



Title	イオン性脂質の分岐足場は脂質ナノ粒子の安定性とin vivo mRNA送達効率を高める
Author(s)	橋場, 一毅
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 乙第7177号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.r7177
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89908
Type	theses (doctoral)
File Information	Kazuki_Hashiba.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

イオン性脂質の分岐足場は脂質ナノ粒子の安定性と
in vivo mRNA 送達効率を高める

橋場一毅

北海道大学大学院生命科学院

令和5年3月

目次

略語表.....	4
序論.....	6
第1章 イオン性脂質の分岐構造と LNP の機能の関係性理解のための系統的な脂質ライブラリ設計.....	12
1.1 緒言.....	12
1.2 結果.....	13
1.2.1 α 分岐脂肪酸の合成.....	13
1.2.2 α 分岐脂質の合成.....	14
1.2.3 α 分岐脂質の構造を記述する 2 つのパラメータ	15
1.3 考察.....	16
1.4 小括.....	18
第2章 イオン性脂質の分岐構造が LNP の物理化学的性質に与える影響.....	19
2.1 緒言.....	19
2.2 結果.....	21
2.2.1 α 分岐脂質から調製される LNP の物理化学的性質	21
2.2.2 イオン性脂質足場の分岐鎖が脂質の運動性や LNP 内部の粘性に与える影響	23
2.2.3 分子ローターによる LNP 内部の粘性評価	25
2.2.4 LNP 内部の粘性と物理化学的性質の関係性.....	26
2.2.5 LNP 内部の粘性が保存安定性に与える影響.....	27
2.3 考察.....	32
2.4 小括.....	35
第3章 イオン性脂質の分岐構造が膜融合活性や mRNA 送達に与える影響.....	36
3.1 緒言.....	36
3.2 結果.....	37
3.2.1 分岐鎖による LNP のイオン化能の最大化	37

3.2.2 分岐鎖による LNP のエンドソーム膜破壊能の向上.....	39
3.2.3 LNP の <i>in vivo</i> mRNA 送達評価	40
3.2.4 LNP の体内分布評価	40
3.2.5 LNP の物理化学的性質と <i>in vivo</i> mRNA 送達効率の関係性	41
3.2.6 複数のイオン性脂質の混合による <i>in vivo</i> mRNA 送達効率の向上.....	43
3.2.7 EGFP の肝臓内局在評価	43
3.2.8 CL4F 8-6 LNP の <i>in vivo</i> ゲノム編集への応用	45
3.3 考察.....	47
3.4 小括.....	50
結論.....	51
実験手法.....	52
謝辞.....	73
参考文献.....	74

略語表

ApoE	apolipoprotein E
ARCA	anti-reverse cap analog
CAD	charged aerosol detector
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cy5	cyanine5
DCVJ	9-(dicyano-vinyl) julolidine
DDS	drug delivery system
DMG	dimyristoylglycerol
DMPU	<i>N,N'</i> -dimethylpropyleneurea
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSC	differential scanning calorimetry
DSG	distearoyl- <i>rac</i> -glycerol
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
dsRNA	double stranded RNA
ED50	median effective dose
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FAP	familial amyloid polyneuropathy
FVII	coagulation factor VII
FDA	food and drug administration
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fluc	firefly luciferase
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GalNAc	<i>N</i> -acetyl-D-galactosamine
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	high performance liquid chromatography
i.v.	intravenous
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
IVT	<i>in vitro</i> transcribed
LC/MS	liquid chromatography – mass spectrometry
LDA	lithium diisopropylamide
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	LDL receptor

LNPs	lipid nanoparticles
MD	molecular dynamics
min	minute
mRNA	messenger RNA
MS	mass spectrometry
NGS	next-generation sequencing
NMR	nuclear magnetic resonance
ORF	open reading frame
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed death receptor-1
PDI	poly dispersity index
pDNA	plasmid DNA
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
RES	reticuloendothelial system
Rho	rhodamine
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
saRNA	self-amplifying RNA
sgRNA	single-guide RNA
siRNA	small interfering RNA
srRNA	self-replicating RNA
TLC	thin-layer chromatography
TLR	toll-like receptor
TNS	2-(<i>p</i> -toluidino)-6-napthalene sulfonic acid
TTR	transthyretin
UTR	untranslated region

序論

“treat RNA as a drug”と実験ノートに記されたのは 1988 年である。Robert Malone らは *in vitro* transcribed mRNA (IVT mRNA) や plasmid DNA (pDNA) をマウス骨格筋に投与すると、コードしたタンパク質が発現すると *Science* 誌に報告した^[1]。しかしながら、mRNA は不安定なため、当時の技術での mRNA の医薬品応用は現実的ではなかった。

IVT mRNA は直線化 pDNA や PCR 産物などの鋳型 DNA から *in vitro* 転写によって無細胞系で合成される。IVT mRNA は一本鎖であり、5'-cap と 3'-polyA 鎖を有している。タンパク質をコードする領域 (open reading frame; ORF) は、非翻訳領域 (untranslated region; UTR) で挟まれている (Figure 1)。いくつかのブレイクスルーによって、IVT mRNA の生体内投与による薬理活性の発現が実現した。

真核細胞で mRNA を翻訳させるためには mRNA の 5'末端に 7-メチルグアノシン (m^7G) という cap 構造が必要であり^[2]、翻訳開始因子 eIF4E はこの cap 構造を認識する。mRNA 合成後に酵素的に cap を付加する手法もあるが、合成キャップアナログを *in vitro* 転写反応時に添加し、キャッピングと *in vitro* 転写を一度に行う方法が一般的である。ただし後者の方法で *in vitro* 転写を工夫せずに行うと、 m^7G 側の糖からも mRNA が合成されてしまい、この mRNA は翻訳効率が低い。mRNA 合成の伸長方向を制御するため、 m^7G 側の糖の 3'-OH がメチル化された anti-reverse cap analog (ARCA) が開発され、キャップ付加効率が大幅に向上した (Figure 1) ^[3]。また、Trilink 社が開発した CleanCap のように、生体内での免疫反応を回避可能な Cap1 構造を有するキャップアナログも開発され、翻訳効率の高い mRNA の *in vitro* 合成が実現している。

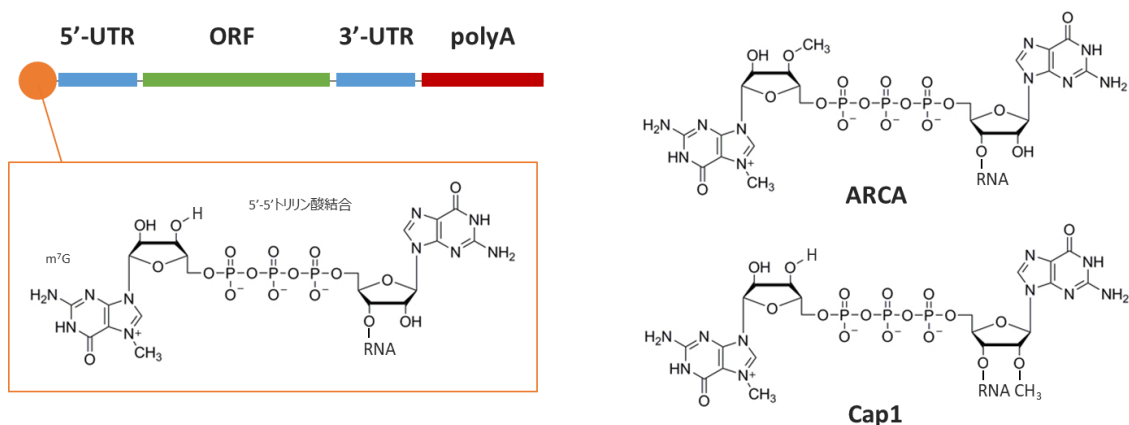


Figure 1 IVT mRNA の構造。ARCA や Cap1 構造を有するキャップアナログを使用することで、翻訳効率の高い mRNA の *in vitro* 合成が実現する^[4]。

polyA 鎖は 5'-cap や内部リボソーム侵入部位 (internal ribosome entry site; IRES) との相互作用を介して、mRNA の安定性と翻訳効率を制御しており^[5]、polyA 鎖の最適な長さは 120 から 150 ヌクレオチドの間であることが報告されている^[6,7]。3'-polyA 付加 mRNA は、転写

後の酵素的なポリアデニル化や、polyA をコードした DNA を鋳型とすることで合成されるが、polyA 鎖長の均一性という観点からは後者が望ましい。

5'-UTR や 3'-UTR は細胞における IVT mRNA の翻訳効率及び安定性に寄与するため配列最適化は重要である。mRNA の安定性と翻訳を増加させることが知られているグロビンや glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の UTR を IVT mRNA に挿入する手法も一般的である。

ORF のコドンの構成も翻訳効率や安定性に影響を与えることが知られており、コドン最適化は一般的な手法である^[8]。しかしながら、翻訳速度はタンパク質のフォールディングに影響を及ぼすことが知られており、翻訳効率だけに注目したコドン最適化が正しいとは限らない。

上述した IVT mRNA の配列最適化は翻訳効率や安定性を大幅に改善し、IVT mRNA の生体内投与の実現に大きく貢献したが、IVT mRNA 由来の免疫原性の制御も mRNA 医薬品実現に向けて重要な点である。免疫細胞では、IVT mRNA がエンドサイトーシスされると、TLR3 は二本鎖 RNA (dsRNA) を認識し^[9]、TLR7 と TLR8 は一本鎖 RNA (ssRNA) を認識することで、インターフェロン産生が誘導される^[10,11]。非免疫細胞においても、細胞質で RNA を認識した cytoplasmic retinoic acid-inducible gene I protein (RIG-I) と melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) の活性化により、インターフェロン産生が誘導される^[12,13]。ワクチン用途としての IVT mRNA の強い免疫賦活効果とアジュバント活性は、強力な抗原特異的細胞性免疫と液性免疫を誘導するという利点がある一方で^[14,15]、翻訳阻害や意図しない副反応を引き起こす恐れもある。また、LNP 自体がアジュバント活性を有することが報告されており^[16-18]、IVT mRNA による自然免疫系の活性化は制御できる状態が望ましい。また、タンパク質補充療法へ mRNA を応用する場合は、IVT mRNA による自然免疫系の活性化は大きなデメリットである。

この問題を改善したブレイクスルーはヌクレオチドの修飾である。N1-メチルシュードウリジン (m1Ψ)、シュードウリジン (Ψ)、5-メトキシウリジン (5-moU)、2-チオウリジン (s2U)、5-メチルシチジン (m5C) 及び N6-methyladenosine (m6A) などの修飾ヌクレオチドを IVT mRNA に組み込むことで、IVT mRNA 本来のアジュバント活性と翻訳阻害効果の両方が抑えられることが示されている^[19,20]。このような修飾 IVT mRNA は TLR7 や TLR8 の活性化や、RIG-I による RNA の認識を回避する可能性が示されている^[21-23]。転写における主要な副産物である dsRNA も TLR3/RIG-I/MDA-5 に認識され、I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生をもたらす^[24]。mRNA の修飾に加え、副生成物の dsRNA を HPLC やセルロースカラム、RNaseIII で除去することで、自然免疫活性化によるタンパク質合成阻害や細胞死などの悪影響を最小化できる^[25]。

上述した mRNA の人工合成技術の発展に伴い、その細胞内安定性と翻訳効率が改善され、自然免疫系の活性化が制御可能となったため、生体内へ送達された mRNA が翻訳されて産生したタンパク質によって薬理活性を誘導できる可能性が拓いた。治療用タンパク質をコ

ードした mRNA は、タンパク質の発現を阻害する small interfering RNA (siRNA) とは逆の方法で機能する。DNA による治療薬とは異なり、mRNA は核内に導入される必要がないため、非分裂細胞へも適用可能であり、かつ迅速な翻訳も期待される。また、pDNA やウイルスベクターとは異なり、mRNA はゲノムに組み込まれないため、意図しない遺伝子配列改変のリスクも存在しない。更に、抗体医薬を含むタンパク質製剤と比較して、IVT mRNA の製造は比較的容易かつ安価なため、IVT mRNA を用いた治療薬の開発は関心を集めており、感染症ワクチン、がん免疫療法、免疫寛容化、タンパク質補充療法、ゲノム編集、遺体内での抗体医薬産生への応用検討が加速している^[26-30]。実際、mRNA ワクチンは COVID-19 のパンデミックに対応して正式に承認され、感染率や死亡率の大幅な減少に貢献した^[31,32]。2022 年 12 月には、患者生検の分析結果に基づく最大 34 種類のネオアンチゲンをコードする mRNA-4157 が抗 programmed death receptor-1 (PD-1) 抗体の KEYTRUDA と併用することで、ステージ III/IV のメラノーマ切除後の術後補助療法において Phase 2b で有意差を示し、がんの個別化医療の実現可能性を示した^[33]。

このように mRNA を薬として扱うことは大きな可能性を秘めているが、mRNA は分子サイズが大きく、陰イオン性であるため、mRNA 単独で細胞膜を通過するのは困難である。それに加えて、mRNA は血液中や組織に存在する RNase によって分解されやすいため、mRNA 単独で効率的に細胞に導入されて機能することは困難である。

核酸用途のドラッグデリバリーシステム (DDS) は、生体内で siRNA の機能を発揮させるために急速に進展してきた。脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticles: LNPs) はその代表的な技術である (Figure 2)。典型的な LNP は、イオン性脂質、コレステロール、リン脂質 (ヘルパー脂質) およびポリエチレングリコール (PEG) 脂質から構成される。LNP を構成する脂質のうち、最も特徴的なマテリアルはイオン性脂質である。イオン性脂質は正に帯電可能な頭部と疎水性足場からなる物質であるため、LNP の電荷制御を実現でき、RNA のバイオアベイラビリティ向上を担う (Figure 2)。具体的には、正に荷電したイオン性脂質は静電的相互作用によって核酸の LNP 内部への封入を促進する。また、生理的 pH ではイオン性脂質は荷電しないため、体内動態の改善が期待される。さらに、エンドソーム酸性化に伴って荷電した LNP はエンドソーム膜との膜融合や細胞質への核酸の放出を促進する^[34-36]。2006 年、世界で初めて、全身投与で霊長類での RNAi の誘導と遺伝子抑制が達成され、siRNA の医薬品応用への道が拓いた。これを可能にした DDS が LNP であり、その時に使用されたイオン性脂質は DLin-DMA である^[35]。引き続き、イオン性脂質の構造最適化がなされ、2010 年に DLin-KC2-DMA (KC2)^[36]、2012 年に DLin-MC3-DMA (MC3) が開発された^[37] (Figure 2)。全身投与した LNP の性能比較は、マウス肝実質細胞で特異的に発現する血液凝固第 VII 因子 (Factor VII) のノックダウン効率を指標に行われることが多いが、ED₅₀ 値で 1 mg kg⁻¹ だった DLin-DMA と比較して、MC3 は 0.005 mg kg⁻¹ での遺伝子サイレンシングに成功している。この MC3-LNP は霊長類でも効率的な遺伝子抑制を実現し、世界初の siRNA 医薬品 Onpatro (patisiran) の誕生に大きく貢献した^[38]。

当研究室では、佐藤らによりイオン性脂質 YSK05 が開発された^[39]。YSK05-LNP はマウス FactorVIIのノックダウン活性として ED₅₀ 値で 0.06 mg kg⁻¹ を達成し、C 型肝炎ウイルス (HCV) の抑制効果を得ている^[40]。続いて開発されたイオン性脂質 YSK13-C3 を含む LNP は ED₅₀ 値で 0.015 mg kg⁻¹ を達成し、B 型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染動物における HBV 抑制効果も得られている^[41]。

上述のイオン性脂質の構造最適化を通して、pKa 値として 6.2-6.5 の LNP が肝実質細胞の遺伝子ノックダウンに適しているという知見が見出されている^[37]。また、肝臓標的型 LNP の全身投与後の体内動態やそのメカニズムも明らかになっている。具体的には、LNP を静脈内投与すると、LNP の粒子径制御や安定化を担っていた PEG 脂質が LNP から脱離し^[42,43]、LNP 表面にアポリポタンパク質 E (ApoE) を中心としたタンパク質が吸着し、低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) を介して、LNP は肝実質細胞へ取り込まれる^[44,45]。

このようにイオン性脂質の構造最適化や LNP の理解が急速に進展したにも関わらず、siRNA がエンドソームを脱出する効率は数%程度であり^[46,47]、RISC に搭載されて機能を発揮する siRNA は投与したうちの 1%以下であることが報告されていた^[48]。そこで 2019 年、筆者らはイオン性脂質の頭部構造と疎水性足場の両方を誘導体化し、構造活性相関の更なる理解を試みた^[49]。その結果、頭部第 3 級アミンの clogP 値と LNP の pKa 値が相関すること、疎水性足場も pKa に寄与すること、親水性頭部だけでなく疎水性足場も LNP の体内動態に寄与することなどが見出された。また、本検討の中で獲得したイオン性脂質 CL4H6 から構成される LNP は、マウスへの全身投与によって ED₅₀ 値として 0.0025 mg kg⁻¹ という高効率での肝実質細胞の遺伝子抑制と、エステル結合由来の生分解性に基づく肝毒性の低下を達成した (Figure 2)。

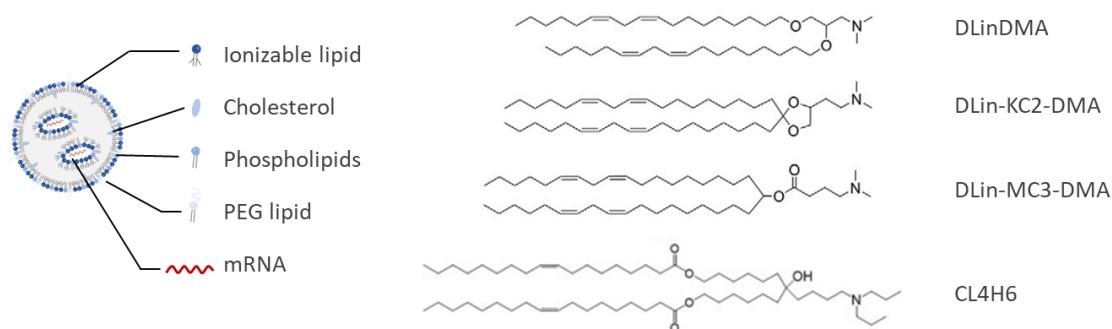


Figure 2 LNP の模式図と代表的なイオン性脂質の化学構造 (DLinDMA、DLin-KC2-DMA、DLin-MC3-DMA、CL4H6) ^[49,50]。

近年、リガンドの発展や核酸修飾技術の高度化に伴い、肝実質細胞への siRNA 送達は GalNAc コンジュゲート体が主流である (Figure 3)。LNP とは異なり、GalNAc コンジュゲート核酸は化学的に単一の構造であることから、製造や品質担保が比較的容易であると考

