Check for updates

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202304908
doi.org/10.1002/anie.202304908

Nanostrukturen

Kompartimentäre Polyampholyt-Mikrogele mittels entropisch bedingter Ausflockung und Koazervation von Nanogelen in Emulsionströpfchen

*Hannah F. Mathews[+], Maria I. Pieper[+], Se-Hyeong Jung, und Andrij Pich**

Abstract: Die Verteilung von Ladungen innerhalb pH-responsiver Wirkstoffträger beeinflusst nachweislich die Effizienz der Freisetzung, ist aber schwer zu kontrollieren und zu verifizieren. Wir stellen nun polyampholytische Nanogel-in-Mikrogel Kolloide (NiM–C) vor und zeigen, dass die Anordnung der Nanogele (NG) abhängig von den Synthesebedingungen ist. Dazu wurden pH-responsive Polyelektrolyt-NG durch Fällungspolymerisation synthetisiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die NG wurden dann durch inverse Emulsionspolymerisation mittels tropfenbasierter Mikrofluidik in Mikrogel-Netzwerke (MG) integriert. Mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurde nachgewiesen, dass, je nach NG-Konzentration, pH-Wert und Ionenstärke, NiM–C mit unterschiedlichen NG-Anordnungen, wie Janus-artiger Phasentrennung, statistischer Verteilung und Kern-Schale-Architektur, erhalten werden. Unser Ansatz ist ein Meilenstein auf dem Weg zum simultanen Transport entgegengesetzt geladener Moleküle.

[*] H. F. Mathews,[+] M. I. Pieper,[+] Dr. S.-H. Jung, Prof. A. Pich
DWI-Leibniz Institute for Interactive Materials, RWTH Aachen University
Forckenbeckstr. 50, 52074 Aachen (Deutschland)
E-mail: pich@dwi.rwth-aachen.de

H. F. Mathews,[+] M. I. Pieper,[+] Dr. S.-H. Jung, Prof. A. Pich
Institute of Technical and Macromolecular Chemistry, RWTH Aachen University
Worringerweg 2, 52074 Aachen (Deutschland)

Dr. S.-H. Jung
Laboratory for Soft Materials and Interfaces, Department of Materials, ETH Zürich
Vladimir-Prelog-Weg 1–5/10, 8093 Zürich (Schweiz)

Prof. A. Pich
Aachen Maastricht Institute for Biobased Materials (AMIBM), Brightlands Chemelot Campus, Maastricht University
6167 RD Geleen (Niederlande)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Einleitung

Lebendige Materie hat die faszinierende Fähigkeit, molekulare Strukturen, die im Nanometerbereich eine spezifische Funktionalität aufweisen, zu nutzen und in wässrigen Systemen durch hierarchische Selbstorganisation und Untergliederung in komplexere Einheiten zu überführen. In der Natur werden Informationen durch aufeinander aufbauende Organisationsebenen gespeichert, und sogar die Entstehung des Lebens scheint mit der Kompartimentierung von Molekülstrukturen und Energieträgern zusammenzuhängen.[1] Wenn wir die dabei zugrundeliegenden Mechanismen verstehen, sind große Fortschritte in der Entwicklung neuer bioinspirierter und nachhaltiger Materialien für Katalyse, Robotik und Medizin möglich.[2–4] Durch die gezielte Herstellung von Materialien mit räumlich getrennten Komponenten können mehrere chemische Funktionalitäten kombiniert werden, ohne dass es zu einer gegenseitigen Deaktivierung und einem Wirkungsverlust kommt.[5] Insbesondere für die Konzeption und Entwicklung neuartiger Wirkstoffträger könnte dies von Vorteil sein. Um Medikamente möglichst effizient zur Therapie von Krankheiten einsetzen zu können, müssen die Wirkstoffmoleküle vor harschen Umgebungsbedingungen, z. B. massiven pH-Wert-Veränderungen, geschützt werden. Im Idealfall sollten die Agenzien nur in der Nähe des Krankheitsherdes freigesetzt werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren und die Kosten zu senken.[6] Als Wirkstoffträger wurden bereits verschiedene kolloidale Systeme (z. B. Vesikel, Liposome, Mizellen) in Betracht gezogen.[7,8,9] Stimuli-responsive Mikrogele sind vielversprechende Kandidaten für die gezielte Verabreichung von Medikamenten, da die interne Netzwerkstruktur der Mikrogele in funktionell verschiedene Regionen unterteilt und die Freisetzung des Agens durch externe Stimuli ausgelöst werden kann.[10]

Mikrogele sind mikroskalige Netzwerke bestehend aus dreidimensional vernetzten Polymeren, die sich dadurch von anderen (makromolekularen) Materialien unterscheiden, dass sie dualistisch gleichermaßen die Eigenschaften von harten Nanopartikeln und weichen Makromolekülen aufweisen. Mikrogele, die in einem Lösungsmittel gequollen vorliegen, enthalten aufgrund ihrer offenen und porösen Netzwerkstruktur große Mengen der Lösungsmittelmoleküle.[11] Durch die Anpassung der chemischen Zusammensetzung der Mikrogele kann eine Sensitivität gegenüber einem Stimulus, wie beispielsweise Temperatur,[12] pH-Wert,[13] Ionenstärke,[14] Licht,[15] oder Ultraschall,[16] erzeugt werden.

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

Eine entsprechende Veränderung der Umgebungsbedingungen bewirkt dann ein Aufquellen oder Kollabieren des Mikrogel-Netzwerks. Ein bekanntes Beispiel responsiver Mikrogele sind kolloidale Hydrogele basierend auf Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), die aufgrund ihrer Temperatur-Responsivität und der geringen Zytotoxizität bereits eingehend untersucht wurden. Da die linearen PNIPAAm-Ketten eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST) aufweisen, durchlaufen die analogen vernetzten Gelstrukturen einen Volumen-Phasen-Übergang (VPT) bei physiologischen Temperaturen $>32\,^{\circ}C$.[12a,17]

PNIPAAm-Netzwerke können zusätzlich zum VPT auch pH- und damit multi-responsiv werden, wenn schwach saure oder schwach basische Co-Monomere in das Netzwerk eingebaut werden.[13a,14a,18] Diese ionisierbaren Mikrogele können für den Transport geladener Gastmoleküle verwendet werden, da sie die gezielte Aufnahme und Freisetzung des Moleküls mittels elektrostatischer Wechselwirkung ermöglichen.[19] Aufgrund der Fülle geladener Biomoleküle in der Pharmakologie[20] sind pH-responsive Mikrogele aussichtsreiche Anwärter für die therapeutische Arzneimittelgabe.

Größere Biomoleküle wie DNS oder Proteine setzen sich jedoch zu 3D-Strukturen zusammen. Diese passen nicht in die Größenbeschränkung von Mikrogelen, welche über herkömmliche Polymerisationsverfahren, wie z. B. Fällungs- oder inverse Miniemulsionspolymerisation, synthetisiert werden.[21] Außerdem erfordern komplexe Krankheiten oft die Verabreichung mehrerer Agenzien, die sich bezüglich ihrer Ladung oder Hydrophilie unterscheiden oder zeitlich nacheinander freisetzt werden müssen.[22]

Um diese Herausforderungen zu überwinden, synthetisierten Peppas et al. Hydrogel-Filme aus Poly(methacrylsäure-*co*-*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (P(MAAc-NVP)), die polykationische Nanogele auf Basis von 2-(Diethylamino)ethylmethacrylat beinhalteten. Die getrockneten Hydrogel-Filme wurden mechanisch zerkleinert und gesiebt, sodass Mikrogele $<75\,\mu m$ erhalten wurden.[23] Die Gruppe zeigte, dass das anionische Mikrogel-Netzwerk selektiv und zeitnah durch Trypsin-Zugabe abgebaut werden kann, wenn ein enzymlabiler Vernetzer verwendet wird. Dadurch werden die Nanogele freigesetzt, welche wiederum eine Endozytose einleiten und somit die endosomale Freisetzung von Frachtmolekülen ermöglichen.[23b] Ein Nachteil dieses Ansatzes ist die Heterogenität der Mikrogelproben in Bezug auf Größe und Form, die auch die experimentelle Reproduzierbarkeit beeinträchtigt.

