

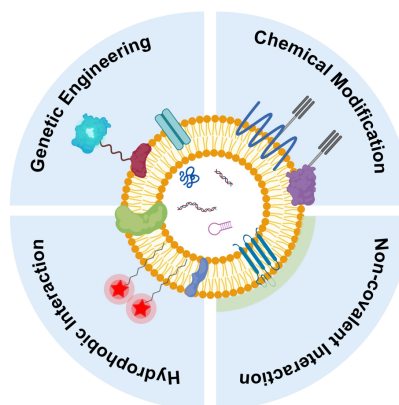
Accounts of Materials & Surface Research

Bioinspired Universal Coatings to Functionalize the Surface of Exosomes

Chenyu Wang, Hirotaka Ejima*

Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan
ejima@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

Exosomes are cell-derived extracellular vesicles that present in most biological fluids including blood, urine, saliva, and so forth. Exosomes mediate intercellular communication by delivering nucleic acids and proteins in vivo. As the surface characteristics of exosomes dictate their biological fate, the surface functionalization is a pivotal technique to broaden the biomedical potential of exosomes. The surface engineering might also lead to solve the purification and stability issues of the exosome. In this paper, we categorize the surface engineering methods of exosomes into three strategies; (i) genetically engineering the parental cell line, (ii) synthetic covalent modification, and (iii) noncovalent modification including hydrophobic interaction. Recently, polydopamine (PDA) and metal-phenolic network (MPN) have emerged as a powerful coating technique through noncovalent interaction with various substrates. These bioinspired coatings have also been applied to exosomal surfaces. The strengths and weaknesses of each methods are reviewed and possible future direction is discussed.



Keyword: Polydopamine, Metal-Phenolic Network, PEGylation, Exosomes

Chenyu Wang received her Master's degree in Science at the University of Bristol in 2017. She became a PhD candidate under the guidance of Prof. Hirotaka Ejima from 2019 at the Department of Materials Engineering, The University of Tokyo. Her current research interests include surface functionalization, detection, and analysis of exosomes.



Hirotaka Ejima obtained his PhD under the guidance of Professor Takeshi Serizawa in 2011 at The University of Tokyo. He then joined the research group of Professor Frank Caruso at The University of Melbourne as a JSPS postdoctoral fellow. After spending two and a half years working on the biomedical applications of metal-phenolic network, he moved back to Japan and now is an associate professor at the Department of Materials Engineering, the University of Tokyo. His current research interests are in developing functional materials for biomedical and environmental applications through bioinspired approaches.



生物から着想した汎用コーティングによる エクソソームの表面修飾

王 晨煜・江島広貴*

東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

1. エクソソームとは

細胞は様々な小胞を分泌する¹⁾。これらの厳密な分類は議論されている最中であるが、大きく分けるとエンドソーム由来のエクソソームと形質膜由来のエクソソームに分類することができる²⁾。エクソソームは血球細胞や内皮細胞など、様々な細胞が分泌し、核酸やタンパク質が内包されている。直径は40–160 nm程度であり、血液、尿、唾液など殆どの体液に含まれている。体内を循環して、分泌細胞と標的細胞の間でコミュニケーションを媒介していることが近年明らかにされてきた(Fig. 1)。

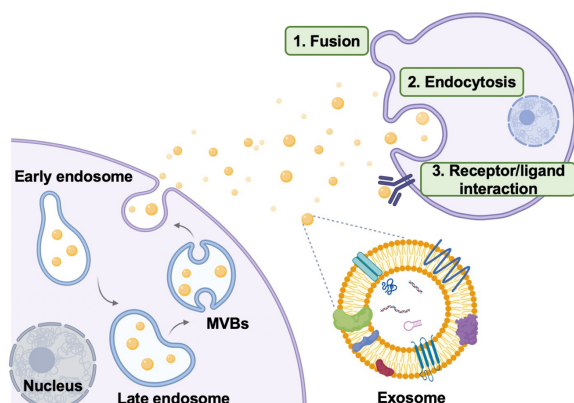


Figure 1. Exosomes are released from the multivesicular bodies (MVBs), which are formed within the cytoplasm of the cell, into the extracellular environment by fusion of MVBs with the cell membrane. Secreted exosomes can deliver the cargos to recipient cells through (1) direct fusion with the recipient plasma membrane; (2) phago- and micropino-cytosis; (3) receptor-mediated endocytosis. Created with BioRender.com

