

Minerva Access is the Institutional Repository of The University of Melbourne

Author/s:

Chan, NJ;Lentz, S;Gurr, PA;Tan, S;Scheibel, T;Qiao, GG

Title:

Vernetzte Polypeptide durch RAFT - vermittelte Polymerisation zum kontinuierlichen Aufbau von Polymerfilmen

Date:

2022-02-21

Citation:

Chan, N. J., Lentz, S., Gurr, P. A., Tan, S., Scheibel, T. & Qiao, G. G. (2022). Vernetzte Polypeptide durch RAFT - vermittelte Polymerisation zum kontinuierlichen Aufbau von Polymerfilmen. *Angewandte Chemie*, 134 (9), <https://doi.org/10.1002/ange.202112842>.

Persistent Link:

<https://hdl.handle.net/11343/308075>

License:

[CC BY-NC](#)

Polypeptidfilme

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202112842

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202112842

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202112842

Vernetzte Polypeptide durch RAFT-vermittelte Polymerisation zum kontinuierlichen Aufbau von Polymerfilmen

Nicholas J. Chan, Sarah Lentz, Paul A. Gurr, Shereen Tan, Thomas Scheibel,* und Greg G. Qiao*

Abstract: Polypeptidbeschichtungen spielen aufgrund ihres großen biologischen Potentials eine wichtige Rolle in der Oberflächenmodifizierung von Materialien. Da ihre Eigenschaften durch ihren strukturellen Aufbau mitbestimmt werden, ist eine Kontrolle der Struktur durch entsprechende Herstellungsstrategien notwendig. In diesem Artikel berichten wir über eine einfache Methode zur präzisen Herstellung von dicht vernetzten Polypeptidfilmen mit ungewöhnlich hoher β -Faltblatt- und Zufallsknäuel Konformation durch eine kontinuierliche Assemblierungspolymerisation (CAP, continuous assembly polymerization) mittels reversibler Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungspolymerisation (RAFT Polymerisation, reversible-addition-fragmentation chain-transfer polymerization), kurz CAP-RAFT. CAP-RAFT wurde bereits grundlegend mit methacryliertem Poly-L-Lysin (PLLMA) und methacrylierter Poly-L-Glutaminsäure (PLGMA) untersucht. Eine sorgfältige Anpassung der Methode führte hier zu Filmen mit einer Schichtdicke von bis zu 36.1 ± 1.1 nm, die durch mehrfache Anwendung dieser Strategie auf 94.9 ± 8.2 nm erhöht werden konnte. PLLMA- und PLGMA-Filme wiesen überraschenderweise bis zu 30–50% Zufallsknäuel Konformation auf. Durch den enzymatischen Abbau mit einem Protease-Mix, der Proteasen im Wundheilungsmilieu repräsentiert, konnte das Potential diesen Strukturen für Anwendungen im Wirkstofftransport und in der Gewebezüchtung gezeigt werden.

Einleitung

Seit Jahrzehnten nutzen Wissenschaftler Oberflächenmodifikationen durch Polypeptide in Gebieten der Biosenso-

rik,^[1] Freisetzung von Wirkstoffen,^[2] sowie in antifouling und antimikrobiellen Anwendungen.^[3] Polypeptide können so modifiziert werden, dass sie anwendungsspezifische chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen, was größtenteils darauf basiert, dass sich ihre spezifischen Aminosäuresequenzen in verschiedene wohldefinierte Konformationen falten können, die Sekundärstrukturen genannt werden.^[4] Somit sind das Design und die Manipulation von Sekundärstrukturen (z. B. α -Helices, β -Faltblatt und Zufallsknäuel) wichtige Parameter für die Herstellung.^[5] Herkömmliche Techniken zur Herstellung von Beschichtungen und zur Filmbildung sind bereits gut etabliert für Polypeptide, die durch N-Carboxyanhydrid-Ringöffnungspolymerisation (NCA-ROP) hergestellt werden, was eine Möglichkeit bietet Polypeptidfilme durch Pfropfpolymerisation herzustellen.^[6] Sowohl *Grafting-to* als auch *grafting-from* Strategien führen zu linearen Polymeren mit einer an der Oberfläche verankerten Endgruppe.^[7] Jedoch sind Filme, die mit Hilfe von Pfropftechniken hergestellt werden, in der Regel sterisch durch die Bindung eines großen Moleküls an einer Oberfläche eingeschränkt. Filme, die mittels Pfropfpolymerisation hergestellt worden sind, sind schwer zu charakterisieren, da im System mehr als ein Monomer vorhanden ist.^[7] *Grafting-through* Strategien zielen darauf ab, diese Probleme zu verringern, indem Makromonomere mit polymerisierbaren Endgruppen anstelle von monofunktionellen Monomeren verwendet werden, was zu Filmen mit größerer Schichtdicke und definierten Polymerbürsten führt.^[3a,8] Basierend auf den Vorteilen, die sich aus der Verwendung von *grafting-through* Methoden ergeben, hat unsere Gruppe die Methodik der kontinuierlichen Assemblierungspolymerisation (CAP) entwickelt, die in einzigartigen, robusten und vernetzten Filmen resultiert.^[9]

Wie bei anderen *grafting-through* Techniken, benutzt CAP Monomere mit einer polymerisierbaren Gruppe, jedoch sind sie nicht auf eine einzelne Endgruppe beschränkt, was in einem Makrovernetzer resultiert, anders als bei den herkömmlichen *grafting* Methoden.^[10] Das Ergebnis ist ein dichtes Polymernetzwerk, das einen robusten Film auf der Substratoberfläche bildet, der oft eine Morphologie aufweist, die sich von den Morphologien der herkömmlichen *grafting through* Methoden unterscheidet. Diese Technik ist so robust, dass einige Makrovernetzer mit dieser Technik verwendet wurden, z. B. Polymere auf Polyethylenglykol (PEG) – Basis,^[11] 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) – Basis,^[9a,c] und Polythiophen.^[12] Diese Technik kann mit Makrovernetzern kombiniert werden, die bereits einzigartige Morphologien aufweisen. Makrovernetzer auf Polyrotaxan-Basis wur-

[*] N. J. Chan, S. Lentz, P. A. Gurr, S. Tan, G. G. Qiao
Polymer Science Group, Department of Chemical Engineering
University of Melbourne
Parkville, Melbourne, Victoria 3010 (Australien)
E-mail: gregghq@unimelb.edu.au

N. J. Chan, S. Lentz, T. Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien
Universität Bayreuth
Prof.-Rüdiger-Bormann-Str. 1, 95447 Bayreuth (Deutschland)
E-mail: thomas.scheibel@uni-bayreuth.de

© 2021 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.

den eingesetzt, um einen Film mit der dichten Vernetzung von CAP-Filmen verbunden mit der Empfindlichkeit gegenüber Stimuli der "Wirt-Gast" Chemie eines Polyrotaxan-Netzwerks auf Cyclodextrin-Basis herzustellen.^[13] Die Morphologie, die durch CAP erreicht wird, und die große Vielfalt an Makrovernetzern, die für dieses Verfahren geeignet sind, ermöglichen die Synthese von Filmen für eine Vielzahl von Anwendungen.^[10a,11a] Die Antibeschlageigenschaften eines PEG-basierten Films wurden mit dieser Technik nachgewiesen, nachdem der Film Umgebungsbedingungen von -20°C bis Raumtemperatur ausgesetzt wurde. Die Filme behielten ihre hohe Lichtdurchlässigkeit mit einer relativ geringen Vernetzungsdichte.^[11b] Zusätzlich zu einer bereits etablierten Datenbank von Vernetzern gibt es eine Vielzahl von Techniken für CAP, die inzwischen etabliert sind und verschiedene Herstellungsbedingungen umfassen.^[9d] Jüngst wurde eine neue Strukturierungsmethode entwickelt, bei der das Material für die CAP durch Mikrokontaktdruck mit einem Polymerstempel aufgebracht wird.^[14] Neben des Fortschritts der Entwicklung von CAP wurden weitere Polymerisationsmethoden wie ringöffnende Metathesepolymerisation (ROMP)^[12,13] und radikalische Polymerisation durch Atomtransfer (ATRP) inkludiert.^[11] Grundsätzlich wirkt sich die Polymerisationsmethode aufgrund mechanistischer Unterschiede auf die resultierenden Filmeigenschaften aus, sodass CAP mit unterschiedlichen Polymerisationstechniken verknüpft interessante Möglichkeiten bietet. Bei einem durch blaues Licht initiierten System wurde ein Thiocarbamat als Photoiniferter verwendet, wobei die Filmschichtdicke jedoch auf circa 5 nm limitiert war.^[9a] Die erzielbare Variabilität der Eigenschaften, unterstreicht Notwendigkeit der Nutzung der reversiblen Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragung (RAFT) als CAP-Technik.

