

Vesikel

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 24716–24723

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202108928

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202108928

Kontrollierbare Zeitverzögerung beim Aufplatzen von oxidationsempfindlichen, mittels PISA synthetisierten Polymersomen*Fabian H. Sobotta, Maren T. Kuchenbrod, Franka V. Gruschwitz, Grit Festag, Peter Bellstedt, Stephanie Hoepfener und Johannes C. Brendel**

Abstract: Reaktive Polymersomen sind ein vielseitiges künstliches Nanotransportsystem, das eine Freisetzung als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus ermöglichen kann. Die vorgestellten oxidationsempfindlichen Polymersomen zeigen einen zeitlich verzögerten Freisetzungsmechanismus in einer oxidativen Umgebung, der durch Anpassung der Membrandicke oder partielle Voroxidation variierbar ist. Diese polymeren Vesikel werden mittels PISA hergestellt, wodurch eine direkte, effektive In-situ-Einkapselung von Molekülen ermöglicht wird, wie z. B. für Farbstoffe und Enzyme gezeigt wurde. Kinetische Studien ergaben, dass ein kritischer Oxidationsgrad die Destabilisierung der Membran bewirkt, während vorab keine Freisetzung der Ladung erfolgt. Die Einkapselung von Glukoseoxidase verwandelt diese Polymersomen direkt in glukoseempfindliche Vesikel, da kleine Moleküle, wie Zucker, ihre Membran passiv durchdringen können. Dank der einfachen Herstellung bieten die Polymersomen eine vielseitige Plattform für den Einschluss und die Freisetzung von Molekülen nach einer genau einstellbaren Zeitspanne in Gegenwart spezifischer Verbindungen wie H_2O_2 oder Glukose.

Einleitung

Polymere Vesikel oder Polymersomen sind Nanostrukturen, die aus einem wässrigen, inneren Kompartiment bestehen, das von einer hydrophoben, meist doppelschichtigen Polymermembran umgeben ist. In den letzten Jahren gingen mehrere Berichte auf ihr Potenzial als Wirkstofftransport-

systeme oder Nanoreaktoren ein, da hydrophile Moleküle wie Nukleinsäuren^[1] oder Enzyme^[2] im hydrophilen Innenraum verkapselt oder hydrophobe Wirkstoffe in die Doppelschicht integriert werden können.^[3] Die Kompartimentierung kann dazu verwendet werden, Reaktanten oder Katalysatoren für bestimmte Zeiträume zu schützen und einzuschließen, mit dem Ziel, ihre Freisetzungskinetik zu kontrollieren.^[4] Durch Nachahmung der Eigenschaften natürlicher Vesikel, welche auf Umweltfaktoren reagieren, kann die Zugänglichkeit der beladenen Moleküle beeinflusst werden, mit dem Ziel, die Diffusionsrate in das äußere Medium zu erhöhen, indem einerseits die Membrandurchlässigkeit verändert wird,^[5] eine Porenbildung ausgelöst wird^[6] oder die Membran vollständig abgebaut wird.^[7] Im Gegensatz zu Liposomen bieten Vesikel auf Polymerbasis eine größere chemische Vielfalt und ermöglichen eine vielfältigere Integration stimuliresponsiver Gruppen in die Vesikelstruktur.^[8] Je nach Art der Funktionalität können die Polymersomen auf externe Stimuli wie pH-Wert,^[9] Temperatur^[10] oder Redoxpotential reagieren.^[11] Insbesondere Polymersomen, die auf die Anwesenheit von Oxidationsmitteln wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren, sind von großem Interesse, doch ist die Anzahl der veröffentlichten Systeme nach wie vor begrenzt.^[12] Unter ROS wird eine Klasse von stark oxidierenden Substanzen zusammengefasst, zu denen Singulett-Sauerstoff, verschiedene Peroxide und Superoxide gehören. Ihre übermäßige Produktion wird mit Entzündungen, wie sie bei Krebs oder neurologischen Störungen auftreten, in Verbindung gebracht und kann als geeigneter Auslöser für die selektive Freisetzung von Therapeutika genutzt werden.^[13] Neben gängigen Motiven wie Boronsäureestern^[14] und Oxalaten^[15] ist Poly(propylsulfid) (PPS)^[16] eines der am häufigsten verwendeten Materialien für oxidationsresponsive Systeme. Die Reaktion führt zu einem abrupten Wechsel von einem hydrophoben zu einem stark hydrophilen Material aufgrund der Oxidation der Sulfidgruppen zu Sulfoxiden oder Sulfonen. Vorab konnten wir bereits berichten, dass *N*-Acryloylthiomorpholin (NAT) in ähnlicher Weise auf oxidative Stimuli wie H_2O_2 reagiert und darüber hinaus geeignet ist, durch polymerisationsinduzierte Selbstassemblierung (PISA) in situ Nanostrukturen zu bilden.^[17] PISA ist eine vielseitige Technik zur simultanen Polymerisation und Selbstassemblierung von Blockcopolymeren in Nanostrukturen unterschiedlicher Form.^[18] Im Gegensatz zu vielen anderen Techniken können Polymersomen in hohen Konzentrationen gebildet werden, wodurch hohe Einkapselungseffizienzen ermöglicht werden. Ein weiterer Vorteil von PISA ist die Möglichkeit, die strukturellen Parameter durch Anpas-

[*] F. H. Sobotta, M. T. Kuchenbrod, F. V. Gruschwitz, Dr. G. Festag, Dr. P. Bellstedt, Dr. S. Hoepfener, Dr. J. C. Brendel
Institut für Organische und Makromolekulare Chemie (IOMC)
Friedrich-Schiller Universität Jena
Humboldtstraße 10, 07743 Jena (Deutschland)
E-Mail: johannes.brendel@uni-jena.de

F. H. Sobotta, M. T. Kuchenbrod, F. V. Gruschwitz, Dr. G. Festag,
Dr. S. Hoepfener, Dr. J. C. Brendel
Jena Center for Soft Matter (JCSM)
Friedrich Schiller Universität Jena
Philosophenweg 7, 07743 Jena (Deutschland)

Hintergrundinformationen und Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202108928> zu finden.

© 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.

sung der Ausgangsbedingungen der Polymerisation zu verändern. So lässt sich beispielsweise der Vesikeldurchmesser durch Variation der Art und Länge des hydrophilen Blocks modifizieren,^[19] während die Membrandicke durch Anpassung der Molmasse des hydrophoben Blocks eingestellt werden kann.^[20] Aus diesem Grund wurde PISA im wässrigen Medium häufig zur Herstellung funktioneller Polymersomen, einschließlich Vesikeln zur Wirkstoffabgabe oder Nanoreaktoren, genutzt.^[2a,21] Es existieren jedoch nur wenige Studien, die sich mit der Bildung von stimuliresponsiven Polymersomen mittels PISA befassen, und diese beziehen sich hauptsächlich auf pH-sensitive Systeme,^[21a,22] während unseres Wissens nach bisher nur ein einziges oxidationsempfindliches System berichtet wurde.^[23] Kürzlich konnten wir zeigen, dass verschiedene Nanostrukturen, darunter auch Polymersomen, in einer PISA mit NAT zugänglich gemacht werden können,^[24] was uns dazu veranlasste, ihr Potenzial für die In-situ-Einkapselung und selektive Freisetzung von Molekülen in oxidativer Umgebung zu untersuchen. Dynamische Lichtstreuung (DLS) und NMR-Messungen wurden eingesetzt, um den zeitabhängigen Abbau bzw. die Oxidation von Polymersomen mit unterschiedlichen Membrandicken zu untersuchen. Zudem wurde die Integrität der vesikulären Membran zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) analysiert. Die Einkapselung und die zeitabhängige Freisetzung wurden mit dem Modell-Fluorophor Calcein getestet. Des Weiteren wurde das funktionelle Enzym Glukoseoxidase (GOx), welches in Gegenwart von Glukose H_2O_2 bildet, eingekapselt, mit dem Ziel, die Membranpermeabilität zu studieren.