言い換えるとエクソソームは細胞から細胞へ物質を運ぶ天然のナノキャリアであるから、その機能をハイジャックして人工的な薬物送達キャリアへと改変することは理にかなったアイデアである。Alvarez ら³⁾は、マウスの細胞培養液か

ら精製したエクソソームに電気穿孔法によって siRNA を封入して細胞採取元のマウスへと注射し、脳選択的に siRNA を送達してタンパク質をノックダウンすることに成功している。核酸医薬の他にも抗がん剤⁴⁾や抗炎症薬⁵⁾をエクソソームに内包させ薬物送達に応用した例が報告されている。

また、癌細胞など病変細胞から分泌されたエクソソームの構成分子がバイオマーカーとして注目されている⁶⁾。例えば、悪性黒色腫細胞が放出するエクソソームには TYRP2、VLA-4、METなどのタンパク質が高濃度に含まれており、これらは転移能を予測するためのマーカーとして有望である⁷⁾。既に血中エクソソームに内包された RNA を分析し、癌診断および抗がん剤投薬の指針とする体液診断が米国で一部実用化されている⁸⁾。血液ではなく、尿や唾液に含まれるエクソソームからも同様の診断が可能になれば、より低侵襲な診断が実現するため、エクソソームに関わる周辺技術は今後ますます重要になるだろう。

2. エクソソームの表面工学

薬物送達や体液診断などの医療応用が先行しているが、エクソソームは脂質二重膜からなる不安定かつ極小サイズの粒子であるためハンドリングが難しいという課題がある。エクソソームは、内包物の漏出、脂質二重膜の融合や脂質分子の交換、プラスチック容器表面への吸着による変性等が頻繁に起こり、不安定である⁹⁾。脂質二重膜は流動性かつ酸化されやすいため、エクソソームを長期保存すると粒径が変化し、化学的に変性する場合がある⁹⁾。経験的に、体液や細胞培養液からエクソソームを精製したら、冷凍庫に長期間保存せず、できるだけ早めに

実験に用いる方が良いと言われている。

最近、我々は生物に着想を得た汎用的なコーティング手法をエクソソームに適用することで、エクソソームの表面を抗酸化性薄膜によって全面被覆することに成功した¹⁰⁾。これまでのエクソソーム表面の修飾法は遺伝子工学的的手法および化学的手法により、膜上の分子を修飾するものが大半であるが¹¹⁾、我々が最近報告した手法は分子間相互作用によりエクソソーム表面を全面被覆することができる¹⁰⁾。本論文では、エクソソームの表面修飾法を (i) 遺伝子工学、(ii) 化学反応、(iii) 分子間相互作用による手法の3つにカテゴライズし、それぞれの特徴を述べる。

3. 遺伝子工学的的手法によるエクソソームの表面修飾

ラクタヘドリンの C1C2 ドメインは脂質表面に結合する指向性がある¹²⁾。この特性を利用して、目的のタンパク質を C1C2 ドメインの N 末端側に融合させることで、エクソソームの外表面に修飾することができる (Fig. 2)。本手法を用いて、腫瘍関連抗原やヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER2)¹³⁾ がエクソソーム表面に固定化された。Wang ら¹⁴⁾は、抗 HER2 抗体と C1C2 ドメインの融合タンパク質をコードしたプラスミドをデザインし、エクソソームの表面に抗 HER2 抗体を提示できることを報告している。抗 HER2 抗体を提示したエクソソームに細胞傷害性薬剤を内包し、HER2 陽性乳がん細胞に選択的に内包物を送達できることも示された。