RAFT gilt als eine der robustesten und vielseitigsten Techniken für die radikalische Polymerisation mit reversibler Deaktivierung.^[15] In einem RAFT Polymerisationssystem wird die Polymerisation durch den degenerativen Kettentransfer des Kettenübertragungsgens (CTA, *engl. chain transfer agent*) in Form einer Thiocarbonylthio-Verbindung, bekannt als RAFT Agens (*engl. RAFT agent*) auf die Polymerketten gesteuert, was zur sequentiellen Einfügung von Monomer Einheiten in das ursprüngliche RAFT-Agens führt.^[15d,16] Die Initiierung beruht auf freien Radikalen, daher gibt es zahlreiche Ansätze für die RAFT-Polymerisation, darunter die Initiierung durch Enzyme, thermische Initiatoren oder die akustische Kavitation von Blasen im System durch Ultraschall. Dennoch bieten lichtbasierte RAFT-Techniken für eine oberflächeninitiierte Polymerisation eine gute Möglichkeit, gepropfte Polymere zu erhalten.^[7c,17] Mithilfe unserer bereits entwickelten Techniken der RAFT-Polymerisation^[18] und NCA-ROP,^[19] wurde das Potenzial von CAP-RAFT weiterentwickelt und dabei Filme auf Polypeptidbasis mit Sekundärstrukturmorphologien hergestellt, die durch das Herstellungsverfahren bestimmt werden.

Diese Arbeit erweitert die Möglichkeiten, Polypeptid-basierte Filme mit Blaulicht vermittelten CAP-RAFT unter Zuhilfenahme von synthetischen Makrovernetzern auf Poly-

peptidbasis herzustellen. Dies ist das erste Beispiel für die Herstellung eines chemisch vernetzten Polypeptidfilms auf der Basis von NCA-ROP mit präziser Kontrolle der Schichtdicke in einem Schritt, kontrollierten mehrschichtigen Strukturen mit angepasster Zusammensetzung und spezifischer Sekundärstruktur, die sich auch aus der Herstellungstechnik ergibt und nicht allein aus der Polypeptidsequenz. Der Fotoinitiator Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) wurde in Verbindung mit zwei verschiedenen Modell – RAFT Agentien verwendet. Ein Dithiobenzoat und ein Trithiocarbonat, die unterschiedliche Kinetiken aufweisen, wurden ausgewählt, um ihren Einfluss auf die Filmbildung mit gleichmäßiger Schichtdicke zu untersuchen. Desweiteren untersuchten wir die Bedeutung des RAFT-Agens in Lösung, das in der Vergangenheit erforderlich war, um Filme mit gleichmäßiger Schichtdicke zu entwickeln, und dessen Auswirkung auf Kinetik und Schichtdickenhomogenität. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersuchten wir auch die Möglichkeit, geschichtete, mehrschichtige vernetzte Filme herzustellen, indem wir das RAFT-Agens an die initiierende Oberfläche koppelten, um den CAP-RAFT-Prozess an der wachsenden Polymeroberfläche erneut zu initiieren. Zur Demonstration der Vielseitigkeit unserer Methode wurde ein zweiter Makrovernetzer auf Polypeptidbasis verwendet. In beiden Fällen wurde ein ungewöhnlich hoher Zufallsknäuel Strukturanteil erzeugt, was in Verbindung mit dem nachgewiesenen enzymatischen Abbau einzigartige Möglichkeiten für Anwendungen im Wirkstofftransport und der Geweberekonstruktion liefert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Polypeptid-Makroinitiatoren wurden durch NCA-ROP, anschließender Entschützung und Methacrylierung synthetisiert (siehe Abbildung S1, S2 in den Hintergrundinformationen). NCA-ROP ist bekanntlich ein einfaches Verfahren zur Herstellung langkettiger, nicht sequenzspezifischer Polypeptide.^[4b,20] Mit einer Auswahl an 21 kanonischen Aminosäuren mit unterschiedlichen Graden an Hydrophobizität, physikalischen Eigenschaften und chemischer Funktionalität sind sie eine äußerst vielseitige Polymerklasse für ein breites Anwendungsgebiet.^[20b,21] Zur Synthese eines Modell-Polypeptid-Makroinitiators wurde ϵ -Carboxybenzyl-geschütztes Poly(L-lysin(Z)) (PZLL) mit Hexylamin als Initiator synthetisiert. Die Verwendung von PLL als Basispolypeptid ist auf seine Amine in den Seitenketten zurückzuführen, die sich ideal für die Funktionalisierung des Materials eignen. Das Polypeptid wurde dann mit Bromwasserstoffsäure (HBr) behandelt, wodurch die Carboxybenzyl-Schutzgruppe entfernt und die primären Amine des Poly(L-Lysin) (PLL) exponiert wurden, die sich für die Methacrylierung eignen. Die Methacrylierung wurde durchgeführt, indem zunächst das Polypeptid in einer 10 gewichtsprozentigen wässrigen Lösung durch Erhöhung des pH-Werts auf 10–11 deprotoniert wurde, und dann Methacrylsäureanhydrid zugegeben wurde, was zu einer Methacrylierungsrate von 15 % führte (siehe Tabelle S1). Es sollte beachtet werden, dass eine zunehmende Funktionalisierung der Makrovernetzer im

Allgemeinen zu einer erhöhten Filmdicke führt wenn CAP verwendet wird, wie in einer früheren Studie gezeigt wurde.^[10c] Für das CAP-Verfahren reicht es in der Regel, wenn 10 % der wiederkehrenden Einheiten Doppelbindungen vorweisen. Während dies wie beabsichtigt zu Poly(L-Lysin-g-methacrylat) (PLLMA) führt, bleibt das Polypeptid als Nebeneffekt deprotoniert, wodurch CAP in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann (Abbildung 1).

Als Vorbereitung für CAP wurde das RAFT-Agens auf aminierten Silizium-Oberflächen immobilisiert. Die Siliziumdioxid-Oberflächen wurden mit 3-Aminopropargyltriethoxysilan (APTES) mittels bereits etablierter Methoden aminiert.^[22] Die subsequenten Amingruppen waren empfänglich für die Carbodiimid-Kopplung mit RAFT-Agentien mit endständiger Carbonsäure (Begleitschema S3). Um die Umsetzbarkeit dieser Methode nachzuweisen, wurde 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure (CPADB) als Modell-Dithiobenzoat-RAFT-Agens verankert, so dass CAP-RAFT mit PLLMA-Makrovernetzer durchgeführt werden konnte. 4-Cyan-4-(thiobenzoylthio)-pentansäure (CTP) wurde bereits früher als Modell-Dithiobenzoat-RAFT-Agens für die Untersuchung von Methacrylamonomeren in Lösung verwendet^[23] und wurde daher in diesem Fall als geeignetes Modell-RAFT-Agens angesehen.

Die CAP-RAFT wurde durchgeführt, indem die behandelten Oberflächen in eine DMSO-Lösung von PLLMA-Makrovernetzer und LAP-Fotoinitiator getränkt und mit blauem Licht (4 mW cm^{-2} , max. 460 nm) bestrahlt wurden. Um zu bestätigen, dass die Filmbildung auf CAP und nicht nur auf die Adhäsion des Makroinitiators an der Oberfläche zurückzuführen ist, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen bestimmte Elemente im System fehlten