えられる。Patisiran (LNP 製剤) と vutrisiran (GalNAc コンジュゲート製剤) は両方トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチーを適応として承認された siRNA 医薬品だが、3 週間に 1 回の全身投与である前者と比べて、後者は 3 か月に 1 回の皮下投与であり、患者負担も少ない。Patisiran 以降に肝実質細胞を標的として承認された siRNA 医薬品には givosiran、lumasiran、inclisiran があるが、これらはすべて GalNAc コンジュゲート製剤である。

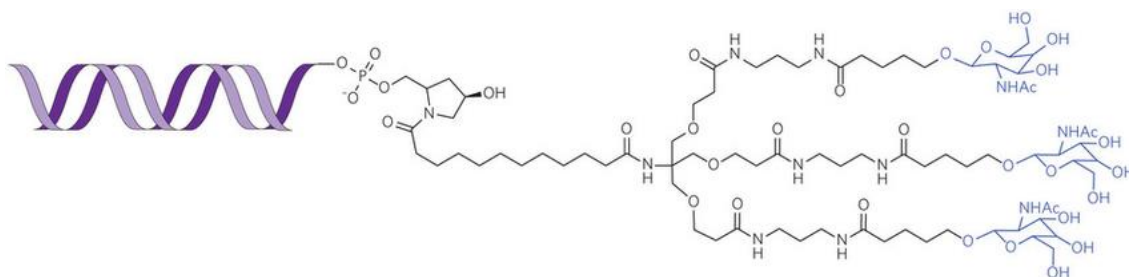


Figure 3 GalNAc コンジュゲート製剤の化学構造^[51]。

mRNA は siRNA と比較して長鎖であり、高度な化学修飾も困難であることから、生体内での安定性は極めて低く、リガンドコンジュゲート化したとしても mRNA の全身投与は困難である。また、リガンドコンジュゲート核酸の性能はリガンドに大きく依存するため、肝実質細胞以外を標的とする場合、リガンド探索とそれに適したリンカー探索も同時に進める必要がある。そのため、生体内への mRNA 送達には LNP 製剤が採用されることが多い。実際、承認された COVID-19 に対する mRNA ワクチンや、臨床試験中の全身投与型 mRNA 医薬品の殆どが LNP 製剤である。

siRNA 送達に有効なイオン性脂質や LNP 組成がそのまま mRNA 送達に転用できるとは限らないことが報告されており^[52]、更なるイオン性脂質開発や脂質組成の改良が行われている。イオン性脂質の頭部構造としては複素環アミンも含めた第 3 級アミンが主流であり、その構造探索が継続されている^[16,53]。イオン性脂質の疎水性部位としては、不飽和足場^[37]、生分解性足場^[54,55]、高分子足場^[56,57]、分岐足場^[58,59]が検討されている。その中でも、分岐脂肪酸を足場構造とするイオン性脂質が mRNA 送達に有効であるという報告がなされている。Zhang らは直鎖の足場を有する 4 種類のイオン性脂質と分岐鎖の足場を有する 5 種類のイオン性脂質を比較し、分岐脂質が高い活性を示す傾向があると報告した^[60]。Hajj らは、イソデシル (脂肪酸の末端にメチル分岐がある) 足場が直鎖足場に比べて *in vivo* で 10 倍以上の活性を持つことを報告した^[61]。臨床においても、COVID-19 ワクチンや Cas9 mRNA を送達する LNP に分岐足場を有するイオン性脂質が使用されている^[62] (Figure 4)。

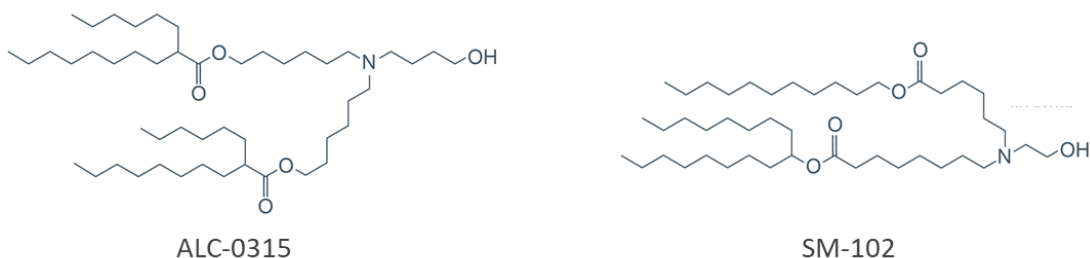


Figure 4 COVID-19 のパンデミックに対応して承認された mRNA/LNP に採用されたイオン性脂質。Pfizer/BioNTech 社の LNP には ALC-0315 が採用され、Moderna 社の LNP には SM-102 が採用されており、どちらも分岐足場を有する^[63]。

上述のように分岐足場を有するイオン性脂質が注目されているにも関わらず、市販で入手可能な分岐化合物が限られており、正確な比較を意図した系統的な脂質ライブラリ設計が容易ではないため、分岐構造が LNP の機能に与える影響についての体系的な知見が得られていないのが現状である。この体系的な知見を得ることは今後の合理的な脂質設計のための指針となるのではないかと考えた。

本研究では、mRNA-LNP の機能に対する分岐構造の影響を理解するために、系統的な分岐脂質ライブラリを設計した。合成した 32 種類の分岐脂質の詳細な比較から、疎水性足場の分岐鎖が mRNA-LNP の安定性と *in vivo* での有効性を高めることを明らかにした。第 1 章では、系統的な分岐脂質ライブラリの設計戦略と合成結果を報告する。第 2 章では、疎水性足場の分岐構造が LNP の物理化学的性質や保存安定性に与える影響について報告する。第 3 章では、疎水性足場の分岐構造が膜融合活性や *in vivo* mRNA 送達に与える影響について報告する。最後に、Cas9 mRNA と sgRNA を同時に封入した LNP の単回投与により、マウスで効率的に *in vivo* ゲノム編集を達成したことについても報告する。

第1章 イオン性脂質の分岐構造と LNP の機能の関係性理解のための系統的な脂質ライブラリ設計

1.1 緒言

分岐化合物は広大な化学空間を有している。具体的には、各鎖の炭化水素鎖長、分岐鎖の数と位置、主鎖と分岐鎖の対称性、総炭素数、ヘテロ原子の数など、分岐化合物を記述するためには多くのパラメータが必要である。この複雑さは分岐脂質間の正確な比較を困難にしている。また、市販で入手可能な分岐化合物は限られており、正確な比較を意図した系統的な脂質ライブラリ設計は容易ではない。以上の理由から、分岐構造が LNP の機能に与える影響についての体系的な知見は報告されていない。この体系的な知見を得ることは今後の合理的な脂質設計のための指針となると考え、系統的な分岐脂質ライブラリの設計を試みた。

本研究では、イオン性脂質の足場構造として α 分岐脂肪酸に着目した。 α 分岐脂肪酸は主鎖と α 位から分岐した側鎖からなる脂肪酸であり、本研究の目的達成に向けて理想的な2つの特徴を有している (Figure 5)。1つ目の特徴は、 α 分岐脂肪酸が市販で入手可能な単純な化合物を原料として合成でき、それに加えて、各鎖の長さを独立して制御しながら合成可能なことである。もう1つの特徴は、 α 分岐脂肪酸は対称性と総炭素数という2つの独立因子のみで構造を記述できることである。 α 分岐脂肪酸のこれらの特徴は、系統的な脂質ライブラリ設計や構造活性相関の理解にとって理想的であると考えた。

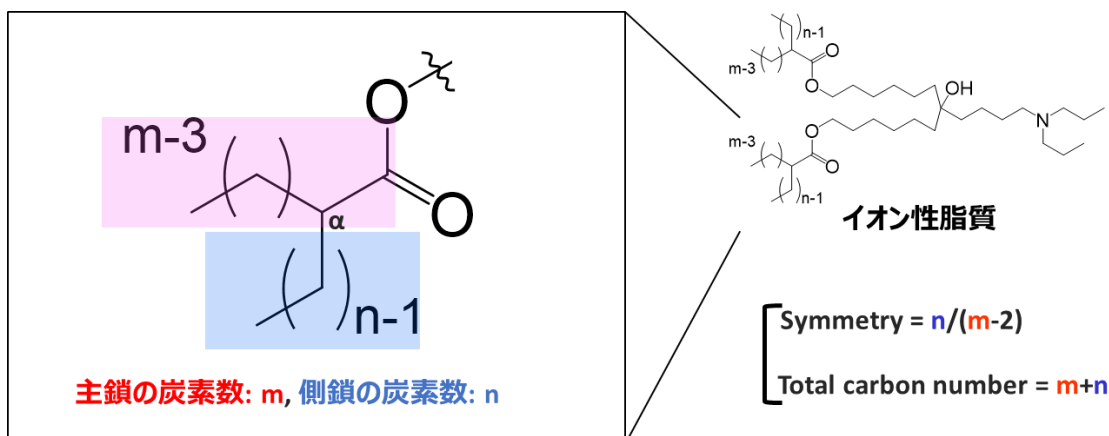


Figure 5 α 分岐足場を有するイオン性脂質。 α 分岐脂肪酸は、単純な化合物を原料として各鎖の長さを独立して制御しながら合成できる。また、対称性 (Symmetry) と総炭素数 (Total carbon number) の2つのパラメータで構造記述が可能である。

1.2 結果

1.2.1 α 分岐脂肪酸の合成

カルボニル化合物の α 炭素は酸性度が高いため、強塩基によってプロトンを引き抜くことができ、その結果エノラートが生成する。エノラートは求核剤として働くため、ハロゲン化アルキルを加えることで、 S_N2 反応が進行する。この反応を利用することで α 分岐脂肪酸 $m-n$ (主鎖の炭素数: m , 側鎖の炭素数: n) が得られる (Figure 6a)。精製の難易度に応じて 2 種類の合成ルートを使い分け、原料や意図しない副産物から分離することで、目的とする構造の α 分岐脂肪酸を得た。1 つ目の合成ルートは直鎖脂肪酸のアルキル化であり、2 つ目の合成ルートはマロン酸ジメチルのアルキル化である (Figure 6b)。

直鎖脂肪酸をアルキル化する場合、未反応の直鎖脂肪酸から目的の分岐脂肪酸を逆相カラムで精製する必要がある。よって、付加するアルキル鎖が長い方が精製難易度は下がるため、本手法は対称性の高い (側鎖の長い) 分岐脂肪酸を合成する場合に有用である。検討当初は、NaH とそれに続けて添加する LDA によって直鎖脂肪酸の α 炭素のプロトンを引き抜いた後に、ヨウ化アルキルを付加させる手法を試みた^[64]。反応温度も文献通りに室温~45°C としたが、複数の副生成物や原料の残存が確認されたうえ、収率も 10%程度であった。副反応を抑制する必要があると考え、より低温 (-20°C~10°C) で反応させる条件を利用した^[65]。本手法では NaH を使用せず、LDA によって全てのプロトンを引き抜いている。また、配位性添加剤 DMPU を添加することで LDA の会合を防ぎ、反応の進行促進を試みている。本条件を使用して分岐脂肪酸 14-2 の合成を試みたところ、収率は 40%程度と大きく改善した。モレキュラーシーブスによる超脱水 THF や DMPU の脱水や DMPU 添加量の最適化も行い、50%程度と比較的高収率で目的物が得られた。

マロン酸ジメチルをアルキル化する場合、鎖長 " $m-2$ " のヨウ化アルキルと鎖長 n のヨウ化アルキルを付加することで、目的の α 分岐脂肪酸 $m-n$ が得られる。しかしながら、副生成物として α 分岐脂肪酸 $m-(m-2)$ と α 分岐脂肪酸 " $n+2$ "- n も得られる。高純度の目的物を得るためには逆相カラムによる精製を行う必要がある。付加する 2 種類のアルキル鎖長の差が大きいほど分離難易度が下がるため、対称性の低い (直鎖に近い) 分岐脂肪酸を合成する場合、もしくは完全に対称な分岐構造の脂肪酸を合成する場合に有用である。NaH によってジメチルマロン酸の α 炭素のプロトン を 2 度引き抜き、2 分子のヨウ化アルキルを付加し、加水分解、脱炭酸反応を行う手法を試みた^[66]。完全対称構造の分岐脂肪酸 9-7 は 1 種類のヨードアルカン (1-iodoheptane) の付加により、98%という高い収率で得られた。非対称の分岐脂肪酸 10-2 は、1-iodooctane と iodoethane を等モルとなるように混合して添加した結果、30%の収率で分岐脂肪酸 10-2 が得られた。各ヨードアルカンが付加する確率が同程度の場合、分岐脂肪酸 4-2/10-2/10-8=1:2:1 の割合で生成する。そのため 2 種類のヨウ化アルキルを混合して添加する方法では、理論上収率が 50%以上になることはない。そこで、マロン酸ジメチルに対して 1 等量の NaH と 1 種類目のヨードアルカンを添加し、反応進行後に 1.5 等量の NaH と 2 種類目のヨードアルカンを添加した。この順次添加する方法で分岐脂肪酸 9-

3 の合成を試みたところ、収率は 63%と大幅に改善された。

どちらの合成ルートにおいても、ヨウ化アルキルを基質として利用したが、必要なヨウ化アルキルが市販で入手できない場合がある。本研究においても、 α 分岐脂肪酸 15-1 を合成するための原料 1-iodotridecane (C13-I) は入手不能であった。ヨウ化アルキルの合成法としてはいくつかの選択肢があるが、本検討では第 1 級アルコールに対してヨウ化水素酸 (hydriodic acid) を反応させる手法を実施した。Tridecanol (C13-OH) を原料として反応を試みたところ、収量 6.7 g、収率 65.6%、clear yellow oil として目的の 1-iodotridecane (C13-I) が得られた。

最終的には、直鎖脂肪酸から 11 種類の分岐脂肪酸、マロン酸ジメチルから 9 種類の分岐脂肪酸を合成し、市販で入手可能な 11 種類の分岐脂肪酸を加えて、合計 31 種類の分岐脂肪酸と 1 種類の直鎖脂肪酸が得られた。

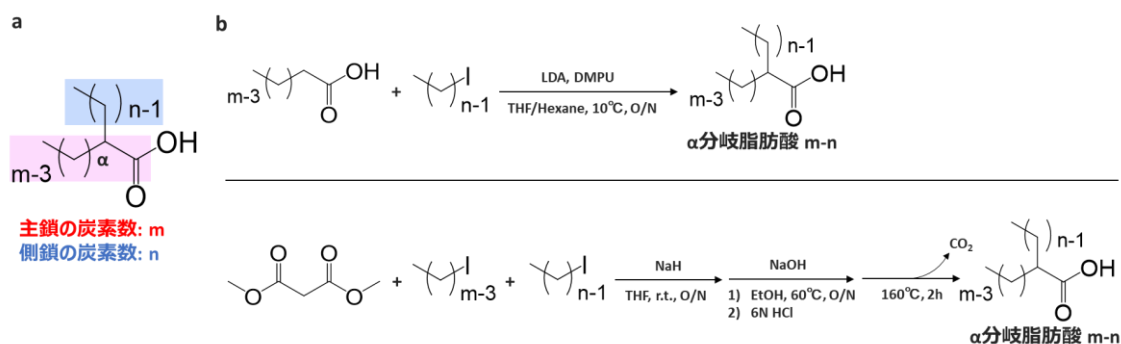


Figure 6 α 分岐脂肪酸の合成。(a) α 分岐脂肪酸の構造。m は主鎖の炭素鎖長、n は側鎖の炭素鎖長を示す。(b) 上段：直鎖脂肪酸を原料とした α 分岐脂肪酸の合成。下段：マロン酸ジメチルを原料した α 分岐脂肪酸の合成。

1.2.2 α 分岐脂質の合成

α 分岐脂質ライブラリの頭部構造は、当研究室で開発済の CL4 構造で固定した^[49]。筆者らは 2019 年に、CL4 構造は肝実質細胞への *in vivo* siRNA 送達において最も高い遺伝子抑制を達成した構造の一つであると報告している。 α 分岐脂肪酸 m-n と CL4 頭部構造を縮合することで、 α 分岐脂質 (CL4F m-n) を 32 種類得た (Figure 7)。イオン性脂質に含まれる不純物は構造活性相関の正確な理解を妨げると予想される^[67]。そのため、得られた脂質は順相および逆相クロマトグラフィーを用いて精製した。精製後のイオン性脂質はすべて ¹H-NMR および液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) を用いて同定された。また、純度はコロナ荷電化粒子検出器付き液体クロマトグラフィー (LC/CAD) により測定し、純度 83.4%以上であり、平均としては 92.9%であった。

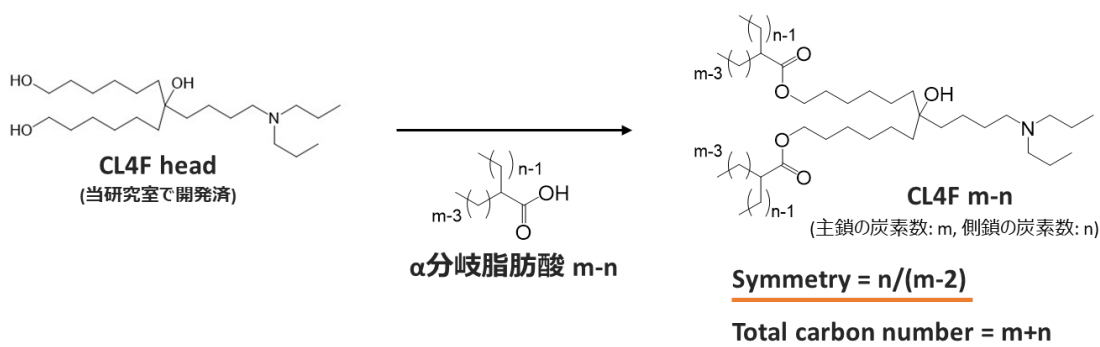


Figure 7 α 分岐脂質 CL4F m-n の合成。m は主鎖の炭素鎖長、n は側鎖の炭素鎖長を示す。 α 分岐脂質も対称性と総炭素数という 2つのパラメータで記述可能である。

1.2.3 α 分岐脂質の構造を記述する 2つのパラメータ

α 分岐足場は、その対称性と総炭素数に基づいて記述される。対称性は、主鎖と側鎖の炭素数の比として計算され、0.0-1.0 の範囲となる。総炭素数は主鎖と側鎖の炭素数の合計として計算され、C8-C26 の範囲となる。合成した 32 種類の脂質構造を可視化するために、 α 分岐足場の対称性と総炭素数に従ってプロットした (Figure 8)。例えば、CL4F 9-7、CL4F 12-4、CL4F 16-0 の足場の総炭素数 (C16) は同じだが、対称性 (y 軸) が異なり、それぞれ完全対称 (1.0)、中程度の対称 (0.4)、直鎖 (0.0) である。一方、CL4F 6-4、CL4F 8-6、CL4F 14-12 は、全て完全対称 (1.0) な脂質だが、総炭素数 (x 軸) は異なり、それぞれ C10、C14、C26 である。以上より、頭部が固定された一方で、足場の分岐構造の対称性と総炭素数の多様性に富んだ分岐脂質ライブラリが得られた。これらのパラメータが LNP の安定性や性能に与える影響を次章以降調べた。

