



Universiteit
Leiden
The Netherlands

mRNA and drug delivery with lipid-based nanoparticles

Zeng, Y.

Citation

Zeng, Y. (2022, December 6). *mRNA and drug delivery with lipid-based nanoparticles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3492640>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3492640>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Tallose patiënten hebben nog steeds te maken met ziekten veroorzaakt door genetische disregulatie, zoals kanker,¹ perifere arteriële ziekten,² hyperlipoproteïnemie type I,³ bèta-thalassemie,^{4, 5} adenosinedeaminase-deficiëntie,⁶ spinale musculaire atrofie,⁷ optische atrofie,⁸ en polyneuropathie van erfelijke transthyretine-gemedieerde amyloïdose.⁹ Bovendien veroorzaken virussen infectieziekten zoals Zika,^{10, 11} MERS,¹² Ebola,¹³ influenza's,^{14, 15} en SARS-CoV-2.¹⁶ Multidisciplinaire samenwerking tussen biologen, klinici, ingenieurs en fysische en chemische wetenschappers moet tot nieuwe therapeutische strategieën leiden om deze ziekten op transcriptioneel en translationeel niveau te behandelen.¹⁷

Tot op heden zijn geneesmiddelen op basis van kleine moleculen en recombinante eiwitten de focus geweest van translationeel onderzoek met succesvolle medicijnen in klinisch gebruik. Ze hebben echter ook beperkingen. De inherente beperking van geneesmiddelen met kleine moleculen is dat ze een hoge systemische blootstelling vereisen om voldoende therapeutische werkzaamheid te garanderen met het risico op mogelijke bijwerkingen die niet op het doel gericht zijn.^{18, 19} Recombinante geneesmiddelen op basis van eiwitten worden onderzocht bij eiwitvervangingstherapie (bijv. diabetes) en chemotherapeutische antilichamen (bijv. checkpointremmers voor de behandeling van kanker). Vanwege het hoge molecuulgewicht en de polariteit van recombinante eiwitten kunnen ze echter meestal cellen niet goed binnendringen, waardoor hun therapeutisch effect wordt beperkt.²⁰

Op nucleïnezuur gebaseerde therapieën bieden de mogelijkheid om een breed scala aan ziekten op transcriptioneel en translationeel niveau aan te pakken en mogelijk om de hoofdoorzaak van ziekten op genetisch niveau te behandelen.²¹⁻²³ Voorbeelden zijn microRNA (miRNA), antisense-oligonucleotiden (ASO) en messenger RNA (mRNA). Afhankelijk van het type RNA dat wordt gebruikt, varieert het therapeutische resultaat van het uitschakelen van genen tot geïnduceerde expressie van een geselecteerd doeleiwit met minimale bijwerkingen.²³ Van deze op RNA gebaseerde geneesmiddelen is mRNA een veelbelovend therapeutisch middel geworden voor veel toepassingen, waaronder de ontwikkeling van vaccins voor infectieziekten,^{10, 11, 14, 16} HIV,²⁴ kanker,²⁵ en weefselregeneratie om wondgenezing te verbeteren of beschadigde organen en weefsel te herstellen.²⁶⁻²⁹ Er is veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van nanodeeltjes om het afleveringsprobleem van mRNA op te lossen. Tot op heden zijn lipid nanoparticles (LNP's) de meest succesvolle mRNA-afgiftevector, zoals blijkt uit de klinische goedkeuringen van twee LNP-formuleringen, Pfizer's BNT162b2 en Moderna's mRNA-1273.³⁰⁻³² Het succes is deels te danken aan hun unieke eigenschappen, zoals eenvoudige chemische synthese van lipidecomponenten, schaalbare productieprocessen van LNP's en de encapsulatie van verschillende vormen van RNA.³³ Hun transfectieprestaties worden echter nog steeds belemmerd door suboptimale endo/lysosomale ontsnappingsefficiëntie, aangezien slechts een kleine fractie van mRNA (<5%) het cytoplasma bereikt en resulterend in eiwitexpressie.