Ergebnisse und Diskussion

Auf der Grundlage unserer früheren ausführlichen Studie zu der morphologischen Entwicklung der Strukturen während des PISA-Prozesses^[24] können vesikuläre Strukturen mit unterschiedlichen hydrophoben Blocklängen durch wässrige RAFT-Dispersionspolymerisation von NAT in Gegenwart von PNAM₂₅ als Makrokettentransferagens (mCTA) hergestellt werden. Das mCTA kann bequem in einer wässrigen RAFT-Polymerisation ohne weitere Reinigung synthetisiert werden, bei der eine quantitative Umsetzung des Monomers erreicht wird. Unter geeigneten Bedingungen wird das PNAM₂₅ direkt mit verschiedenen NAT/mCTA-Anteilen (25, **V1**, 50, **V2** und 70, **V3**) kettenverlängert, um unilamellare Vesikel in wässrigen Dispersionen zu erhalten. Interessanterweise weisen alle erhaltenen Vesikel einen vergleichbaren Durchmesser auf (Tabelle S1), während die Membrandicke (D_M) mit zunehmendem Polymerisationsgrad (degree of polymerization, DP) von PNAT sukzessive von einem durchschnittlichen D_M von ca. 13 nm für einen DP von 25 auf ca. 17 nm für DP 50 und ca. 19 nm für DP 70 zunimmt (bestimmt aus einer statistischen Analyse der Kryo-TEM-Bildern, Abbildung 1 A–C, S2, S3).

Anschließend untersuchten wir den oxidativen Zerfall dieser Vesikel in 100 mM H_2O_2 und analysierten dabei den Zerfallsprozess anhand zeitabhängiger DLS-Messungen (Abbildung 1 E). In allen Fällen nahm die Streurrate erst nach

einer bestimmten Verzögerungszeit ab, gefolgt von einem sehr schnellen Abfall, bis die Streuintensitäten vergleichbar mit entsprechenden Lösungen freier Polymerketten waren. Die sigmoidale Form des Intensitätsabfalls deutet darauf hin, dass eher ein Bulk-Abbau als eine Grenzflächenreaktion eintritt, was auch bereits für Nanostrukturen auf PPS-Basis berichtet wurde.^[25] Interessanterweise bleibt der hydrodynamische Durchmesser (D_H) aller Strukturen bis zum Start des Zerfalls konstant. Kurz vor diesem Startpunkt steigt er leicht an, bevor ein schneller Abfall folgt, der mit der Abnahme der Streurrate übereinstimmt (Abbildung S5B). Offensichtlich scheinen die Polymersomen während der stundenlangen Inkubation intakt zu bleiben, bis sie zu einem bestimmten kritischen Zeitpunkt spontan zerfallen. Die einzelnen Zerfallspunkte lassen sich sogar in Mischungen der drei verschiedenen Vesikel **V1-3** identifizieren (Abbildung 1 E, graue Quadrate), die zu den für die einzelnen Vesikel charakteristischen Zerfallszeiten deutliche Stufen aufweisen. Die einzelnen Zerfallsprofile konnten durch eine Boltzmann-Funktion angenähert werden, mit dem Ziel, die jeweiligen $T_{1/2}$ jedes Vesikels in H_2O_2 zu bestimmen. Der Vergleich der $T_{1/2}$ mit der mittels Kryo-TEM bestimmten D_M ergab eine lineare Korrelation, was darauf schließen lässt, dass die Zerfallszeit hauptsächlich von der Dicke der Vesikelmembran abhängt. Die Variation der molaren Masse des PNAT-Blocks und damit der Membrandicke bietet somit die Möglichkeit, den Zeitpunkt des Zerfalls dieser Polymersomen zu modulieren.

Mit dem Ziel, den Zerfallsmechanismus weiter zu untersuchen, führten wir eine kinetische Studie an einer größeren Charge von Vesikeln **V3** in 100 mM H_2O_2 durch, indem zu bestimmten Reaktionszeiten Proben entnommen wurden (100 mL, 1 mg mL⁻¹, 37 °C, PBS pH 7,4). Die Proben wurden sofort in einem Überschuss an wässriger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (0,2 M) verdünnt und abgekühlt, um die Oxidationsreaktion zu quenchen. Der charakteristische selbstbeschleunigende Zerfall (Streurate und D_H) nach ca. 7 Stunden für **V3** (Abbildung 1 E), der bereits bei den vorherigen zeitabhängigen DLS-Messungen beobachtet wurde, konnte analog nachgebildet werden, was auf ein erfolgreiches Quenchen der Oxidationsreaktion schließen lässt (Abbildung 2). Für ausgewählte Proben, kurz vor Zerfallsbeginn, wurden Kryo-TEM-Bilder aufgenommen (Abbildung 2 I–IV). Die Mikroskopieaufnahmen zeigen, dass nach einer Inkubationszeit von 350 Minuten die vesikuläre Struktur noch intakt ist (Abbildung 2 I, S4A). Selbst nach 420 Minuten, als die Streurrate zu sinken beginnt, scheinen die Vesikel noch stabil zu sein, ohne offensichtliche Anzeichen eines Zerfalls (Abbildung 2 II, S4B). Eine Stunde später, nach 484 Minuten, sinkt die Streurrate deutlich (ca. 40%) und der D_H nimmt zu. Das entsprechende Kryo-TEM zeigt fast ausschließlich Vesikel mit gerissener bzw. perforierter Membran, und einige wenige, die sich bereits zu entfalten beginnen (Abbildung 2 III, S4C). Nur 30 Minuten später, nach 514 Minuten, sind die vesikulären Strukturen vollständig zerfallen und es sind nur noch Membranfragmente zu erkennen (Abbildung 2 IV, S4D). Um die Strukturinformationen mit der PNAT-Oxidationskinetik zu korrelieren, wurde der Oxidationsgrad der gequenchten Proben mittels NMR bestimmt. Zunächst wurden die Proben in einer Dialyse von den Resten an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und PBS befreit.