Morishita ら¹⁵⁾はガウシアルシフェラーゼ (GLuc) とラクタヘドリンの融合タンパク質をコードするプラスミドを設計した。マウス悪性黒色種細胞 (B16-BL6) にプラスミドを導入し、分泌されたエクソソームを超遠心分離によって回収した。このエクソソームは、セレンテラジン存在下で GLuc の酵素活性に起因する発光を示した。このエクソソームをマウスに静脈内注射し、生体内分布を発光シグナルに基づいて経時的にモニターした。血清中の発光強度はすぐに低下し、半減期は約 2 分であった。比較的強い発光強度がまず肝臓で、次に肺で観察された。

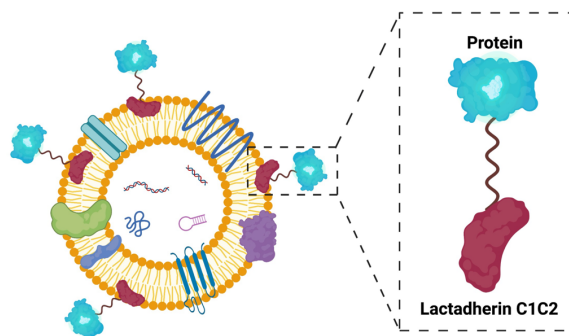


Figure 2. Fusing proteins to the C1C2 domain of Lactadherin allows chimeric proteins to immobilize on the surface of exosomes.

標的ペプチドをエクソソームの膜タンパク質である Lamp2b と融合させることで、エクソソーム表面に固定化することも可能である。狂犬病ウイルスに由来する RVG ペプチドは、脳内や脳血管内皮細胞に多く発現しているアセチルコリンレセプターと結合し、脳移行性を示す¹⁶⁾。Alvarez ら³⁾は RVG ペプチドを Lamp2b と融合させ、エクソソームの脳ターゲティングを試みている。Tian ら¹⁷⁾は iRGD ペプチドを Lamp2b と融合させることで、ドキシソルビシン搭載エクソソームの表面に提示した。iRGD ペプチドはがん組織に多く発現する $\alpha_v\beta_3$ に特異的に結合するため、iRGD 修飾によってがん組織におけるエクソソームの集積量が増加した。

Lai ら¹⁸⁾は、血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) の膜貫通ドメイン (BAP ドメイン) と GLuc をコードするレンチウイルスベクターを調製した。このベクターを導入された HEK293T 細胞は、表面に GLuc および BAP ドメインを提示するエクソソームを持続的に分泌した。BAP ドメインは動物細胞で発現させると、ビオチンリガーゼによってビオチン化される。このビオチンを介して、streptavidin-Alexa Fluor 680 複合体を二次修飾した。Alexa Fluor 680 の蛍光シグナルを用いて、エクソソームの組織分布と血中濃度を *in vivo* イメージングした。静脈内投与されたエクソソームは、まず体内に分布した後、肝臓および腎臓を介して排泄段階へと移行した。半減期はほとんどの組織で 30 分未満であった。最も高い蛍光シグナルは脾臓から検出され、次に肝臓、腎臓、肺と続いた。脳と心臓からは弱い蛍光シグナルしか検出されなかつ