(siehe Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Alle Proben zeigten aufgrund der Adhäsion des abgeschiedenen Polypeptids eine sehr geringe Schichtdicke ($1.31\text{--}5.60\text{ nm}$). Wie zu erwarten war, ergaben Oberflächen ohne Oberflächeninitiator Filme ähnlicher Schichtdicke, was auf eine fehlende oberflächenbegrenzte Polymerisation hindeutet (Abbildung 1). Darüber hinaus zeigten Proben, die im Dunkeln aufbewahrt wurden (d.h. ohne Blaulichtexposition), ebenfalls eine fehlende oberflächenbegrenzte Polymerisation, was die Notwendigkeit von Blaulicht für die RAFT-Polymerisation bestätigt. Unsere Gruppe konnte bereits zeigen, dass die RAFT-Polymerisation mit blauem Licht ohne Verwendung eines Fotoinitiators eingeleitet werden kann, wobei die Polymerisationsgeschwindigkeit im Vergleich zu anderen bekannten RAFT-Mechanismen deutlich geringer ist.^[24] Allerdings zeigten nur Proben mit Fotoinitiator eine Polymerisation, wobei eine Schichtdicke von mindestens 30 nm beobachtet wurde, was eine Bestätigung für eine oberflächenbegrenzte RAFT-Polymerisation ist.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die oberflächeninitiierte RAFT-Polymerisation im Allgemeinen die Verwendung eines RAFT-Agens in Lösung erfordert, um eine gleichmäßige Schichtdicke zu gewährleisten.^[7c] Kürzlich demonstrierten Seo et al. die Verwendung von SI-PET-RAFT ohne RAFT-Agens in Lösung was in strukturierbaren Polymerbürsten resultierte.^[25] Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein, die darauf hindeuten, dass die Polymerisation auf die Filmoberfläche beschränkt ist. Um den Polymerisationsgrad sowohl mit als auch ohne RAFT-Agens in Lösung zu bestimmen, wurde die Aggregatgröße analysiert. DLS-Analysen zeigten eine Zunahme der Partikelgröße von $0.901 \pm 0.0590\text{ nm}$ auf $2.47 \pm 0.21\text{ nm}$ mit LAP und ohne funktionalisierte Oberflächen nach der Bestrahlung mit blauem Licht, solange der Fotoinitiator in Lösung vorhanden war (Hintergrundinformationen Abbildung S6 und S7). Eine Abnahme der Partikelgröße, die mit einer Abnahme der Polymerisation im Überstand korreliert, wurde mit der Einführung von funktionalisierten Oberflächen beobachtet, was auf eine Zunahme der Kontrolle nach deren Einführung hindeutet. Für Reaktionen ohne RAFT-Agens in Lösung wurden Partikel mit einem Durchmesser von $2.47 \pm 0.21\text{ nm}$ nach der Reaktion ohne Oberflächen im Vergleich zu $2.04 \pm 0.36\text{ nm}$ mit Oberflächen beobachtet. Mit RAFT-Agens in Lösung wurden Partikel mit einem Durchmesser von $4.01 \pm 0.51\text{ nm}$ ohne Oberflächen im Vergleich zu $3.19 \pm 0.41\text{ nm}$ mit Oberflächen beobachtet. Es wurde jedoch festgestellt, dass der Polymerisationsgrad ohne freies RAFT-Agens in der Lösung abnimmt, was auf eine stärkere Oberflächeneinschränkung der Reaktion hindeutet. Um die Notwendigkeit eines RAFT-Opferagens bei der Verwendung von polymeren Makroinitiatoren weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit und ohne RAFT-Agens in Lösung durchgeführt (Abbildung 2). In Gegenwart des RAFT-Opferagens erreichten die Filme nach 16 Stunden ein Maximum von $36.1 \pm 1.1\text{ nm}$ (Abbildung 2ai) mit einer quadratischen (RMS)-Rauheit von 6.1 nm (Abbildung 2aii). Ohne das RAFT-Agens in der Lösung wuchsen die Oberflächen langsamer (Maximum nach 24 Stunden), waren rauer und dünner ($31.5 \pm 2.4\text{ nm}$ mit einer RMS-Rauheit von 9.4 nm),

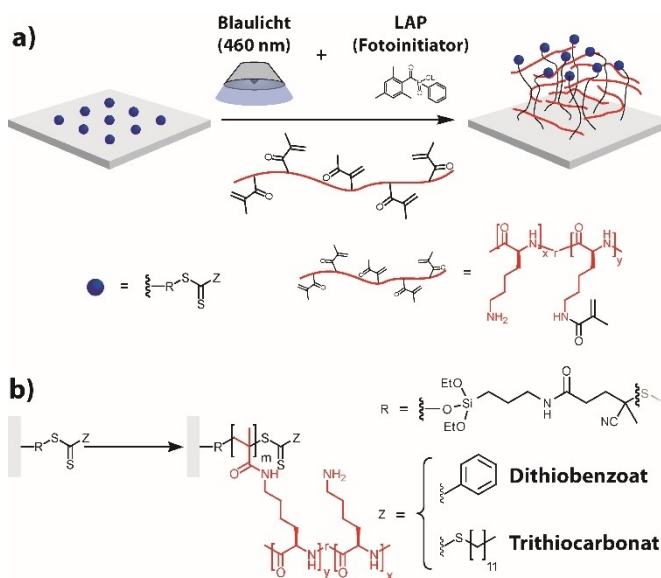


Abbildung 1. Schema für CAP-RAFT unter Verwendung eines Polypeptid-Makroinitiators auf einer mit einem RAFT-Agens funktionalisierten Oberfläche. a) Grafisches Schema für CAP-RAFT von PLLMA-Makrovernetzern durch die Verwendung von blauem Licht (4 mW cm^{-2} , $\lambda_{\text{max}} = 460\text{ nm}$). b) Chemisches Schema, das die Verwendung von Modell-Dithiobenzoat- und Trithiocarbonat-RAFT-Agentien darstellt.

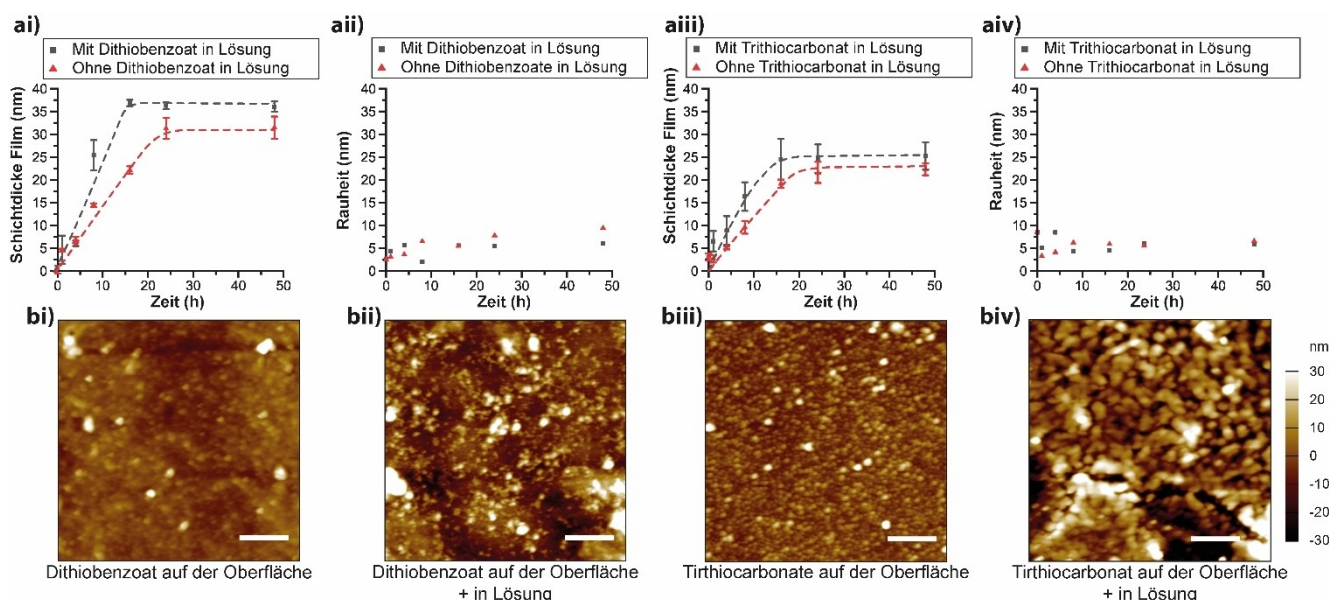


Abbildung 2. AFM-Abbildung und -Analyse von CAP-RAFT-Filmen unter Verwendung eines PLLMA-Makrovernetzlers mit verschiedenen RAFT-Agenten. ai, aii) Analyse des Filmwachstums mit einem Dithiobenzoat-RAFT-Agens unter Beobachtung der Kinetik des Filmwachstums (ai) und der Filmrauheit (aaii) sowohl mit als auch ohne RAFT-Agens in Lösung. aiii, aiv) Analyse des Filmwachstums mit einem Trithiocarbonat-RAFT-Agens unter Beobachtung der Kinetik des Filmwachstums (aaiii) und der Filmrauheit (aiv) sowohl mit als auch ohne RAFT-Agens in Lösung. b) Oberflächenmorphologie nach 48 Stunden CAP-RAFT, die mit AFM abgebildet wurde, mit bi) einem Dithiobenzoat-RAFT-Agens, das sowohl an der Oberfläche als auch im RAFT-Agens in Lösung verankert ist; bii) einem Dithiobenzoat-RAFT-Agens, das an der Oberfläche verankert ist, aber nicht in der Reaktionslösung vorhanden ist; biii) einem Trithiocarbonat-RAFT-Agens, das sowohl an der Oberfläche verankert als auch im RAFT-Agens in Lösung vorhanden ist; und biv) einem Trithiocarbonat, das an der Oberfläche verankert ist, aber nicht in der Reaktionslösung vorhanden ist (Maßstab = 1 μm).