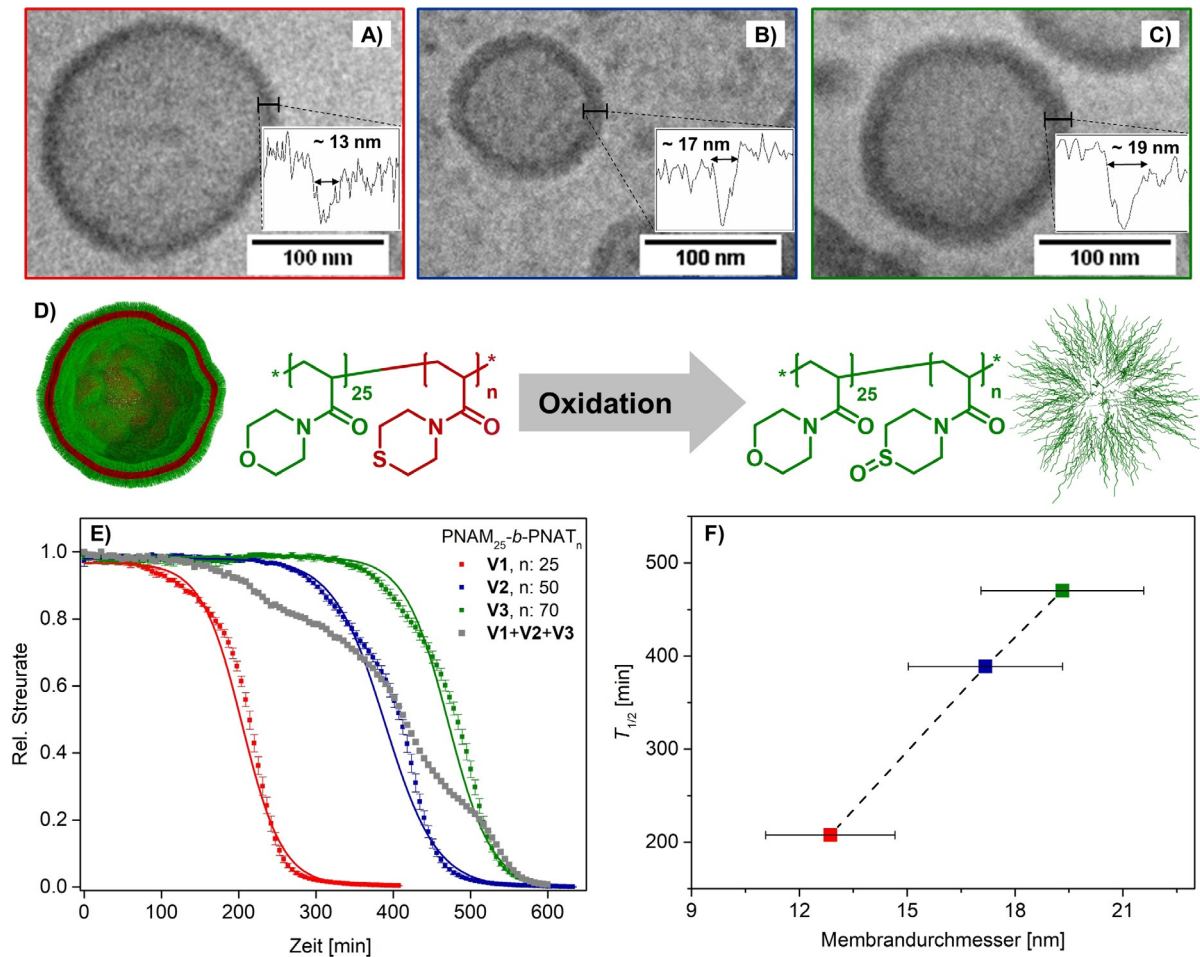


Abbildung 1. Einfluss des DP des hydrophoben Blocks und der Membrandicke auf das Degradationsverhalten. Der Membrandurchmesser wurde anhand von Kryo-TEM-Bildern der verschiedenen Vesikelproben bestimmt: A) V1 basierend auf PNAM₂₅-b-PNAT₂₅. B) V2 basierend auf PNAM₂₅-b-PNAT₅₀. C) V3 basierend auf PNAM₂₅-b-PNAT₇₀. D) Vesikelzerfall bei Oxidation des kernbildenden Blocks. E) Zeitabhängige Abnahme der Streurate bestimmt aus DLS-Messungen von separaten Proben V1-3 (drei einzelne Replikate) und einer kombinierten Mischung von V1 + V2 + V3 (100 mM H₂O₂, 1 mg mL⁻¹, 37°C, PBS pH 7). F) Korrelation der vesikulären $T_{1/2}$, bestimmt mittels sigmoidaler Kurvenanpassung der DLS-Zerfallskurven, und Membrandurchmesser, bestimmt aus einer graphischen Analyse von > 100 Kryo-TEM-Bildern.

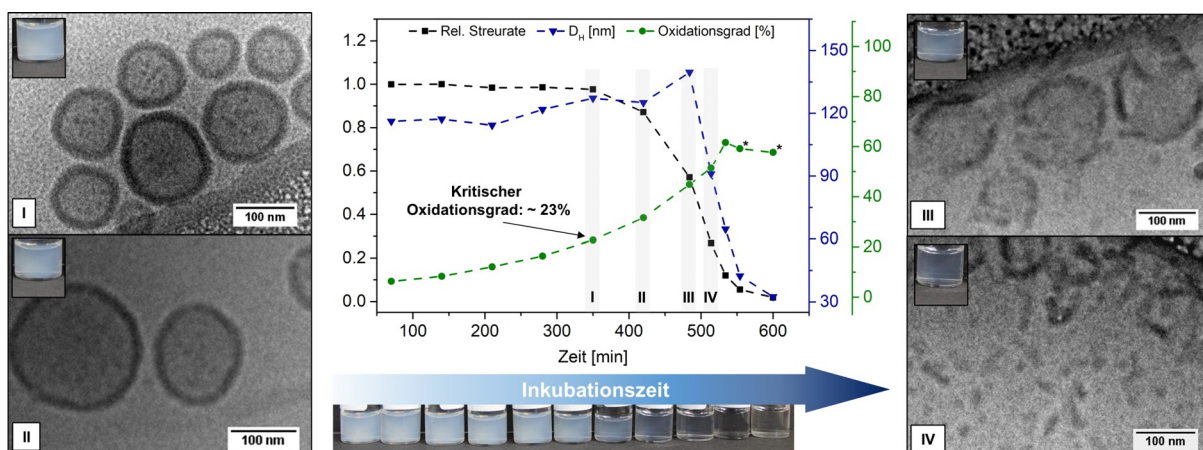


Abbildung 2. Kinetische Untersuchung des durch Oxidation ausgelösten Zerfalls von PNAM₂₅-b-PNAT₇₀-basierten Vesikeln V3 (100 mM H₂O₂, 1 mg mL⁻¹ PBS, 37°C, pH 7). Die Korrelation des Vesikelzerfalls wurde mittels DLS analysiert und der Oxidationsgrad mittels ASAP-HSQC-NMR von gequenchten Proben (8 mL, 0,2 M Na₂S₂O₃, 4/–20°C) bestimmt. Kryo-TEM-Bilder von gequenchten Proben wurden nach 350 (I), 420 (II), 484 (III) und 514 min (IV) aufgenommen. * Proben nicht vollständig aufgelöst.