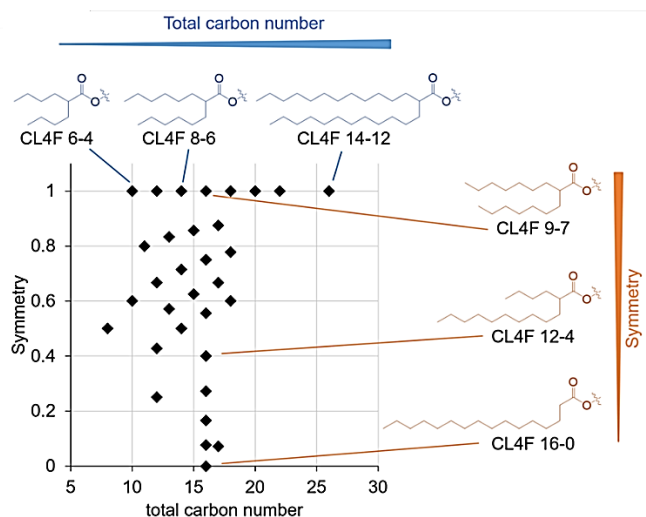


Figure 8 32 種類の脂質構造。各脂質はその総炭素数と対称性に従ってプロットされた。

1.3 考察

Moderna 社や Pfizer/BioNTech 社が開発した COVID-19 に対する mRNA ワクチンは高い有効性を示しており、両社はキャリアとして LNP を採用している。LNP 製剤は通常イオン性脂質、コレステロール、リン脂質、PEG 脂質から構成されるが、両社の製剤の共通点はイオン性脂質として分岐足場を有する脂質を採用したことである (Figure 4)。しかしながら、分岐鎖が LNP の性質や mRNA 送達効率に与える影響についての報告は非常に限られている。分岐鎖に関する構造活性相関を理解するためには、系統的で連続的な脂質ライブラリを設計することが理想的だが、市販で入手可能な分岐化合物が限られていることがこれを妨げていると考えた。実際、Hajj らや Zhang らは限られた脂質ライブラリ内での比較試験に基づいて、分岐鎖の重要性を主張している。

そこで本研究では、イオン性脂質の足場構造として α 分岐脂肪酸に着目した (Figure 5)。対応するハロゲン化アルキルを入手できれば、 α 分岐脂肪酸の主鎖と側鎖の炭化水素鎖長は自由に制御可能であり、本特徴は系統的で連続的な脂質ライブラリ設計を可能とした (Figure 6)。2つの独立したパラメータのみで構造を記述できるという α 分岐構造の特徴も構造活性相関を理解する上で重要である (Figure 8)。

本研究では 32 種類の α 分岐脂肪酸を合成したが、2つのルートを使い分けた (Figure 6)。直鎖脂肪酸を原料とするルートであれば 1 ステップで目的物が得られるが、発火の危険性がある試薬や適切な温度管理が必要であり、収率も安定しなかった。したがって、主鎖と分岐鎖の炭素鎖長が近いために逆相精製が困難な場合を除いて、マロン酸ジメチルを原料とした合成法を優先した。本手法は、アルキル付加・加水分解・脱炭酸反応の 3 ステップが必要だが、温和な条件で反応が進行することから収率が安定し、スケールアップも容易であった。異なる 2 種類のヨウ化アルキルを付加する際には、1 種類付加するごとに精製するのが基本だが、合成期間の短縮を目指し、2 種類のヨウ化アルキル (仮に A と B とする) を同時に添加したところ、予想通り AA/AB/BB=1:2:1 の割合で分岐脂肪酸が得られた。更に工夫し、2 種類のヨウ化アルキル (仮に A と B とする) を順次添加したところ、AA/AB/BB=1:8:1 といったように目的的分岐脂肪酸がより多く得られるようになり、合成期間の短縮と収率を両立できた。

本研究では主鎖と側鎖がそれぞれ直鎖状の単純な α 分岐脂質の理解に取り組んだが、主鎖や側鎖が更に分岐するような複雑な α 分岐脂質も興味の対象である。その場合、原料として複雑なハロゲン化アルキルが必要となるが、市販で入手できなかったとしても、アルコール、カルボン酸、アルケンのハロゲン化は実施可能である。分岐構造が複雑になるほど構造記述も難しくなるが、ケモインフォマティクスの発展に伴い、例えば RDkit によって様々な記述子を算出可能である^[68]。原子数や clogP のような 0 次元や 1 次元の記述子では CL4F 16-0 と CL4F 10-6 といったような構造異性体を区別できないが、化合物をグラフ構造としてとらえる 2 次元のトポロジカルインデックスは強力なツールとなりうる^[69-71]。具体的には、Kappa shape index や Balaban's J value は分岐の程度も含む全体的な分子形状を表すことがで

きる。一方で、脂質は1分子で機能するわけではなく、複数の脂質分子の集合体としてLNPの機能が発揮するため、分子の立体構造から算出される3次元記述子の適用は慎重に検討する必要がある。

上述のように α 分岐に着目することで、系統的で連続的な分岐脂肪酸や分岐脂質ライブラリが得られた。しかしながら、 α 分岐を導入したことで生じると予想される欠点もあり、それは生分解性の低下である。イオン性脂質の適切な位置にエステル結合を導入することで、イオン性脂質は臓器内・細胞内のエステラーゼやリパーゼによって生分解されることが報告されている。例えば、Onpattroに使用されたMC3にエステル結合を導入したL319という脂質は活性と生分解性を両立している^[54]。それと同様に、筆者らが開発したCL4H6もエステル結合が導入されており、肝臓FactorVIIを標的とするsiRNAデリバリーにおいてED₅₀値で0.0025 mg kg⁻¹を達成し、その400倍の1.0 mg kg⁻¹を投与しても体重減少や血液学的・病理組織学的な異変は確認されなかった^[49]。本研究で合成した分岐脂質ライブラリもCL4H6と同様にエステル結合が導入されているが、 α 位から分岐した炭化水素鎖が立体障害となるために、生分解性を失う可能性が高い。 β 分岐脂肪酸、 γ 分岐脂肪酸、 δ 分岐脂肪酸...というようにエステル結合から分岐鎖を遠ざけることで生分解性が改善する可能性がある。 β 分岐脂肪酸はホスホノ酢酸トリエチルと目的炭素鎖長のケトン为原料としたHorner-Wadsworth-Emmons反応から、 δ 分岐脂肪酸は β 分岐脂肪酸エステルを還元・酸化することで得られる β 分岐のアルデヒド为原料としたHorner-Wadsworth-Emmons反応から、 ϵ や ζ 分岐脂肪酸は β 分岐のアルデヒドと(3-Carboxyethyl) triphenylphosphonium や(3-Carboxypropyl) triphenylphosphonium 为原料としたWittig反応から合成可能である。ただし、ステップ数が多く、市販で入手可能なケトンも限られていることから、系統的な脂肪酸ライブラリの取得は困難であると予想される。

Moderna社やPfizer/BioNTech社のmRNA/LNPワクチンに採用されたSM-102やALC-0315にも言えることだが、殆どの分岐脂質は分岐部分が不斉炭素となりラセミ体である。LNPの活性や保存安定性は脂質構造そのものではなく、脂質構造によって変わるLNPの性質に依存する。そのため脂質の立体構造や脂質間の相互作用が重要であり、S体/R体で活性が異なる可能性がある。実際、Alejandro J. Da Silva Sanchezらはイオン性脂質C12-200について、S体はR体と比較して強い活性を示し、ラセミ体はその中間の活性を有すると報告した^[72]。

1.4 小括

本章では、イオン性脂質の分岐構造が LNP の機能に与える影響についての体系的な知見の獲得を目指し、系統的な分岐脂質ライブラリの設計を試みた。イオン性脂質の足場構造として α 分岐脂肪酸に着目した。 α 分岐脂肪酸は市販で入手可能な単純な原料から、各鎖の長さを独立して制御しながら合成可能である。また、精製の難易度に応じて 2 種類の合成ルート（直鎖脂肪酸のアルキル化/マロン酸ジメチルのアルキル化）を使い分けた。これにより系統的な α 分岐脂肪酸ライブラリを獲得した。得られた α 分岐脂肪酸をそれぞれ CL4 頭部構造と縮合することで、 α 分岐脂質を 32 種類得た。得られた脂質は足場の分岐構造が連続的に異なるイオン性脂質ライブラリであり、分岐構造の正確な比較が可能となる。また、 α 分岐構造は対称性と総炭素数という 2 つの独立因子のみで記述でき、この特徴は構造活性相関の理解にとって理想的である。

第2章 イオン性脂質の分岐構造が LNP の物理化学的性質に与える影響

2.1 緒言

典型的な LNP はイオン性脂質、コレステロール、リン脂質、PEG 脂質を構成成分とする (Figure 9a)。これらの成分、成分比及び粒子作製条件によって決まる LNP の物理化学的性質は LNP の動態を決める重要な要素であり、LNP の粒子径や見かけの pKa はその代表的なパラメータである。例えば、血中に投与された LNP が肝実質細胞へ移行するためには、肝類洞血管内皮細胞に存在するフェネストラと呼ばれる 100~150 nm 程度の間隙を通過し、ディッセ腔へ移行する必要があるため^[73,74]、粒子径制御は重要である。また、粒子径の大きい LNP は免疫細胞へ取り込まれやすいことも報告されている^[75]。通常 pKa は分子ごとに固有の値を示すが、LNP は複数分子の集合体であるため、LNP を 1 つの分子として捉える見かけの pKa (apparent pKa) が LNP の性質を決める。この見かけの pKa についても、pKa が 6 以下だと脾臓、pKa が 6~7 の範囲内だと肝臓、pKa が 9 以上だと肺で mRNA が効率的に発現する傾向があると報告されている^[76]。

LNP の物理化学的性質は制御可能である。LNP の調製はエタノール希釈法で行われることが一般的である。具体的には、エタノールに溶かした脂質を、核酸を含む酸性緩衝液で急速に攪拌・希釈し、極性上昇に伴う自己集合を促進することで LNP が形成する。この希釈率、希釈速度、希釈からバッファー交換までの時間^[77]、緩衝液の塩濃度^[75,78]に依存して粒子径は変化する。また、PEG 脂質は粒子同士の融合を阻害するため、PEG 脂質が多いほど粒子径は小さくなる^[79]。見かけの pKa は第 4 級アンモニウム塩のような常に正電荷を有する脂質やリン酸塩のような常に負電荷を有する脂質を加えることで制御できる^[80]。

このように LNP の物性を制御する手法は報告されているが、脂質の化学構造によって LNP の物理化学的性質がどのように制御されているかについての研究は非常に限られている。例えば、M. Cornebise らは、脂質頭部の化学構造は mRNA との静電的相互作用もしくは水素結合に寄与することで、LNP の粒子径や不均一性に影響を与えることを示唆した^[81]。筆者らも LNP の見かけの pKa はイオン性脂質の頭部 clogP 値に依存していると報告している^[49]。これらの研究は今後の脂質設計の指針となるが、主に頭部構造の比較である。そこで本研究では、足場の化学構造が LNP の物理化学的特性に与える影響について調査を試みた。

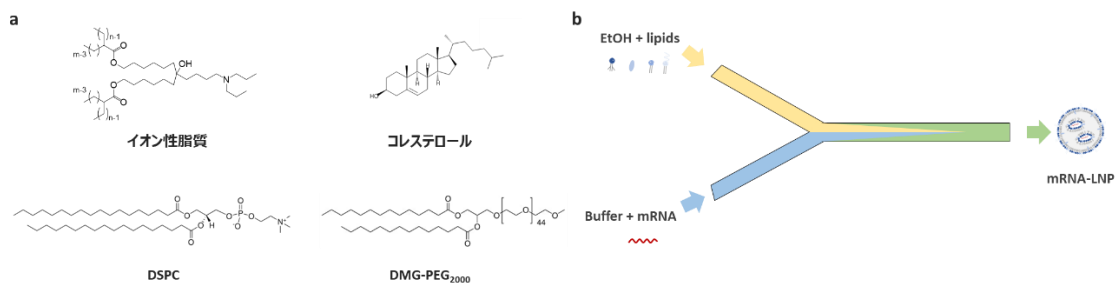


Figure 9 LNP を構成する脂質構造と LNP の調製法。(a) 典型的な LNP には、イオン性脂質、コレステロール、DSPC (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、DMG-PEG₂₀₀₀ (1,2-Dimyristoyl-*rac*-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000) が利用される。(b) エタノール希釈法による LNP 調製は、マイクロ流体デバイスによる急速攪拌・混合により行われることが多い。

2.2 結果

2.2.1 α 分岐脂質から調製される LNP の物理化学的性質

イオン性脂質の化学構造が LNP の物理化学的性質に与える影響を検討するため、イオン性脂質を除く構成脂質の種類、脂質組成、核酸の種類、核酸/脂質比および粒子調製法は固定した。脂質の種類や組成は Onpattro 製剤と同一とした。Onpattro 製剤は PEG 脂質として PEG₂₀₀₀-C-DMG ((R)- α -(3'-{[1,2-di (myristyloxy) propanoxy]carbonylamino}propyl)- ω -methoxy, polyoxyethylene) を使用しているが、入手難易度を考慮して、グリセロールリンカーと PEG の間のアミド結合の有無以外は同一の構造を有する DMG-PEG₂₀₀₀ を使用した。核酸は Firefly Luciferase をコードした mRNA (FLuc mRNA、5moU 修飾、1929 ヌクレオチド、Trilink 社製) を使用し、イオン性脂質と核酸のモル比に該当する N/P 比は 10 とした。また、エタノール希釈法は Precision Nanosystems 社のマイクロ流体デバイス NanoAssemblr を採用し、これにより自動で LNP を作製した。ピペッティング、もしくは激しく攪拌している緩衝液へのエタノール注入によってもエタノール希釈法は実現でき、低コスト・試薬ロスの最小化というメリットがあるが、再現性の低下が懸念され、かつスケールアップも容易ではないため本検討では採用しなかった^[82]。

即ち、LNP はイオン性脂質、コレステロール、DSPC および DMG-PEG₂₀₀₀ (50:38.5:10:1.5 mol%) と FLuc mRNA をマイクロ流体デバイス内で急速に攪拌混合して製剤化した。得られた LNP は HEPES 緩衝液で置換し、限外濾過によって精製された。LNP の物理化学的性質として、粒子径、多分散指数 (PDI)、mRNA 封入率、見かけの pKa を評価した。PDI の値が小さいと粒子径分布が均一であることを示し、0.0-1.0 の範囲で算出される。その結果、脂質組成や製剤工程を同一にしたにもかかわらず、イオン性脂質の足場構造に依存して LNP の物理化学的性質は変化した (Table 1)。粒子径は 65-220 nm、PDI は 0.002-0.225、mRNA 封入率は 40%-100% の範囲であった。また、32 種類のイオン性脂質の頭部構造はジプロピルアミンに固定されているにもかかわらず、見かけの pKa 値は 5.85~6.81 と 1 ポイントほどの範囲で変動することが見出され、頭部構造ほどの変動ではないが、足場構造も pKa に寄与することが示された。

mRNA-LNP 製剤の物性に対する足場構造の影響を可視化するために、2 つのパラメータ (対称性および総炭素数) に従って等高線図を作成した (Figure 10a-d)。Figure 10a-c は分岐足場の総炭素数の増加が、粒子径の低下、均一性の向上および mRNA 封入率の向上に寄与することを示している。この傾向は logP 値で示される脂質分子の疎水性とそれに伴う脂質同士の相互作用の強弱に起因していると考えられる。また、分岐足場の対称性も粒子径、PDI および mRNA 封入率に影響を及ぼすことが示された。しかしながら、分岐構造の対称性は脂質分子の logP 値に影響を与えないため、対称性が LNP の物性に寄与したメカニズムを理解することは困難であった。Figure 10d は、見かけの pKa も足場の分岐構造に依存して規則的に変動することを示唆しているが、そのメカニズムも不明であった。

Table 1 32 種類の LNP の粒子径、PDI、mRNA 封入率、見かけの pKa。

LNP 組成はイオン性脂質、コレステロール、DSPC および DMG-PEG2k (50:38.5:10:1.5 mol%)、N/P 比=10 で固定した。mRNA は Fluc をコードしたものを使用した。

Lipid name	ζ-Average [nm]	PDI	% mRNA encapsulation	pKa
CL4F 6-2	218.20	0.069	41.4	6.40
CL4F 7-5	109.80	0.057	99.9	6.27
CL4F 8-4	101.60	0.020	99.7	6.27
CL4F 9-3	102.80	0.030	99.6	6.34
CL4F 10-2	93.60	0.068	98.6	6.35
CL4F 8-6	88.78	0.022	99.4	6.14
CL4F 10-4	84.92	0.041	99.8	6.19
CL4F 10-5	84.62	0.021	99.7	6.07
CL4F 9-7	81.30	0.004	99.2	6.05
CL4F 11-5	81.81	0.019	99.6	6.19
CL4F 12-4	84.57	0.015	99.0	6.16
CL4F 13-3	83.05	0.044	96.3	6.22
CL4F 14-2	74.02	0.078	94.0	6.29
CL4F 10-7	79.68	0.039	99.8	5.99
CL4F 11-6	84.50	0.020	99.8	6.02
CL4F 16-0	158.30	0.225	86.2	6.81
CL4F 16-1	69.08	0.045	65.9	6.40
CL4F 10-8	81.99	0.021	99.8	5.99
CL4F 11-7	79.45	0.021	99.7	5.98
CL4F 11-9	81.13	0.014	99.8	5.92
CL4F 12-10	75.85	0.019	99.6	5.85
CL4F 10-6	82.66	0.006	99.6	6.05
CL4F 6-4	141.10	0.023	97.2	6.38
CL4F 7-3	133.90	0.025	98.1	6.39
CL4F 7-4	113.50	0.032	98.8	6.33
CL4F 8-5	94.65	0.043	99.1	6.23
CL4F 9-4	95.29	0.002	99.1	6.26
CL4F 9-5	89.41	0.048	99.0	6.16
CL4F 9-6	89.18	0.021	99.1	6.10