blieben jedoch in ihrer Schichtdicke relativ einheitlich, obwohl es mehr Bereiche mit variierender Schichtdicke gab (Abbildung 2b). In beiden Fällen wurde festgestellt, dass die Oberflächen eine relativ hohe RMS-Rauheit in Bezug auf die Schichtdicke aufwiesen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Gesamthomogenität der Oberfläche ohne RAFT-Agens in Lösung abnimmt. Obwohl beide Schichten relativ homogen waren, wurden auch große Bereiche mit dichteren Schichten beobachtet. Dies wurde bereits in früheren Fällen der Verwendung von CAP beobachtet, was auf die geringere Verfügbarkeit des Initiators an der Filmoberfläche zurückzuführen ist, da dieser während des Filmwachstums von Makrovernetzern bedeckt wird, wobei Unterschiede in der Homogenität in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerisationstechnik und den Makromonomeren auftreten.^[10] Darüber hinaus sind RAFT-Agenzien anfällig für die Aminolyse durch primäre Amine, was zum Abbau führen kann.^[26] Um festzustellen, ob dies der Fall war, wurde der Überstand nach der Reaktion sowohl mit als auch ohne RAFT-Agens in Lösung analysiert. Es wurde eine Dialyse durchgeführt, um überschüssiges CPADB (RAFT-Agens) und LAP zu entfernen. Ein durchgeführtes ¹H NMR -Spektrum zeigte Spaltmuster, die mit den aromatischen Ringen übereinstimmen, die nur durch die Aminolyse von CPADB vorhanden sein könnten (siehe Abbildung S8). Obwohl Experimente in Lösung bestätigt haben, dass die Aminolyse mit PLLMA stattfinden kann, ist eine direkte Bestätigung auf der Oberfläche aufgrund der geringen Konzentration der RAFT-Endgruppen schwierig. Andererseits kann das

ungleichmäßige Wachstum der CAP-Schicht auch auf andere Gründe zurückzuführen sein, wie z. B. dem verwendeten Monomertyp, die Polymerisationsmethoden sowie die Effizienz der erneuten Initiierung, wie sie bereits bei anderen Systemen beobachtet wurde. Darüber hinaus hat die Einführung des RAFT-Agens in die Lösung zwar einen relativ großen Einfluss, ist aber in diesem System keine entscheidende Voraussetzung.

Um festzustellen, ob dieser Trend auch bei anderen Initiatoren zu beobachten ist, wurde 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentansäure (CDTPA) - ein RAFT-Agens auf Trithiocarbonatbasis - auf die gleiche Weise wie der Dithiobenzoat-Initiator verwendet. Trithiocarbonate haben in der Regel eine hohe Affinität zu Methacrylamiden^[27] und ermöglichen einen gewissen Einblick in die Variabilität der Verwendung von CAP (Abbildung 2). Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Filmdicke war identisch wie beim Dithiobenzoat-Initiator mit und ohne RAFT-Opferagens (16 h bzw. 24 h), aber die Filmdicken waren sowohl mit als auch ohne RAFT-Agens deutlich reduziert (25.3 ± 3.0 bzw. 22.3 ± 1.3 nm) (Abbildung 2aiii–iv). Außerdem wurde festgestellt, dass die Filme noch Aggregate aufwiesen (Abbildung 2biii–iv). Dies scheint mit dem allgemeinen Grundsatz übereinzustimmen, dass Trithiocarbonate bekanntermaßen weniger aktiv sind als Dithiobenzoate.^[15d] Allerdings sind sie auch weniger anfällig für eine Aminolyse,^[26c] was die Hypothese unterstützt, dass die geringere Gesamthomogenität der Dithiobenzoat-Proben auf den Abbau des RAFT-Agens durch Aminolyse zurück-

zuführen ist. Da es jedoch unser Ziel war, die Methode weiterzuentwickeln, in dem wir die Polymerisationsoberfläche begrenzt hielten, wurden die weiteren Tests ohne RAFT-Agens ins Lösung durchgeführt.

Ein Vorteil von CAP ist die Möglichkeit, die Filmdicke zu erhöhen, ohne sich Gedanken über die Aufrechterhaltung der Kettengenauigkeit durch erneute Initiierung zu machen. Da Lysinreste primäre Aminseitenketten besitzen, können diese Filme mit der gleichen Carbodiimid-Chemie modifiziert werden, die auch für die Immobilisierung des RAFT-Agens mit Carbonsäure Funktionalität verwendet wird. Aufbauend auf mit dem RAFT-Agens funktionalisierten Schichten kann eine zweite CAP-Schicht aufgebracht werden (Abbildung 3a). Dieser Prozess könnte theoretisch kontinuierlich wiederholt werden, um, je nach gewünschter Funktionalität, dickere Schichten zu erhalten. Mit dieser Strategie konnten wir nach 4 Iterationen, Schichten mit einer Filmdicke von 94.9 ± 8.2 nm erzeugen (Abbildung 3b). Es ist anzumerken, dass eine deutliche Zunahme der Aggregation beobachtet wurde wenn immer mehr Schichten in das System eingebracht wurden (Abbildung 3d). Darüber hinaus sind diese seitenständigen primären Amine nach dem Angriff auf ein anderes immobilisiertes RAFT-Agens nicht mehr für die Carbodiimid-Kopplung verfügbar. Während dies bei der ersten oder zweiten Schicht keine nennenswerten Auswirkungen zu haben schien, war diese unregelmäßige Morphologie bei der dritten und vierten Schicht viel ausgeprägter. Nichtsdestotrotz zeigt dies das Potenzial für die Entwicklung mehrschichtiger Systeme, das auf der Grundlage früherer Arbeiten, noch weiter gesteigert werden kann.^[10]

Die Verwendung von Polypeptiden bei der Herstellung dieser Filme führt zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, die für Proteine und Polypeptide typisch sind, wobei Poly-L-Lysin keine Ausnahme bildet.^[28] ATR-FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I-Bande ($1600\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$) werden häufig zur Analyse des Sekundärstrukturgehalts von Proteinen verwendet.^[28] Bei der Analyse der Amid I Bande wurde festgestellt, dass die unteren drei Schichten ähnliche Sekundärstrukturen aufwiesen (Abbildung 3c). Die Einführung der vierten Schicht schien jedoch eine drastische Auswirkung zu haben, da sich der Peak bei 1649 cm^{-1} in zwei Peaks (1658 und 1642 cm^{-1}) aufspaltete und der Peak bei 1696 cm^{-1} abnahm, was beides auf einen Rückgang der β -Faltblattanteile hinweist.

Zur weiteren Analyse der vorhandenen Sekundärstrukturen wurde eine IR-Linienformanalyse gemäß Chirgadze et al.^[29] durchgeführt. Es ist bekannt, dass hochmolekulares Poly-L-Lysin in Lösung Zufallsknäuel bildet, wenn es geladen ist,^[30] die sich unter alkalischen, wässrigen Bedingungen (d.h. ungeladene primäre Amine) in eine primär α -helikale Struktur umwandeln.^[28d] Poly-L-Lysin-Filme, die mit verschiedenen Methoden gebildet wurden, einschließlich der Tauchbeschichtung von Quarz in einem alkalischen wässrigen Medium oder der direkten Pfpfung des Polypeptids auf die Oberfläche, zeigten diese α -helikale Struktur im ungeladenen Zustand.^[31] Folglich könnte angenommen werden, dass die hier hergestellten Filme die gleiche Sekundärstruktur annehmen, da Polylysin die Ausbildung von α -Helices bevorzugt.^[32] Dies war jedoch bei der Verwendung von CAP-RAFT nicht der Fall, da stattdessen in der Mehrzahl der Filme bevorzugt Zufallsknäuel und β -Faltblät-