Nach der Gefriertrocknung wurden NMR-Spektren in einem 4:1-Volumengemisch aus $[D_8]THF:D_2O$ aufgenommen, welches sich als das optimale Gemisch für die Auflösung sowohl des nicht oxidierten als auch des oxidierten Polymers erwies und gleichzeitig die Interferenzen durch die Überlappung der Signale reduzierte. Aufgrund der starken Verbreiterung der Protonensignale wurden schnelle $^1H,^{13}C$ -Heteronuklear-Einzelquantenkorrelationsexperimente (ASAP-HSQC) durchgeführt, um oxidierte von nicht oxidierten Spezies eindeutig zu trennen.^[26] Zur Berechnung des Oxidationsgrades wurde die Verschiebung der CH_2 -Protonensignale in α -Position zum Schwefelatom (1,7/26,1 ppm zu 2,7/32,6 ppm, 3,1/36,3 ppm, 3,4/32,6 ppm) verglichen (Abbildung S6–S8). Der Oxidationsgrad offenbarte, dass die Oxidation von PNAT während der Inkubationszeit einem kontinuierlichen exponentiellen Anstieg bis zu einem Oxidationsgrad von ca. 65% folgte (Abbildung 2, S9). Nur die letzten beiden Messpunkte, 554 und 600 min, zeigten wieder eine leichte Abnahme (mit * gekennzeichnet), was jedoch höchstwahrscheinlich mit der begrenzten Löslichkeit des Sulfoxidpolymers in der verwendeten THF-Mischung zusammenhängt, die zur Wahrung der Vergleichbarkeit erforderlich war. Der exponentielle Anstieg während der Polymeroxidation ist typisch für eine selbstbeschleunigende Reaktion und spiegelt die erhöhte Zugänglichkeit des H_2O_2 zu den Thioethergruppen in der hydrophoben Domäne aufgrund des Polaritätswechsels von Polysulfid zu Polysulfoxid wider.^[27] Andererseits deutet das Fehlen einer anfänglichen Verzögerungsphase darauf hin, dass der Oxidationsprozess nicht durch die hydrophobe Membran gehemmt wird und einem ähnlichen Bulk-Mechanismus folgt, wie für den Zerfallsprozess beobachtet wurde, woraus eine ausreichende Permeabilität der PNAT-Membran gegenüber

H_2O_2 geschlossen werden kann. Die Korrelation der NMR-Daten mit den DLS- und Kryo-TEM-Daten ergab einen kritischen Oxidationsgrad von ca. 23%, bei dem die PNAT-Membran teilweise oxidiert war, aber immer noch ihre mechanische Stabilität behielt (Abbildung 2I). Auf der Grundlage dieses Ergebnisses haben wir getestet, ob die partielle Oxidation der Membran dazu genutzt werden kann, die Zerfallszeit weiter einzustellen, ähnlich zum Einfluss der Variation des Membrandurchmessers. Aus diesem Grund wurde die Membran der PNAT₂₅-*b*-PNAT₇₀-basierten Vesikel **V3** durch Oxidation in H_2O_2 -Lösung und Quenchen zu bestimmten, durch die vorherige kinetische Studie vorgegebenen Zeitpunkten teilweise oxidiert bzw. „geätzt“. Der Vergleich der Streuprofile der unbehandelten mit teilweise oxidierten Vesikeln **V3** bestätigte die Integrität der Vesikelstruktur auch nach Langzeitlagerung von bis zu 6 Monaten (Abbildung S10). Nach einer Aufreinigung durch Dialyse wurde der vollständige Zerfall der „geätzten“ Vesikel mittels DLS verfolgt (Abbildung 3 A, S5C). Die Streuraten folgten einem ähnlichen sigmoidalen Abfall wie bei den unbehandelten Proben, jedoch verschob sich die Zerfallszeit (dargestellt durch $T_{1/2}$) in Korrelation mit dem ursprünglichen Oxidationsgrad der Probe (Abbildung 3 B). Die Ergebnisse zeigen, dass, obwohl die Membranintegrität bei niedrigen Oxidationsgraden erhalten bleibt, die Empfindlichkeit der „geätzten“ Vesikel gegenüber Oxidationsmitteln stark erhöht ist und dazu genutzt werden kann, die Lebensdauer der Vesikel durch Voroxidation und Quenching-Behandlung anzupassen.

In einem nächsten Schritt untersuchten wir, ob die Vesikel auch in der Lage waren, Verbindungen einzukapseln und zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder freizusetzen. Calcein

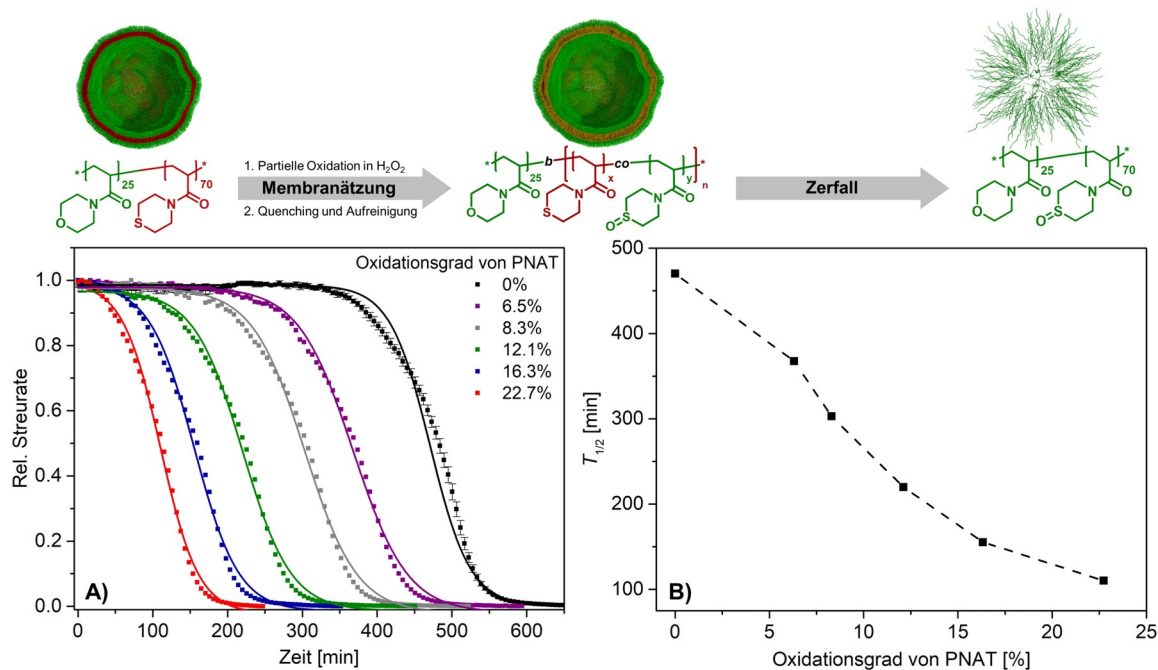


Abbildung 3. Einstellung der vesikulären Halbwertszeit $T_{1/2}$ durch Membranätzung. A) Zeitabhängige Abnahme der Streuraten, bestimmt durch DLS von teilweise oxidierten Vesikeln **V3** (100 mM H_2O_2 , 1 mg mL⁻¹ PBS, 37 °C, pH 7). B) Korrelation von $T_{1/2}$ und dem Oxidationsgrad des PNAT-Blocks, bestimmt durch NMR.

wurde als hydrophiler Modellfarbstoff gewählt, der für das Selbstquenching seiner Fluoreszenz bekannt ist, wenn er in hohen Konzentrationen in das Vesikellumen eingekapselt wird.^[28] Nach Freisetzung und Verdünnung kann dann ein charakteristischer Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Calcein wurde direkt durch Zugabe einer 1 mM Lösung zu der oben beschriebenen RAFT-Dispersionspolymerisation von NAT eingekapselt. Es muss hierbei jedoch beachtet werden, dass höhere Calceinkonzentrationen von 10 und 100 mM den RAFT-Prozess zu stören scheinen und die Polymerisation beeinträchtigen. Die Polymersomen wurden mittels präparativer Größenausschlusschromatographie (GPC) und anschließender Dialyse von verbleibendem freiem Calcein getrennt. Die Herstellung aller drei Calcein-haltigen Vesikel (**V1-3-C**) ergab ähnliche Molmassen und Dispersitäten, während leicht unterschiedliche D_H -Werte beobachtet wurden, die jedoch in einem vergleichbaren Größenbereich liegen (Tabelle S1). Die Einkapselungseffizienzen (EE) wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie anhand gefriergetrockneter Proben nach Auflösung der Vesikel bestimmt (Tabelle S1, Abbildung S12D). Die ausgezeichnete Stabilität dieser Vesikel und die Fähigkeit, kleine Moleküle zurückzuhalten, wurden zusätzlich in AF4-Messungen (asymmetrische Fluss-Feld-Flussfraktionierung) bestätigt, welche zeigen, dass Calcein auch nach einer Lagerung von mehr als einem Jahr in den Vesikeln **V3-C** verbleibt (Abbildung S12A,B). Eine Lokalisierung des Calceins innerhalb des

wässrigen Lumens wurde anhand eines Vergleichs der Fluoreszenzmissionsspektren der mit Calcein beladenen Vesikel **V1-3-C** mit freiem Calcein in wässrigem Puffer und organischem Lösungsmittel bestätigt (Abbildung S13E).