CL4F 12-6	82.84	0.017	99.7	6.03
CL4F 15-1	106.4	0.143	88.9	6.32
CL4F 14-12	97.41	0.043	97.9	5.83

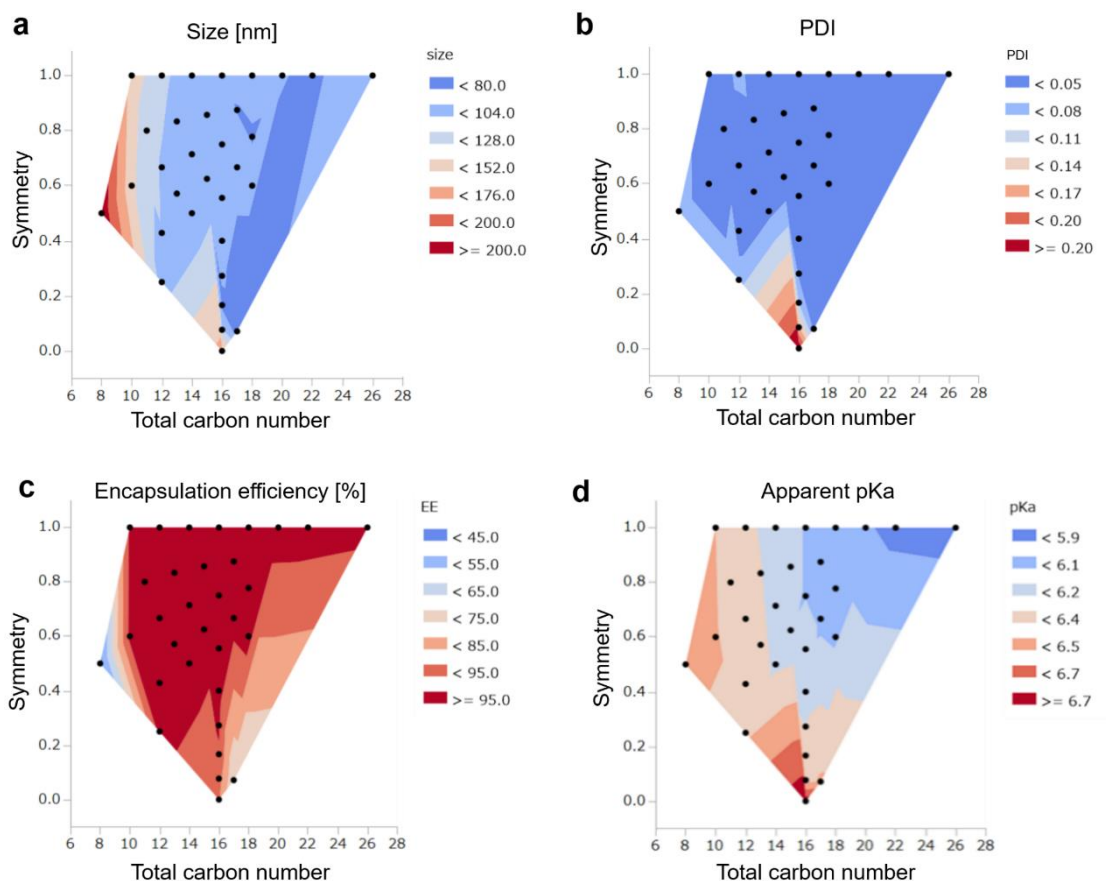


Figure 10 mRNA-LNP 製剤の各種物性と足場の分岐構造を記述する 2 つのパラメータ (対称性および総炭素数) の等高線図。x 軸は総炭素数、y 軸は対称性を表す。(a) 粒子径 (ζ -Average)、(b) 多分散指数 (PDI)、(c) mRNA 封入率、(d) 見かけの pKa 値。

2.2.2 イオン性脂質足場の分岐鎖が脂質の運動性や LNP 内部の粘性に与える影響

エタノール希釈法による粒子作製の際、脂質足場の疎水性は自己集合の駆動力となるため、疎水性足場は粒子形成において重要な役割を果たす^[83]。Figure 10 で示された LNP の物性に対する分岐足場の影響を理解するために、LNP 内部での脂質の分子運動に着目した。*in silico* 研究において、リン脂質足場の分岐鎖は脂質二重層における脂質分子の回転運動を制限することが見出されており、脂質の面弾性係数や軸方向緩和時間の計算値によって示されている^[84,85]。分子レベルでは、分岐鎖によって生じた疎水鎖の折れ曲がり構造や疎水鎖同士の間隔によって、脂質分子の側方拡散や回転運動が遅くなる^[86]。これらの知見に基づき、イオン性脂質の分岐鎖によって生じる分子運動の制限はナノ粒子を安定化させ、その結果、

mRNA 封入率が高く、均一で小さな粒子が形成されたと仮説を立てた。

LNP 内部における分子運動を直接評価することは困難なため、LNP 内部の粘性を実験的に評価することで、分岐鎖の役割の検証を試みた。マクロスケールでの粘性は通常、力学的手法で測定されるが、ミクロスケールでは蛍光プローブを用いてモニターすることができる。蛍光法の例として、1 分子追跡法 (single molecule tracking; SMT) [87]、光褪色後蛍光回復法 (FRAP) [88]、蛍光相関分光法 (FCS) [89]、蛍光異方性[90]が挙げられる。ミクロスケールの粘性測定に用いられる技術の中でも、分子ローターは最も有力なもの 1 つである[91,92]。分子ローターはねじれ型分子内電荷移動 (TICT) を利用した蛍光プローブであり、その量子収率と蛍光寿命はナノスケールの粘性に依存する。分子ローターのうち、9-(dicyanovinyl)-julolidine (DCVJ) や 9-(2-carboxy-2-cyano) vinyljulolidine (CCVJ) などのプッシュ-プル型分子ローター、BODIPY-C₁₂ などの BODIPY 系分子ローターは、粘性のモニタリングに広く用いられている。イオン性脂質と分子ローターの静電的相互作用による測定値への影響を排除するために、荷電しない DCVJ を選択した。DCVJ のジュロリジン基とジシアノビニル基の間の単結合付近で分子内回転すると、励起エネルギーの無放射遷移が起こり、蛍光が観察されなくなる (Figure 11a) [93]。DCVJ は脂質膜に優位に分配され、DPPC/コレステロールリポソームと DOPC/コレステロールリポソームの粘性の差を検出できることが知られている[94]。典型的な LNP は mRNA、水、イオン性脂質、コレステロールを含むコア、DSPC が豊富な表面層および PEG 層から形成される[95]。DCVJ は疎水性のため、LNP の疎水性領域に位置し、LNP 内部の粘性測定が可能と考えられる。

初めに、グリセロール/メタノールの体積比 (G/M) が異なる混合液を準備し、DCVJ 由来の蛍光強度がグリセロール/メタノール混合液の粘性に依存することを確認した (Figure 11b)。反対に、DCVJ の吸収スペクトルは粘性に依存しないことも確認され、そのため蛍光分子の濃度補正に使用した (Figure 11c)。測定値を粘性に変換するために、蛍光スペクトルと吸光スペクトルの積分比 (「R」と表記) を算出した。各温度 (30°C~60°C) におけるグリセロール/メタノール混合液の粘性値に対して R の値をプロットすると、相関関係が認められ ($R^2=0.833$)、検量線が作成された (Figure 11d)。なお、検量線に基づく回帰式の指数値 (0.581) は装置や環境に依存しない値だが、他グループが報告した値の範囲内 (0.51~0.59) であった[96,97]。

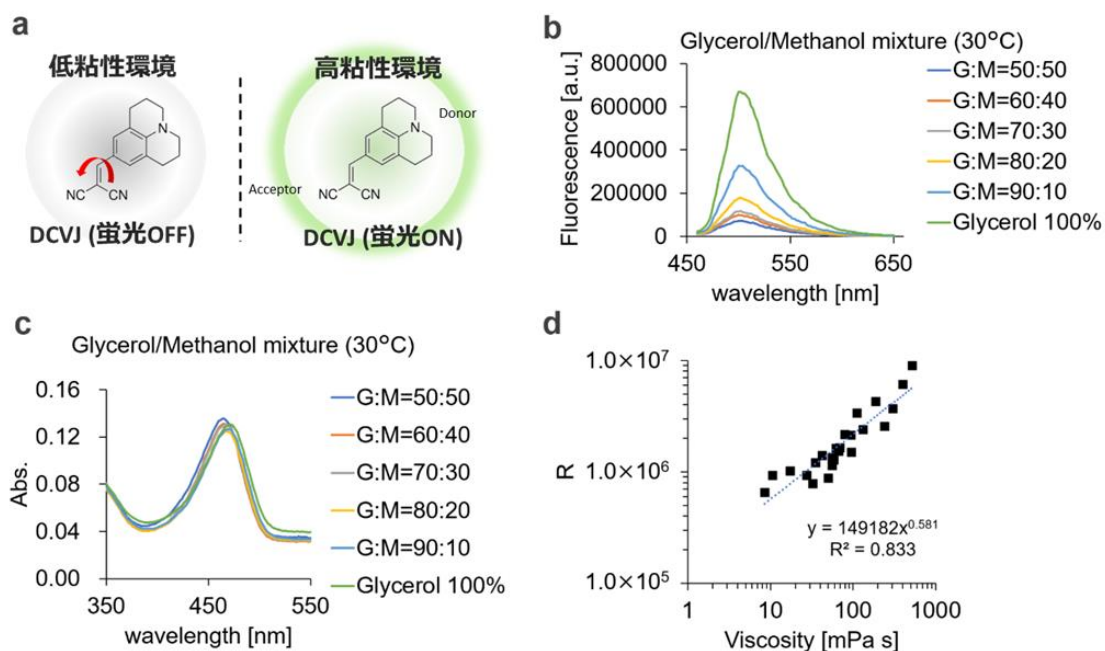


Figure 11 DCVJによる粘性の評価。(a) DCVJは、微小環境における粘性に応じて分子内回転速度が変化し、それによって蛍光強度が変化する。(b) DCVJ由来の蛍光強度は粘性に依存した。(c) DCVJ由来の吸光度は粘性に依存しない。(d) 蛍光スペクトルと吸光スペクトルの積分比 R は粘性値を反映した。

2.2.3 分子ローターによる LNP 内部の粘性評価

DCVJで標識した15種類のLNPについて (Figure 12a)、各温度 (30°C~60°C) における蛍光スペクトルと吸光スペクトルを測定し、粘性に換算した。各LNPの粘性値を温度に対してプロットすると、活性化エネルギーの値として $30.3\text{--}50.3\text{ kJ mol}^{-1}$ の範囲でアレニウス則に従うようにフィッティングされ、これは他グループの報告と一致する^[94]。転移点が確認されなかったことや、後述する加速条件下での保存安定性データとの関連性を考慮し、各LNPの40°Cにおける粘性を比較した。

総炭素数は同じC16な一方で、対称性 (0.0-1.0) の異なるイオン性脂質から調製した8種類のLNPの粘性を比較した (Figure 12b)。その結果、対称性の高い (側鎖の長い) 脂質は、より高粘性なLNPを形成する傾向があることが明らかとなった。具体的には、CL4F 9-7 (側鎖が長い) および CL4F 14-2 (側鎖が短い) は、直鎖脂質 CL4F 16-0 と比較して、それぞれ1.76倍および1.29倍の粘性上昇を示した。この結果は側鎖が長いほど脂質の分子運動が制限されることを示唆している。さらに、総炭素数 (C10-C26) が異なる完全対称の脂質から調製した8種類のLNPの粘性を比較した (Figure 12c)。その結果、総炭素数の多い脂質は高粘性なLNPを形成する傾向があった。具体的には、CL4F 6-4 (C10) と比較すると、CL4F 14-12 (C26) と CL4F 9-7 (C16) はそれぞれ1.96倍および1.47倍の粘性を示した。

このように、LNP 内部の粘性はイオン性脂質の分岐構造（対称性と総炭素数）に依存している傾向があったため、重回帰分析を行った結果、粘性と分岐構造（対称性と総炭素数）の間には相関関係が認められた ($R^2=0.837$) (Figure 12d)。更に因子分析の結果は、対称性と総炭素数の両方が粘性に有意に寄与することを明らかとした (Table 2)。32 種類の脂質について、回帰した粘性値を等高線図として可視化した (Figure 12e)。

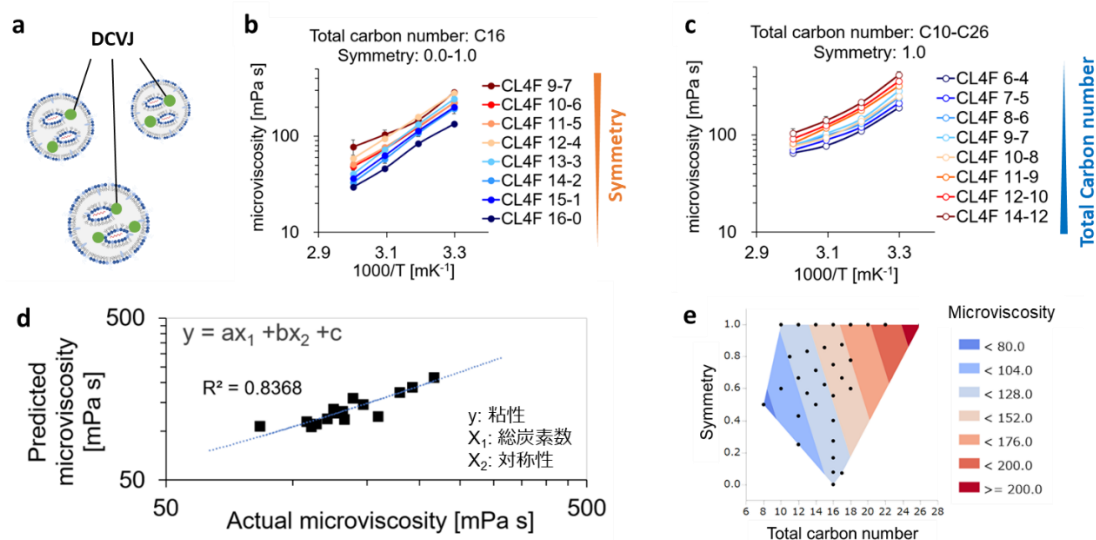


Figure 12 DCVJ による LNP 内部の粘性評価。(a) DCVJ 修飾 LNP を調製し、各温度における蛍光スペクトルと吸光スペクトルを測定した。(b) 総炭素数が同じである一方、対称性が異なる分岐脂質 8 種類の LNP の粘性値。(c) C10-C26 の範囲で総炭素数が異なる完全対称脂質 8 種類の LNP の粘性値。(d) 重回帰分析における高い相関係数 ($R^2 = 0.8368$) は、40°C における LNP 内部の粘性値 (Y) が総炭素数 (X_1) と対称性 (X_2) に依存することを示唆している。(e) 重回帰式から算出した 32 種類の脂質の粘性値を、分岐構造に対してプロットして等高線図を作成した。

Table 2 重回帰分析に基づく因子分析結果

	Coefficient	SE	t-value	p-value
Intercept	-0.222	17.992	-0.012	0.99031
total carbon number	6.763	1.034	6.542	0.00002
symmetry	38.993	9.845	3.961	0.00163

2.2.4 LNP 内部の粘性と物理化学的性質の関係性

回帰した粘性値を各 LNP の物性に対してプロットすると、高粘性の LNP は粒子径が小さく、PDI が低く、封入率が高いという明確な傾向が見出された (Figure 13a-c)。粘性が 120 mPa s を下回ると、各物性値が悪化した。意外なことに、LNP の粘性値と見かけの pKa の間

にも強い相関が見いだされた (Figure 13d)。限られた種類の脂質の比較ではあるが、直鎖足場と比較して、分岐足場のイオン性脂質は LNP の見かけの pKa を低下させるというデータを筆者らは過去に報告しており^[49]、Figure 13d が示す高粘性な (分岐構造を有する) LNP は見かけの pKa が低いという結果と一貫している。イオン性脂質は第 3 級アミンなため、分子としての本来の pKa は 9~11 付近であり^[98]、イオン性脂質の pKa を ChemDraw で予測すると、MC3 の pKa は 9.45、CL4F (本脂質ライブラリ) の pKa は足場構造に依らず 10.20 と算出される。しかしながら、粒子化されたイオン性脂質同士は近接するため、電荷反発が斥力となり、イオン性脂質がプロトン化することはエネルギー的に不利である。そのため、プロトン化しない方向に平衡が移動しやすく、LNP 全体を 1 分子として考える見かけの pKa はイオン性脂質本来の pKa よりも低下する^[99-101]。LNP 内部の粘性が高い、即ち脂質分子の運動性が低い場合、頭部の第 3 級アミンが上述の電荷反発を逃れにくいため見かけの pKa が低下したと推察された。

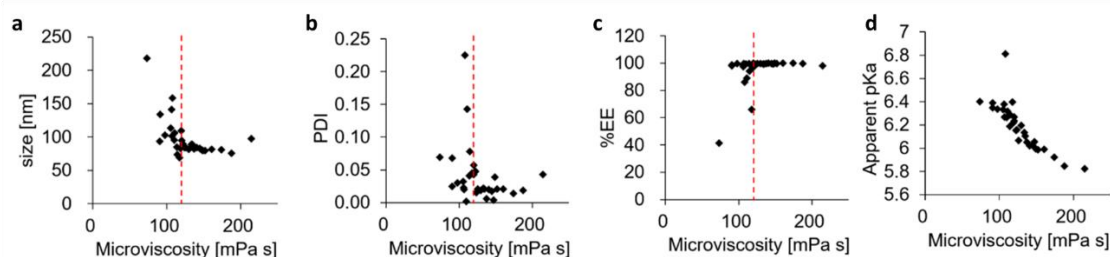


Figure 13 LNP 内部の粘性と物理化学的性質の関係性。粘性が 120 mPa s (赤色の破線) を超える LNP は、(a) 粒子径が小さく、(b) PDI が狭く、(c) mRNA 封入率が高いことが見出された。(d) 粘性値と見かけの pKa の間には相関関係が認められた。

2.2.5 LNP 内部の粘性が保存安定性に与える影響

実用化を見据えた場合、mRNA-LNP の長期保管安定性は重要な課題である。mRNA-LNP が保存後も機能を維持するためには、mRNA と脂質の化学的劣化、および LNP の物理的劣化を防がなければならない。化学的な劣化という観点では、mRNA は加水分解、酸化、トランスエステル化により活性を失い、脂質は加水分解や酸化を受ける可能性がある^[102-105]。物理的な劣化を防ぐためには、加熱や凍結融解の繰り返しを避けるべきという知見は得られているが、脂質の化学構造が LNP の長期保管安定性に与える影響については十分に理解されていない。また、LNP を長期保管した後の物理的劣化を類推する指標は報告されていない。

粘性は自由に拡散しようとする脂質の分子運動の指標であることから、今回測定した粘性値が LNP の長期保管安定性を推測する指標になるのではないかと考えた。そこで、LNP を様々な温度 (4°C、25°C、40°C) で保管し、物性を最大 90 日間経時的に評価した (Table 3)。その結果、予想通り、CL4F 15-1 や CL4F 14-2 などの粘性の低い LNP は、時間の経過と

ともに粒子径と PDI が徐々に増加し、mRNA は LNP から漏出することが示された。粘性が LNP の長期安定性に与える影響をより明確にするために、40°C・1 ヶ月間保存後の物性値に対して粘性値をプロットした (Figure 14a-c)。その結果、高粘性な LNP は 40°C加熱条件下においても物性が維持され、その閾値が約 150 mPa s であることが見出された。初期物性における粘性の閾値と比較して、40°C・1 ヶ月間保存後における粘性の閾値はより高い値となっているが、加熱によって分子の運動性が増加することを考慮すると自然な結果だと考えられる。