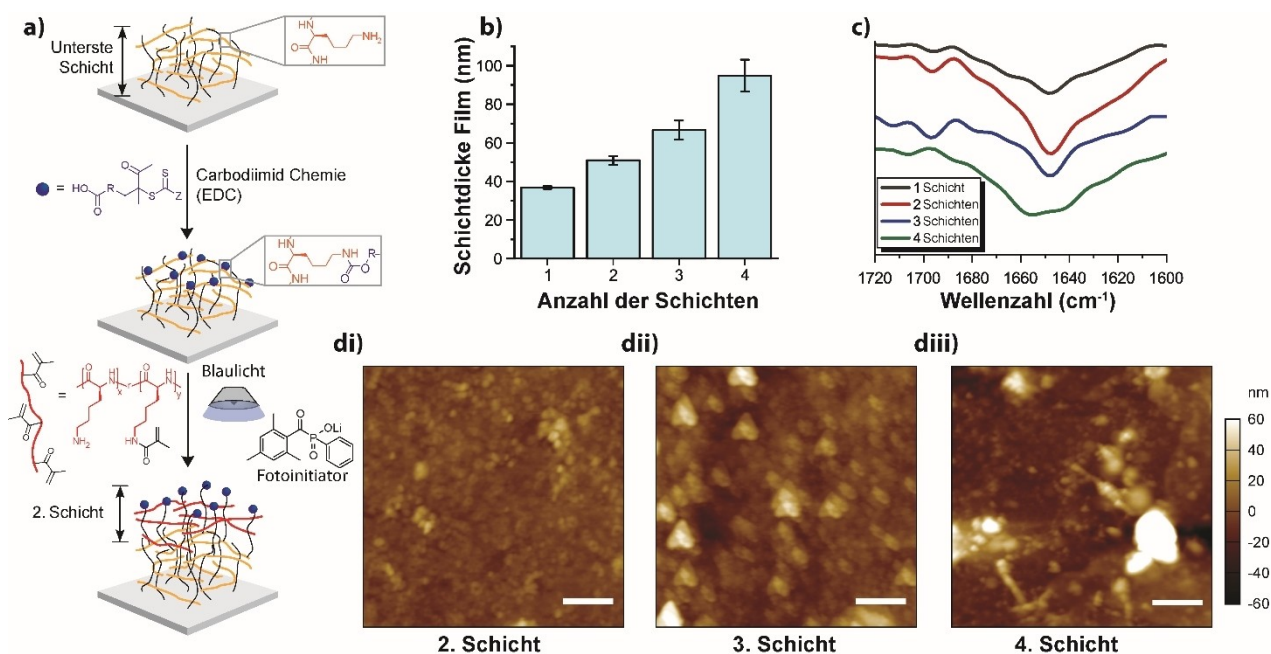


Abbildung 3. Mit CAP-RAFT synthetisierte Mehrschichten. a) Schema für die Reinitialisierung und Ausführung von Mehrschichten mit CAP-RAFT. b) Mit AFM ermittelte Filmdicke für Mehrschichten mit PLLMA-Makrovernetzer. c) Amid-I-Bande der FTIR-Spektren jeder Schicht. d) Oberflächenmorphologie der Schichten dargestellt als AFM-Abbildung der di) 2. und dii) 3. und diii) 4. Schicht (Maßstab = $1\ \mu\text{m}$). EDC ist 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid.

ter gebildet wurden (Tabelle 1). Während der Gehalt an Zufallsknäuel zwischen 30 und 50 % schwankte, blieb der Gehalt an β -Faltblättern zwischen 32 und 39 % konstant. Diese Abweichung von den erwarteten α -helikalen Strukturen ist wahrscheinlich auf die kovalent vernetzte Morphologie der durch CAP gebildeten Filme zurückzuführen, die zu einer verringerten Mobilität der PLLMA-Ketten führt und somit ihre übliche bevorzugte Konformation verhindert. Interessanterweise scheinen sich die vierschichtigen Filme wieder der erwarteten Norm anzunähern, wobei der Gehalt an β -Faltblättern und Zufallsknäuel auf 21 bzw. 19 % sinkt, während die α -helikalen Strukturen von etwa 13–19 % auf 26 % ansteigen. Darüber hinaus wurden β -Schleifen mit 27 % in weitaus größerer Menge beobachtet. Die zuvor genannten Probleme im Zusammenhang mit dem lokalen Filmwachstum würden auch zu einer geringeren Vernetzungsdichte führen. In der Folge würde sich die Kettenbeweglichkeit erhöhen, so dass die PLLMA-Ketten beginnen könnten, ihre favorisierten Konformationen anzunehmen. Die ungewöhnlich hohe zufällige Zufallsknäuel Strukturanteil verleiht diesen Filmen eine eher amorphe Struktur, die den Zugang zu funktionellen Gruppen oder Motiven erleichtern kann, die für eine weitere Oberflächenmodifizierung oder die spezifische Bindung von Molekülen wünschenswert ist, was sie zu einem guten Kandidaten für die Verabreichung von Arzneimitteln oder als Material für die Geweberekonstruktion macht, wo solche Signalmoleküle und molekulare Beladungen erwünscht sind.

Um die Vielseitigkeit dieser Technik zu zeigen, wurde Poly(L-Glutaminsäure-*r*-L-Lysin-*g*-methacrylat) (PLGMA) mit ähnlich modifizierbaren funktionellen Gruppen an den Seitenketten (d.h. Carbonsäuren) analog zu PLLMA untersucht (Hintergrundinformationen, Abbildung S3, Tabelle S3). Bei der Durchführung von CAP mit PLGMA in wässrigen Medien wurde die Bildung eines etwas dickeren Filmes von 41.2 ± 1.4 nm beobachtet, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass PLGMA nicht aminolysiert werden kann (Abbildung 4a). Die vergleichbare Zunahme der Filmdicke war jedoch ausgeprägter, wenn CAP an einer neu initiierten PLLMA-Schicht durchgeführt wurde, mit einem Sprung auf 76.0 ± 9.4 nm. Da die Reaktion bei pH 7 (deionisiertes Wasser) durchgeführt wurde, liegen PLLMA- und PLGMA-Schichten sowohl in kationischer als auch in anionischer Form vor. Dies könnte zu einer ionischen Anziehung der Schichten führen, was die beobachtete erhöhte Schichtdicke erklären würde.

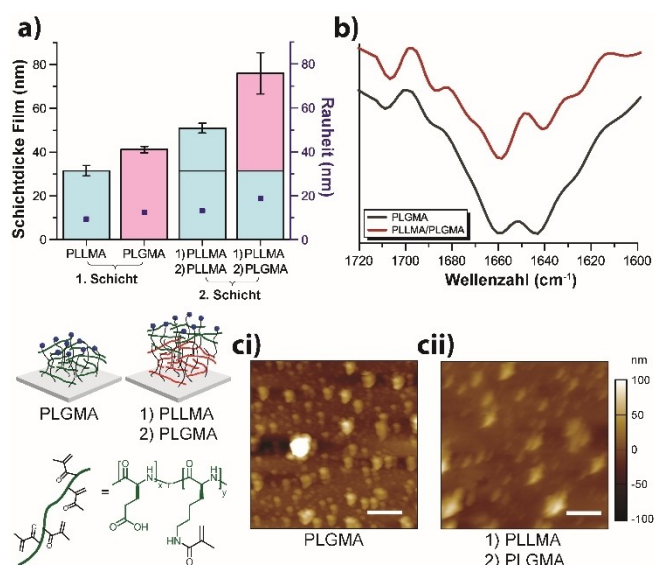


Abbildung 4. a) Vergleich der Schichtdicke und der Rauheit nach dem Einbringen von PLGlu als Ausgangsschicht und als zweite Schicht; b) FTIR-Spektren der obersten PLGlu-Schicht; c) Oberflächenmorphologie der PLGlu-Schicht als ci) Ausgangsschicht und cii) zweite Schicht (Maßstabsbalken = 1 μm).

Obwohl die Proben eine PLLMA-Schicht unter der PLGMA-Schicht enthielten, wiesen beide Proben mit PLGMA ähnliche FTIR-Spektren in der Amid-I-Bande auf (Abbildung 4b). Da man davon ausgeht, dass Poly-L-Glutaminsäure bei neutralem pH-Wert überwiegend eine Zufallsknäuel Struktur annimmt,^[33] ist der hohe Gehalt an Zufallsknäuel Strukturen in den PLGMA-Filmen (37 ± 2 %) nicht überraschend, auch wenn es immer noch beträchtliche Anteile anderer Sekundärstrukturen gab, die auf lokale Einschlüsse in den CAP-Filmen zurückzuführen sein könnten. Analog zu den aus Poly-L-Glutaminsäure und Poly-L-Lysin^[34] hergestellten Schicht-für-Schicht-Filmen (LbL-Filmen) würde man jedoch erwarten, dass die PLLMA/PLGMA-Filme aufgrund der polyionischen Komplexbildung in erster Linie β -Faltblatt Strukturen bilden. Allerdings wurde dies nicht beobachtet, stattdessen wurde ein ähnlicher Sekundärstrukturaufbau wie bei den reinen PLGMA-Filmen (mit Ausnahme von β -Schleifen bei 23 ± 14 %) festgestellt. Dies führt zu der Vermutung, dass nach der anfänglichen PLGMA-Schicht die nachfolgend abgeschiedene

Tabelle 1: Sekundärstrukturelemente von mehrschichtigen PLLMA- und PLGMA-Filmen (bestimmt mit ATR-FTIR).