In dit proefschrift worden strategieën beschreven om de afgifte-efficiëntie van mRNA en geneesmiddelen te verbeteren met behulp van LNP's en liposomen als nanodrager. Fusogene coiled-coil peptiden werden geïntroduceerd in LNP's en liposomen en het effect op mRNA/medicijnafgifte in verschillende cellijnen werd bestudeerd.¹

Geïnspireerd door SNARE-eiwitten hebben we eerder aangetoond dat het coiled-coil-peptidepaar K4/E4 efficiënte membraanfusie tussen liposomen en cellen induceert, wat een efficiënte afgifte van medicijnen in cellen mogelijk maakt.³⁵⁻³⁷ In Hoofdstuk 2 werden de fusogene coiled-coil-peptiden geïntroduceerd in algemene LNP-formuleringen om de werkzaamheid van mRNA-transfectie te verbeteren. De Onpattro LNP-formulering werd gemodificeerd met lipopeptide CPE4 en de toevoeging van CPE4 veranderde de fysisch-chemische kenmerken van de nanodeeltjes noch de mRNA-inkapselingsefficiëntie. Door confocale microscopie en flowcytometrie-analyse toe te passen, werd de cellulaire internalisatie-efficiëntie gemeten. Er werd aangetoond dat de coiled-coil-peptiden de LNP-opname met een factor 63 verhoogde, resulterend in een verhoogde eiwitexpressie. Bovendien onthulden mechanistische studies dat de belangrijkste route voor celopname membraanfusie was, waardoor de minder efficiënte endocytose-routes omzeild werden. Deze aanzienlijke verbetering van de transfectie-efficiëntie na modificatie van de LNP met coiled-coil-peptiden kan worden toegepast op andere celtypen, waaronder moeilijk te transfecteren cellijnen (bijv. T-cellen) die nodig zijn voor T-celtherapie.

Onze groep heeft laten zien dat een efficiënte liposomale afgifte kan worden bereikt met behulp van coiled-coil peptiden.³⁵⁻³⁷ In Hoofdstuk 3 is het effect van peptide K-dimerisatie op membraanfusie onderzocht. Drie verschillende dimeerontwerpen werden gesynthetiseerd en hun structurele verschillen werden gekarakteriseerd. Confocale microscopie en flowcytometrie metingen toonden aan dat PK4 de hoogste bindingsaffiniteit induceerde voor cellen die waren voorbehandeld met CPE4. Vervolgens werd de efficiëntie van de cellulaire opname en het farmacologische effect van het antitumormiddel doxorubicine bestudeerd. Liposoom-celfusie was efficiënt voor dit dimeer in vergelijking met de lineaire dimeerontwerpen en het benchmark-peptidemonomeer. Het nieuwe peptide-dimeerontwerp is dus in staat om geneesmiddelen efficiënter in cellen af te leveren en zal in de toekomst in een in vivo setting worden getest.

We hebben aangetoond dat fusogene coiled-coil peptide-gemodificeerde LNP's RNA efficiënter aan cellen afleveren in vergelijking met LNP's zonder coiled-coil peptide. In Hoofdstuk 4 werd de afgifte van mRNA in cardiomyocyten onderzocht. Myocardinfarct (MI) is de belangrijkste doodsoorzaak bij hartaandoeningen, aangezien de hartspiercellen van het menselijk hart een zeer beperkte regeneratieve capaciteit hebben na een myocardinfarct, de gewonde hartcellen vertrouwen alleen op vervanging van littekenweefsel om de integriteit van de organen te behouden.³⁸ Geïnduceerde pluripotente stamcellen-cardiomyocyten (iPSC-CM's) vertegenwoordigen de beste celbron voor menselijke hartaandoeningen en hartregeneratie, maar vereisen een efficiënte transfectie. Er werd een nieuw incubatieprotocol ontwikkeld om deze cellen te transfecteren. De efficiëntie van mRNA-transfectie van verschillende incubatieprotocollen werd vergeleken en het 1-staps incubatieprotocol bereikte verbeterde mRNA-transfectie met een optimale CPK4:CPE4-verhouding van 1:1. De verbetering van de mRNA-transfectie met behulp van 1-staps incubatie werd vergeleken voor drie klinisch goedgekeurde LNP-formuleringen en waargenomen dat transfectie onafhankelijk was van de LNP-samenstelling. In alle gevallen verbeterde de introductie van de fusogene coiled-coil-peptiden de mRNA-expressie in iPSC-CM's aanzienlijk. Dit geoptimaliseerde mRNA-afgifteplatform zou veelbelovend kunnen zijn voor verder in vivo cardiomyocytenonderzoek naar de behandeling van MI.