Table 3 各温度 (4°C、25°C、40°C) で一定期間保管後の LNP の物理化学的性質 (粒子径・PDI・封入率)

	Day	4°C				25°C		40°C		
		0	14	30	90	7	30	3	7	30
CL4F 6-2	Size [nm]	218.2	227.3	233.7	231.4	227.3	232.1	234.9	232.7	222.0
	PDI	0.07	0.10	0.09	0.12	0.06	0.11	0.11	0.11	0.20
	EE [%]	41.4	68.0	65.6	68.0	66.3	66.9	64.9	71.0	62.3
CL4F 7-5	Size [nm]	109.8	113.7	133.5	116.5	107.5	116.8	118.9	127.9	206.1
	PDI	0.06	0.03	0.02	0.05	0.04	0.002	0.04	0.06	0.11
	EE [%]	99.9	99.6	99.6	99.7	99.4	98.9	93.5	83.1	29.2
CL4F 8-4	Size [nm]	101.6	103.3	102.7	105.2	102.3	106.3	106.3	107.7	205.4
	PDI	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.02	0.05	0.13
	EE [%]	99.7	99.6	99.6	99.4	99.0	97.7	95.9	87.6	52.2
CL4F 9-3	Size [nm]	102.8	109.2	109.4	112.7	104.6	112.1	138.3	162.8	226.3
	PDI	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.01	0.12	0.13	0.10
	EE [%]	99.6	99.4	99.4	99.1	99.3	98.4	82.3	65.6	17.6
CL4F 10-2	Size [nm]	93.6	98.6	103.1	107.1	99.1	109.7	171.5	209.7	278.2
	PDI	0.07	0.08	0.06	0.08	0.15	0.22	0.17	0.16	0.18
	EE [%]	98.6	98.1	97.8	98.2	97.6	96.9	53.7	39.3	6.8
CL4F 8-6	Size [nm]	88.8	89.4	89.0	88.4	88.7	91.8	88.1	92.4	126.2
	PDI	0.02	0.01	0.03	0.05	0.03	0.02	0.02	0.007	0.15
	EE [%]	99.4	99.4	99.3	99.3	99.3	98.7	98.2	98.4	76.6
CL4F 10-4	Size [nm]	84.9	85.9	85.2	85.8	84.6	89.1	106.5	114.1	152.3
	PDI	0.04	0.04	0.05	0.03	0.05	0.03	0.05	0.04	0.14
	EE [%]	99.8	99.3	99.1	99.2	99.1	98.8	95.8	93.8	73.7
CL4F 10-5	Size [nm]	84.6	86.3	85.1	84.3	97.3	101.9	89.9	89.7	98.9
	PDI	0.02	0.02	0.04	0.02	0.10	0.12	0.03	0.07	0.07

	EE [%]	99.7	99.4	99.3	99.4	92.5	92.2	97.8	97.2	93.7
CL4F 9-7	Size [nm]	81.3	82.1	82.2	81.3	86.1	89.6	83.7	82.1	82.9
	PDI	0.004	0.06	0.05	0.02	0.06	0.05	0.05	0.02	0.05
	EE [%]	99.2	98.9	98.9	99.1	97.4	97.1	98.9	98.4	98.7
CL4F 11-5	Size [nm]	81.8	81.1	81.1	78.1	81.1	82.4	85.5	92.4	129.4
	PDI	0.02	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03	0.07	0.12	0.21
	EE [%]	99.6	99.3	99.3	99.3	99.6	99.4	99.4	99.2	97.0
CL4F 12-4	Size [nm]	84.5	86.6	85.3	84.3	87.1	93.7	101.8	101.1	164.3
	PDI	0.02	0.08	0.09	0.05	0.05	0.08	0.06	0.07	0.25
	EE [%]	99.0	98.6	98.5	98.6	98.0	96.7	94.3	94.3	55.4
CL4F 13-3	Size [nm]	83.0	90.8	98.9	95.4	126.0	155.4	113.5	110.8	152.1
	PDI	0.04	0.19	0.24	0.23	0.26	0.19	0.20	0.12	0.49
	EE [%]	96.3	92.9	90.9	91.1	79.0	67.6	81.3	80.8	75.8
CL4F 14-2	Size [nm]	74.0	85.2	108.1	101.5	130.7	169.1	115.6	120.5	164.5
	PDI	0.08	0.26	0.31	0.30	0.40	0.35	0.20	0.17	0.19
	EE [%]	94.0	89.3	84.4	87.0	74.7	64.2	75.2	75.1	57.6
CL4F 10-7	Size [nm]	79.6	80.3	78.3	78.7	84.6	95.9	81.8	80.9	82.9
	PDI	0.04	0.01	0.03	0.004	0.06	0.11	0.03	0.02	0.02
	EE [%]	99.8	99.8	99.8	99.9	98.4	95.5	99.7	99.5	99.3
CL4F 11-6	Size [nm]	84.5	83.2	82.1	80.4	82.5	88.0	86.8	88.3	90.3
	PDI	0.02	0.05	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04
	EE [%]	99.8	99.8	99.9	100.0	99.8	99.1	99.6	99.6	99.3
CL4F 16-1	Size [nm]	69.0	98.2	96.1	107.7	98.0	98.7	1281	1962	5110
	PDI	0.05	0.14	0.16	0.17	0.18	0.20	0.39	0.05	1.00
	EE [%]	65.9	63.3	63.9	67.7	60.9	57.2	58.0	51.1	53.5
CL4F 10-8	Size [nm]	82.0	82.1	82.6	81.7	82.0	83.4	84.6	84.1	86.0
	PDI	0.02	0.03	0.003	0.01	0.02	0.03	0.03	0.003	0.05
	EE [%]	99.8	99.8	99.4	100.0	99.9	99.8	99.8	99.9	99.7
CL4F 11-7	Size [nm]	79.4	79.9	79.9	78.4	81.1	82.7	86.7	85.9	87.8
	PDI	0.02	0.04	0.06	0.01	0.06	0.07	0.06	0.08	0.06
	EE [%]	99.7	99.5	99.4	99.8	99.6	99.5	99.5	99.5	99.4
CL4F 11-9	Size [nm]	81.1	80.3	79.3	80.3	82.1	83.0	82.2	82.6	82.0
	PDI	0.01	0.04	0.03	0.006	0.01	0.07	0.01	0.02	0.04
	EE [%]	99.8	99.8	99.8	99.9	99.8	99.5	99.8	99.7	99.6
CL4F 12-10	Size [nm]	75.8	77.1	76.8	76.5	79.9	82.7	85.8	84.7	82.8

	PDI	0.02	0.06	0.03	0.07	0.06	0.08	0.05	0.06	0.07
	EE [%]	99.6	99.5	99.4	99.5	99.5	99.2	99.5	99.4	99.5
CL4F 10-6	Size [nm]	82.6	84.0	81.6	82.1	88.1	98.7	85.0	84.3	87.0
	PDI	0.01	0.02	0.003	0.03	0.04	0.08	0.01	0.02	0.07
	EE [%]	99.6	99.6	99.6	99.8	97.3	93.8	98.7	98.5	98.1
CL4F 6-4	Size [nm]	141.1	149.7	150.5	153.5	150.4	147.9	153.9	163.7	170.6
	PDI	0.02	0.05	0.008	0.05	0.02	0.05	0.06	0.09	0.18
	EE [%]	97.2	98.4	99.0	98.6	98.4	99.0	94.2	70.9	58.9
CL4F 7-3	Size [nm]	133.9	145.5	146.8	156.1	147.5	149.1	150.3	165.3	178.5
	PDI	0.03	0.07	0.03	0.06	0.06	0.07	0.05	0.10	0.11
	EE [%]	98.1	98.6	99.1	98.4	98.4	98.8	78.9	60.9	52.4
CL4F 7-4	Size [nm]	113.5	121.3	125.3	138.5	119.6	128.2	118.6	125.6	194.1
	PDI	0.03	0.04	0.06	0.05	0.05	0.04	0.05	0.06	0.10
	EE [%]	98.8	99.0	99.2	99.2	97.7	97.7	96.7	93.6	69.4
CL4F 8-5	Size [nm]	94.6	96.4	93.5	99.6	94.3	97.8	96.1	97.1	96.4
	PDI	0.04	0.03	0.05	0.02	0.04	0.05	0.02	0.05	0.03
	EE [%]	99.1	99.3	99.2	99.5	98.7	98.4	99.1	98.5	98.3
CL4F 9-4	Size [nm]	95.2	95.9	94.8	98.9	96.2	98.7	96.3	99.1	131.7
	PDI	0.002	0.04	0.01	0.04	0.03	0.04	0.02	0.06	0.12
	EE [%]	99.1	99.2	99.1	99.5	98.7	98.7	97.7	97.2	88.3
CL4F 9-5	Size [nm]	89.4	88.8	87.8	91.3	90.6	98.0	89.5	90.5	88.0
	PDI	0.05	0.06	0.04	0.03	0.03	0.08	0.02	0.01	0.01
	EE [%]	99.0	99.2	99.1	99.6	98.0	97.1	98.6	98.7	98.8
CL4F 9-6	Size [nm]	89.1	88.9	85.4	91.0	87.5	88.7	88.7	90.3	87.3
	PDI	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.08	0.02	0.004	0.01
	EE [%]	99.1	99.4	99.0	99.7	99.0	98.9	98.9	99.1	99.2
CL4F 16-0	Size [nm]	158.3	160.6	157.3	250.3	163.8	178.1	191.9	200.8	243.3
	PDI	0.23	0.25	0.29	0.41	0.21	0.32	0.12	0.13	0.17
	EE [%]	86.2	91.4	85.1	96.0	93.9	93.9	86.3	84.7	90.8
CL4F 12-6	Size [nm]	82.8	82.8	81.7	81.9	86.3	94.8	82.3	83.6	82.0
	PDI	0.01	0.04	0.05	0.02	0.06	0.08	0.04	0.03	0.03
	EE [%]	99.7	99.5	98.9	99.9	97.8	98.0	99.0	99.0	99.1
CL4F 15-1	Size [nm]	106.4	113.2	117.5	125.4	113.9	122.2	152.2	174.4	476.6
	PDI	0.14	0.13	0.15	0.15	0.15	0.13	0.34	0.33	0.56
	EE [%]	88.9	85.5	82.0	70.3	87.2	87.9	66.3	45.7	11.0

CL4F 14-12	Size [nm]	97.4	101.0	104.0	105.0	96.5	99.6	99.9	96.8	98.5
	PDI	0.04	0.02	0.03	0.05	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01
	EE [%]	97.8	98.6	97.1	99.4	99.4	97.9	98.6	99.5	98.6

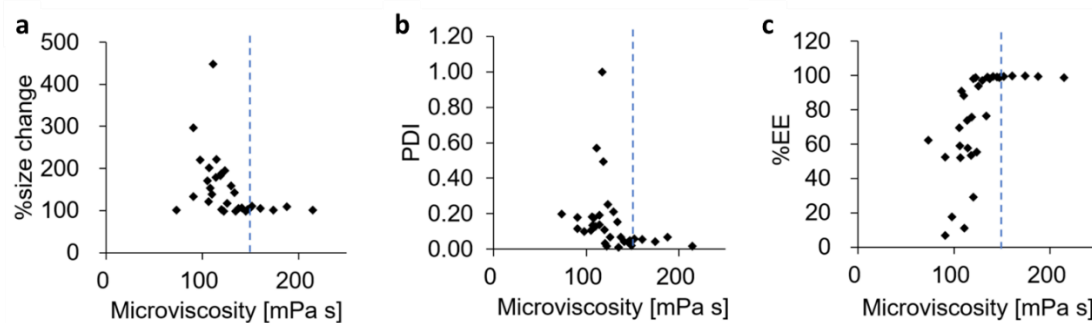


Figure 14 LNP 内部の粘性と 40°Cで 30 日間保存後の物性の関係性。粘性が 150 mPa s (青色の破線) を超える LNP は、(a) 粒子径変化が少なく、(b) 低い PDI が維持され、(c) mRNA が漏出しないことが見出された。

2.3 考察

LNP の物性と活性を紐付ける研究は世界中で行われており、粒子径や pKa は LNP の動態を決める代表的な物性パラメータである。また、パラメータを制御する研究も進んでおり、例えば粒子径は粒子作製条件で制御可能であり、pKa はカチオン性脂質やアニオン性脂質を LNP へ一部配合することで制御可能である。

しかしながら、イオン性脂質の化学構造が LNP の物性に与える影響についての報告は非常に限られている。本研究では、足場の分岐構造が連続的に異なる脂質群から LNP を作製することで、足場の化学構造が LNP の物性に与える影響を見出すことができた (Figure 10)。分岐構造のパラメータの 1 つである総炭素数は脂質の logP 値と相関することから、総炭素数が多い脂質を使用した場合、脂質同士の相互作用が強固になり、封入率が高く、均一で小さい粒子が形成されたと考察できる。もう 1 つのパラメータである対称性も物性への影響が認められたが、そのメカニズムは LNP 内部における脂質分子の運動性から説明可能であると仮説を立てた。本研究では、LNP 内部の粘性という観点から実験的な検証を試みた。

ナノスケールの粘性を測定する手法として分子ローターを利用した。代表的な分子ローターとして DCVJ や BODIPY-C₁₂ が有名だが、イオン性脂質との静電的相互作用による測定値への影響を排除するために DCVJ を採用した (Figure 11a)。また、DCVJ は水溶性が低い (logP=3.38, ChemDraw による予測値)、LNP へ挿入される可能性が高く、実際 Chwastek らは殆どの DCVJ がリポソームに封入されていることを確認している^[94]。

検量線から LNP 内部の粘性の絶対値を算出でき、例えば炭素数 C16 の直鎖脂質 CL4F 16-0 LNP の粘性は、30°C で 134.6 mPa s、40°C で 83.6 mPa s、50°C で 46.1 mPa s であり (Figure 12b)、グリセロール/メタノール混合溶液の体積比で表すと 80:20 程度の粘性値である。この値の妥当性の検証を試みたが、LNP 内部の粘性測定を試みた研究を確認できなかった。そこで、CL4F 16-0 と同じ炭素数 C16 かつ直鎖のリン脂質 DPPC からなるリポソームの粘性値と比較した^[94]。Chwastek らは DCVJ を分子ローターとして利用し、DPPC/コレステロールリポソーム (モル比 1:1) の 30°C における粘性は 105 mPa s であると報告している。また、S.K. Han らは、ピレンのエキシマー発光とモノマー発光の比が濃度や粘性に依存することを利用し、DPPC リポソームの粘性は 25°C で 129 mPa s であると報告しており^[106]、CL4F 16-0 LNP 内部の粘性値と大きな矛盾は確認されなかった。

重回帰分析の結果、分岐構造のうち対称性と総炭素数の 2 つのパラメータの両方が LNP 内部の粘性に有意に寄与することを見出した (Table 2)。また、LNP 内部の粘性と LNP の物性が関連していることを見出した (Figure 13)。また、低粘性 LNP の物性は経時変化しやすいという新たな知見も得られた (Figure 14)。以上の結果をまとめると、イオン性脂質の化学構造が LNP 内部の粘性に寄与し、その結果粒子調製直後や長期保管後の LNP 物性が変化すると理解できる。ただし、更に詳細を確認すると、イオン性脂質の分岐構造が LNP の物性に与える影響は、粒子調製直後と長期保管後で少し異なっており、粒子調製直後の物性は総炭素数の影響が大きく、長期保管後の物性は対称性の影響が大きくなる傾向がある

(Figure 15)。粒子調製時、エタノールに溶けた脂質はマイクロ流路内で緩衝液によって急速に希釈され、極性上昇に伴い自己集合する。このように LNP の形成は極性上昇がトリガーとなって起こるため、脂質の logP 値は粒子形成にとって重要である。そのため、LNP 調製直後の物性に対しては、脂質の logP 値（総炭素数）の寄与が大きいと予想される。一方で、LNP 内部の粘性、つまり分子運動は、LNP の構造維持を担うファンデルワールス力に相反する力であり、分子運動が高まるほど LNP の崩壊や LNP 同士の融合が加速する。実際、相転移温度 (T_m) 以上でリポソームを保管するのは難しいのはこのためである。したがって、長期保管後の物性に対しては分子運動の寄与が大きい、つまり対称性の影響がより強くなると予想される。

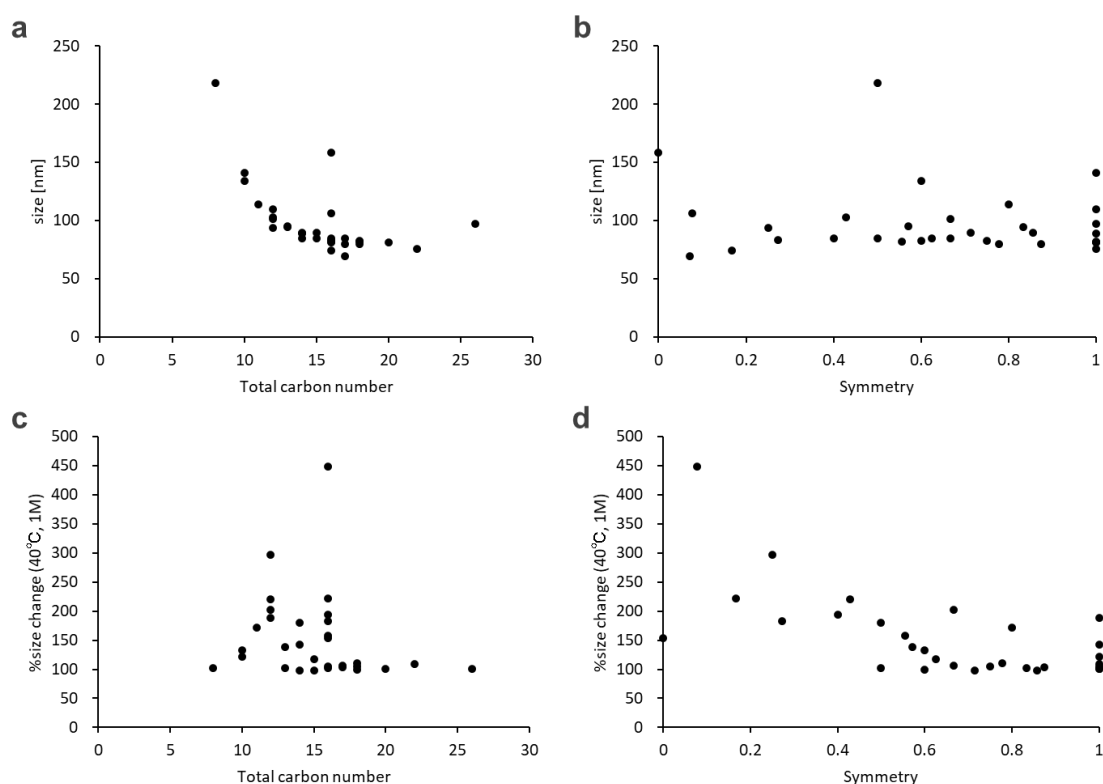


Figure 15 粒子径と化学構造の関係性。(a, b) LNP 調製直後の粒子径は総炭素数の影響を受けやすい傾向がある。(c, d) LNP を 40°C・1 か月保管した後の粒子径は対称性の影響を受けやすい傾向がある。