Durch die Herstellung von Mikrogelen in mikrofluidischen Wassertröpfchen kann ihre Größe in einem Bereich zwischen 10–1000 μm präzise eingestellt und sowohl die innere als auch die äußere Morphologie genau kontrolliert werden.[24] Auch die Synthese von Polyelektrolyt- oder Polyampholyt-Mikrogelen durch den Einbau von transient geladenen Monomeren ist hier etabliert und ermöglicht nachweislich die Verkapselung von Nährstoffmolekülen oder Modellwirkstoffen.[25] Darüber hinaus brachten Weitz et al. neue Funktionalität in Mikrogele ein, indem sie unterschiedliche Materialien wie Quantenpunkte, magnetische Nanopartikel und polymere Mikropartikel in die Mikrogel-Netzwerke einbetteten. Selbst nach Einbau dieser Additive blieb die Temperatur-Responsivität des ursprünglichen PNIPAAm-Netzwerks erhalten.[26] Santos et al. integrierten Halloysit-Nanoröhrchen in Mikrogele, die auf Hydroxylpropylmethylcelluloseacetatsuccinat basierten. Sie wiesen nach, dass dieses System zwei Modellwirkstoffe (Atorvastatin und Celecoxib) gleichzeitig aufnehmen kann. Die beiden Wirkstoffe könnten als Kombinationstherapie zur Behandlung von Dickdarmkrebs eingesetzt werden, unterscheiden sich aber stark in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Das Polymer-Netzwerk war in saurem Medium stabil, löste sich jedoch in einer neutralen bis basischen Umgebung auf, was die schnelle und gezielte Freisetzung beider Arzneimittel förderte.[27] Auf ähnliche Weise wurden auch Janus-artige Mikrogele hergestellt. Dazu wurden kationische, Temperatur-responsive Mikrogele mit Polyacrylsäure, Acrylamid als Monomer sowie Vernetzer und Initiator in wässrigen Tröpfchen gemischt. Eine Erhöhung der Temperatur und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den kationischen Nanogelen und den anionischen Polymeren bewirkten dann eine Phasentrennung, die durch eine sofortige Polymerisation des Acrylamids beibehalten wurde.[28] Kürzlich schlug die Gruppe von Isa sogenannte Suprakapseln für die Verabreichung mehrerer Medikamente vor. Sie nutzten einen Mikrofluidik-Kanal, um Öltröpfchen zu bilden, in denen Dextran-basierte Nanogele enthalten waren. Nach dem Verdampfen des Öls fügten sich die Nanogele spontan zu Suprapartikeln zusammen. Die Gruppe konnte zudem demonstrieren, dass die Van-der-Waals-Kräfte, die für den Zusammenhalt der Nanokompartimente verantwortlich sind, durch einen hohen Energieeintrag in Form von Ultraschall aufgehoben werden können. Auf diese Weise ließen sich die Suprapartikel wieder in ihre einzelnen Einheiten zerlegen.[29] Obwohl die kompartimentären Suprakapseln den simultanen Transport mehrerer Wirkstoffe ermöglichen, bleibt es eine Herausforderung, Frachtmoleküle mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften oder gegensätzlichen Ladungen zu integrieren.

Bisherige Arbeiten konzentrierten sich auf die Einbettung geladener oder hydrophober Spezies in anionische hydrophile Netzwerke.[23,27,28] Die Integration zweier entgegengesetzt geladener Polyelektrolyt-Nanogel-Spezies eröffnet jedoch neue Möglichkeiten für die orthogonale Verabreichung von Medikamenten. In dieser Arbeit zeigen wir zum ersten Mal die Synthese von kompartimentären Polyampholyt-Mikrogelen (MG) mittels entropisch bedingter Ausflockung und Koazervation von Polyelektrolyt-Nanogelen (NG) in Emulsionströpfchen. Zur Verbesserung der Lesbarkeit verwenden wir im Folgenden den Begriff "Nanogel" für diejenigen Polymergele, die durch Fällungspolymerisation synthetisiert wurden, obwohl ihr Durchmesser (ca. 400–500 nm) den von der IUPAC-Definition vorgeschriebenen Größenbereich für Nanogele überschreitet.[30] Die unterschiedlichen Bezeichnungen sollen die Unterscheidung zwischen den jeweiligen Polymer-Netzwerken erleichtern, da der Durchmesser von Mikrogelen, die mittels Mikrofluidik hergestellt werden, um mehrere Größenordnungen größer ist. Mithilfe der tropfenbasierten Mikrofluidik wurden Dispersionen von entgegengesetzt geladenen NG, die durch

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

konventionelle Fällungspolymerisation synthetisiert wurden, in wässrige Emulsionströpfchen integriert. Anschließend folgte die Polymerisation und Vernetzung von *N*-Isopropylacrylamid, um Nanogel-in-Mikrogel-Kolloide (NiM–C) zu erzeugen. In unseren Experimenten bestätigte sich, dass die NiM–C ähnlich responsiv auf Veränderungen von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur reagieren wie reines PNIPAAm-MG. Durch die Markierung der NG mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen konnten wir die Anordnung der NG innerhalb der NiM–C mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) analysieren. Dabei stellten wir fest, dass sich Janus-artige Strukturen bilden, wenn die NG koazervieren und sich auf einer Seite des MG-Netzwerks sammeln. Wir veranschaulichen, dass die treibenden Faktoren für diesen Koazervationsmechanismus die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den beiden NG-Spezies und die wegen der Bildung von Polymerketten entstehenden entropischen Kräfte sind. Aufgrund des responsiven Charakters der Polyelektrolyt-NG kann ihre Anordnung innerhalb des MG durch die Anpassung der Synthesebedingungen, d. h. der NG-Konzentration, der Ionenstärke und des pH-Werts, kontrolliert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Unser Ziel war die Entwicklung einer zuverlässigen Synthesemethode zur Herstellung von Gelen im Mikrometerbereich, welche unter physiologischen Bedingungen positiv und negativ geladene Kompartimente enthalten, um Wirkstoffe effizient aufzunehmen. Als Modellsystem wählten wir PNIPAAm-basierte Netzwerke, die mit *N,N′*-Methylenbisacrylamid (BIS) quervernetzt sind, da NIPAAm eines der am meisten genutzten Monomere ist und eine temperaturbedingte VPT nahe der menschlichen Körpertemperatur aufweist.[17a,31] Als pH-responsive Co-Monomere wurden schwach saure Methacrylsäure (MAAc, $pK_S \approx 5.0$[32]) und schwach basisches *N*-(3-aminopropyl)methacrylamid (APMH, $pK_S \approx 10.0$[33]) eingesetzt, da diese Monomere wasserlöslich und im neutralen pH-Wert-Bereich entgegengesetzt geladen sind. Polyelektrolyt-NG mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 400–500 nm und einem Co-Monomer-Anteil von 10 mol% wurden mittels Fällungspolymerisation synthetisiert (Hintergrundinformationen, Tabelle S1). Um die gewünschte Menge an ionisierbaren Co-Monomeren in die Mikrogele zu integrieren, mussten, wie in der Literatur beschrieben,[13a] die Synthesebedingungen präzise eingestellt werden. Für die Synthese der NG mit APMH (pNG) wurde ein basischer pH-Wert eingestellt, um die Deprotonierung des Co-Monomers sicherzustellen. Wie bereits für die freie radikalische Polymerisation von ionischen Monomeren in wässrigem Milieu nachgewiesen wurde, wird die Reaktionskinetik durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem wachsenden Polyelektrolyt-Polymer und Gegenionen, weiteren Polymerketten und radikalischen Spezies negativ beeinflusst.[34] Die Batch-Fällungspolymerisation wurde mit dem kationischen Azoinitiator 2,2′-Azobis-(2-methyl-propionamidin) (AMPA, V-50) initiiert. Bei der Synthese der NG, die MAAc beinhalten (nNG), wurde der schnellere Einbau der MAAc durch eine nachträgliche Zugabe dieses Co-Monomers zum sauren Reaktionsgemisch kompensiert. 2,2′-Azobis[*N*-(2-carboxyethyl)-2-methylpropionamidin]-Tetrahydrat (ACMA, VA-057) wurde als Initiator verwendet und das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde hinzugegeben, um die nNG in einer mit den pNG vergleichbaren Größe zu erhalten. Um sowohl visuell als auch in der CLSM effizient zwischen den NG-Spezies unterscheiden zu können, wurden die NG mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Während die nNG durch Co-Polymerisation mit einem geringen Anteil Acryloxyethyl-thiocarbamoyl-Rhodamin B (Rhod B Ac) markiert wurden, reagierten die pNG im Rahmen einer Postmodifikation nachträglich mit Cyanin-5-*N*-Hydroxysuccinimidester, wobei der NHS-Ester an einzelne primäre Aminogruppen im NG-Netzwerk konjugiert wurde. Nach der Aufreinigung der NG durch eine automatisierte Tangentialfluss-Diafiltration (TFF)[35] wurden die NG hinsichtlich ihrer Größe und Temperatur-, pH- sowie Ionenstärken-Responsivität mittels Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM, Abbildung S2), dynamischer Lichtstreuung (DLS, Abbildung S3) und elektrophoretischer Lichtstreuung (ELS, Abbildung S4) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die nNG in HPLC-Wasser bei Raumtemperatur einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 400 nm haben, während die pNG unter gleichen Bedingungen etwa 470 nm groß sind. Beide Spezies weisen einen Polydispersitätsindex von < 0.09 auf, was auf eine enge Größenverteilung hindeutet. Die NG-Arten zeigen beide das erwartete Temperatur-, pH- und Ionenstärkenabhängige Verhalten (Abbildung S3). Unsere ELS-Messungen bestätigen eine negative effektive Oberflächenladung der nNG bei pH-Werten oberhalb des pK_S-Werts und eine positive effektive Oberflächenladung der pNG bei pH-Werten unterhalb des pK_S-Werts (Abbildung S4). Der Co-Monomer-Gehalt der NG wurde quantifiziert, indem die Proben mittels Kernspinresonanzspektroskopie (^{1}H NMR) und Infrarot-Spektroskopie (IR) (Abbildungen S5–S8) analysiert wurden. Der mithilfe von ^{1}H NMR ermittelte APMH-Gehalt lag bei 8.4 mol% (Abbildung S7). Zur Bestimmung des MAAc-Gehalts ist ^{1}H NMR als Methode ungeeignet, da sich die Signale der NIPAAm- und MAAc-Funktionen überschneiden. Stattdessen wurde die Quantifizierung der MAAc anhand des entsprechenden Carboxylsignals im IR vorgenommen. Demnach betrug der MAAc-Gehalt in den fluoreszenzmarkierten NG etwa 8.0 mol% (Abbildungen S5, S8).