Anzahl an Schichten				β -Faltblatt [%]	α -Helices [%]	Zufallsknäuel [%]	β -Schleifen [%]	Andere ^[a] [%]
1 (untere)	2	3	4 (obere)					
PLLMA	–	–	–	37 ± 6	19 ± 11	35 ± 11	9 ± 5	N/A
PLLMA	PLLMA	–	–	32 ± 7	13 ± 3	50 ± 5	5 ± 2	N/A
PLLMA	PLLMA	PLLMA	–	39 ± 2	15 ± 3	40 ± 2	6 ± 2	N/A
PLLMA	PLLMA	PLLMA	PLLMA	21 ± 4	26 ± 1	19 ± 2	27 ± 4	6 ± 4
PLGMA	–	–	–	19 ± 1	29 ± 2	37 ± 2	13 ± 2	2 ± 1
PLLMA	PLGMA	–	–	14 ± 4	25 ± 8	37 ± 12	23 ± 14	2 ± 1

[a] In einigen Fällen war die Menge der "anderen" Sekundärstrukturelemente vernachlässigbar und wird daher als "N/A" bezeichnet.

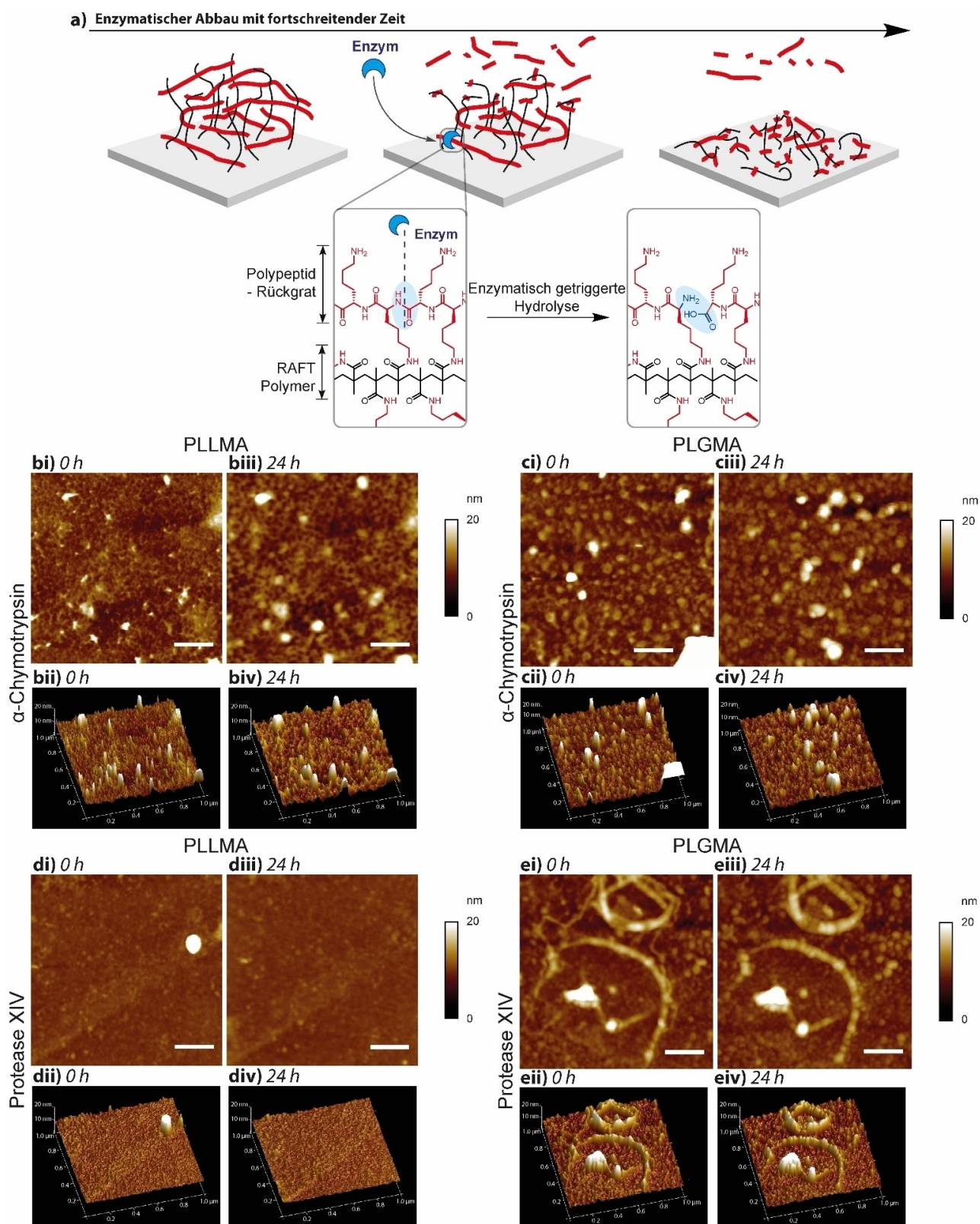


Abbildung 5. a) Schematische Darstellung des enzymatischen Abbaus von Polypeptidfilmen durch Hydrolyse der Amidbindungen im Polypeptid-rückgrat (in rot). Das RAFT-Polymer bleibt intakt (schwarz). b–e) AFM-Bilder von mit Enzymen behandelten Filmen. b) PLLMA-basierte Filme vor (bi, bii) und nach Inkubation (biii, biv) mit 1 mg mL^{-1} α -Chymotrypsin bei 25°C . c) PLGMA-basierte Filme vor (ci, cii) und nach Inkubation (ciii, civ) mit 1 mg mL^{-1} α -Chymotrypsin bei 25°C . d) PLLMA-basierte Filme vor (di, dii) und nach Inkubation (diii, div) mit 1 mg mL^{-1} Protease XIV bei 37°C . e) PLGMA-basierte Filme vor (ei, eii) und nach Inkubation (eiii, eiv) mit 1 mg mL^{-1} Protease XIV bei 37°C . b)–e) 2D- (i, iii) und 3D-Bildkarten (ii, iv). Die verwendeten Proteaselösungen waren (b, c) 1 mg mL^{-1} α -Chymotrypsin bei 25°C und (d, e) 1 mg mL^{-1} Protease XIV bei 37°C (Maßstab = 200 nm).

PLGMA-Schicht nicht mehr so stark mit der vorangehenden PLLMA-Schicht interagiert, um den polyionischen Komplex zu bilden.

Strukturierte Polypeptide sind für Bioanwendungen wie Wirkstofftransport und -Freisetzung und die Geweberekonstruktion von Vorteil, da sie enzymatisch abgebaut werden können.^[35] Um den enzymatischen Abbau zu bewerten, wurden die PLLMA- und PLGMA-basierten Filme sowohl mit α -Chymotrypsin als auch mit dem Protease Mix Typ XIV als Modellproteasen inkubiert. α -Chymotrypsin ist ein Verdauungsenzym, das im Darm von Säugetieren vorkommt,^[36] während Protease Typ XIV ein Protease Gemisch ist, von dem bekannt ist, dass es β -Faltblattstrukturen abbaut, weswegen es häufig in Wundheilungsstudien verwendet wird, da es den Cocktail von Metalloproteasen (MMPs) nachahmt, der in Wunden vorkommt.^[37] Es wird erwartet, dass Proteasen die Amidbindungen des Polypeptidrückgrats an mehreren Stellen hydrolysieren, während sie das durch die RAFT-Polymerisation gebildete Kohlenwasserstoffrückgrat intakt lassen (Abbildung 5a). Es ist also davon auszugehen, dass zwar ein Restpolymer verbleibt, der größte Teil des Films jedoch abgebaut wird. Die AFM-Analyse von Filmen an der gleichen Stelle (korrelativ) der PLLMA-basierten Filme vor und nach der Inkubation (Abbildung 5b und d) ergab signifikante Veränderungen durch beide Enzyme. Nach der Verwendung von α -Chymotrypsin wurde eine deutliche Zunahme der Rauheit beobachtet, wobei sich sowohl die oberen als auch die unteren Bereiche der Filme relativ zueinander ausdehnten, was auf den Abbau insbesondere in diesen unteren Bereichen zurückzuführen ist (Abbildung 5b). Dies konnte auch in Gegenwart von Protease Typ XIV beobachtet werden (Abbildung 5d), und es fehlte nach der Inkubation ein großes Stück, was auf einen erfolgreichen Abbau hindeutet. Interessanterweise führte die Behandlung von PLGMA-Filmen mit diesen Enzymen nicht zu einem nennenswerten Abbau, der in Gegenwart von α -Chymotrypsin nur geringfügig veränderte (Abbildung 5c) und in Gegenwart von Protease Typ XIV gar nicht sichtbar, was auf eine Resistenz gegen diese Protease hindeutet (Abbildung 5d). Das heißt, dass der Abbau gegen bestimmte Enzyme durch die Auswahl verschiedener Aminosäuren kontrolliert werden kann, wie es für Proteine typisch ist. Mit beiden Modellenzymen wurde also ein kontrollierbarer enzymatischer Abbau nachgewiesen, was auf ein gutes Potenzial für Anwendungen als Zellgerüste und Arzneimittelabgabesysteme schließen lässt.