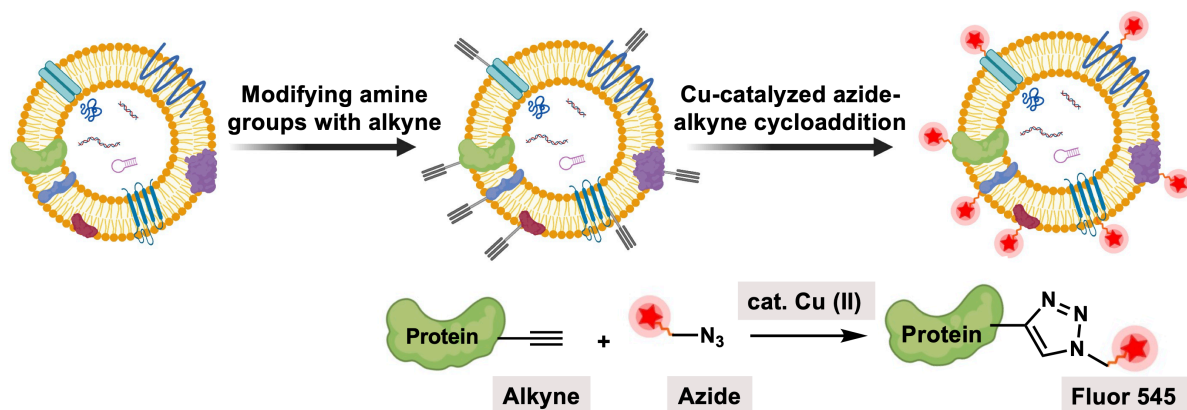


Figure 3. Surface engineering of exosomes through the click reaction.

た。

タンパク質をエクソソームの内表面選択的に固定化することもできる。Yim ら¹⁹⁾は、エクソソームの膜上に存在するタンパク質である CD9 の C 末端側に緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、N 末端側に CIBN を融合させた (CIBN-EGFP-CD9) プラスミドを調製した。これとは別に、赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を CRY2 と融合させたプラスミドも用意した。CIBN と CRY2 は青色光照射に応答して光二量化する²⁰⁾。細胞にプラスミドを遺伝子導入し、青色光照射下で培養することで、分泌されるエクソソーム内に mCherry が固定化された。次に、Cre リコンビナーゼと CRY2 の融合タンパク質を調製し、これもエクソソーム内表面に固定化した。このエクソソームはリコンビナーゼを細胞や組織にデリバリーするための薬物送達キャリアとして機能した。

このように遺伝子工学的手法によるエクソソームの表面修飾は膜の外表面と内表面を区別して修飾可能である。一方で、プラスミドをまず作製する必要がある。適応可能な分子はペプチド鎖やタンパク質に制限される。また、ペプチドやタンパク質であったとしても、細胞内で翻訳されエクソソーム膜上へ移行する過程で分解される可能性があり、どのような配列でも提示できるというわけではない²¹⁾。

4. 化学反応によるエクソソームの表面修飾

化学反応をエクソソームの表面機能化に利用した例がいくつか報告されている。Smyth ら²²⁾

は、4-ペンチン酸をエクソソーム膜上タンパク質のアミンと反応させることで、エクソソームの外表面にアルキンを導入した。次に、アジド基をもつ蛍光色素 (5-カルボキシテトラメチルローダミンアジド) をエクソソーム表面上のアルキンとクリック反応 (ヒュスゲン双極子環化付加) させることで固定化できることを示した (Fig. 3)。所定の密度でアルキンを修飾したリポソームを別途用意し、これと比較することでエクソソーム表面に導入されたアルキンの量を見積もったところ、エクソソーム膜上のタンパク質 1 分子あたり 1.5 分子のアルキンが導入されたことが示唆された。しかし、本手法ではどの膜タンパク質が修飾を受けたのか定かではなく、さらに膜タンパク質のアミンではなくホスファチジルエタノールアミンなどの脂質分子中のアミン基と反応している可能性も否定できない。

クリック反応によって標的ペプチドをエクソソーム表面に固定化し、薬物送達に応用した例がある。Tian ら²³⁾は、2 段階反応により環状ペプチド (cRGD, Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) をエクソソーム表面に修飾した。まずジベンゾシクロオクチン (DBCO) -Sulfo-N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) をエクソソーム膜上に存在するアミノ基と反応させた。次に導入された DBCO 基とアジド化ペプチドをクリック反応させた。抗炎症薬 (クルクミン) を内包し、局所脳虚血モデルのマウスに尾静脈内投与したところ、炎症性サイトカインの発現レベルを有意に減少させた。