Die fluoreszenzmarkierten NG wurden anschließend mittels tropfenbasierter mikrofluidischer Technik in MG eingebaut. Diese Methode ermöglicht die Herstellung monodisperser kolloidaler Hydrogele, deren Größe, Zusammensetzung und Dispersität durch Variation der Flussraten und Veränderungen der organischen und wässrigen Phase leicht angepasst werden können.[36] Auch hier wurden NIPAAm und BIS zur Synthese des Gel-Netzwerks verwendet. Um die Wasser-in-Öl-Tröpfchen zu stabilisieren, wurde das ungeladene Tensid FluoSurf in der kontinuierlichen Hydrofluorether-Ölphase eingesetzt. Dadurch wurde die Einbringung zusätzlicher Ladungen vermieden, welche die

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Reaktion beeinflussen könnten. Die Polymerisation wurde mit dem UV-Initiator Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl-phosphinat (LAP) gestartet, der eine gute Wasserlöslichkeit und hohe UV-Reaktivität (365 nm) aufweist. LAP ist dafür bekannt, dass es eine vorzeitige Gelierung unterdrückt und so eine räumliche und zeitliche Kontrolle über die Photopolymerisation erlaubt.[37] Wir entschieden uns für einen UV-Initiator anstelle eines herkömmlichen Azoinitiators, um ein Erhitzen der Dispersion und eine damit einhergehende Ausfällung der NG zu umgehen.

Für die mikrofluidischen Reaktionen wurden NIPAAm, BIS und LAP in der jeweiligen NG-Dispersion (10 mg/mL) gelöst, um eine homogene Verteilung der NG zu gewährleisten. Zur Herstellung von Polyelektrolyt-NiM–C wurde entweder eine nNG- oder eine pNG-Dispersion als wässrige Phase genutzt und nur eine Zufluss-Öffnung verwendet (Abbildung S1). Zur Erzeugung der Polyampholyt-NiM–C wurden beide NG-Spezies durch gleichzeitige Verwendung von zwei verschiedenen wässrigen Dispersionen, eine für jede Zufluss-Öffnung, eingesetzt. An der Kreuzungsstelle, an der die Ströme orthogonal aufeinander zulaufen (Abbildung 1 (A)), führen die Scherkräfte zwischen den beiden nicht mischbaren Phasen zur Bildung von Wasser-in-Öl-Tröpfchen. Diese werden anschließend gut durchmischt (Abbildung 1 (B)), da die laminare Strömung wegen des schlangenförmigen Kanals in eine turbulente Strömung umgewandelt wird.[38] Nach dem Auffangen der Produkt-Emulsion (Abbildung 1 (C)) wurde diese mit UV-Licht bestrahlt. Dabei stellte sich eine Bestrahlungszeit von 10 s als optimal heraus, da die Polymerisation erfolgreich war, Bleicheffekte aufgrund der Lichteinstrahlung aber auf ein Minimum beschränkt wurden. Unterschiede in der MG-Größe zwischen den einzelnen Proben können auf Abweichungen in der eingewogenen Masse des Monomers zurückgeführt werden. Auch kleinere Unterschiede in den Durchflussraten, die wegen der Genauigkeit der Spritzenpumpen auftreten, können leichte Diskrepanzen verursachen. Nach der Aufreinigung untersuchten wir die NiM–C in Hinblick auf Morphologie und Lokalisierung der fluoreszenzmarkierten NG mittels CLSM-Bildgebung. Für beide Arten der Polyelektrolyt-NiM–C zeigt Abbildung 2 eine statistische Verteilung der NG, wobei die mit Rhod B markierten nNG rot und die mit Cy5 markierten pNG blau gefärbt sind. Beide NG-Spezies sind bei Raumtemperatur in Wasser

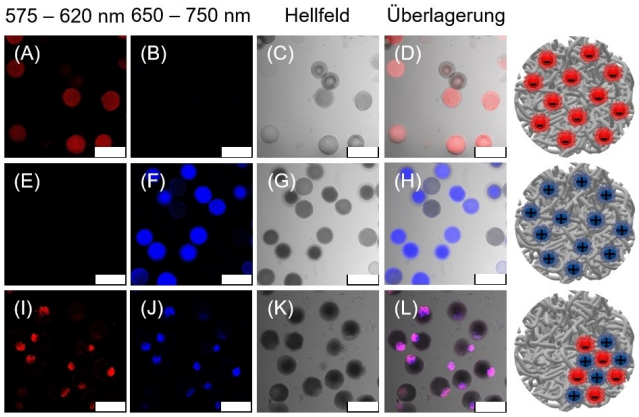

Abbildung 2. CLSM-Bilder und schematische Darstellungen der Polyelektrolyt-NiM–C mit nNG ((A)–(D)) und pNG ((E)–(H)), und der Polyampholyt-NiM–C ((I)–((L)) in HPLC-Wasser (pH ≈ 6.5). In der ersten Reihe von links nach rechts ((A), (E) und (I)) zeigen Fluoreszenz-Bilder (DPSS Laser: $\lambda_{ex} = 561$ nm, HyD Detektor) die Position der mit Rhod B markierten nNG (rot). In der zweiten Reihe ((B), (F) und (J)) zeigen die Fluoreszenz-Bilder (HeNe Laser: $\lambda_{ex} = 633$ nm, HyD Detektor) die Position der mit Cy5 markierten pNG (blau). Die Überlagerungsbilder (rechte Reihe: (D), (H) und (L)) kombinieren jeweils die beiden Fluoreszenz-Bilder mit dem zugehörigen Hellfeldbild (PMT Detektor: ≈ 300 V) ((C), (G) und (K)). Die Skala repräsentiert jeweils 300 µm.