Die Freisetzungskinetik wurde ermittelt, indem die mit Calcein beladenen Vesikel (**V1-3-C**) in 100 mM H_2O_2 in einer Küvette inkubiert wurden und die Änderung der Fluoreszenzintensität des Calceins (Ex.: 495 nm, Em.: 510–540 nm; Abbildung 4B) über die Zeit beobachtet wurde. Da H_2O_2 eine oxidationsbedingte Fluoreszenzabschwächung bewirkt, wurde freies Calcein unter gleichen Bedingungen als Referenz untersucht.^[29] Im Falle der mit Calcein beladenen Vesikel (**V1-3-C**) in H_2O_2 wurde eine vergleichbare kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität in den Anfangsphasen beobachtet. Dieses kontinuierliche Quenching des eingekapselten Calceins, ähnlich dem freiem Calcein, bestätigt die oben erwähnte ungehinderte Diffusion von H_2O_2 durch die Vesikelmembran. Für jede der getesteten Proben konnte nach einer bestimmten Inkubationszeit die Freisetzung von Calcein durch einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden (Abbildung 4B). Ähnlich zu den oben beschriebenen $T_{1/2}$ -Werten verschiebt sich die Freisetzung bei größeren PNAT-Blöcken zu späteren Zeitpunkten und korreliert gut mit dem Einsetzen des Membranzerfalls der unbeladenen Vesikel **V1-2**. Wir nehmen an, dass die Verzögerung bei **V3** mit einer Abnahme der H_2O_2 -Konzentration in Anwesenheit des Farbstoffs zusammen-

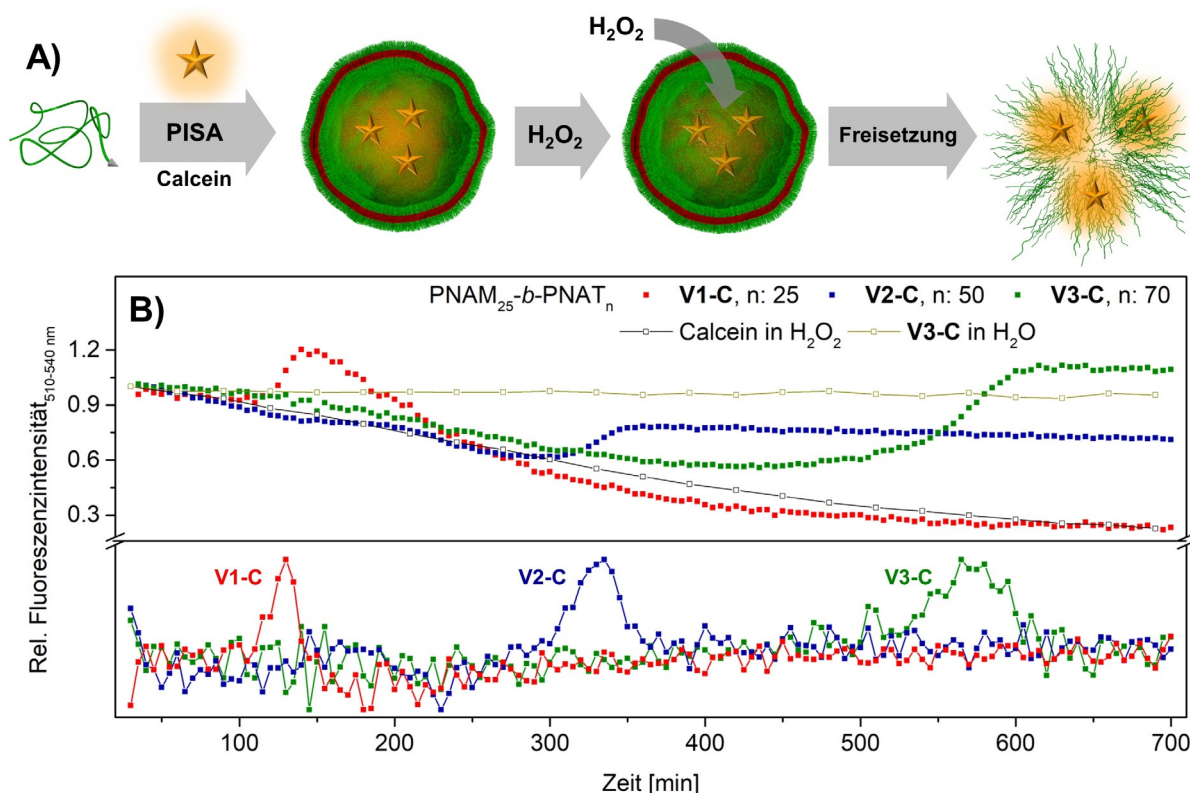


Abbildung 4. A) Schematische Darstellung der Beladung und der durch Oxidation ausgelösten Freisetzung von Calcein. B) Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität von Calcein beladenen Vesikeln **V1-3-C** in 100 mM H_2O_2 (1,75 mg mL⁻¹, 37 °C, PBS pH 7). **V3-C** in H_2O und Calcein in 100 mM H_2O_2 dienen als Kontrollen. Freisetzungseignisse werden durch die Maxima der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensität nach der Zeit angezeigt.

hängt, dennoch zeigte sich ein ähnliches Freisetzungsmuster. Im Falle der Vesikel mit längeren PNAT-Blöcken **V2-3-C** war die Löschung der Calcein-Fluoreszenz nach der Freisetzung verlangsamt, was auf eine verringerte H_2O_2 -Konzentration aufgrund der Oxidation der polymeren Thioether-Gruppen zurückzuführen sein könnte. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Membran der Vesikel auch bei einem erhöhten Oxidationsgrad intakt und undurchlässig für größere Moleküle wie Calcein bleibt, da vor dem Zerfallspunkt kein Austreten des Farbstoffs zu beobachten ist. Diese verzögerte Freisetzung ist bei der Verabreichung von Wirkstoffen sehr wünschenswert, um ein vorzeitiges Austreten des Wirkstoffs zu verhindern und gleichzeitig die Zirkulationszeit zu verlängern, mit dem Ziel, hohe lokale Konzentrationen zu erreichen.^[30] Ermutigt durch diese Ergebnisse und inspiriert durch frühere Arbeiten zu Polymersomen als Nanoreaktoren^[31] wurde die Einkapselung funktioneller und aktiver Enzyme getestet. Glukoseoxidase (GOx) schien in dieser ersten Machbarkeitsstudie besonders attraktiv für die Einkapselung, da dieses Enzym die Bildung von Glukonsäure und H_2O_2 aus Glukose katalysiert. Eine erfolgreiche Einkapselung würde die Polymersomen daher responsiv gegenüber Glukose machen, allerdings nur, wenn dieser Zucker auch die Polymersomen passieren kann. Im Gegensatz zur Verkapselung mit Calcein musste der ursprüngliche PISA-Prozess leicht angepasst werden, um eine Denaturierung des

