mindestens zwei biodegradierbaren Lagen bestehen
   - zwischen diesen mindestens zwei Lagen sich mindestens eine Nukleinsäure, Protein, small Molecule und/oder chemotherapeutische Medikamente befindet
   - ein oder mehrere Layer oder Cargo können durch die Anbindung der funktionellen Gruppen modifiziert werden um die Stabilität bei der Lagerung, oder Degradationszeit in den Zellen zu regulieren.

5. Nanokapseln gemäß Anspruch 1, verändert durch funktionelle Gruppen zu Stabilisierungszwecken

6. Nanokapseln gemäß Anspruch 1, für den gezielten Transfer

7. Verfahren nach Anspruch 5. wobei die Zellen gesunde oder maligne Zellen eines hämatopoetischen Ursprungs sind .

8. Verfahren nach Anspruch 6 wobei die Zellen transient transfiziert werden

9. Verfahren nach Anspruch 6 wobei die Zellen stabil transfiziert werden

10. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zellen embryonale Zellen oder iPS-Zellen sind.

11. Verfahren zur Herstellung von Nanokapseln, dadurch gekennzeichnet, dass die Kerne zum Aufbau der Nanokapseln monodisperse Nanopartikel sind und dass die Nanokapseln mit Nukleinsäuren, Proteinen, small molecules oder chemotherapeutischen Medikamenten beladen sind und modifiziert mit funktionellen Gruppen oder nicht-modifiziert angewendet werden