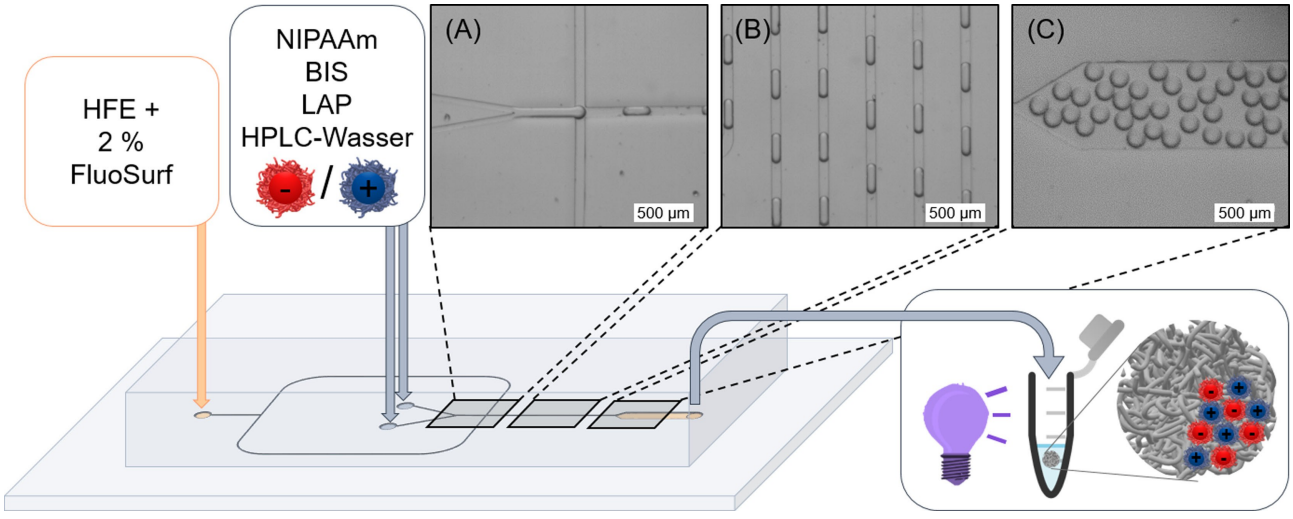

Abbildung 1. Chip-Layout für die mikrofluidische Herstellung des Polyampholyt-NiM–C. FluoSurf in fluoriertem Öl wurde als kontinuierliche Phase verwendet, HPLC-Wasser als dispergierte Phase. In beiden Wasserphasen sind die Edukte in der Dispersion einer der Polyelektrolyt-NG-Spezies aufgelöst. Wasser-in-Öl-Tröpfchen werden an der Kreuzungsstelle gebildet (A), dann durchgemischt (B), am Ausgang gesammelt (C) und 10 s lang mit UV-Licht bestrahlt, um die Polymerisation zu initiieren. Die Skala repräsentiert jeweils 500 µm.

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

gequollen (Abbildung S3 (C)), da sich die geladenen funktionellen Gruppen gegenseitig elektrostatisch abstoßen und zusätzlich ein osmotischer Druck durch die nativen Gegenionen entsteht.[39] Wir postulieren, dass die repulsiven elektro-statischen Wechselwirkungen auch in größerer Entfernung wirken und somit die räumlich verteilte Anordnung der NG bewirken. Die Bildung, das Kettenwachstum und die Vernetzung der PNIPAAm-Polymere hat offenbar keinen Einfluss auf die kolloidale Stabilität der Polyelektrolyt-NG, bevor sie im Polymer-Netzwerk fest fixiert werden. Referenzversuche mit reinen PNIPAAm-NG zeigen eine ähnlich homogene Verteilung der NG innerhalb des MG (Abbildung S9). In neutralen NG, die keine geladenen Co-Monomere enthalten, resultiert die kolloidale Stabilität aus freibeweglichen Polymerketten und einem geringen elektrostatischen Beitrag, der von den integrierten Initiatorresten und dem Fluoreszenzfarbstoff Rhod B Ac verursacht wird. Es ist daher wahrscheinlich, dass schon diese Stabilisierungsmechanismen ausreichen, um die statistische Verteilung der NG im MG zu bewirken. Im Gegensatz dazu weisen die Polyampholyt-NiM–C, die beide Arten NG enthalten, eine Janus-artige Struktur auf, bei der die NG-Spezies gemeinsam stark phasengetrennte Koazervate bilden, die sich innerhalb des MG-Netzwerks an einer Seite absetzen. Wie die rosa Farbe in den Überlagerungsbildern (Abbildung 2, Abbildung 3) demonstriert, bestehen die Koazervate aus der Kombination von nNG (rot) und pNG (blau). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den entgegengesetzt geladenen NG die treibende Kraft der Koazervation sind, genauso wie die Abstoßung zwischen den NG gleicher Ladung eine räumliche Verteilung der NG im gesamten MG-Netzwerk bewirkt. Das einfache Mischen der beiden Polyelektrolyt-NG-Dispersionen führt nicht zu einer sichtbaren oder mikroskopisch nachweisbaren Koazervation (Abbildung S10, Abbildung 4). Anhand von Viskosimetrie-Messungen konnten wir zudem abschätzen, dass der allgemeine effektive Volumenanteil der NG in den Dispersionen unterhalb des kolloidalen Glasübergangs liegt (Abbildung S11).

Wir prüften außerdem die Gesamtresponsivität der NiM–C in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke. Durch temperaturabhängige Größenmessungen wurde nachgewiesen, dass der Durchmesser der NiM–C oberhalb der VPTT analog zu reinen PNIPAAm-MG abnimmt. Die für unsere PNIPAAm-MG und NiM–C durch einen sigmoidalen Boltzmann-Fit ermittelte VPTT ist jedoch im Vergleich zur Literatur-bekannten VPTT kolloidaler PNIPAAm-Gele höher (Abbildung 3, Abbildung S12).[17a,31] Dies kann auf die Messmethode zurückgeführt werden: Während der hydrodynamische Durchmesser von NG üblicherweise mittels DLS, d. h. frei in einem Dispersionsmedium schwimmend, bestimmt wird, werden die MG-Größen bei der mikroskopischen Messung wahrscheinlich durch Oberflächenwechselwirkungen zwischen dem Glasträger und der Probe beeinflusst. Die geladenen NG reagieren auf Veränderungen in pH-Wert und Ionenstärke, während die neutralen PNIPAAm-NG nur bei hohen Ionenstärken kollabieren (Abbildung S3, (A)). In Anbetracht unseres Ziels,

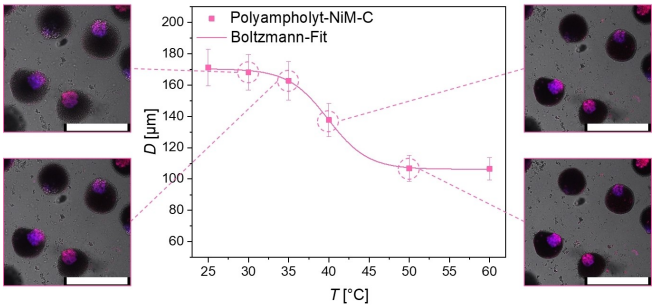

Abbildung 3. Durch optische Mikroskopie bestimmter Einfluss der Temperatur auf den hydrodynamischen Durchmesser der Polyampholyt-NiM–C in HPLC-Wasser (pH ≈ 6.5). Ein sigmoidaler Boltzmann-Fit resultiert in VPTT ≈ 40 °C. CLSM-Überlagerungsbilder stellen die Polyampholyt-NiM–C und die entsprechenden Koazervate bei 30, 35, 40 und 50 °C dar. Die Skala repräsentiert jeweils 300 µm.