mRNA-LNP's zijn de huidige state-of-the-art in mRNA-vaccinatietechnologie sinds de goedkeuring

van de COVID-19-mRNA-vaccins. In Hoofdstuk 5 evalueerden we de invloed van LNP-lipidensamenstelling op de T-cel immuunrespons in de ontwikkeling van kankervaccins. In deze studie hebben we de exacte lipidensamenstelling gevarieerd door het ioniseerbare lipide (IL), cholesterol (derivaat) en het percentage van de fusogene helper lipide DOPE te variëren. Een kleine collectie van LNP's werd geëvalueerd op het vermogen om van beenmerg afgeleide dendritische cellen te transfecteren, antigeenpresentatie en T-celstimulatiereponsen. We onderzochten of het vervangen van cholesterol door β -sitosterol en/of DOPE de mRNA-transfectie zou stimuleren, resulterend in een verhoogde immuunrespons. Er werd aangetoond dat de introductie van β -sitosterol alleen verbeterde transfectie in LNP's veroorzaakte wanneer MC3 werd gebruikt als de IL, terwijl het verschillende transfectie-efficiëntie-effecten vertoonde op verschillende cellijnen wanneer C12-200 en cKK-E12 werden gebruikt als de IL. Het vervangen van cholesterol door DOPE resulteerde in gemengde mRNA-transfectie-efficiënties in verschillende celtypen. We hebben aangetoond dat de LNP-mRNA-vaccinkandidaten significante activering van BMDC's kunnen genereren, zoals blijkt uit de verhoogde regulatie van de co-stimulerende receptoren (CD40 en CD86) en IL-12-expressie, robuuste T-celproliferatie en verhoogde cytokineproductie ex vivo.

We hebben aangetoond dat fusogene coiled-coil-peptiden de mRNA-afgifte verbeteren met behulp van LNP's in meerdere cellijnen, waaronder moeilijk te transfecteren Jurkatcellen en cardiomyocyten in vitro. Soms vertalen de in vitro resultaten zich echter niet naar in vivo prestaties, daarom is verder in vivo onderzoek nodig om de gepresenteerde bevindingen te valideren. Momenteel zijn in vivo studies met lokale injectie van cardiomyocyten van muizen gepland en zullen ze inzicht geven in het vermogen om MI te behandelen. De tweede open vraag is of het afleveren van mRNA een relevant therapeutisch effect zal hebben in een muizenmodel. Het gepresenteerde mRNA-afgiftesysteem op basis van coiled-coil-peptiden en LNP's is hoogstwaarschijnlijk geschikt voor lokale toediening, terwijl systemische (intraveneuze) toediening mogelijk complexer is. Dimerisatie van peptide K4 resulteerde in een verbeterde efficiëntie van medicijnafgifte, maar het gebruikte incubatieprotocol moet ook worden bestudeerd in een relevant in vivo model om het nut ervan te valideren.