総炭素数が短い脂質 (CL4F 6-2、7-3、7-4) や対称性が低い脂質 (CL4F 10-2、13-3、14-2、16-1、15-1、16-0) 以外の脂質を使用した LNP の粒子径は、4°C で 90 日間保存した後でも $\pm 10\%$ 以内の変動であった。上市されている COVID-19 に対する mRNA-LNP ワクチンでは、Moderna 社製は -25~-15°C 保存で 9 か月 (解凍後 2~8°C で 30 日)、Pfizer/BioNTech 社製は -90~-60°C 保存で 18 か月 (解凍後 2~8°C で 10 週) の有効期限となっている。よって、上市製剤と比較して、本研究で合成された脂質のうち総炭素数が多く対称性が高いものは一定の水準

を満たしていると考えられる。本研究では LNP の物理的な劣化に着目して保存安定性を検討したが、mRNA-LNP が保存後も薬効を示すためには、mRNA と脂質の化学的劣化も防がなければならない。mRNA は 2'-OH 基によるリン酸ジエステル結合の加水分解、酸化、トランスエステル化により活性を失う。脂質も同様に、加水分解や酸化する可能性がある。さらに、mRNA-LNP が保存後に活性を失う新たな様式として、イオン性脂質の酸化によって生じる N-oxide 体が加水分解して生じたアルデヒドは LNP 内で mRNA の塩基に共有結合で付加するという報告が 2021 年になされた^[107]。イオン性脂質合成時のアルデヒドは Biotage 社や SiliCycle 社の求電子スカベンジャーなどを利用して除去可能であるが、イオン性脂質の N-oxide 体はイオン性脂質と性質が似通っているため完全な除去は難しい。その上、LNP 中で N-oxide 体からアルデヒドが産生することを回避するのは容易ではない。N/P 比 10 の Fluc mRNA-LNP の場合、イオン性脂質に 0.00518%の不純物アルデヒドが含まれるだけで、mRNA とアルデヒドは理論上等モルになる。また、1 分子の mRNA へ不純物アルデヒドが付加する確率や加水分解する確率は mRNA が長ければ長いほど高まる。近年、長鎖 mRNA の医薬品応用も進んでおり、self-amplifying RNA (saRNA) タイプのコロナワクチンの臨床試験も既に実施されている^[108-110]。これらの技術により、更に低用量での薬効を期待できるが、保存安定性の担保はより難しくなると予想される。イオン性脂質の酸化抑制、Tris 緩衝液の使用によるアルデヒドの捕捉^[111,112]、凍結乾燥製剤化^[17,113]、RNA の 2 次・3 次構造の制御による加水分解抑制^[114]を含む様々な技術を組み合わせていく必要があると考えられる。

2.4 小括

本章では、イオン性脂質の分岐構造が LNP の物理化学的性質に与える影響を調べた。分岐構造がそれぞれ異なる 32 種類の α 分岐脂質から mRNA-LNP を調製し、各 LNP の物理化学的性質を比較した。その結果、脂質組成や製剤工程が同一であるにもかかわらず、イオン性脂質の足場構造に依存して LNP の物理化学的性質は変化した。具体的には、足場の分岐構造のうち、総炭素数の増加は、粒子径の低下、均一性の向上および mRNA 封入率の向上に寄与した。この傾向は脂質分子の $\log P$ 値に基づく、脂質同士の相互作用の強弱に起因していると考えられる。また、分岐構造の対称性の増加は、粒子径の低下、均一性の向上および mRNA 封入率の向上に寄与したが、分岐構造の対称性は脂質分子の $\log P$ 値に影響を与えないため、分岐構造の対称性が LNP の物性に寄与したメカニズムの理解を試みた。

脂質足場の分岐鎖は脂質分子の側方拡散や回転運動を遅くするという知見に基づき、イオン性脂質の分岐鎖によって生じる分子運動の制限はナノ粒子を安定化させ、その結果、mRNA 封入率が高く、均一で小さな粒子が形成されたと仮説を立てた。LNP 内部における分子運動を直接評価することは困難なため、LNP 内部の粘性を実験的に評価することで、分岐鎖の役割の検証を試みた。LNP 内部というナノスケールの粘性を測定するために、蛍光プローブの DCVJ を利用した。DCVJ で LNP を標識し、分岐構造の異なるイオン性脂質から構成される各 LNP の粘性を比較したところ、対称性の高い（側鎖の長い）脂質は、より高粘性な LNP を形成することが明らかとなった。また、この粘性値が LNP の物性とも相関していることが確認された。したがって、イオン性脂質足場の分岐鎖が LNP 内部で脂質の分子運動を制限した結果、mRNA 封入率が高く、均一で小さな LNP が形成されたという仮説を支持する結果が得られた。

それに加え、低粘性 LNP の物性が経時変化しやすいことも見出された。したがって、LNP 内部の粘性が LNP の長期保管安定性を類推する指標になる可能性も示された。

第3章 イオン性脂質の分岐構造が膜融合活性や mRNA 送達に与える影響

3.1 緒言

LNP が細胞内に取り込まれた後、イオン性脂質はエンドソームの酸性化に伴ってプロトン化する。これにより、LNP と負電荷のエンドソーム膜との相互作用が促進され、膜融合や細胞質への mRNA の放出が可能となる (Figure 16)。また、アミノ基のプロトン消費に伴う対イオン流入や浸透圧上昇がエンドソーム膜を不安定化させるプロトンスポンジ効果の寄与も想定されている。いずれのメカニズムにおいても、エンドソーム酸性化に伴うイオン性脂質のプロトン化は効率的なエンドソーム脱出にとって重要である。したがって、LNP の見かけの pKa はエンドソーム脱出効率に影響を与え、pKa 5.5 以下のような低い見かけの pKa は LNP の核酸送達能を低下させることが知られている^[115,116]。それに加え、2019 年に Hajj らは、イオン性脂質のイオン化能、つまり LNP 中のイオン性脂質が酸性環境でどの程度荷電できるかがエンドソーム脱出能に寄与すると報告した。具体的には、酸性環境下でのイオン化能は脂質の種類によって異なり、その強弱が活性に寄与すると主張した。

本研究の分岐脂質ライブラリから作製された LNP の pKa は 5.85~6.81 と比較的狭い範囲内の変動であり、かつエンドソーム酸性化に伴ってプロトン化しないほど低い値ではないにも関わらず、後述するように *in vivo* での mRNA 発現効率は脂質によって大きく変化した。そこで Hajj らが報告した酸性環境下でのイオン化能の強弱という指標に着目し、イオン性脂質の分岐構造が LNP のエンドソーム脱出効率に与える影響の理解を試みた。

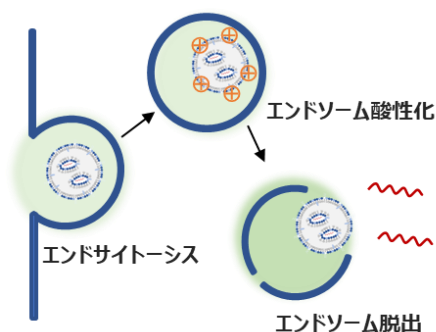


Figure 16 mRNA-LNP のエンドソーム脱出の模式図。

3.2 結果

3.2.1 分岐鎖による LNP のイオン化能の最大化

イオン性脂質の分岐足場がイオン化能の強弱に与える影響を系統的に評価した。LNP の電荷はアニオン性蛍光色素 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid (TNS) で測定できる^[117]。TNS は電荷を帯びた LNP へ静電的相互作用で吸着する。その結果、TNS 周囲の極性が低下すると蛍光を発するようになる (Figure 17a)。

TNS を利用して、分岐鎖の長さが異なる 5 種類の脂質 (直鎖またはメチル分岐—ヘプチル分岐) からなる LNP のイオン化能を酸性環境下で比較した。総炭素数の影響を排除するため、これらの脂質はすべて総炭素数 C16 である。その結果、メチル分岐の CL4F 15-1 は、直鎖の CL4F 16-0 と比較して高いイオン化能力を持つことが確認され、メチル分岐脂質に関する Hajj らの報告と一致する結果であった (Figure 17b) ^[61]。それに加えて、分岐鎖が長い脂質から構成される LNP ほどそのイオン化能が高くなるという新たな知見も得られた (Figure 17b)。また、総炭素数 (C10-C26) の異なる完全対称脂質 5 種類も比較した。その結果、CL4F 14-12 (C26) 以外の完全対称脂質は、イオン化能が高いことが明らかになった (Figure 17c)。また、生理的 pH 下でのイオン化能は、酸性条件下と比較して低い値であった (Figure 17d, e)。以上より、分岐足場の対称性が高く (分岐鎖が長く)、総炭素数が多すぎないイオン性脂質は、高いイオン化能を示すことが見出された。

そのメカニズム理解のため、分岐構造を有するリン脂質は脂質膜のパッキング (充填度) を乱すという知見に着目した。実際、リン脂質足場の分岐鎖は、脂質 1 分子あたりの表面積増加とオーダーパラメータ減少を誘導する^[84,85]。また、Shinoda らは、直鎖のリン脂質 DPPC と比較して、分岐のリン脂質 DPhPC はその疎水鎖の折れ曲がり構造のため、近接する疎水鎖と平行に配列することが困難となり、脂質同士のパッキングが乱れることを示した^[86]。以上の報告を基に、直鎖脂質は密なパッキングによりイオン性脂質同士の距離が近く、電荷反発によってプロトン化しない方向に平衡が移動する一方で、分岐脂質は分岐鎖が密なパッキングを乱すことで生まれるスペースのために電荷反発が緩和されイオン化能が最大化するという仮説が立てられる。

密なパッキングが脂質のイオン化を制限し、分岐鎖はそのパッキングを乱すことでイオン化能が最大化されるという本仮説を検証するため、界面活性剤で LNP を可溶化し、脂質間のスペースを強制的に生みだした。電荷の影響を避けるため、非イオン性界面活性剤である TritonX-100 を LNP に添加し、酸性環境下におけるイオン化能を測定した。その結果、元々イオン化能が高い LNP (対称性が高く、総炭素数が多すぎないイオン性脂質) を可溶化してもイオン化能は変化しない一方で、元々イオン化能の低い LNP (対称性が低い、もしくは総炭素数が多いイオン性脂質) を可溶化したところイオン化能が有意に向上した (Figure 17f, g)。本データは、LNP の密なコンフォメーションがイオン性脂質のプロトン化を制限し、分岐鎖がその密なパッキングを崩す役割を果たしているという上記仮説を支持するものである。

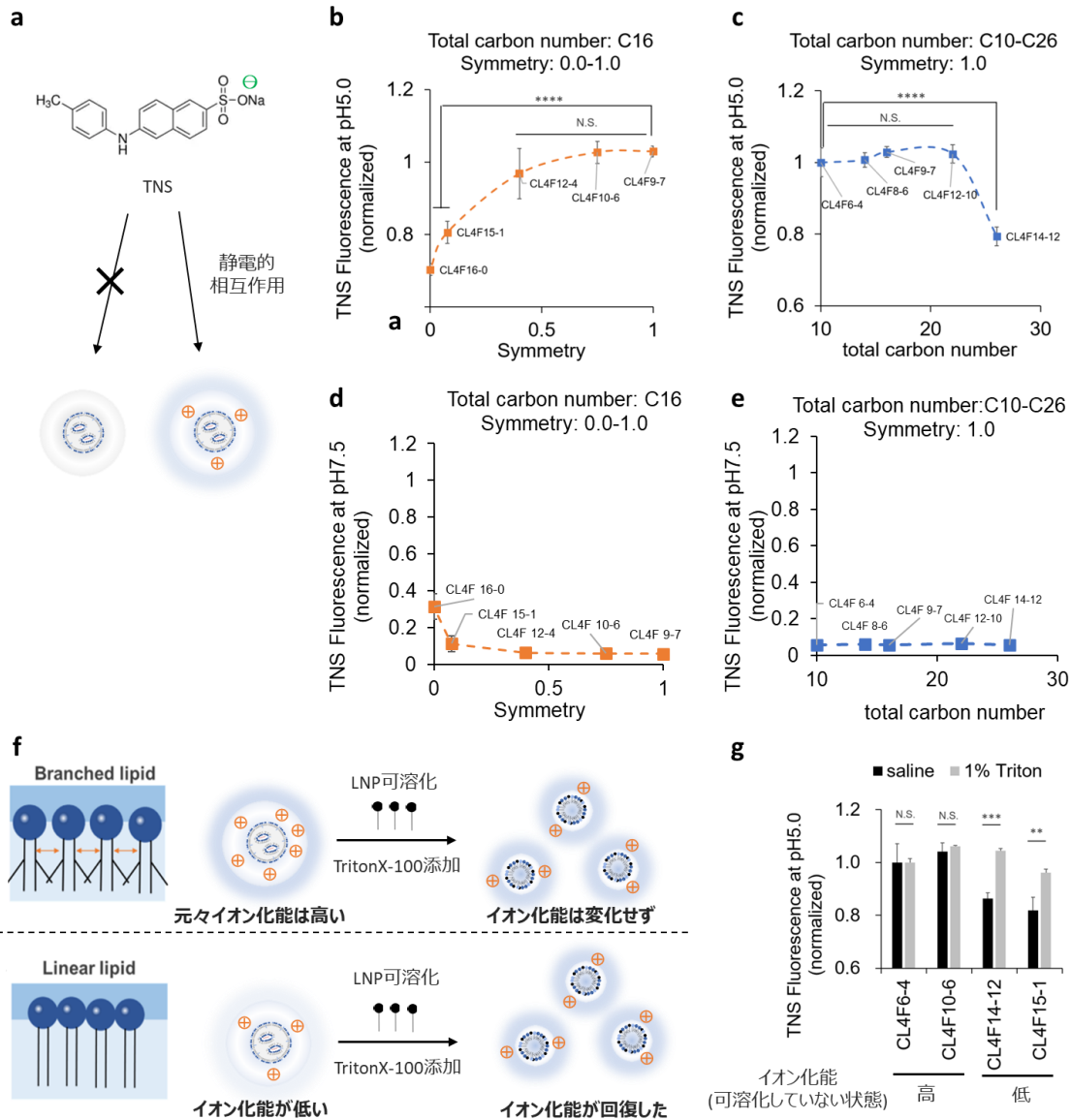


Figure 17 イオン性脂質の分岐構造がイオン化能に与える影響。(a) TNS は電荷を帯びた LNP へ静電的相互作用で吸着した結果、TNS 周囲の極性が低下し蛍光を発する。(b) 同一の総炭素数 (C16) である一方、異なる対称性を有するイオン性脂質 5 種類のイオン化能。(c) 異なる総炭素数 (C10-C26) の完全対称脂質 5 種類のイオン化能。(Ave.±S.D., n=3, one-way ANOVA followed by Dunnett's post-tests (b) vs CL4F 9-7, (c) vs CL4F 6-4, ****: P < 0.0001, N.S.: Not significant) (d, e) pH7.5 における各 LNP のイオン化能を TNS で測定した。TNS 由来の蛍光強度は、Figure 17b, c と同じ尺度で標準化した。(f, g) 各 LNP を TritonX-100 で可溶化し、スペースを生みだした。CL4F 6-4 と CL4F 10-6 については、LNP 可溶化前後で有意差は検出されなかった一方、CL4F 14-12 や CL4F 15-1 のようなイオン化能力の低い脂質はイオン化能が改善された。(Ave.±S.D., n=3, unpaired Student's t-test, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, N.S.: Not Significant)

3.2.2 分岐鎖による LNP のエンドソーム膜破壊能の向上

イオン化能の強弱が脂質足場の分岐構造に依存することが見出された。Hajj らは、イオン化能の高い脂質が優れた *in vivo* mRNA 送達効率を示す理由は、エンドソーム脱出効率が向上するためだと考察していた。そこで実際に、イオン化能とエンドソーム脱出効率の関係性を評価した。本研究では、酸性環境下で赤血球と LNP を混合することで、LNP のエンドソーム膜に対する膜破壊活性を疑似的に評価した。各濃度の LNP を新鮮なマウス赤血球と混合し、pH5.0、37°C、900 rpm の条件で 30 分振とう攪拌し、膜破壊に伴って漏出したヘモグロビン由来の吸光度を測定した (Figure 18a, b)。生理的 pH 下でのイオン化能と膜破壊能は非常に低いため、血液中での LNP の非特異的な相互作用を考慮する必要はほとんどないと予想される (Figure 17d, 17e, 18c)。各脂質の膜破壊能を比較するために、TritonX-100 で膜破壊した時の吸光度を 100% Hemolysis としたときの、50% Hemolysis が誘発される LNP 濃度を算出した。その結果、対称性が高く、総炭素数が多すぎない脂質から構成される LNP は 10 μ M 以下で 50% Hemolysis を誘起した (Figure 18d, e)。さらに、pH 5.0 においてイオン化能と膜破壊能の間に強い相関関係が認められた (Figure 18f)。以上より、分岐鎖が脂質間のパッキングを乱すことで、酸性環境下でのイオン化能が向上し、その結果エンドソーム膜の破壊が促進される可能性が示された。

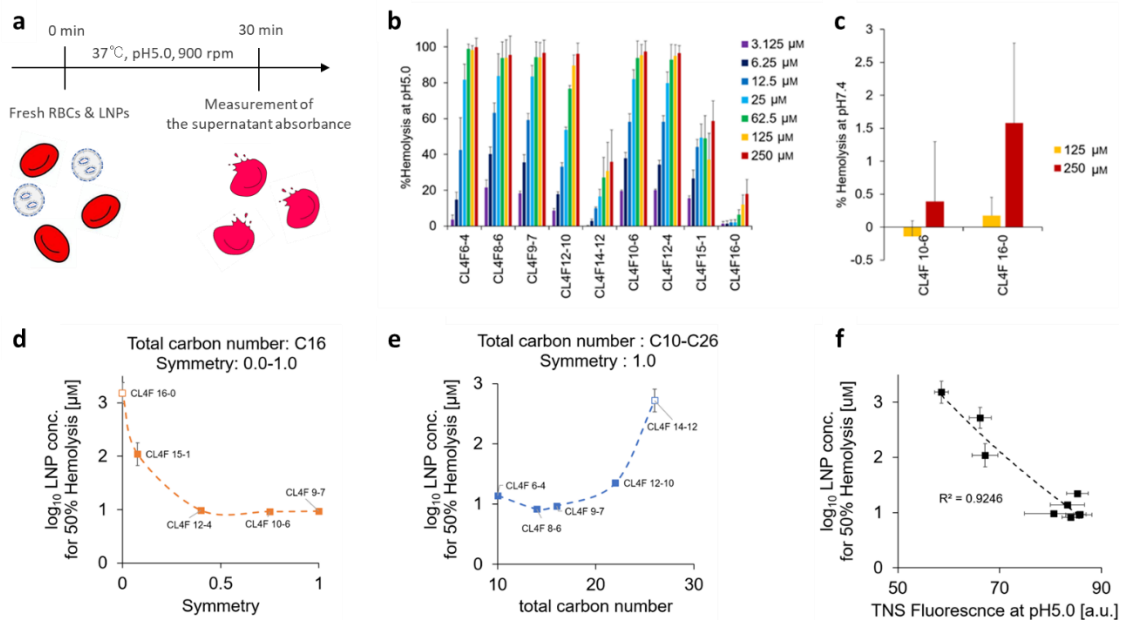


Figure 18 LNP の膜破壊活性評価。(a) 赤血球と LNP を混合し、膜破壊に伴って漏出したヘモグロビン由来の吸光度を測定することで、LNP の膜破壊活性を評価した。(b) 分岐構造が異なる脂質からなる 9 種類の LNP の膜破壊活性。TritonX-100 で膜破壊した時の吸光度を 100% Hemolysis とし、各条件の膜破壊活性を算出した。膜破壊活性は LNP 濃度に依存す