メチオニンおよびシスチンの代わりに L-アジドホモアラニン (メチオニンのアジド基含有アミノ

酸類似体)を添加した培地中で細胞培養すると、翻訳されるタンパク質中にアジド基が導入される。このアジド基をクリック反応による修飾点として利用することができる²⁴⁾。Wang ら²⁵⁾は、この手法によってエクソソーム上の膜タンパク質にアジド基を導入した。導入されたアジド基と DBCO-Cy3 および DBCO-PEG-ビオチンをクリック反応させることでエクソソーム表面に蛍光色素およびビオチンを修飾することに成功した。

化学反応によるエクソソームの表面修飾は、ほとんどの場合においてエクソソーム表面の膜タンパク質や脂質分子内に存在するアミノ基を化学反応点として活用している。また、精製過程において完全に排除することのできない不純物が望ましくない副反応を引き起こす可能性も指摘されている²⁶⁾。エクソソームの純度を十分に担保でき、表面上の反応点がさらに開拓されれば、標的ペプチド、蛍光色素、PEG 誘導体などをエクソソーム表面に固定化するための標準的手法になり得る。

5. 分子間相互作用を利用したエクソソームの表面修飾

PKH26 は分子内に蛍光発色部位と脂質親和性の高い長鎖アルキル基をもつ。短時間(1~5分)の標識処理でアルキル鎖が細胞膜に挿入され、蛍光発色部位を細胞の外表面に固定化できる。エクソソームも細胞と同様の脂質二重膜から成るため、エクソソーム膜を染色するためにも使用できる(Fig. 4)。ただし、PKH26 はその両親媒性から、超遠心分離中にナノ粒子へと自己組織化する可能性が指摘されており、サイズと蛍光強度が類似している蛍光ラベル化されたエクソソームと分離することは困難である²⁷⁾。したがって、エクソソームを PKH26 染色する際には、偽陽性シグナルの可能性に常に注意する必要がある。

このように長鎖アルキル基は疎水性相互作用を介して分子をエクソソームの脂質二重膜に固定化するために利用されている。Koojimens ら²⁸⁾はエクソソームの血中半減期を延ばすために、PEG-脂質複合体のアルキル鎖部位を脂質二重膜に挿入することで PEG をエクソソーム表面

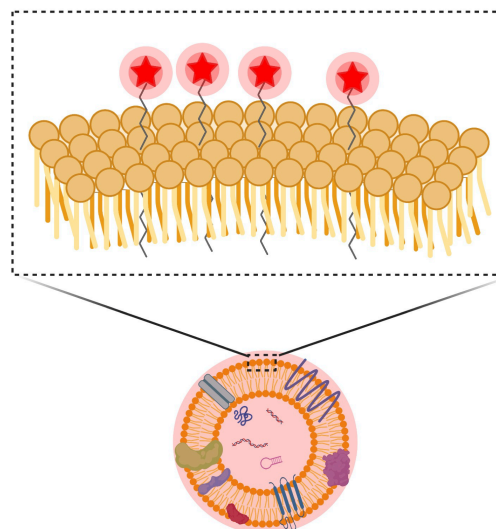


Figure 4. Immobilization of functional molecules on exosomal surfaces via insertion of hydrophobic alkyl chains.

に固定化した。未修飾のエクソソームは静脈注射後 10 分以内に血中から迅速に除去されたが、PEG 修飾されたエクソソームは 60 分後も検出可能であった。

Hu1545 細胞(正常肝由来)の表面に、HepG2 細胞(肝癌由来)の表面と比べて、より多く結合する DNA アプタマーがスクリーニングされた²⁹⁾。Wan ら³⁰⁾は、HepG2 細胞の表面に結合するアプタマーは、HepG2 細胞が分泌するエクソソーム表面にも結合するはずとの仮説を立てた。実際に、7 種類のアプタマーが HepG2 細胞が分泌したエクソソームの表面によく結合したが、うち 6 種類のアプタマーは Hu1545 細胞が分泌したエクソソーム表面にも結合した。特異性を示したのは 1 種類のアプタマー(LZH8)のみであった。このことはエクソソーム表面のタンパク質組成が分泌細胞表面のそれと一部異なることを示唆している。