In dit proefschrift hebben we met succes fusogene coiled-coil peptiden gebruikt om geneesmiddelen met een laag molecuulgewicht (bijv. doxorubicine) en macromoleculair mRNA af te leveren. Dit resulteerde in een versterkt antitumoreffect en verhoogde significant de mRNA-transfectie-efficiëntie in vergelijking met de meest geavanceerde en klinisch goedgekeurde liposoom/LNP-formuleringen. Dit werk vereenvoudigde het incubatieprotocol van ons met coiled-coil peptide gemodificeerde LNP-systeem verder, resulterend in de succesvolle transfectie van cardiomyocyten, wat een grote belofte is voor hartregeneratietherapie na een hartinfarct. Tenslotte werden LNP-mRNA-kandidaten die krachtige BMDC-activering en T-celproliferatie opwekken geïdentificeerd voor ontwikkeling van toekomstige kandidaat-kankervaccins. Ik hoop dat dit werk zal bijdragen aan de mRNA-afgiftetechnologie met verbeterde in vitro en in vivo therapeutische prestaties en krachtige beschermende immuniteit tegen kanker.

Referenties

1. Saadatpour, Z.; Bjorklund, G.; Chirumbolo, S.; Alimohammadi, M.; Ehsani, H.; Ebrahiminejad, H.; Pourghadamyari, H.; Baghaei, B.; Mirzaei, H.; Sahebkar, A., Molecular imaging and cancer gene therapy.

Cancer gene therapy **2016**, 1-5.

2. Ouriel, K., Peripheral arterial disease. *The Lancet* **2001**, 358 (9289), 1257-1264.
3. Vogt, A., Hyperlipoproteinaemia(a) – apheresis and emerging therapies. *Clinical Research in Cardiology Supplements* **2017**, 12 (1), 12-17.
4. Jessup, M.; Greenberg, B.; Mancini, D.; Cappola, T.; Pauly, D. F.; Jaski, B.; Yaroshinsky, A.; Zsebo, K. M.; Dittrich, H.; Hajjar, R. J., Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID). *Circulation* **2011**, 124 (3), 304-313.
5. Jaski, B. E.; Jessup, M. L.; Mancini, D. M.; Cappola, T. P.; Pauly, D. F.; Greenberg, B.; Borow, K.; Dittrich, H.; Zsebo, K. M.; Hajjar, R. J., Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID Trial), a First-in-Human Phase 1/2 Clinical Trial. *Journal of Cardiac Failure* **2009**, 15 (3), 171-181.
6. Kang, Z.; Ding, G.; Meng, Z.; Meng, Q., The rational design of cell-penetrating peptides for application in delivery systems. *Peptides* **2019**, 121, 170149.
7. d'Ydewalle, C.; Sumner, C. J., Spinal Muscular Atrophy Therapeutics: Where do we Stand? *Neurotherapeutics* **2015**, 12 (2), 303-316.
8. Deverman, B. E.; Ravina, B. M.; Bankiewicz, K. S.; Paul, S. M.; Sah, D. W. Y., Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* **2018**, 17 (9), 641-659.