Zusammenfassung

Zum ersten Mal wurde die CAP-RAFT Methode eingesetzt, um vernetzte Polypeptidfilme mit Sekundärstrukturmerkmalen die so nicht erwartet wurden, herzustellen. Mit PLLMA als anfänglichen Modell-Makrovernetzer wurden Untersuchungen mit Dithiobenzoat- und Trithiocarbonat-Initiatoren sowie mit und ohne RAFT-Opferagens in Lösung durchgeführt. Während die Filme mit der größten Schichtdicke mit dem oberflächenbegrenzten Dithiobenzoat-RAFT-Agens (Schichtdicke von 36.1 ± 1.1 nm) erhalten

wurden, entstanden Filme mit vergleichbarer Dicke (31.5 ± 2.4 nm) und Gleichmäßigkeit mit Opfer-RAFT-Agens in Lösung. Infolgedessen wurden weitere Experimente ohne RAFT-Agens in Lösung durchgeführt, um eine größere Oberflächenbeschränkung zu gewährleisten. Auf diese Weise wurden mehrschichtige Filme mit einer Schichtdicke von 94.9 ± 8.2 nm erzielt. Die Analyse der Sekundärstruktur zeigte einen ungewöhnlich hohen Anteil an Zufallsknäuelstrukturen (35–50 %) sowie β -Faltblättern, trotz des eigentlich erwarteten hohen α -helikalen Anteils für PLLMA. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Mobilität des oberflächenbegrenzten PLLMA zurückzuführen und damit auf den Verlust seiner Fähigkeit, die normalerweise favorisierte Sekundärstruktur zu bilden. Ähnliche Tendenzen wurden bei der Verwendung des PLGMA-Makrovernetzers beobachtet. Zusammenfassend konnten wir CAP-RAFT als eine praktikable Strategie zur Herstellung von oberflächenbegrenzten, vernetzten Polypeptidfilmen mit präziser Schichtdickenkontrolle und neuer Eigenschaften wie spezifische Sekundärstrukturbildung und biologischen Abbau etablieren. Diese Kontrolle der Sekundärstruktur in Verbindung mit dem enzymatischen Abbau zeigt ein hohes Potenzial für zahlreiche biologische Anwendungen, einschließlich der Verabreichung von Arzneimitteln oder die Herstellung von Wirkstoffdepots und der Gewebezüchtung, die in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde zum Teil in der Materials Characterization and Fabrication Platform (MCFP) an der Universität Melbourne durchgeführt. Wir danken außerdem Prof. Laforch für den Zugang zum Harrick VariGATR. S.L. dankt Markus Hund für die technische Unterstützung bei den AFM-Messungen. N.J.C. dankt der Universität Melbourne für das Australian Government Research Training Program Scholarship (AGRTP) und für die Bereitstellung von Reisekosten. Diese Arbeit wurde von der DFG mit der Projektnummer SCHE603/23-1 gefördert (T.S.). N.J.C., S.L., G.G.Q. und T.S. bedanken sich für die Förderung durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) im Rahmen seines thematischen Netzwerks Bayreuth-Melbourne Colloid/Polymer Network, das aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert wurde. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: CAP-RAFT · Oberflächeninitiierte Polymerisation · Polypeptide · Sekundärstruktur · Vernetzung