る。(c) 生理的 pH 下では 250 μ M という高濃度の LNP でも膜破壊活性が非常に低い。(d, e) 4-parameter logistic curve fit analysis を利用し、50% Hemolysis を誘起する LNP 濃度を算出した。250 μ M でも 50% Hemolysis を誘導しなかった LNP は、検量線から外挿することで 50% Hemolysis を推定した (該当データは白抜きの四角で表した)。(d) 同一の総炭素数 (C16) である一方、異なる対称性を有するイオン性脂質 5 種類の膜破壊能の比較。(e) 異なる総炭素数 (C10-C26) の完全対称脂質 5 種類の膜破壊能の比較。(Ave. \pm S.E., n=3) (f) イオン化能と膜破壊能の間には強い相関関係が認められた。

3.2.3 LNP の *in vivo* mRNA 送達評価

32 種類のイオン性脂質すべてについて、*in vivo* での mRNA 発現効率を評価した。ホタルのルシフェラーゼ (Fluc) をコードした mRNA 封入 LNP を 0.1 mg kg⁻¹ の用量で静脈内投与した (Figure 19a)。投与 6 時間後に肝臓と脾臓を回収し、その発光強度を *in vivo* imaging system (IVIS) で測定したところ、足場の分岐構造に依存して発光強度が大きく変化することが明らかになった。構造活性相関の理解を容易にするために、対称性と総炭素数の等高線図として可視化した (Figure 19b, c)。本結果は、肝臓と脾臓どちらにおいても対称性の高い脂質が mRNA の発現を促進することを示しており、上述のイオン化能や膜破壊能の結果と一貫していた。さらに、総炭素数 C14-C18 の脂質が肝臓への mRNA 送達において優位であり、総炭素数 C11-C14 の脂質が脾臓への mRNA 送達において優位であることが見出された。この結果は、分岐足場の総炭素数が臓器選択性を制御している可能性を示唆している。

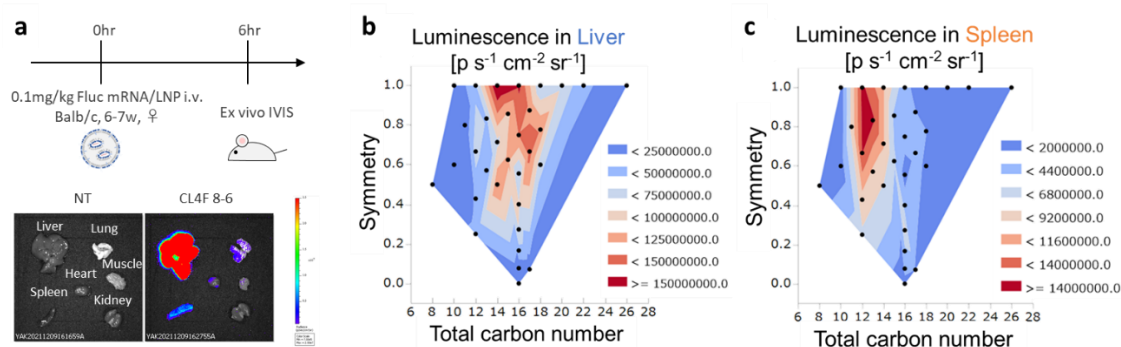


Figure 19 *In vivo* における mRNA の発現。(a) 32 種類の LNP (0.1 mg kg⁻¹ Fluc mRNA) を投与した 6 時間後に肝臓および脾臓の *ex vivo* 生物発光を測定した。(b, c) 発光強度は、X 軸を総炭素数、Y 軸を対称性とした等高線図で表した。(b) 肝臓。(c) 脾臓。(Ave., n=3)

3.2.4 LNP の体内分布評価

各臓器における mRNA 発現量を決定する要因を把握するため、Cy5-mRNA を搭載した LNP 12 種類を静脈内投与し、その生体内分布を評価した (Figure 20a)。イオン性脂質の分岐構造に依存して、肝臓では最大 7500 倍の発光強度の差が確認された一方で (Figure 19b)、肝臓に分布した Cy5-mRNA の蛍光強度は脂質間で最大 2 倍程度の差が存在するのみであり

(Figure 20b)、相関関係も認められなかった (Figure 20c)。本結果は、肝臓での mRNA 発現は LNP の生体内分布で説明できないことを示している。脾臓については、CL4F 6-4 を除き、Fluc 由来の発光強度と Cy5-mRNA 由来の蛍光強度の間に相関関係が認められた (Figure 20b, d)。脾臓での mRNA 発現にとって、生体内分布が重要な因子であることを示唆している。

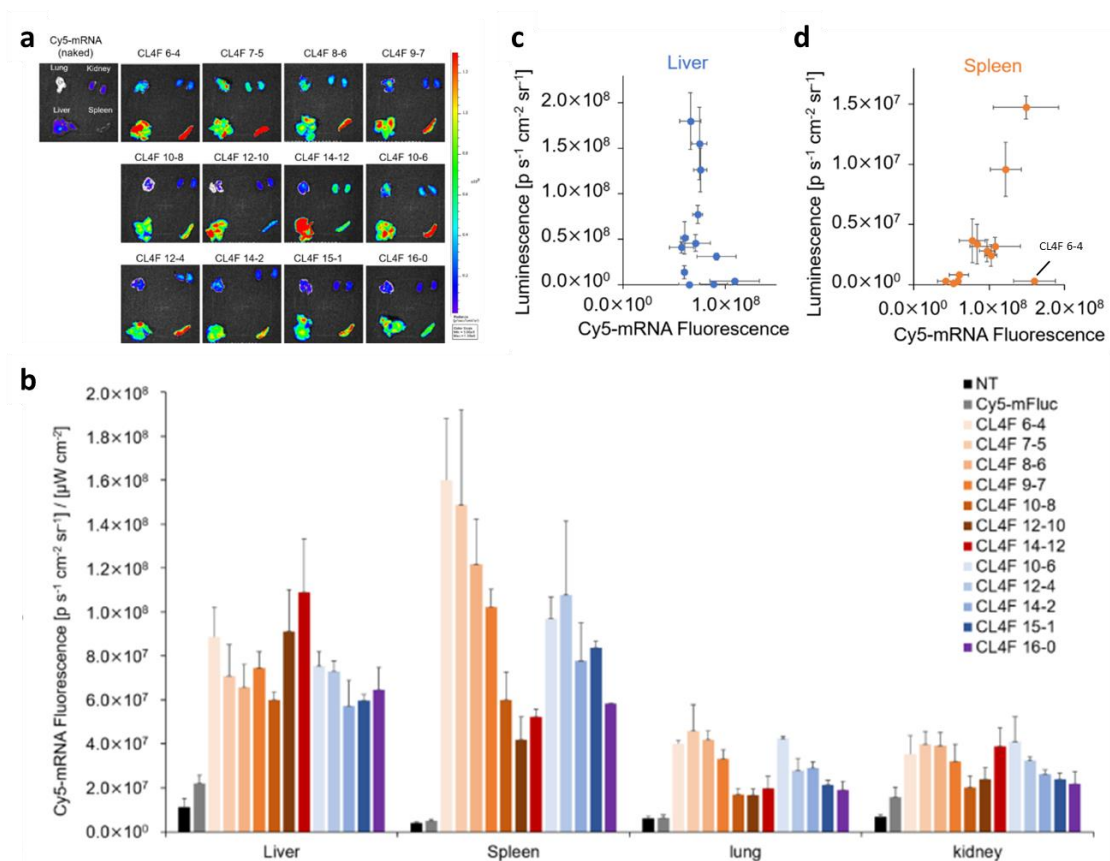


Figure 20 Cy5-mRNA-LNP 投与後の Cy5-mRNA の生体内分布。(a) 12 種類の LNP (0.5 kg^{-1} Cy5 修飾 Fluc mRNA) を投与した 3 時間後に各臓器の *ex vivo* 蛍光強度を測定した。(b) 各臓器について region of interest (ROI) を指定し、単位面積あたりの蛍光強度を算出した。(Ave. \pm S.D., $n=3$) (c) 肝臓において、Fluc 由来の発光強度と Cy5-mRNA 由来の蛍光強度の間には相関関係が認められなかった。(d) 脾臓においては、CL4F 6-4 を除いて、Fluc 由来の発光強度と Cy5-mRNA 由来の蛍光強度の間には相関関係が認められた。

3.2.5 LNP の物理化学的性質と *in vivo* mRNA 送達効率の関係性

肝臓において、mRNA の発現と分布に大きな差が生じる要因を理解するため、LNP の物理化学的性質に着目した。LNP の見かけの pKa は、LNP の *in vivo* での挙動を左右する重要なパラメータであることが知られている。例えば、肝実質細胞に siRNA や mRNA を効率的に送達するためには、6~7 の pKa 値が最適である^[37,76]。本研究で探索した 32 種類の LNP について、見かけの pKa 値と肝臓での発光強度を散布図としてプロットすると、 pKa 5.9~

6.3 の LNP が効率的な mRNA 発現を誘導していることが示された (Figure 21a)。このように、見かけの pKa は *in vivo* での有効性を予測するための有用なパラメータであり、過去の知見と一致している。ただし、pKa 5.9~6.3 の範囲内であっても、発光強度に 10 倍程度の差が生じており (Figure 21a)、pKa だけでメカニズムを説明することはできない。

更に解析を進めたところ、酸性環境での膜破壊活性が mRNA 発現と相関していることが認められ (Figure 21b)、本結果は mRNA の細胞質への送達においてエンドソーム脱出過程が律速段階であるという知見と一致する^[46,47]。例外的に、CL4F 6-4 は効率的に膜破壊するにもかかわらず、mRNA 送達効率が低い (Figure 21b)。*In vitro* 試験では、CL4F 6-4 LNP の細胞内への取り込みは非常に低いことが見出されているため (Figure 21c)、CL4F 6-4 LNP はエンドサイトーシスされにくい可能性が示唆された。

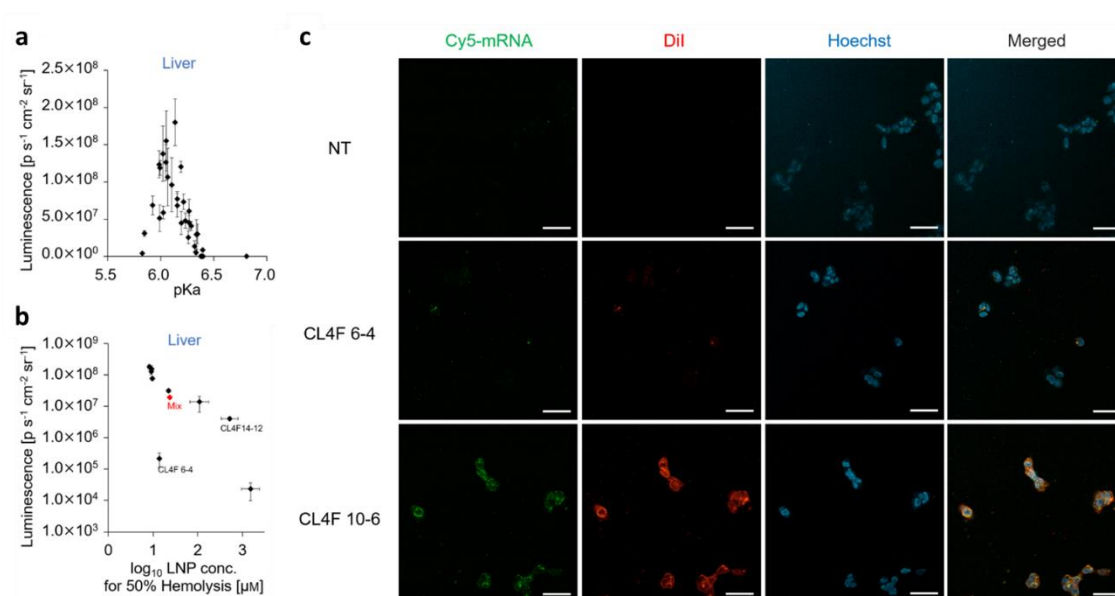


Figure 21 *In vivo* mRNA 送達に対する LNP 物性の影響。(a) pKa は肝臓への mRNA 送達を予測するのに有用なパラメータであったが、それだけでは最適 pKa 領域における発光強度の約 10 倍の差を説明できない。(b) 酸性環境における膜破壊活性は、CL4F 6-4 を除き肝臓での mRNA 発現と相関していることが認められた。赤色の四角は CL4F 6-4 と CL4F 14-12 をモル比 50:50 で混合した LNP を示す。(n=3) (c) Cy5-FLuc mRNA (5 moU) を封入した DiI 標識 LNP を、HEK293 細胞を予め播種したガラスベースディッシュに $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$ で添加した。3 時間インキュベーションした後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy; CLSM) LSM 900 を用いて各 LNP の細胞取り込みを観察した。CL4F 10-6 LNP と比較して、CL4F 6-4 LNP の細胞取り込みが非常に少ない様子が観察された。Cy5 (緑)、DiI (赤)、および Hoechst33342 (青)。(Bars: $50 \mu\text{m}$)

3.2.6 複数のイオン性脂質の混合による *in vivo* mRNA 送達効率の向上

ここまでの検討結果から、分岐足場の化学的な「構造」が、見かけの pKa・イオン化能・膜破壊活性などの LNP の「性質」を決定し、それが生体内における mRNA の「機能発現」に影響を与えると推察できる。分岐構造が LNP の性質と機能を制御するかどうか確かめるため、2種類の完全対称なイオン性脂質 (CL4F 6-4 と CL4F 14-12) を 65:35 から 20:80 (モル比) の範囲で混合した LNP を調製した。LNP の各種性質を測定したところ、CL4F 6-4 の比率が増加するにつれて pKa 値が高くなり、膜破壊活性も増加した (Figure 21b, 22)。加えて、*in vivo* で肝臓における mRNA 発現効率を評価したところ、CL4F 6-4 と CL4F 14-12 をそれぞれ 50%ずつ混合した LNP は、各脂質単独の LNP よりも 10 倍高い効率で mRNA 発現を誘導した (Figure 22)。本データは、足場構造の異なるイオン性脂質の混合することで LNP の特性を精密に制御し、その機能を最大化できる可能性を示している。

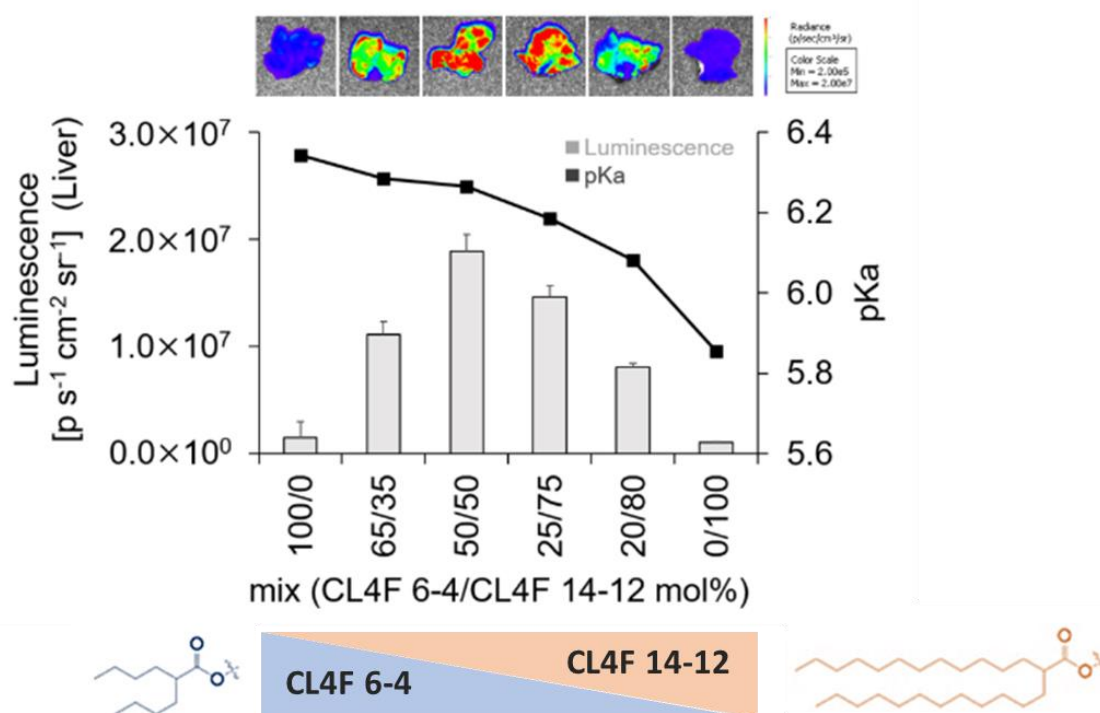


Figure 22 *In vivo* mRNA 送達における "構造-性質-機能" の関係。CL4F 6-4 と CL4F 14-12 を混合した LNP の *in vivo* 評価を行った (0.1 mg kg^{-1} Fluc mRNA)。上段: 投与 6 時間後における *ex vivo* 肝臓由来の発光を観察した。下段: CL4F 6-4 の比率が増加するにつれて pKa 値が増加した。CL4F 6-4 と CL4F 14-12 をそれぞれ 50%ずつ混合した LNP は、各脂質単独の LNP よりも 10 倍高い効率で mRNA 発現を誘導した。(n=3)

3.2.7 EGFP の肝臓内局在評価

CL4F 8-6 は完全対称の足場構造を有する脂質であり、膜破壊能の高い LNP を形成する。

CL4F 8-6 LNP は本脂質ライブラリの中で最も効率的に肝臓での Fluc mRNA の発現を誘導する。4°Cにおける長期保管試験においても、CL4F 8-6 LNP の粒子径・PDI・mRNA 封入率は、分岐鎖の短い CL4F 14-2 LNP と比較して変化せず、保存安定性の観点からも優れている (Figure 23a-c)。これは上述のように、分岐鎖によって回転運動が制限されるためであると考えられる。