9. Wang, F.; Qin, Z.; Lu, H.; He, S.; Luo, J.; Jin, C.; Song, X., Clinical translation of gene medicine. *The Journal of Gene Medicine* **2019**, 21 (7), e3108.
10. Richner, J. M.; Himansu, S.; Dowd, K. A.; Butler, S. L.; Salazar, V.; Fox, J. M.; Julander, J. G.; Tang, W. W.; Shresta, S.; Pierson, T. C.; Ciaramella, G.; Diamond, M. S., Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* **2017**, 168 (6), 1114-1125.e10.
11. Pardi, N.; Hogan, M. J.; Pelc, R. S.; Muramatsu, H.; Andersen, H.; DeMaso, C. R.; Dowd, K. A.; Sutherland, L. L.; Searce, R. M.; Parks, R.; Wagner, W.; Granados, A.; Greenhouse, J.; Walker, M.; Willis, E.; Yu, J.-S.; McGee, C. E.; Sempowski, G. D.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Huang, Y.-J.; Vanlandingham, D.; Holmes, V. M.; Balachandran, H.; Sahu, S.; Lifton, M.; Higgs, S.; Hensley, S. E.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Karikó, K.; Santra, S.; Graham, B. S.; Lewis, M. G.; Pierson, T. C.; Haynes, B. F.; Weissman, D., Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* **2017**, 543 (7644), 248-251.
12. Wang, L.; Shi, W.; Joyce, M. G.; Modjarrad, K.; Zhang, Y.; Leung, K.; Lees, C. R.; Zhou, T.; Yassine, H. M.; Kanekiyo, M.; Yang, Z.-y.; Chen, X.; Becker, M. M.; Freeman, M.; Vogel, L.; Johnson, J. C.; Olinger, G.; Todd, J. P.; Bagci, U.; Solomon, J.; Mollura, D. J.; Hensley, L.; Jahrling, P.; Denison, M. R.; Rao, S. S.; Subbarao, K.; Kwong, P. D.; Mascola, J. R.; Kong, W.-P.; Graham, B. S., Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV. *Nature Communications* **2015**, 6 (1), 7712.
13. Donoff, B.; McDonough Je Fau - Riedy, C. A.; Riedy, C. A., Integrating oral and general health care. (1533-4406 (Electronic)).
14. Petsch, B.; Schnee, M.; Vogel, A. B.; Lange, E.; Hoffmann, B.; Voss, D.; Schlake, T.; Thess, A.; Kallen, K.-J.; Stitz, L.; Kramps, T., Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nature Biotechnology* **2012**, 30 (12), 1210-1216.
15. Ping, J.; Lopes, T. J. S.; Nidom, C. A.; Ghedin, E.; Macken, C. A.; Fitch, A.; Imai, M.; Maher, E. A.; Neumann, G.; Kawaoka, Y., Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. *Nature Communications* **2015**, 6 (1), 8148.
16. Zhang, N.-N.; Li, X.-F.; Deng, Y.-Q.; Zhao, H.; Huang, Y.-J.; Yang, G.; Huang, W.-J.; Gao, P.; Zhou, C.; Zhang, R.-R.; Guo, Y.; Sun, S.-H.; Fan, H.; Zu, S.-L.; Chen, Q.; He, Q.; Cao, T.-S.; Huang, X.-Y.; Qiu, H.-Y.; Nie, J.-H.; Jiang, Y.; Yan, H.-Y.; Ye, Q.; Zhong, X.; Xue, X.-L.; Zha, Z.-