Enzyms zu verhindern. Infolgedessen wurde die Temperatur für die RAFT-Polymerisation auf 40°C gesenkt, was eine Erhöhung der Initiatorkonzentration und eine Verlängerung der Polymerisationszeit auf 20 Stunden erforderte. Außerdem wurde der Gehalt an 1,4-Dioxan auf 33 Vol% erhöht, um eine ausreichende Kettenbeweglichkeit und Vesikelbildung zu gewährleisten. Nach der Reaktion wurde der Überschuss des freien Enzyms durch präparative GPC in Pufferlösung entfernt. Es wurden Polymersomen von vergleichbarer Größe wie die unbeladene Probe **V3** erhalten, was durch DLS-, Kryo-TEM- und AF4-Messungen bestätigt wurde (Abbildung S11C,D, S12SC-F, Tabelle S1). GPC-Messungen der mit GOx beladenen Vesikel **V3-G** in wässrigem Puffer beweisen eine erfolgreiche Aufreinigung und Entfernung der verbleibenden freien GOx (Abbildung S1C,D). Da die Membrandicke mit der der unbeladenen Vesikel vergleichbar war (Tabelle S1, Abbildung S3D), wurde davon ausgegangen, dass GOx in das vesikuläre Lumen internalisiert wurde, ähnlich zu bereits beschriebenen Systemen.^[32] Eine Adsorption von GOx an die innere Vesikelmembran kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. In einem ersten Experiment wurde die Aktivität der eingekapselten GOx durch eine Kaskadenreaktion mit Meerrettichperoxidase (HRP) und Amplex Red (AR) als Fluoreszenzsonde bestimmt (Abbildung 5A, S13A). Der Assay ermöglicht den Nachweis selbst kleiner Mengen von H_2O_2 , die bei der Re-

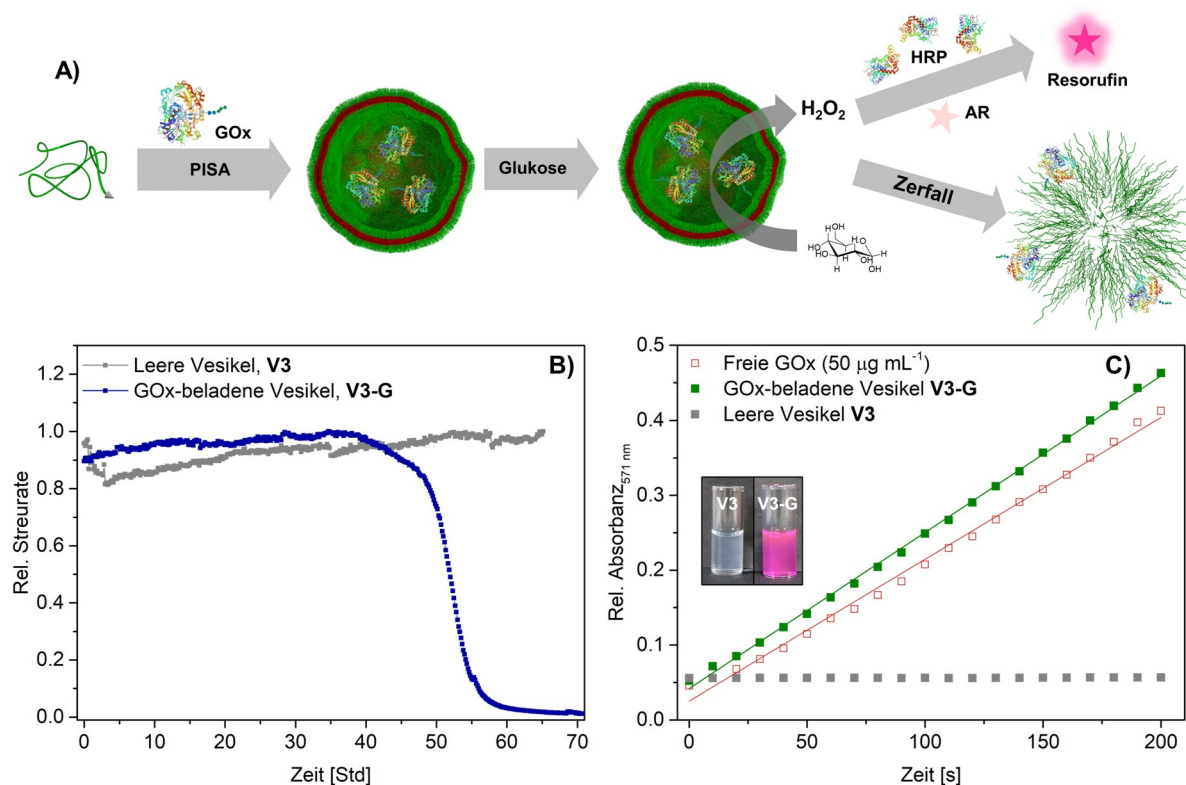


Abbildung 5. Beladung und durch Glukose ausgelöster Membranzerfall von GOx-beladenen Vesikeln: A) schematische Darstellung der Beladung, der Kaskadenreaktion und des Zerfalls. B) Membrandestabilisierung von GOx-beladenen Vesikeln **V3-G**, beobachtet in zeitabhängigen DLS-Messungen. **V3-G** und **V3** wurden in 100 mM Glukoselösung ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ Citrat-Phosphat-Puffer, 37°C , pH 7) inkubiert. C) Enzymatische Aktivität der mit GOx beladenen Vesikel **V3-G**, bestimmt anhand der Umsetzung von Amplex Red zu pinkem Resorufin im Vergleich zu freier GOx ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

aktion von GOx und Glukose freigesetzt werden, da die HRP die Umwandlung des farblosen AR zum pinken Resorufin katalysiert. In unserem Fall muss die Glukose jedoch erst durch die Vesikelmembran diffundieren, um die eingekapselte GOx zu erreichen und die Reaktionskaskade zu starten.