ein Gelsystem zu entwickeln, das zur orthogonalen Wirkstofffreisetzung fähig ist, müssen die NG unter unterschiedlichen Umgebungsbedingungen im MG-Netzwerk immobilisiert bleiben. Um die Responsivität der Polyampholyt-NiM–C gegenüber pH-Wert und Ionenstärke zu untersuchen, wurden die Proben auf einem Objektträger getrocknet und anschließend in verschiedenen Puffern bzw. Salzlösungen rehydriert. Die CLSM-Bilder zeigen, dass die Koazervate bei allen gemessenen pH-Werten zwischen 2.5 und 11.0, und bei allen Salzkonzentrationen zwischen 1 mM und 1000 mM phasengetrennt bleiben (Abbildung S13). Da die nNG bei pH-Werten unterhalb des pK_S(MAAc) ≈ 5.0 schrumpfen und die pNG bei pH-Werten oberhalb des pK_S(APMH) ≈ 10.0 kollabiert vorliegen (Abbildungen S3, S4), konnten wir nachweisen, dass die NG auch im kollabierten Zustand im MG-Netzwerk immobilisiert sind. Auch reine PNIPAAm-Netzwerke reagieren auf hohe Ionenstärken, weil die gelösten (Salz−)Ionen und die geladenen Polymerketten um Solvatisierung konkurrieren. Dabei ersetzen Elektrolyt-Wasser-Wechselwirkungen die Polymer-Wasser-Wechselwirkungen, sodass der hydrophobe Effekt dominiert, was den Kollaps der MG-Netzwerke bewirkt.[14b] Das gesamte NiM–C schrumpft also bei Ionenstärken von etwa 1000 mM. Insgesamt ist die Makroresponsivität der Polyampholyt-NiM–C ähnlich der Responsivität von reinen PNIPAAm-MG (Abbildung 3, Abbildungen S12–S14). Da sich das Quellen und Kollabieren der NG nicht auf das NiM–C als Ganzes auswirkt, scheint das neutrale MG-Netzwerk wie ein Schwamm die Änderungen der NG-Größe zu kompensieren. Die Morphologie der NiM–C ist bei allen gemessenen pH-Werten und bei Ionenstärken von < 1000 mM stabil. Unter Berücksichtigung der im menschlichen Körper vorherrschenden Ionenstärke (100–200 mM) erweist sich das NiM–C System daher im Vergleich zu freien Polyampholyt-NG insbesondere für die Biomedizin als vorteilhaft.[40]

Um den Koazervationsmechanismus genauer zu untersuchen, wurden Experimente in der tropfenbasierten Mikrofluidik durchgeführt, bei denen die Wasser-in-Öl-Tröpfchen nur bestimmte Reaktanden enthielten. Von jeder Probe

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

wurden CLSM-Bilder vor und nach der UV-Bestrahlung aufgenommen (Abbildung 4). Wie zuvor stellten wir zunächst wässrige Tröpfchen her, die beide Arten von NG enthielten. In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen (Abbildung S10) koazervierten die NG weder vor noch nach der Bestrahlung (Abbildung 4 (A), (F)). Das Experiment wurde einmal mit zusätzlichem LAP-Initiator und einmal mit zusätzlichem NIPAAm-Monomer wiederholt (Abbildung 4 (B), (C)). In einem vierten Versuch wurden sowohl NIPAAm als auch LAP der NG-Dispersion zugesetzt, während für den letzten Versuch alle für die Synthese der Polyampholyt-NiM–C verwendeten Reaktanden eingesetzt wurden (Abbildung 4 (D), (E)). Alle CLSM-Bilder vor der UV-Bestrahlung zeigen eine gleichmäßige Verteilung der NG in den wässrigen Tröpfchen, d.h. es fand keine Koazervation statt. Die Proben, die sowohl beide NG-Spezies als auch Monomer oder Initiator enthalten, wiesen auch nach der UV-Bestrahlung immer noch keine Koazervation auf (Abbildung 4 (G), (H)). Nur bei zwei Proben wurde eine Phasentrennung nach der UV-Bestrahlung, also nach der radikalischen Zersetzung von LAP, beobachtet: bei der Probe, die beide NG-Arten und sowohl Monomer als auch Initiator enthielt, und bei der Probe, die dazu zusätzlich noch Vernetzer enthielt (Abbildung 4 (I), (J)). Die Anwesenheit von Monomer und Initiator in den Tröpfchen ermöglicht die Polymerisation. Die Koazervation tritt nur auf, wenn (1) sowohl positiv als auch negativ geladene NG-Spezies vorhanden sind (Abbildung 2) und (2) lineare oder quervernetzte Polymere gebildet werden. Deshalb kommen wir zu dem Schluss, dass – neben der elektrostatischen Wechselwirkung – die entropisch bedingte Ausflockung eine wichtige Antriebskraft für die Assemblierung der entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyt-NG ist. Um die NG gibt es eine an Polymeren verarmte Zone (Verarmungszone, *depletion zone*), die von den erzeugten Polymeren nicht durchdrungen werden kann ohne die Freiheitsgrade der Kettenmoleküle einzuschränken. Durch die Phasentrennung der NG überlappen sich die jeweiligen Verarmungszonen, sodass das freie Volumen der Polymere maximiert wird.[41] Wenn während der Polymerisation nur NG mit gleicher Ladung vorliegen, konkurriert diese entropisch bedingte Ausflockung mit der elektrostatischen Abstoßung zwischen den NG,[42] sodass die NG in dem gesamten MG-Netzwerk statistisch verteilt sind (Abbildung 2). Sind beide NG-Arten vorhanden, führen die entropisch bedingte Verarmungskraft (*depletion force*) und die elektrostatische Anziehung jedoch zu einem kooperativ-synergistischen Effekt, der die Koazervation auslöst (Abbildung 4 (I), (J)). Daher ist die Einführung von Ladungen für die Bildung von Kompartimenten in NiM–C unerlässlich.

Auf dieser Grundlage gehen wir davon aus, dass die Dynamik der Wechselwirkungen durch die Syntheseparameter NG-Konzentration, pH-Wert und Ionenstärke erheblich beeinflusst wird. Durch die Variation dieser Parameter können wir also die innere Morphologie und die NG-Anordnung innerhalb der NiM–C kontrollieren. Zuerst wurde die Konzentration der NG-Dispersion, die in der mikrofluidischen Reaktion verwendet wurde, zwischen 5 und 30 mg/mL variiert (Abbildung 5 (A)). Die am stärksten ausgeprägte Phasentrennung zeigte die Probe mit jeweils

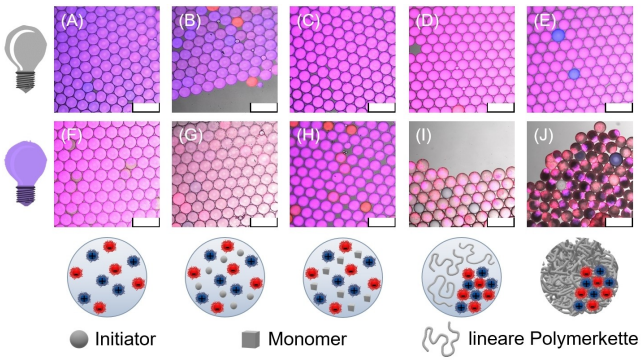

Abbildung 4. CLSM-Überlagerungsbilder der Wasser-in-Öl-Tröpfchen, welche NG sowie verschiedene Reaktanden vor ((A)–(E)) und nach der UV Bestrahlung ((F)–(J)) enthalten. Darunter sind schematische Darstellungen der wässrigen Tröpfchen und der darin enthaltenden Komponenten nach der UV-Bestrahlung gezeigt. Koazervation tritt nur auf, nachdem (überwiegend) lineare (I) oder quervernetzte Polymerketten (J) generiert wurden. Die Skala repräsentiert jeweils 300 µm.