- Y.; Zhou, D.; Yang, X.; Wang, Y.-C.; Ying, B.; Qin, C.-F., A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell* **2020**, *182* (5), 1271-1283.e16.
17. Fenton, O. S.; Olafson, K. N.; Pillai, P. S.; Mitchell, M. J.; Langer, R., Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Advanced Materials* **2018**, *30* (29), 1705328.
18. Toure, M.; Crews, C. M., Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (6), 1966-1973.
19. Lomenick, B.; Olsen, R. W.; Huang, J., Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chemical Biology* **2011**, *6* (1), 34-46.
20. Stewart, M. P.; Langer, R.; Jensen, K. F., Intracellular Delivery by Membrane Disruption: Mechanisms, Strategies, and Concepts. *Chemical Reviews* **2018**, *118* (16), 7409-7531.
21. Kaczmarek, J. C.; Kowalski, P. S.; Anderson, D. G., Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Medicine* **2017**, *9* (1), 60.
22. Kole, R.; Krainer, A. R.; Altman, S., RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11* (2), 125-140.
23. Gupta, A.; Andresen, J. L.; Manan, R. S.; Langer, R., Nucleic acid delivery for therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *178*, 113834.
24. Pardi, N.; LaBranche, C. C.; Ferrari, G.; Cain, D. W.; Tombácz, I.; Parks, R. J.; Muramatsu, H.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Karikó, K.; Polacino, P.; Barbosa, C. J.; Madden, T. D.; Hope, M. J.; Haynes, B. F.; Montefiori, D. C.; Hu, S.-L.; Weissman, D., Characterization of HIV-1 Nucleoside-Modified mRNA Vaccines in Rabbits and Rhesus Macaques. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **2019**, *15*, 36-47.
25. Irvine, D. J.; Dane, E. L., Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nature Reviews Immunology* **2020**, *20* (5), 321-334.
26. DeRosa, F.; Guild, B.; Karve, S.; Smith, L.; Love, K.; Dorkin, J. R.; Kauffman, K. J.; Zhang, J.; Yahalom, B.; Anderson, D. G.; Heartlein, M. W., Therapeutic efficacy in a hemophilia B model using a biosynthetic mRNA liver depot system. *Gene Therapy* **2016**, *23* (10), 699-707.
27. Ramaswamy, S.; Tonnu, N.; Tachikawa, K.; Limphong, P.; Vega, J. B.; Karmali, P. P.; Chivukula, P.; Verma, I. M., Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114* (10), E1941-E1950.
28. Zangi, L.; Lui, K. O.; von Gise, A.; Ma, Q.; Ebina, W.; Ptaszek, L. M.; Später, D.; Xu, H.; Tabebordbar, M.; Gorbato, R.; Sena, B.; Nahrendorf, M.; Briscoe, D. M.; Li, R. A.; Wagers, A. J.; Rossi, D. J.; Pu, W. T.; Chien, K. R., Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature Biotechnology* **2013**, *31* (10), 898-907.
29. Hou, X.; Zhang, X.; Zhao, W.; Zeng, C.; Deng, B.; McComb, D. W.; Du, S.; Zhang, C.; Li, W.; Dong, Y., Vitamin lipid nanoparticles enable adoptive macrophage transfer for the treatment of multidrug-resistant bacterial sepsis. *Nature Nanotechnology* **2020**, *15* (1), 41-46.
30. Hou, X.; Zaks, T.; Langer, R.; Dong, Y., Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nature Reviews Materials* **2021**, *6* (12), 1078-1094.
31. Wang, C.; Zhang, Y.; Dong, Y., Lipid Nanoparticle-mRNA Formulations for Therapeutic Applications. *Accounts of Chemical Research* **2021**, *54* (23), 4283-4293.
32. Meyer, R. A.; Neshat, S. Y.; Green, J. J.; Santos, J. L.; Tuesca, A. D., Targeting strategies for mRNA delivery. *Materials Today Advances* **2022**, *14*, 100240.
33. Zhang, Y.; Sun, C.; Wang, C.; Jankovic, K. E.; Dong, Y., Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *Chemical Reviews* **2021**, *121* (20), 12181-12277.
34. Paramasivam, P.; Franke, C.; Stöter, M.; Höijer, A.; Bartesaghi, S.; Sabirsh, A.; Lindfors, L.; Arteta, M. Y.; Dahlén, A.; Bak, A.; Andersson, S.; Kalaidzidis, Y.; Bickle, M.; Zerial, M., Endosomal

escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale. *Journal of Cell Biology* **2021**, *221* (2), e202110137.

35. Yang, J.; Bahreman, A.; Daudey, G.; Bussmann, J.; Olsthoorn, R. C. L.; Kros, A., Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes. *ACS Central Science* **2016**, *2* (9), 621-630.

36. Yang, J.; Shimada, Y.; Olsthoorn, R. C. L.; Snaar-Jagalska, B. E.; Spalink, H. P.; Kros, A., Application of Coiled Coil Peptides in Liposomal Anticancer Drug Delivery Using a Zebrafish Xenograft Model. *ACS Nano* **2016**, *10* (8), 7428-7435.

37. Kong, L.; Askes, S. H. C.; Bonnet, S.; Kros, A.; Campbell, F., Temporal Control of Membrane Fusion through Photolabile PEGylation of Liposome Membranes. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (4), 1396-1400.

38. Yang, Q.; Fang, J.; Lei, Z.; Sluijter, J. P. G.; Schiffelers, R., Repairing the heart: State-of the art delivery strategies for biological therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**, *160*, 1-18.