Die Reaktion wurde anhand der Änderung der Absorption bei 571 nm direkt nach der Glukosezugabe nachverfolgt (Abbildung 5C). Die Lösung von **V3-G** färbte sich schnell pink und zeigte einen stetigen Anstieg der Absorption, was auf eine hohe GOx-Aktivität und eine stetige Diffusion von Glukose durch die Membran hindurch hinweist. Als Kontrolle zeigten die leeren Vesikel **V3** unter den gleichen Bedingungen keine Aktivität. Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit von **V3-G** mit Proben definierter GOx-Konzentrationen ließ einen Rückschluss auf die Menge an eingekapselter, aktiver GOx zu, und eine EE von 34% konnte bestimmt werden (Berechnung siehe SI, Abbildung 5B, S13B,C). Die hohe EE spiegelt einmal mehr das Potenzial von PISA für die effiziente Einkapselung von Enzymen wider.^[2b,10c] Es sei darauf hingewiesen, dass die tatsächliche EE sogar noch höher sein könnte, da die Reaktion im Vergleich zum freien Enzym aufgrund der Diffusionsbarriere durch die Membran verlangsamt sein könnte. Abgesehen davon deutet die für die eingekapselte GOx beobachtete hohe Aktivität auf eine inhärente gröÙenselektive Permeabilität der PNAT-Membran für kleine hydrophile Moleküle wie Glukose oder H₂O₂ hin, während etwas größere Moleküle wie Calcein und das Makromolekül GOx im Vesikellumen zurückgehalten werden. Da PNAT eine hohe Glasübergangstemperatur aufweist, ist diese intrinsische Permeabilität der Membran wahrscheinlich auf eine erhöhte Hydratation der PNAT-Domäne zurückzuführen,^[33] ähnlich wie bei früheren Beobachtungen für PHPMA-basierte Systeme.^[2b,5a,34] Im Anschluss an diese Permeabilitätsstudien untersuchten wir, ob die H₂O₂-Bildung der eingekapselten GOx ausreicht, um die Oxidation der Thioethergruppen zu induzieren und die Vesikelmembran schließlich zu destabilisieren. Daher wurden die mit GOx beladenen Vesikel **V3-G** und die leeren Vesikel **V3** in einer Glukoselösung inkubiert, und die Membranstabilität wurde in zeitabhängigen DLS-Messungen überwacht (Abbildung 5A, S5D). Für **V3-G** wurde nach etwa 48 Stunden Inkubation ein ähnlicher selbstbeschleunigender Abfall der Streurate beobachtet, wie er für den Abbau in H₂O₂ festgestellt wurde. Die Kontrollprobe **V3** wies innerhalb der Messzeit keinen Zerfall auf. Die Ergebnisse belegen, dass die mit GOx beladenen Vesikel nicht nur eine hohe Enzymaktivität aufweisen, sondern auch in der Lage sind, in Gegenwart von Glukose als Auslöser einen Selbstzerfallsmechanismus zu induzieren.

Fazit

Zusammenfassend wurden oxidationsempfindliche Polymersomen entwickelt, die sich durch das abrupte Einsetzen eines spezifischen Zerfallsprozesses nach bestimmten Expositionszeiten in oxidativer Umgebung auszeichnen. Das auf Thioether basierende PNAT kann in einer PISA in einer wässrigen RAFT-Dispersionspolymerisation synthetisiert

werden. Eine detaillierte kinetische Untersuchung des Zerfallsmechanismus ergab, dass die Polymersomen erst ab einem bestimmten kritischen Oxidationsgrad beginnen, schnell zu zerfallen. Ein Bulk-Mechanismus wurde identifiziert, der eine hohe Diffusionsrate von H₂O₂ durch die PNAT-basierte Membran impliziert. Durch Variation des DP des hydrophoben PNAT-Blocks konnte die Membrandicke angepasst werden, welche wiederum direkt mit unterschiedlichen Zerfallszeiten korreliert. Eine weitere Strategie zur Modulation der Lebensdauer der Polymersomen konnte ausgehend von der beobachteten hohen Stabilität der Membran vor Erreichen eines kritischen Oxidationsgrades entwickelt werden. Bei diesem Ansatz wird die PNAT-Membran teilweise oxidiert bzw. „geätzt“ und anschließend gequencht. In einer ersten Machbarkeitsstudie wurde Calcein als Modellfarbstoff erfolgreich in diese Vesikel eingekapselt. Eine Freisetzung wurde erst nach Erreichen eines kritischen Oxidationsgrades beobachtet, der zum vollständigen Zerfall der Membran führte. Die hier vorgestellten Polymersomen sind daher ideale Vesikel, um eine zeitgesteuerte, abrupte Freisetzung auszulösen, die mit den oben beschriebenen Strategien präzise eingestellt werden kann. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit der Einkapselung eines aktiven Enzyms, in diesem Fall GOx, demonstriert. Die beobachtete Aktivität des Enzyms beweist nicht nur eine hohe Permeabilität der PNAT-Membran für kleine hydrophile Moleküle, sondern wandelt die Polymersomen mittels der In-situ-Umsetzung von Glukose in H₂O₂ in glukoseempfindliche, selbstzerfallende Nanoreaktoren um. Insgesamt machen die einfache Herstellung und die hohe Einkapselungseffizienz die Polymersomen zu einer vielseitigen Plattform für eine kontrollierte Freisetzung von eingekapselten Verbindungen, die an eine Reihe unterschiedlicher Bedingungen angepasst werden kann. Darüber hinaus kann das vorgestellte System angepasst werden, um die Zugänglichkeit von Reaktanten während Mehrkomponentenreaktionen zu modulieren oder eingekapselte Wirkstoffe in Bereichen mit hoher Glukosekonzentration und oxidativem Stress, wie Diabetes- oder Tumorgewebe,^[35] zeit- und konzentrationsgesteuert freizusetzen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich beim Sonderforschungsbereich – Projektnummer 316213987 – SFB 1278 PolyTarget (Projekte A05, Z01) für die Finanzierung. JCB dankt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die großzügige Förderung im Rahmen des Emmy-Noether-Programms (Projektnummer 358263073). Die TEM-Untersuchungen wurden an der Elektronenmikroskopie-Einrichtung des Jena Center for Soft Matter (JCSM) durchgeführt, das mit Zuschüssen der DFG und des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) eingerichtet wurde. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Dispersionspolymerisation · Nanoreaktor · Permeable Membran · Thioether · Vesikel