近年、ムラサキイガイの接着にヒントを得た汎用的なコーティング手法³¹⁾が材料工学分野で注目を集めている。イガイ目イガイ科に属する二枚貝の 1 種であるムラサキイガイは、接着性タンパク質を用いて湿潤環境においても岩肌などに接着する。岩肌のみでなく、金属材料、無機材料、有機材料など様々な人工材料の表面にも接着することができる。この接着性タンパク質は、側鎖がカテコール基であるジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)と側鎖がアミノ基である

リシンを多く含んでいる³²⁾。Lee ら³¹⁾はドーパミンがカテコール基とアミノ基を両方含むことに着目し、種々の基材に適用可能な被膜前駆体になることを報告した。ドーパミン水溶液に被覆対象の物質を浸漬するだけで、ドーパミンが表面に吸着して重合し、ポリドーパミン (PDA) 被膜が生成する。

我々は PDA コーティングがエクソソームにも適用可能であることを示した¹⁰⁾。精製したエクソソームをドーパミンの Tris 塩酸緩衝溶液 (ドーパミン 2 mg/mL、Tris 10 mM、pH 7.4) 中に分散させ、室温で2時間インキュベーションするだけでコーティングが完了する (Fig. 5)。PDA コーティング前後のエクソソームの粒径を動的光散乱で測定したところ、 78 ± 11 nm から 98 ± 9 nm へと増加した。このことから膜厚は約 10 nm であることがわかる。またコーティングに伴って表面ゼータ電位が -16.7 mV から -26.5 mV へと変化した。ポリドーパミンはチオール基とマイケル付加反応するため、チオール末端 PEG を添加するだけで PEG 鎖を高密度にエクソソーム表面に導入することができる。PEG 鎖の導入はエクソソームの保存期間中の分散安定性を向上させた。

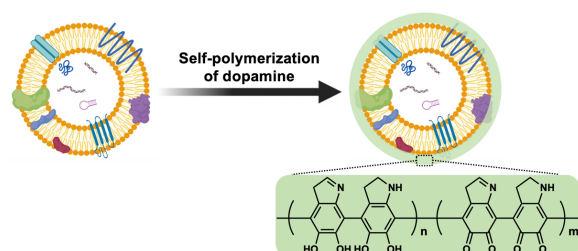


Figure 5. Polydopamine coating of exosomal surface.

PDA と同じく様々な基材を被覆できる Metal-Phenolic Network (MPN)³³⁾もエクソソームの表面修飾に適応されている³⁴⁾。Fe³⁺とタンニン酸からなる MPN 被覆により、エクソソームのゼータ電位が -49 ± 1.2 mV から -23 ± 1.6 mV に変化した。MPN 被膜は、熱ストレスおよび UV 照射から内包物を保護した。グルタチオン保護金ナノ粒子をマイケル付加反応によって MPN 被膜上に固定化することができた。これにより、暗視野顕微鏡を使用した単一エクソソ-

ームの可視化が可能になった。MPN を介して金ナノ粒子を表面に固定化したエクソソームの MCF-7 細胞による取り込みを透過型電子顕微鏡で観察したところ、主にリソソーム内に局在していた。さらに、MPN 被膜は pH 5 で分解し、除去可能であった。このように刺激に応答して表面が変化する系を実現する上で、分子間相互作用を活用した修飾法は有効である。