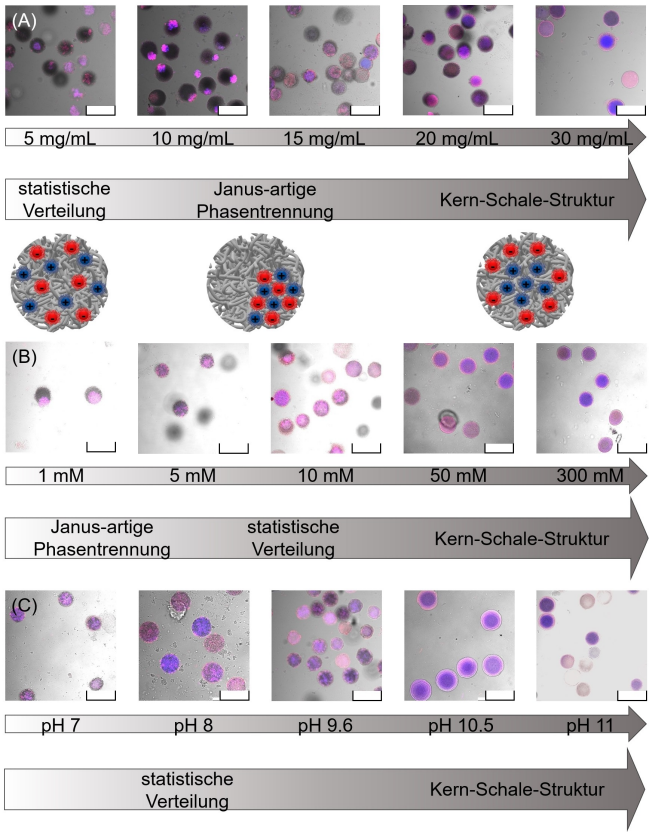

Abbildung 5. CLSM-Überlagerungsbilder der PA-NiM–C mit unterschiedlichen NG-Konzentrationen (A), Ionenstärken (B) und pH-Werten (C) während der Synthese mit einem 1:1 NG-Verhältnis. Eine NG-Konzentration von 10 mg/mL wurde für die Variation der Ionenstärke und des pH-Werts verwendet. Die Parameter anzupassen, ermöglicht die Synthese von NiM–C mit Janus-artiger Phasentrennung, statistisch verteilter Koazervate und Kern-Schale-Strukturen der NG. Die Skala repräsentiert jeweils 300 µm.

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

10 mg/mL der beiden NG-Spezies, was der bisher verwendeten Konzentration entspricht. In Experimenten, in denen die Konzentration der Dispersionen auf jeweils 5 mg/mL reduziert wurde, bildeten sich kleinere Koazervate. Die geringere Anzahl von NG in den Tröpfchen führt zu einer größeren räumlichen Trennung der NG innerhalb des MG-Netzwerks und verhindert somit die Bildung eines zusammenhängenden Koazervats. Mit steigender NG-Konzentration wächst die Größe des Koazervats, bis es den größten Teil des MG-Metzwerks einnimmt. Überraschenderweise ist bei 30 mg/mL das gesamte MG-Netzwerk mit NG gefüllt und weist eine Kern-Schale-ähnliche Substruktur auf, bei der sich die pNG im Inneren und die nNG im Äußeren des MG-Netzwerks befinden. Für ladungsstöchiometrische Lösungen entgegengesetzt geladener Polymere wurde bereits nachgewiesen, dass oberhalb einer bestimmten Polyelektrolyt-Konzentration Koazervationseffekte unterdrückt sind und sich eine einzige Phase bildet.[43] Aufgrund unserer Beobachtungen gehen wir davon aus, dass die NG in dieser Hinsicht ein ähnliches Verhalten wie lineare Polyelektrolytketten aufweisen. Darüber hinaus deuten neuere Studien darauf hin, dass die Wahl des Co-Monomers in PNIPAAm-basierten MG deren Grenzflächenaktivität verändert.[44] Aufgrund der chemischen Strukturen der MAAc-und APMH-Gruppen (Abbildungen S7, S8) gehen wir davon aus, dass die nNG etwas polarer sind. Daraus folgern wir, dass die hydrophilere nNG-Spezies bevorzugt nahe des hydrophilen Tensidkopfes vorzufinden ist, während die etwas hydrophoberen pNG eher im Inneren des NiM–C lokalisiert sind. Alle drei NG-Anordnungen (statistische Verteilung, Janus-artige Phasentrennung und Kern-Schale-Struktur) wurden mittels CLSM-Bildern mehrerer z-Ebenen (sogenannter *z-stack*) untersucht, um ihre dreidimensionale Struktur zu überprüfen (Abbildung S15).

Für die Variation der Ionenstärke wurden die NG (10 mg/mL) in wässrigen Natriumchlorid-Lösungen mit Ionenstärken zwischen 1 und 300 mM redispergiert (Abbildung 5 (B)). Wie erwartet waren Phasentrennung und Koazervation am stärksten in den NiM–C ausgeprägt, die mit einer Salzkonzentration von 1 mM erzeugt wurden. Eine Erhöhung der Ionenstärke führte zu einer verringerten Koazervation und einer homogeneren Verteilung beider NG-Spezies innerhalb des MG-Netzwerks. Je höher die Salzkonzentration ist, desto stärker werden die Ladungen der NG abgeschirmt. Dies wiederum verringert die elektrostatische Anziehung zwischen den NG, von der wir annehmen, dass sie eine der treibenden Kräfte der Koazervation ist. Die CLSM-Bilder in Abbildung 5 (B) bestätigen diese Vermutung. Bei Salzkonzentrationen von ≥ 50 mM wurden die Ladungen größtenteils abgeschirmt und die Polyelektrolyt-NG kollabierten (Abbildung S3, (A)). Auch hier bildeten sich Kern-Schale-ähnliche Anordnungen von NG innerhalb der NiM–C. Unserer Hypothese folgend argumentieren wir, dass die Lage der NG bei hohen Salzkonzentrationen ausschließlich durch ihre Grenzflächenaktivität und Hydrophobie beeinflusst wird, da die elektrostatische Anziehung durch die Abschirmung der Ladungen aufgehoben wird.

Um die Auswirkungen des pH-Werts auf die interne Struktur der NiM–C zu untersuchen, musste die Ionenstärke durch die Verwendung von Puffern konstant bei einer Ionenstärke von 10 mM gehalten werden.[45] Obwohl die Puffer speziell mit diesen niedrigen Ionenstärken hergestellt wurden, reicht die geringe Menge der freien Ionen bereits aus, um eine Abschirmung einiger Ladungen innerhalb der NG im NiM–C zu bewirken. Natürlich ist die Abschirmung proportional zur Ionenstärke, genügt aber, um im neutralen pH-Bereich eine anteilige Dissoziation und Verteilung der NG auszulösen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind daher eher mit den Experimenten zu vergleichen, die bei einer Ionenstärke von 10 mM durchgeführt wurden, als mit denen, für die HPLC-Wasser verwendet wurde (Abbildung 5). Wie die pK_S-Werte von MAAc und APMH nahelegen und unsere DLS- und ELS-Messungen belegen (Abbildung S3, S4), sind die nNG bei pH <4.0 ungeladen, während die pNG bei pH >10.0 nicht geladen sind. In sauren Puffern fielen die nNG bei Zugabe von NIPAAm und BIS aus, sodass pH-Werte <5.0 nicht getestet werden konnten. Möglicherweise sind die nNG bei pH 5.0 bereits weitgehend deprotoniert und scheiden sich daher aufgrund von hydrophoben Effekten ab, welche in Gegenwart von NIPAAm und BIS auftreten. Abbildung 5 (C) zeigt, dass bei pH 7.0–9.6 kleinere Koazervate im NiM–C räumlich verteilt sind. Die partielle Abschirmung der Ladungen ($I=10$ mM) und die zunehmende Protonierung der APMH-Gruppen führen zu einer im Vergleich weniger ausgeprägten Phasentrennung. Bei den pH-Werten 10.5 und 11.0 sind nur noch die nNG geladen. Wieder bilden sich Kern-Schale-ähnliche Anordnungen der NG, weil hier die elektrostatische Abstoßung zwischen den negativen Ladungen überwiegt, während die Anziehungskräfte abnehmen.