- [1] a) G. Bozokalfa, H. Akbulut, B. Demir, E. Guler, Z. P. Gumus, D. Odaci Demirkol, E. Aldemir, S. Yamada, T. Endo, H. Coskunol, S. Timur, Y. Yagci, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4161–4167; b) B. Demir, T. Yilmaz, E. Guler, Z. P. Gumus, H. Akbulut, E. Aldemir, H. Coskunol, D. G. Colak, I. Cianga, S. Yamada, S. Timur, T. Endo, Y. Yagci, *Talanta* **2016**, *161*, 789–796; c) T. Yilmaz Sengel, E. Guler, Z. P. Gumus, E. Aldemir, H. Coskunol, H. Akbulut, D. Goen Colak, I. Cianga, S. Yamada, S. Timur, T. Endo, Y. Yagci, *Sens. Actuators B* **2017**, *246*, 310–318.
- [2] a) K. Park, H. Jeong, J. Tanum, J.-C. Yoo, J. Hong, *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, *69*, 263–268; b) B. Jiang, B. Li, *Int. J. Nanomed.* **2009**, *4*, 37–53; c) B. Jiang, E. De Fusco, B. Li, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3630–3637.
- [3] a) Q. Gao, M. Yu, Y. Su, M. Xie, X. Zhao, P. Li, P. X. Ma, *Acta Biomater.* **2017**, *51*, 112–124; b) G. P. Sakala, M. Reches, *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5*, 1800073; c) J. S. Rudra, K. Dave, D. T. Haynie, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 1301–1315; d) Q. Yang, L. Wang, W. Lin, G. Ma, J. Yuan, S. Chen, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 577–584.
- [4] a) T. J. Deming, *J. Polym. Sci. Part A* **2000**, *38*, 3011–3018; b) T. J. Deming, *Nature* **1997**, *390*, 386–389; c) C. Nacar, *Protein J.* **2020**, *39*, 21–32; d) K. Fujiwara, H. Toda, M. Ikeguchi, *BMC Struct. Biol.* **2012**, *12*, 18.
- [5] a) N. J.-A. Chan, D. Gu, S. Tan, Q. Fu, T. G. Pattison, A. J. O'Connor, G. G. Qiao, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1630; b) D. T. Haynie, L. Zhang, J. S. Rudra, W. Zhao, Y. Zhong, N. Palath, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2895–2913; c) S. H. Wibowo, A. Sulistio, E. H. H. Wong, A. Blencowe, G. G. Qiao, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4971–4988; d) T. Borase, A. Heise, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 5725–5731.
- [6] a) C. Zhang, J. Yuan, J. Lu, Y. Hou, W. Xiong, H. Lu, *Biomaterials* **2018**, *178*, 728–737; b) A. Heise, H. Menzel, H. Yim, M. D. Foster, R. H. Wieringa, A. J. Schouten, V. Erb, M. Stamm, *Langmuir* **1997**, *13*, 723–728; c) Y.-C. Chang, C. W. Frank, *Langmuir* **1996**, *12*, 5824–5829; d) F. Audouin, M. Fox, R. Larragy, P. Clarke, J. Huang, B. O'Connor, A. Heise, *Macromolecules* **2012**, *45*, 6127–6135.
- [7] a) K. Kato, E. Uchida, E.-T. Kang, Y. Uyama, Y. Ikada, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 209–259; b) Y. Uyama, K. Kato, Y. Ikada, *Grafting/Characterization Techniques/Kinetic Modeling* **1998**, 1–39; c) M. Li, M. Fromel, D. Ranaweera, S. Rocha, C. Boyer, C. W. Pester, *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 374–380.
- [8] a) E. Roeven, A. R. Kuzmyn, L. Scheres, J. Baggerman, M. M. J. Smulders, H. Zuilhof, *Langmuir* **2020**, *36*, 10187–10199; b) Y. Zhang, K. Kang, N. Zhu, G. Li, X. Zhou, A. Zhang, Q. Yi, Y. Wu, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 7428–7437.
- [9] a) E. H. H. Wong, S. N. Guntari, A. Blencowe, M. P. van Koe-verden, F. Caruso, G. G. Qiao, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 1020–1023; b) T. K. Goh, S. N. Guntari, C. J. Ochs, A. Blencowe, D. Mertz, L. A. Connal, G. K. Such, G. G. Qiao, F. Caruso, *Small* **2011**, *7*, 2863–2867; c) D. Mertz, C. J. Ochs, Z. Zhu, L. Lee, S. N. Guntari, G. K. Such, T. K. Goh, L. A. Connal, A. Blencowe, G. G. Qiao, F. Caruso, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12601–12603; d) E. Nam, J. Kim, S. N. Guntari, H. Seyler, Q. Fu, E. H. H. Wong, A. Blencowe, D. J. Jones, F. Caruso, G. G. Qiao, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3374–3380.
- [10] a) S. N. Guntari, A. C. H. Khin, E. H. H. Wong, T. K. Goh, A. Blencowe, F. Caruso, G. G. Qiao, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 5159–5166; b) E. H. H. Wong, M. P. van Koe-verden, E. Nam, S. N. Guntari, S. H. Wibowo, A. Blencowe, F. Caruso, G. G. Qiao, *Macromolecules* **2013**, *46*, 7789–7796; c) S. N. Guntari, T. K. Goh, A. Blencowe, E. H. H. Wong, F. Caruso, G. G. Qiao, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 68–75.
- [11] a) Q. Fu, J. Kim, P. A. Gurr, J. M. P. Scofield, S. E. Kentish, G. G. Qiao, *Energy Environ. Sci.* **2016**, *9*, 434–440; b) E. Nam, E. H. H. Wong, S. Tan, Q. Fu, A. Blencowe, G. G. Qiao, *Macromol. Mater. Eng.* **2017**, *302*, 1600199.
- [12] E. Nam, E. H. H. Wong, S. Tan, S. N. Guntari, Q. Fu, J. Kim, B. Delalat, A. Blencowe, G. G. Qiao, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 3251–3258.
- [13] S. Tan, E. Nam, J. Cui, C. Xu, Q. Fu, J. M. Ren, E. H. H. Wong, K. Ladewig, F. Caruso, A. Blencowe, G. G. Qiao, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2025–2028.
- [14] T. G. Pattison, A. Spanu, A. M. Friz, Q. Fu, R. D. Miller, G. G. Qiao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 4041–4051.
- [15] a) G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 1634–1644; b) G. Moad, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 177–219; c) M. D. Nothling, Q. Fu, A. Reyhani, S. Allison-Logan, K. Jung, J. Zhu, M. Kamigaito, C. Boyer, G. G. Qiao, *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 2001656; d) G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer* **2008**, *49*, 1079–1131; e) R. Whitfield, K. Parkatidis, N. P. Truong, T. Junkers, A. Anastasaki, *Chem* **2020**, *6*, 1340–1352; f) K. Parkatidis, H. S. Wang, N. P. Truong, A. Anastasaki, *Chem* **2020**, *6*, 1575–1588.
- [16] a) S. Allison-Logan, F. Karimi, Y. Sun, T. G. McKenzie, M. D. Nothling, G. Bryant, G. G. Qiao, *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 1291–1295; b) A. Reyhani, S. Allison-Logan, H. Ranji-Burachaloo, T. G. McKenzie, G. Bryant, G. G. Qiao, *J. Polym. Sci. Part A* **2019**, *57*, 1922–1930.
- [17] a) A. R. Kuzmyn, A. T. Nguyen, L. W. Teunissen, H. Zuilhof, J. Baggerman, *Langmuir* **2020**, *36*, 4439–4446; b) Q. Wang, L. Hu, Z. Cui, P. Fu, M. Liu, X. Qiao, X. Pang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 42161–42168.
- [18] a) S. Allison-Logan, Q. Fu, Y. Sun, M. Liu, J. Xie, J. Tang, G. G. Qiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 21392–21396; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 21576–21580; b) T. G. McKenzie, E. H. H. Wong, Q. Fu, A. Sulistio, D. E. Dunstan, G. G. Qiao, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1012–1016.
- [19] a) S. J. Lam, N. M. O'Brien-Simpson, N. Pantarat, A. Sulistio, E. H. H. Wong, Y.-Y. Chen, J. C. Lenzo, J. A. Holden, A. Blencowe, E. C. Reynolds, G. G. Qiao, *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16162; b) S. J. Shirbin, S. J. Lam, N. J.-A. Chan, M. M. Ozmen, Q. Fu, N. O'Brien-Simpson, E. C. Reynolds, G. G. Qiao, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 552–557.
- [20] a) G. J. M. Habraken, K. H. R. M. Wilsens, C. E. Koning, A. Heise, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1322–1330; b) Z. Song, Z. Tan, J. Cheng, *Macromolecules* **2019**, *52*, 8521–8539; c) G. J. M. Habraken, M. Peeters, C. H. J. T. Dietz, C. E. Koning, A. Heise, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 514–524.
- [21] a) H. Lu, J. Wang, Z. Song, L. Yin, Y. Zhang, H. Tang, C. Tu, Y. Lin, J. Cheng, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 139–155; b) N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5528–5578.
- [22] M. D. Nothling, T. G. McKenzie, I. A. Eastland, H.-C. Chien, J. Collins, A. S. Meyer, G. G. Qiao, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 8544–8547.
- [23] a) Y. A. Vasilieva, C. W. Scales, D. B. Thomas, R. G. Ezell, A. B. Lowe, N. Ayres, C. L. McCormick, *J. Polym. Sci. Part A* **2005**, *43*, 3141–3152; b) P. Singhsa, H. Manuspiya, R. Narain, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 4140–4151.
- [24] T. G. McKenzie, Q. Fu, E. H. H. Wong, D. E. Dunstan, G. G. Qiao, *Macromolecules* **2015**, *48*, 3864–3872.
- [25] S. E. Seo, E. H. Discekici, Y. Zhang, C. M. Bates, C. J. Hawker, *J. Polym. Sci.* **2020**, *58*, 70–76.
- [26] a) J. Xu, J. He, D. Fan, X. Wang, Y. Yang, *Macromolecules* **2006**, *39*, 8616–8624; b) C. Boyer, A. Granville, T. P. Davis, V. Bulmus, *J. Polym. Sci. Part A* **2009**, *47*, 3773–3794; c) G. B. Desmet, D. R. D'hooge, M. K. Sabbe, M.-F. Reyniers, G. B. Marin, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 11626–11634.
- [27] a) Y. Shi, E. T. A. van den Dungen, B. Klumperman, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 403–

- 408; b) K. Luo, J. Yang, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2481–2488.
- [28] a) X. Zhou, Z. Li, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, *7*, 1800020; b) J. Huang, A. Heise, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7373–7390; c) N. H. Lee, L. M. Christensen, C. W. Frank, *Langmuir* **2003**, *19*, 3525–3530; d) K. Ciešlik-Boczula, *Biochimie* **2017**, *137*, 106–114.
- [29] a) A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2007**, *1767*, 1073–1101; b) Y. N. Chirgadze, B. V. Shestopalov, S. Y. Venyaminov, *Biopolymers* **1973**, *12*, 1337–1351.
- [30] D. Huesmann, A. Birke, K. Klinker, S. Türk, H. J. Räder, M. Barz, *Macromolecules* **2014**, *47*, 928–936.
- [31] a) A. Di Mauro, F. Mirabella, A. D'Urso, R. Randazzo, R. Purrello, M. E. Fragalà, *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *437*, 270–276; b) Y. Wang, Y. C. Chang, *Macromolecules* **2003**, *36*, 6511–6518.
- [32] A. Mirtič, J. Grdadolnik, *Biophys. Chem.* **2013**, *175–176*, 47–53.
- [33] K. Inoue, N. Baden, M. Terazima, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22623–22628.
- [34] A.-M. Pilbat, V. Ball, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Szalontai, *Langmuir* **2006**, *22*, 5753–5759.
- [35] a) S. J. Shirbin, F. Karimi, N. J.-A. Chan, D. E. Heath, G. G. Qiao, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2981–2991; b) M. Byrne, P. D. Thornton, S.-A. Cryan, A. Heise, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 2825–2831; c) M. K. Joo, D. Y. Ko, S. J. Jeong, M. H. Park, U. P. Shinde, B. Jeong, *Soft Matter* **2013**, *9*, 8014–8022.
- [36] a) D. M. Blow, *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 145–152; b) W. Appel, *Clin. Biochem.* **1986**, *19*, 317–322.
- [37] a) J. Brown, C.-L. Lu, J. Coburn, D. L. Kaplan, *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 212–221; b) S. Müller-Herrmann, T. Scheibel, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 247–259.

Manuskript erhalten: 21. September 2021

Akzeptierte Fassung online: 3. Dezember 2021

Endgültige Fassung online: 12. Januar 2022