6. 今後の展望

エクソソームの表面修飾法を (i) 遺伝子工学、(ii) 化学反応、(iii) 分子間相互作用による手法に分類し、それぞれを概観した。遺伝子工学的手法がエクソソームの表面改質のために現在最もよく利用されている。融合タンパク質の発現のために、ベクターの調製および細胞株の樹立が必要だが、一度確立してしまえば、安定してエクソソームを生産可能である。グラム陽性菌由来や植物由来の膜小胞など、哺乳類細胞以外の供給源からの細胞外小胞の表面修飾においても遺伝子工学的手法は有用だろう。ただし、タンパク質またはペプチドの修飾に限定されるため、合成小分子や高分子を表面修飾するには化学反応および分子間相互作用を利用したエクソソームの表面修飾法が依然として必要である。

エクソソームの血中半減期はおおむね 10 分未満であり、血中滞留性の改善が薬物送達キャリアとしての応用には必須である。血中滞留性向上のためには PEG の表面固定化が有効であり、これは化学反応および分子間相互作用を利用した表面修飾によって試みられている。しかし、化学反応による修飾では、ほとんどがエクソソーム表面のタンパク質のアミノ基を反応点として用いているため、新たな表面修飾反応の開拓は重要な研究テーマであろう。また異なる供給源由来のエクソソーム表面に対して同様の化学反応を行うと、同様の修飾率が得られるかどうかを評価した研究が不足しているため、再現性担保の観点からさらなる研究が必要とされている。

分子間相互作用を利用した表面修飾は化学反応と併用されながら今後着実に進展していく

だろう。分子間相互作用による表面修飾は共有結合形成による修飾と比べてダイナミックに制御できる可能性が魅力的である。実際、エクソソーム上のMPN被膜は弱酸性条件において分解し除去可能であることが報告されている³⁴⁾。エクソソームをMPNとPEGからなるシェルで被覆しておいて、疾患部位に到着したところでシェルを脱着するスマートナノマシンの開発も今後期待される。

7. 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金(20H02581)、三菱財団、花王芸術・科学財団からの研究助成を受けて実施した。ここに深く感謝する。