Wie Weitz et al. gezeigt haben, fallen thermoresponsive NIPAAm-basierte MG in wässrigen Tröpfchen aus, wenn sie über die VPTT erhitzt werden. Zusätzlich zu den elektrostatischen Wechselwirkungen und der entropisch bedingten Ausflockung spielt daher auch die Temperatur eine Rolle bei der Koazervation von MG/NG.[28] Weitere Experimente sollten den Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Koazervation der NG untersuchen. Zusätzlich sollten NiM–C mit Kern-Schale-Strukturen untersucht werden, um zu überprüfen, ob die Hydrophobizität und Grenzflächenaktivität der NG tatsächlich entscheidend sind. In Bezug auf unser Ziel, ein Wirkstoffträger-System mit entgegengesetzt geladenen Kompartimenten zu entwerfen, ermöglicht ein tieferes Verständnis der entscheidenden Wechselwirkungen die Kontrolle über die NiM–C-Architektur und Wirkungsweise. Vorläufige Experimente bestätigen die Stimulus-responsive Aufnahme und Freisetzung eines geladenen Modellwirkstoffs[46,47] mithilfe der NiM–C (Abbildungen S16, S17). Es sind jedoch weitere Optimierungen und Analysen erforderlich, um die Effizienz der Absorption und Freisetzung des zu transportierenden Moleküls zu verbessern und die Anwendbarkeit für weitere Arzneimittel zu überprüfen. Da die NiM–C in einem zweistufigen Verfahren hergestellt werden, kann die Größe der NiM–C prinzipiell durch Änderung des Kanaldurchmessers auf dem Mikrofluidik-Chip angepasst werden. Es ist bereits bekannt, dass mittels tropfenbasierter Mikrofluidik Mikrogele mit Durchmessern zwischen 10 µm und 1000 µm hergestellt werden

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

können.[24] Abhängig von der gewünschten Größe der NiM–C muss außerdem der Durchmesser der NG durch Anpassung der Reaktionsbedingungen bei der Fällungspolymerisation reduziert werden. Im Allgemeinen ist für die Auswahl einer geeigneten Größe die geplante pharmazeutische Formulierung entscheidend: Während für Wirkstoffträger-Systeme, die intravenös in die Blutbahn injiziert werden, eine ideale Größe von 100–500 nm angegeben wird,[48] sollten inhalierbare Wirkstoffträger beispielsweise eine Größe zwischen 0.5–5 μm aufweisen.[49] Da die vorgestellten NiM–C eine einzigartige pH-Empfindlichkeit aufweisen, ist eine Verabreichung durch orale Aufnahme zur gezielten Wirkstofffreisetzung im Magen-Darm-Trakt denkbar. Es könnten aber auch andere therapeutische Darreichungsformen wie die transdermale Einnahme getestet werden.[50] In jedem Fall müssen Größe, Oberflächenfunktionalisierung und Abbaubarkeit der NiM–C optimiert werden, um ihre Eigenschaften für die in vivo-Anwendung zu verbessern.[48]

Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir eine einfache stufenweise Syntheseroute zur Herstellung von polyelektrolytischen und polyampholytischen Nanogel-in-Mikrogel-Kolloiden (NiM–C) entwickelt. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde eingesetzt, um die Lokalisierung und Anordnung der NG innerhalb der NiM–C zu visualisieren. Die Variation von pH-Wert und Ionenstärke nach der Bildung des MG-Netzwerks bewiesen, dass die Morphologie der NiM–C selbst bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen gleichbleibt und dass die NG fest im MG-Netzwerk immobilisiert sind. Wir konnten nachvollziehbar zeigen, dass die Koazervation und Phasentrennung der NG durch die Kombination aus elektrostatischer Anziehung und entropisch bedingten Verarmungskräften auftritt. Die NG ziehen sich aufgrund der unterschiedlichen Ladungen an, doch erst durch die entropischen Kräfte, die bei der Bildung der Polymere im Tröpfchen entstehen, entwickeln sich Janus-artige NiM–C. Dementsprechend ermöglicht eine sorgfältige Auswahl der Syntheseparameter, insbesondere der Konzentration der NG-Dispersionen, des pH-Werts und der Ionenstärke, die Kontrolle über die innere Morphologie der NiM–C. Selektiv können so phasenseparierte oder statistisch verteilte NG-Koazervate sowie Kern-Schale-artige Anordnungen der NG erhalten werden. Die am stärksten ausgeprägte Phasenseparation und Koazervation der NG wurde in HPLC-Wasser ($pH \approx 6.5$) bei niedrigen Ionenstärken ($I < 5$ mM) und einer Konzentration der NG-Dispersion von 10 mg/mL erreicht.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB 985 "Funktionale Mikrogele und Mikrogelsysteme" (Projekt A3) und danken der Organisation für die finanzielle Unterstützung. Die Autoren bedanken sich zudem bei Stefan Hauk für die Unterstützung bei der Aufnahme der REM-Bilder. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

Stichwörter: Janus-artige Phasenseparation · Kooperative Effekte · Polyampholyte · Responsive Materialien · Kolloide

[1] S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 155–162.
[2] P. Qu, J. W. Cleveland, E. Ahmed, F. Liu, S. Dubrawski, C. W. Jones, M. Weck, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 57–70.
[3] T.-Y. Huang, M. S. Sakar, A. Mao, A. J. Petruska, F. Qiu, X.-B. Chen, S. Kennedy, D. Mooney, B. J. Nelson, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 6644–6650.
[4] a) T. Trantidou, M. S. Friddin, A. Salehi-Reyhani, O. Ces, Y. Elani, *Lab Chip* **2018**, *18*, 2488–2509; b) J. Fu, D. An, Y. Song, C. Wang, M. Qiu, H. Zhang, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *422*, 213467.
[5] Y. Geng, P. Zhang, Q. Wang, Y. Liu, K. Pan, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 5390–5396.
[6] a) R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5–10; b) J. K. Mills, D. Needham, *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, *9*, 1499–1513; c) C. Lautenschläger, C. Schmidt, D. Fischer, A. Stallmach, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *71*, 58–76; d) S. H. Lee, R. Bajracharya, J. Y. Min, J.-W. Han, B. J. Park, H.-K. Han, *Pharmaceutica* **2020**, *12*, 68.
[7] a) X. Ge, M. Wei, S. He, W.-E. Yuan, *Pharmaceutica* **2019**, *11*, 55; b) S. Chen, S. Hanning, J. Falconer, M. Locke, J. Wen, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *144*, 18–39.
[8] F. Farooque, M. Wasi, M. M. Mughees, *J. Drug Delivery Ther.* **2021**, *11*, 149–158.
[9] S. K. Hari, A. Gauba, N. Shrivastava, R. M. Tripathi, S. K. Jain, A. K. Pandey, *Drug Delivery Transl. Res.* **2023**, *13*, 135–163.
[10] a) P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 569–579; b) M. Malmsten, H. Bysell, P. Hansson, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 435–444; c) G. Agrawal, R. Agrawal, *Small* **2018**, *14*, 1801724.
[11] a) F. A. Plamper, W. Richtering, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 131–140; b) M. Karg, A. Pich, T. Hellweg, T. Hoare, L. A. Lyon, J. J. Crassous, D. Suzuki, R. A. Gumerov, S. Schneider, I. I. Potemkin, W. Richtering, *Langmuir* **2019**, *35*, 6231–6255.
[12] a) R. H. Pelton, P. Chibante, *Colloids Surf.* **1986**, *20*, 247–256; b) H. Kawaguchi, *Gels* **2020**, *6*, 26.
[13] a) M. Annegarn, M. Dirksen, T. Hellweg, *Polymer* **2021**, *13*, 827; b) A. Pich, A. Tessier, V. Boyko, Y. Lu, H.-J. P. Adler, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7701–7707; c) E. Mueller, S. Himbert, M. J. Simpson, M. Bleuel, M. C. Rheinstadter, T. Hoare, *Macromolecules* **2021**, *54*, 351–363.
[14] a) M. J. Snowden, B. Z. Chowdhry, B. Vincent, G. E. Morris, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 5013–5016; b) T. López-