- [1] a) S. Iqbal, M. Blenner, A. Alexander-Bryant, J. Larsen, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1327–1350; b) H. Lomas, I. Canton, S. MacNeil, J. Du, S. P. Armes, A. J. Ryan, A. L. Lewis, G. Battaglia, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 4238–4243.
- [2] a) L. D. Blackman, S. Varlas, M. C. Arno, Z. H. Houston, N. L. Fletcher, K. J. Thurecht, M. Hasan, M. I. Gibson, R. K. O'Reilly, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 718–723; b) L. D. Blackman, S. Varlas, M. C. Arno, A. Fayter, M. I. Gibson, R. K. O'Reilly, *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 1263–1267; c) C. Z. Bueno, A. C. Apolinário, A. Duro-Castano, A. Poma, A. Pessoa, C. O. Rangel-Yagui, G. Battaglia, *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 1471–1477.
- [3] S. Matoori, J.-C. Leroux, *Mater. Horiz.* **2020**, *7*, 1297–1309.
- [4] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, *297*, 967.
- [5] a) S. Varlas, J. C. Foster, P. G. Georgiou, R. Keogh, J. T. Husband, D. S. Williams, R. K. O'Reilly, *Nanoscale* **2019**, *11*, 12643–12654; b) G. Cheng, J. Pérez-Mercader, *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 5691–5698; c) H. Che, S. Cao, J. C. M. van Hest, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5356–5359.
- [6] a) K. T. Kim, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2787–2791; b) P. Shi, Y. Qu, C. Liu, H. Khan, P. Sun, W. Zhang, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 88–93; c) W.-J. Zhang, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 15086–15095.
- [7] a) X.-R. You, X.-J. Ju, F. He, Y. Wang, Z. Liu, W. Wang, R. Xie, L.-Y. Chu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 19258–19268; b) G. Liu, X. Wang, J. Hu, G. Zhang, S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7492–7497.
- [8] J. Lefley, C. Waldron, C. R. Becer, *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 7124–7136.
- [9] a) F. Ahmed, D. E. Discher, *J. Controlled Release* **2004**, *96*, 37–53; b) K. Dan, S. Ghosh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7300–7305; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7441–7446.
- [10] a) Y. Li, B. S. Lokitz, C. L. McCormick, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5792–5795; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5924–5927; b) A. O. Moughton, R. K. O'Reilly, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1091–1093; c) J. He, J. Cao, Y. Chen, L. Zhang, J. Tan, *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 533–539.
- [11] a) A. Napoli, M. Valentini, N. Tirelli, M. Muller, J. A. Hubbell, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 183–189; b) K. N. Power-Billard, R. J. Spontak, I. Manners, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1260–1264; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1280–1284.
- [12] a) Y. Deng, H. Chen, X. Tao, F. Cao, S. Trépout, J. Ling, M.-H. Li, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3435–3444; b) E. Jäger, V. Sincari, L. J. C. Albuquerque, A. Jäger, J. Humajova, J. Kucka, J. Pankrac, P. Paral, T. Heizer, O. Janouskova, R. Konefal, E. Pavlova, O. Sedlacek, F. C. Giacomelli, P. Pouckova, L. Sefc, P. Stepanek, M. Hruby, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 1437–1449; c) G. Saravanakumar, H. Park, J. Kim, D. Park, J. Lim, J. Lee, W. J. Kim, *J. Controlled Release* **2020**, *327*, 627–640.
- [13] a) M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84; b) K. Apel, H. Hirt, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399.
- [14] J. Kim, K. T. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 23502–23513.
- [15] D. Lee, S. Bae, D. Hong, H. Lim, J. H. Yoon, O. Hwang, S. Park, Q. Ke, G. Khang, P. M. Kang, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2233.
- [16] a) S. Bobbala, S. D. Allen, S. Yi, M. Vincent, M. Frey, N. B. Karabin, E. A. Scott, *Nanoscale* **2020**, *12*, 5332–5340; b) K. M. Poole, C. E. Nelson, R. V. Joshi, J. R. Martin, M. K. Gupta, S. C. Haws, T. E. Kavanaugh, M. C. Skala, C. L. Duvall, *Biomaterials* **2015**, *41*, 166–175; c) A. E. Vasdekis, E. A. Scott, C. P. O'Neil, D. Psaltis, J. A. Hubbell, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7850–7857.
- [17] F. H. Sobotta, F. Hausig, D. O. Harz, S. Hoepfener, U. S. Schubert, J. C. Brendel, *Polym. Chem.* **2018**, *9*, 1593–1602.
- [18] a) S. Y. Khor, J. F. Quinn, M. R. Whittaker, N. P. Truong, T. P. Davis, *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40*, 1800438; b) W. J. Zhang, C. Y. Hong, C. Y. Pan, *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40*, 1800279.
- [19] a) C. Gonzato, M. Semsarilar, E. R. Jones, F. Li, G. J. Krooshof, P. Wyman, O. O. Mykhaylyk, R. Tuinier, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11100–11106; b) J. Lesage de la Haye, X. Zhang, I. Chaduc, F. Brunel, M. Lanslot, F. D'Agosto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3739–3743; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 3803–3807; c) M. Huo, Z. Xu, M. Zeng, P. Chen, L. Liu, L.-T. Yan, Y. Wei, J. Yuan, *Macromolecules* **2017**, *50*, 9750–9759.
- [20] a) S. Pearce, J. Perez-Mercader, *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 29–49; b) N. J. Warren, O. O. Mykhaylyk, A. J. Ryan, M. Williams, T. Doussineau, P. Dugourd, R. Antoine, G. Portale, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1929–1937.
- [21] a) X.-F. Xu, C.-Y. Pan, W.-J. Zhang, C.-Y. Hong, *Macromolecules* **2019**, *52*, 1965–1975; b) C. J. Mable, R. R. Gibson, S. Prevost, B. E. McKenzie, O. O. Mykhaylyk, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 16098–16108; c) J. Tan, H. Sun, M. Yu, B. S. Sumerlin, L. Zhang, *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1249–1253.
- [22] a) M. Chen, J.-W. Li, W.-J. Zhang, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, *Macromolecules* **2019**, *52*, 1140–1149; b) C. J. Mable, I. Canton, O. O. Mykhaylyk, B. Ustbas Gul, P. Chambon, E. Themistou, S. P. Armes, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4811–4821.
- [23] S. Xu, G. Ng, J. Xu, R. P. Kuchel, J. Yeow, C. Boyer, *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 1237–1244.
- [24] F. H. Sobotta, M. Kuchenbrod, S. Hoepfener, J. C. Brendel, *Nanoscale* **2020**, *12*, 20171–20176.
- [25] V. Khutoryanskiy Vitaliy, N. Tirelli, *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 1703.
- [26] D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1242–1245.
- [27] R. d'Arcy, A. Siani, E. Lallana, N. Tirelli, *Macromolecules* **2015**, *48*, 8108–8120.
- [28] S. Cerritelli, D. Velluto, J. A. Hubbell, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1966–1972.
- [29] J.-M. Liu, Z.-b. Liu, Q. Huang, X. Lin, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 8779–8784.
- [30] a) T. Guo, T. Meng, G. Yang, Y. Wang, R. Su, S. Zhou, *Nano Lett.* **2019**, *19*, 6065–6071; b) M. A. Yassin, D. Appelhans, R. Wiedemuth, P. Formanek, S. Boye, A. Lederer, A. Temme, B. Voit, *Small* **2015**, *11*, 1580–1591.
- [31] a) L. D. Blackman, Z. Y. Oo, Y. Qu, P. A. Gunatillake, P. Cass, K. E. S. Locock, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 11353–11362; b) S. F. M. van Dongen, M. Nallani, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1107–1114; c) J. Gaitzsch, X. Huang, B. Voit, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1053–1093; d) H. Che, J. C. M. Van Hest, *ChemNanoMat* **2019**, *5*, 1092–1109.
- [32] a) D. M. Vriezema, P. M. L. Garcia, N. Sancho Oltra, N. S. Hatzakis, S. M. Kuiper, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7378–7382; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7522–7526; b) S. M. Kuiper, M. Nallani, D. M. Vriezema, J. J. L. M. Cornelissen, J. C. M. van Hest, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4315–4318.
- [33] a) R. Takahashi, S. Miwa, F. H. Sobotta, J. H. Lee, S. Fujii, N. Ohta, J. C. Brendel, K. Sakurai, *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 1514–1524; b) F. H. Sobotta, M. T. Kuchenbrod, C. Grune, D. Fischer, S. Hoepfener, J. C. Brendel, *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 1668–1680.

- [34] A. J. Miller, A. K. Pearce, J. C. Foster, R. K. O'Reilly, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 30–38.
- [35] a) J. Yu, C. Qian, Y. Zhang, Z. Cui, Y. Zhu, Q. Shen, F. S. Ligler, J. B. Buse, Z. Gu, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 733–739; b) L. Zhao, L. Wang, Y. Zhang, S. Xiao, F. Bi, J. Zhao, G. Gai, J. Ding, *Polymers* **2017**, *9*, 255; c) W. Ke, J. Li, F. Mohammed, Y. Wang, K. Tou, X. Liu, P. Wen, H. Kinoh, Y. Anraku, H. Chen, K. Kataoka, Z. Ge, *ACS Nano* **2019**, *13*, 2357–2369.

Manuskript erhalten: 5. Juli 2021

Veränderte Fassung erhalten: 7. September 2021

Akzeptierte Fassung online: 20. September 2021

Endgültige Fassung online: 11. Oktober 2021