参考文献

- 1) S. E. L. Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, M. J. A. Wood, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 347–357.
- 2) R. Kalluri, V. S. LeBleu, *Science* **2020**, *367*.
- 3) L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhali, M. J. A. Wood, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 341–345.
- 4) L. Pascucci, V. Coccè, A. Bonomi, D. Ami, P. Ceccarelli, E. Ciusani, L. Viganò, A. Locatelli, F. Sisto, S. M. Doglia, *J. Control. Release* **2014**, *192*, 262–270.
- 5) D. Sun, X. Zhuang, X. Xiang, Y. Liu, S. Zhang, C. Liu, S. Barnes, W. Grizzle, D. Miller, H. G. Zhang, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1606–1614.
- 6) B. Zhou, K. Xu, X. Zheng, T. Chen, J. Wang, Y. Song, Y. Shao, S. Zheng, *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 1–14.
- 7) H. Peinado, M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. M. Ghajar, *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891.
- 8) C. Sheridan, *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 359–360.
- 9) R. Maroto, Y. Zhao, M. Jamaluddin, V. L. Popov, H. Wang, M. Kalubowilage, Y. Zhang, J. Luisi, H. Sun, C. T. Culbertson, *J. Extracell. Vesicles* **2017**, *6*, 1359478.
- 10) C. Wang, K. Kimura, J. Li, J. J. Richardson, M. Naito, K. Miyata, T. Ichiki, H. Ejima, *ChemNanoMat* **2021**, *7*, 592–595.
- 11) M. Richter, P. Vader, G. Fuhrmann, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *173*, 416–426.
- 12) A. Delcayre, A. Estelles, J. Sperinde, T. Roulon, P. Paz, B. Aguilar, J. Villanueva, S. Khine, J.-B. Le Pecq, *Blood Cells, Mol. Dis.* **2005**, *35*, 158–168.
- 13) Z. C. Hartman, J. Wei, O. K. Glass, H. Guo, G. Lei, X.-Y. Yang, T. Osada, A. Hobeika, A. Delcayre, J.-B. Le Pecq, *Vaccine* **2011**, *29*, 9361–9367.
- 14) J. H. Wang, A. V Forterre, J. Zhao, D. O. Frimannsson, A. Delcayre, T. J. Antes, B. Efron, S. S. Jeffrey, M. D. Pegram, A. C. Matin, *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 1133–1142.
- 15) M. Morishita, Y. Takahashi, M. Nishikawa, K. Sano, K. Kato, T. Yamashita, T. Imai, H. Saji, Y. Takakura, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 705–713.
- 16) P. Kumar, H. Wu, J. L. McBride, K. E. Jung, M. H. Kim, B. L. Davidson, S. K. Lee, P. Shankar, N. Manjunath, *Nature* **2007**, *448*, 39–43.
- 17) Y. Tian, S. Li, J. Song, T. Ji, M. Zhu, G. J. Anderson, J. Wei, G. Nie, *Biomaterials* **2014**, *35*, 2383–2390.
- 18) C. P. Lai, O. Mardini, M. Ericsson, S. Prabhakar, C. A. Maguire, J. W. Chen, B. A. Tannous, X. O. Breakefield, *ACS Nano* **2014**, *8*, 483–494.
- 19) N. Yim, S. W. Ryu, K. Choi, K. R. Lee, S. Lee, H. Choi, J. Kim, M. R. Shaker, W. Sun, J. H. Park, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12277.
- 20) D. Shalitin, H. Yang, T. C. Mockler, M. Maymon, H. Guo, G. C. Whitlam, C. Lin, *Nature* **2002**, *417*, 763–767.
- 21) M. E. Hung, J. N. Leonard, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8166–8172.
- 22) T. Smyth, K. Petrova, N. M. Payton, I. Persaud, J. S. Redzic, M. W. Graner, P. Smith-Jones, T. J. Anchordoquy, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1777–1784.
- 23) T. Tian, H. X. Zhang, C. P. He, S. Fan, Y. L. Zhu, C. Qi, N. P. Huang, Z. D. Xiao, Z. H. Lu, B. A. Tannous, *Biomaterials* **2018**, *150*, 137–149.
- 24) J. A. Johnson, Y. Y. Lu, J. A. Van Deventer, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 774–780.
- 25) M. Wang, S. Altinoglu, Y. S. Takeda, Q. Xu, *PLoS One* **2015**, *10*, e0141860.
- 26) P. Li, M. Kaslan, S. H. Lee, J. Yao, Z. Gao, *Theranostics* **2017**, *7*, 789.
- 27) P. P. Dominkuš, M. Stenovec, S. Sitar, E. Lasič, R. Zorec, A. Plemenitaš, E. Žagar, M. Kreft, M. Lenassi, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **2018**, *1860*, 1350–1361.
- 28) S. A. A. Kooijmans, L. A. L. Fliervoet, R. Van Der Meel, M. Fens, H. F. G. Heijnen, P. M. P. van B. en Henegouwen, P. Vader, R.

- M. Schiffelers, *J. Control. Release* **2016**, *224*, 77–85.
- 29) L. Zhang, Z. Yang, K. Sefah, K. M. Bradley, S. Hoshika, M. J. Kim, H. J. Kim, G. Zhu, E. Jiménez, S. Cansiz, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6734–6737.
- 30) S. Wan, L. Zhang, S. Wang, Y. Liu, C. Wu, C. Cui, H. Sun, M. Shi, Y. Jiang, L. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5289–5292.
- 31) H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, *Science* **2007**, *318*, 426–430.
- 32) B. P. Lee, P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, J. H. Waite, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2011**, *41*, 99–132.
- 33) H. Ejima, J. J. Richardson, K. Liang, J. P. Best, M. P. Van Koevreden, G. K. Such, J. Cui, F. Caruso, *Science* **2013**, *341*, 154–157.
- 34) S. Kumar, I. J. Michael, J. Park, S. Granick, Y. Cho, *Small* **2018**, *14*, 1802052.