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

León, A. Elaïssari, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 148–156; c) M. Karg, I. Pastoriza-Santos, B. Rodriguez-González, R. von Klitzing, S. Wellert, T. Hellweg, *Langmuir* **2008**, *24*, 6300–6306.
[15] a) A. Garcia, M. Marquez, T. Cai, R. Rosario, Z. Hu, D. Gust, M. Hayes, S. A. Vail, C.-D. Park, *Langmuir* **2007**, *23*, 224–229; b) M. Bekir, J. Jelken, S.-H. Jung, A. Pich, C. Pacholski, A. Kopyshev, S. Santer, *Appl. Phys. Lett.* **2021**, *118*, 091603; c) C. Hu, W. Xu, C. M. Conrads, J. Wu, A. Pich, *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *582*, 1075–1084.
[16] a) M. F. Schulte, E. Izak-Nau, S. Braun, A. Pich, W. Richtering, R. Göstl, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 2939–2956; b) M. Zou, P. Zhao, J. Fan, R. Göstl, A. Herrmann, *J. Polym. Sci.* **2022**, *60*, 1864–1870; c) T. Kharandiuk, K. H. Tan, W. Xu, F. Weitenhagen, S. Braun, R. Göstl, A. Pich, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 11304–11311.
[17] a) J. Ramos, A. Imaz, J. Forcada, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 852–856; b) Z. Guo, S. Li, C. Wang, J. Xu, B. Kirk, J. Wu, Z. Liu, W. Xue, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2017**, *32*, 17–31; c) L. Tang, L. Wang, X. Yang, Y. Feng, Y. Li, W. Feng, *Prog. Mater. Sci.* **2021**, *115*, 100702.
[18] a) J. Kleinen, W. Richtering, *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289*, 739–749; b) T. López-León, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, A. Elaïssari, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 4629–4636.
[19] a) T. Hoare, R. Pelton, *Langmuir* **2008**, *24*, 1005–1012; b) T. Śliwa, M. Jarzębski, E. Andrzejewska, M. Szafran, J. Gapiński, *React. Funct. Polym.* **2017**, *115*, 102–108; c) W. Xu, A. A. Rudov, R. Schroeder, I. V. Portnov, W. Richtering, I. I. Potemkin, A. Pich, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 1578–1591; d) M. Nöth, L. Hussmann, T. Belthle, I. El-Awaad, M. D. Davari, F. Jakob, A. Pich, U. Schwaneberg, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 5128–5138.
[20] P. S. Charifson, W. P. Walters, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9701–9717.
[21] L. Bromberg, M. Temchenko, T. A. Hatton, *Langmuir* **2003**, *19*, 8675–8684.
[22] R. Iyengar, *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 1039–1042.
[23] a) J. M. Knipe, F. Chen, N. A. Peppas, *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, 40098; b) J. M. Knipe, L. E. Strong, N. A. Peppas, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 788–797.
[24] a) R. K. Shah, J.-W. Kim, J. J. Agresti, D. A. Weitz, L.-Y. Chu, *Soft Matter* **2008**, *4*, 2303–2309; b) S. Seiffert, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 1600–1609; c) W. J. Duncanson, T. Lin, A. R. Abate, S. Seiffert, R. K. Shah, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2012**, *12*, 2135–2145; d) J. Wang, Y. Li, X. Wang, J. Wang, H. Tian, P. Zhao, Y. Tian, Y. Gu, L. Wang, C. Wang, *Micromachines* **2017**, *8*, 22.
[25] a) B. Lu, M. D. Tarn, N. Pamme, T. K. Georgiou, *J. Polym. Sci. Part A* **2018**, *56*, 59–66; b) S. Tie, W. Su, X. Zhang, Y. Chen, X. Zhao, M. Tan, *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1466–1477; c) A. Sharma, S.-H. Jung, N. Lomadze, A. Pich, S. Santer, M. Bekir, *Macromolecules* **2021**, *54*, 10682–10690.
[26] J.-W. Kim, A. S. Utada, A. Fernández-Nieves, Z. Hu, D. A. Weitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1819–1822.
[27] W. Li, D. Liu, H. Zhang, A. Correia, E. Mäkilä, J. Salonen, J. Hirvonen, H. A. Santos, *Acta Biomater.* **2017**, *48*, 238–246.
[28] R. K. Shah, J.-W. Kim, D. A. Weitz, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1949–1953.
[29] M. Hu, N. Reichholf, Y. Xia, L. Alvarez, X. Cao, S. Ma, A. J. DeMello, L. Isa, *Mater. Horiz.* **2022**, *9*, 1641–1648.
[30] J. V. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, R. F. T. Stepto, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 1801–1829.
[31] M. Kwok, T. Ngai, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *461*, 409–418.
[32] A. Ahiabu, M. J. Serpe, *ACS Omega* **2017**, *2*, 1769–1777.
[33] X. Hu, Z. Tong, L. A. Lyon, *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289*, 333–339.
[34] a) A. Matsumoto, H. Mano, M. Oiwa, G. B. Butler, *J. Polym. Sci. Part A* **1989**, *27*, 1811–1816; b) W. Jaeger, J. Bohrisch, A. Laschewsky, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 511–577; c) H. Ahmadloo, R. Losada, C. Wandrey, *Polymer* **2016**, *8*, 234.
[35] A. Lüken, M. Bruckhaus, U. Kosfeld, M. Emondts, M. Wessling, *HardwareX* **2021**, *10*, e00200.
[36] R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, S. Herminghaus, *Rep. Prog. Phys.* **2012**, *75*, 016601.
[37] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6702–6707.
[38] a) H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdts, R. F. Ismagilov, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664–4666; b) D. Di Carlo, *Lab Chip* **2009**, *9*, 3038–3046; c) J. Sivasamy, Z. Che, T. Neng Wong, N.-T. Nguyen, L. Yobas, *Chem. Eng. Sci.* **2010**, *65*, 5382–5391; d) Y. K. Suh, S. Kang, *Micromachines* **2010**, *1*, 82–111; e) A. Venkateshwarlu, R. P. Bharti, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2021**, *129*, 64–79.
[39] R. Schroeder, A. A. Rudov, L. A. Lyon, W. Richtering, A. Pich, I. I. Potemkin, *Macromolecules* **2015**, *48*, 5914–5927.
[40] O. S. Wolfbeis, H. Offenbacher, *Sens. Actuators* **1986**, *9*, 85–91.
[41] a) P. Jenkins, M. Snowden, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, *68*, 57–96; b) R. I. Feigin, D. H. Napper, *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *75*, 525–541.
[42] R. Tuinier, J. Rieger, C. G. de Kruif, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *103*, 1–31.
[43] a) A. Veis, E. Bodor, S. Mussell, *Biopolymers* **1967**, *5*, 37–59; b) L. Li, S. Srivastava, M. Andreev, A. B. Marciel, J. J. de Pablo, M. V. Tirrell, *Macromolecules* **2018**, *51*, 2988–2995; c) H. Li, M. Fauquignon, M. Haddou, C. Schatz, J.-P. Chapel, *Polymer* **2021**, *13*, 3848; d) H. Li, L. Porcar, A. Bentaleb, C. Schatz, J.-P. Chapel, *ChemRxiv preprint* **2022** https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-f362k.
[44] T. Zhang, T. Ngai, *Langmuir* **2021**, *37*, 1045–1053.
[45] D. D. Perrin, *Aust. J. Chem.* **1963**, *16*, 572–578.
[46] a) R. Rotival, P. Espeau, Y. Corvis, F. Guyon, B. Do, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 3223–3232; b) A. A. Chumanevich, E. E. Witalison, A. Chaparala, A. Chumanevich, P. Nagarkatti, M. Nagarkatti, L. J. Hofseth, *Oncotarget* **2016**, *7*, 52928–52939.
[47] A. C. Capomacchia, S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta* **1975**, *77*, 79–85.
[48] N. M. B. Smeets, T. Hoare, *J. Polym. Sci. Part A* **2013**, *51*, 3027–3043.
[49] P. Wanakule, G. W. Liu, A. T. Fleury, K. Roy, *J. Controlled Release* **2012**, *162*, 429–437.
[50] Y. Kittel, A. J. C. Kuehne, L. De Laporte, *Adv. Healthcare Mater.* **2022**, *11*, 2101989.

Manuskript erhalten: 6. April 2023
Akzeptierte Fassung online: 30. Juni 2023
Endgültige Fassung online: 31. Juli 2023

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH

15213757, 2023, 36, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.202304908 by Rwth Aachen Hochschulbibliothek, Wiley Online Library on [19/08/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License