肝臓を標的とした LNP は、血中のアポリポタンパク質 E (ApoE) を中心としたプロテインコロナに吸着され、低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) を介して肝実質細胞に取り込まれる^[36,45]。CL4F 8-6 LNP によって肝臓に送達された mRNA がどの細胞で発現しているか把握するために EGFP mRNA を封入した CL4F8-6 LNP 投与後の肝臓内 EGFP 発現を観察した。CLSM による観察の結果、EGFP 由来の蛍光は血管へ殆ど局在していないことが示唆され、mRNA の発現は主に肝実質細胞で用量依存的に起きていると考えられた (Figure 23d, e)。

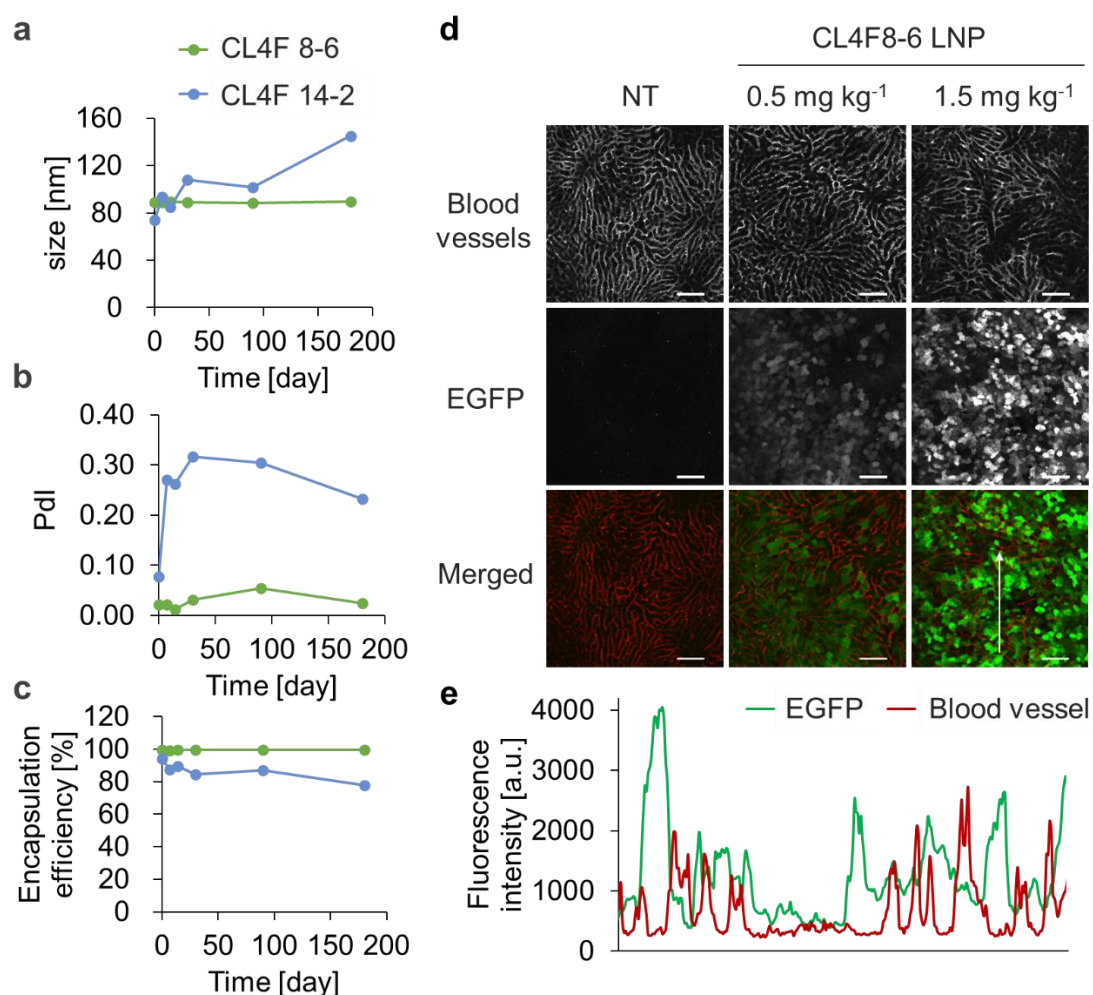


Figure 23 CL4F 8-6 による EGFP mRNA 送達。(a-c) Fluc mRNA 封入 LNP を 4°C保管し、経時的に物理化学的の性質を測定した。(a) 平均粒子径。(b) PDI。(c) mRNA 封入率。CL4F 8-6 LNP は、4°C6 ヶ月保管後も物性は大きく変化しなかった。(d) EGFP mRNA/CL4F8-6 LNP

(0.5 または 1.5 mg kg⁻¹ EGFP mRNA) 投与 24 時間後に EGFP 発現の肝臓内局在を観察した。EGFP (緑)、DyLight649-トマトレクチン (赤, 血管)。Bars: 100 μm (e) 白色矢印によって示された蛍光強度プロファイルは、EGFP が血管と共局在する確率が低いことを示している。

3.2.8 CL4F 8-6 LNP の *in vivo* ゲノム編集への応用

CL4F 8-6 の肝実質細胞における *in vivo* ゲノム編集への適用可能性を検討した。トランスサイレチン (TTR) は、主に肝実質細胞で産生され、血液中に分泌されるタンパク質である。トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー治療において、TTR の発現抑制を意図した siRNA 医薬品は既に承認されており^[38]、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を活用した臨床試験も実施中である^[62]。初めに、Cas9 mRNA と TTR に対する single guide RNA (sgTTR) の投与比率を検討した。Cas9 mRNA と sgTTR を 2 : 1 から 1 : 2 の範囲で異なる比率で同時に封入した CL4F 8-6 LNP をマウスへ静脈内投与し、ELISA で血中 TTR 濃度を測定したところ、Cas9 mRNA/sgTTR = 1 : 2 で封入した LNP が TTR タンパク質を効率的に減少させていた (Figure 24a)。配列特異性を担保し、脂質自体の予期できない影響を排除するために、sgTTR または sgGFP を封入した LNP を比較した (Table 4)。sgTTR 投与群では投与量依存的に血中 TTR 濃度が低下した一方で、sgGFP 投与群では血中 TTR 濃度は変化しなかった。また、合計 RNA 濃度として 2.5 mg kg⁻¹ の LNP 投与 30 日後において、血清 TTR 濃度は 77%減少した (Figure 24b)。加えて、next-generation sequencing (NGS) による DNA シークエンスを行い、ゲノム編集効率を解析した結果、投与量依存的にゲノム編集効率が向上し、2.5 mg kg⁻¹ の単回投与で肝臓において 54%の DNA が編集された (Figure 24c)。一方、脾臓においては、sgTTR 処理群・sgGFP 処理群どちらにおいてもゲノム編集は確認されなかった (Figure 24d)。標的遺伝子座周辺における編集パターンとしては、1 塩基挿入が大部分で、残りは数塩基の欠失であり (Figure 24e)、いくつかの研究で報告された spCas9 によるゲノム編集時のパターンと一致していた^[118,119]。これらの変異はフレームシフトやそれに伴うタンパク質機能の喪失に寄与する。以上のデータは、CL4F 8-6 が長鎖 RNA の送達やゲノム編集に応用できる可能性を示している。

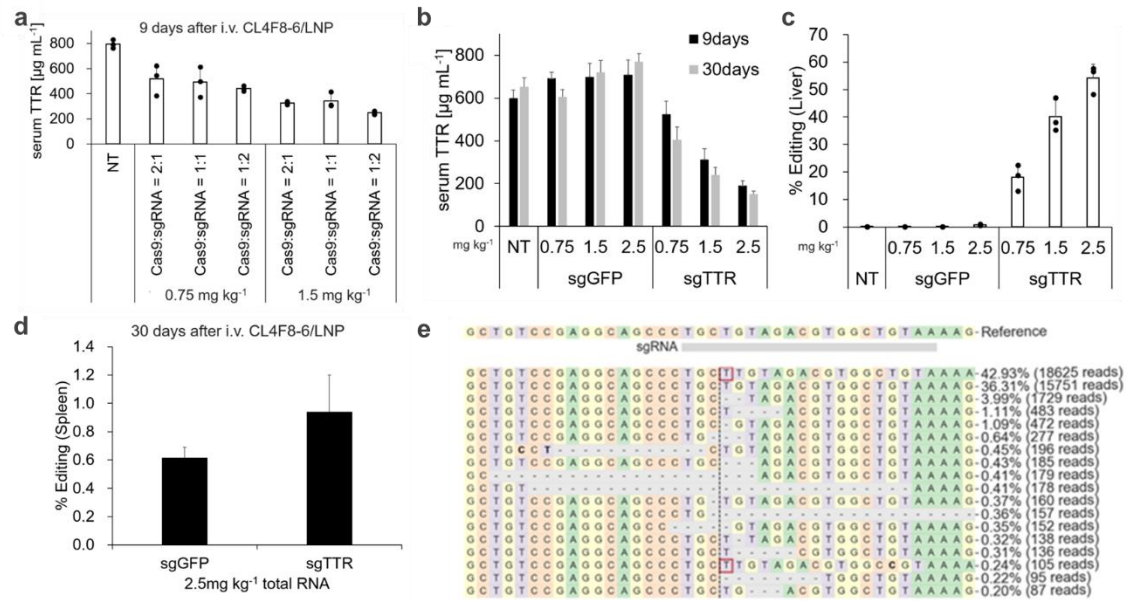


Figure 24 CL4F8-6/LNP の *in vivo* ゲノム編集への応用。(a) Cas9 mRNA と sgTTR を 2 : 1 から 1 : 2 まで異なる比率 (重量比) で投与した。その結果、Cas9 mRNA と sgTTR の比率が 1 : 2 のときに、標的タンパク質が減少しやすい傾向が示された。(b) LNP 投与 9 日後および 30 日後の血清 TTR 濃度を ELISA で測定した。(0.75、1.5 または 2.5 mg kg⁻¹ total RNA、Cas9 mRNA/sgRNA 重量比は 1:2、n=3) (c, d) LNP 投与 30 日後における各臓器の DNA 配列を次世代シーケンサーで決定し、ゲノム編集効率を算出した。n=3 (c) 肝臓、(d) 脾臓。(e) 標的遺伝子座周辺において同定された遺伝子配列の分布を可視化した。各ヌクレオチドは固有の色で示す (A=緑、C=赤、G=黄、T=紫)。置換された塩基は太字で示す。赤色の長方形は挿入された配列を示す。水平の破線は欠失した配列を示す。縦の破線は予想される切断部位を示す。

3.3 考察

細胞に取り込まれた LNP はエンドソームを脱出することで、mRNA を細胞質へ送達できる。LNP がエンドソーム脱出するメカニズムは完全には解明されていないが、有力な仮説として、エンドソーム酸性化に伴い LNP が正電荷を帯びることで、LNP はエンドソーム膜と接近し、ラメラ相から逆ヘキサゴナル相への転移を介して部分的にエンドソーム膜が破壊されると言われている^[120-122]。このエンドソーム脱出効率は数%程度であると見積もられており、本過程が核酸 DDS における律速段階であることが知られている。

Hajj らの報告では、酸性環境下でのイオン化能は脂質の種類によって異なり、その強弱が活性に寄与すると主張された。本分岐脂質ライブラリを活用し、分岐足場がイオン化能に与える影響を系統的に評価した結果、分岐鎖が長い脂質から構成される LNP ほどイオン化能が高くなるという新たな知見が得られた (Figure 17b)。また、総炭素数 (C10-C26) の異なる完全対称のイオン性脂質 5 種類を比較したところ、CL4F 14-12 (C26) 以外の脂質は、イオン化能が高いことが明らかになった (Figure 17c)。この化学構造とイオン化能の関係性は、密なパッキングが脂質のイオン化を制限し、分岐鎖はそのパッキングを乱すことでイオン化能を最大化できるという仮説で説明可能である。仮説検証のため、界面活性剤で LNP を可溶化して、脂質がイオン化するためのスペースを生み出す試験を実施したが、仮説を裏付ける結果が得られた (Figure 17f, g)。

Hajj らは、イオン化能と *in vivo* mRNA 発現に強い相関関係が認められた結果に基づいて、イオン化能の強弱がエンドソーム脱出効率に寄与すると考察していたが、本研究では赤血球膜を利用して、LNP のエンドソーム脱出効率を実験的に検証した。その結果、イオン化能と膜破壊能に強い相関関係が認められ (Figure 18f)、Hajj らの仮説を支持する結果が得られた。更なる理解のためには、FRET 解消を指標とした膜融合活性評価^[123]、培養細胞において細胞内小胞が損傷するとリクルートされる Galectin-8 の顕微鏡観察によるエンドソーム脱出効率評価^[124]、超解像度顕微鏡による蛍光修飾 mRNA とエンドソームコンパートメントの観察^[125]などの様々な評価系で検証を進める必要がある。

また、イオン化能だけではエンドソーム脱出効率を説明しきれないと考えられる。LNP はエンドソーム膜に接近したのち、膜の不安定化や膜融合を誘起する必要がある。そのため、ラメラ相から逆ヘキサゴナル構造への相転移も重要であると考えられ、脂質の液晶構造や脂質分子の立体形状や脂質の流動性に着目した研究も行われている^[120,126,127]。実際、脂質足場の分岐構造はイオン化能だけでなく、相転移にも寄与する可能性がある。エンドソーム膜のリン脂質頭部とイオン性脂質の頭部が静電的相互作用で近づき、分子形状がコーン型の傾向を示すことで、逆ヘキサゴナル構造を安定化し、膜破壊を誘導すると言われている^[36]。直鎖足場と比較して、分岐足場はその分岐鎖のためにコーン型の分子形状であると予想されるため、分岐脂質の分子形状も膜破壊を促進する要因かもしれない。これを検証するためには DSC や NMR により相転移のしやすさについての更なる実験が必要である。また、脂質の鎖長自体も、脂質二重層との親和性という点で、膜融合に影響を与える可能性がある。

例えば、CL4F 14-12 と CL4F 16-0 の膜破壊活性が低いという結果 (Figure 18d, e) は、イオン化能が低いだけでなく (Figure 17b, c)、鎖長が長すぎて脂質二重層との親和性が低いことに起因している可能性がある。

本研究で設計した系統的な脂質ライブラリを活用することで、分岐脂質が保存安定性と膜破壊能を高めるという結果を見出した (Figure 14, 18d, 18e)。そのメカニズムとして、分岐脂質は LNP 中で分子運動が制限され、脂質間のパッキングを乱しているとそれぞれ仮説を立て、仮説を支持するデータが得られている。脂質膜中での分子運動と脂質間パッキングの関係性を、ゲル相と液晶相の相転移温度だけで議論するのであれば、二重結合や分岐鎖による脂質間パッキングの破壊は脂質の分子運動の増加につながり、上述の仮説と矛盾するように思われる。しかし、LNP はコレステロールを含むため明確な相転移温度が観察されず、秩序液体相と呼ばれる液晶相とゲル相の間隔的な性質を持ち、脂質の向きなどの制約はあるものの運動可能な状態である。したがって、直鎖脂質は密にパッキングを形成しても分子回転しており、一方で分岐脂質はパッキングを崩しても、分岐鎖同士が交差することで分子回転が抑制される。実際、Lim らは分岐鎖によるパッキングの破壊と脂質分子の運動性低下は両立すると報告している^[85]。

In silico での実験を活用することで、イオン化能・分子形状・脂質鎖長の膜破壊能への寄与や分子スケールでの脂質運動を可視化できるかもしれない。現代の技術や計算資源をもってしても多数の脂質と高分子の核酸からなる LNP 全体を MD シミュレーションで再現して分子スケールで観察するのは困難であるが、粗視化シミュレーションや脂質膜の一部のみで全原子シミュレーションする取り組みが行われつつある^[128-130]。

CL4F 8-6 の *in vivo* ゲノム編集への応用可能性も評価した。Cas9 mRNA と sgTTR を同時に封入した LNP 単回投与 (2.5 mg kg^{-1}) で 77%のタンパク質低減と 54%のゲノム編集が誘導された (Figure 24b, c)。発現した EGFP の肝臓内分布の実験結果を考慮すると (Figure 23d, e)、CL4F 8-6 LNP は主に肝実質細胞へ mRNA を送達していると考えられる。TTR タンパク質は主に肝実質細胞で発現し、血中に分泌される。本試験ではハイスループット性を考慮し、肝実質細胞以外も含む肝臓全体の DNA を回収してゲノム編集効率を測定したため、タンパク質低減効率とゲノム編集効率に差があるが、肝実質細胞では 77%に迫る効率でゲノム編集が起きていると考えられる。実際 Finn らは、Cas9 mRNA 封入 LNP 投与後、灌流で単離した肝実質細胞から DNA を回収した方が、肝臓全体の DNA を回収した時と比較して高いゲノム編集効率を示すというデータを報告している^[62]。

CRISPR/Cas9 技術の登場以降、ゲノム編集技術の医薬品応用の検討が加速している。LNP は *ex vivo* ゲノム編集だけでなく、*in vivo* ゲノム編集も可能とし、Intellia 社は既にヒトで TTR や KLKB1 (血漿カリクレインタンパク質をコード) 遺伝子のノックアウトを達成している^[62,131]。また、Verve 社は base editor による PCSK9 の塩基編集の臨床試験を計画中であり^[132]、*in vivo* CAR-T による心線維化治療やアンチトロンビンのノックアウトによる血友病 A・B 治療の可能性も論文報告されている^[30,133]。生体内へ Cas9 mRNA と sgRNA を高効率で送達

できる本脂質のゲノム編集への応用も期待される。また、予備検討において、LNP に同時封入する Cas9 mRNA と sgTTR の比率は 2:1~1:2 (wt/wt) の範囲では、1:2 がタンパク質を低減できている傾向を示した。モル比で表すと Cas9 mRNA/sgTTR=1:92 であり、圧倒的に sgTTR が多い状況にも関わらず sgTTR 比率の高い LNP が高い活性を有するという結果は、翻訳された Cas9 タンパク質と sgTTR が細胞内で複合体を構成するステップが律速になっていることを示唆している。Ribonucleoprotein (RNP) のように Cas9 タンパク質と gRNA が既に複合体を形成したものを送達することで更に高いゲノム編集効率を期待できるかもしれない^[134]。

3.4 小括

本章では、イオン性脂質の分岐構造が膜破壊活性や mRNA 送達に与える影響を調べた。2019 年に Hajj らが報告した酸性環境下でのイオン化能の強弱という指標に着目し、イオン性脂質の分岐構造が LNP のエンドソーム脱出効率に与える影響の理解を試みた。TNS を利用して、分岐構造が異なるイオン性脂質からなる各 LNP のイオン化能を比較した。その結果、分岐足場の対称性が高く（分岐鎖が長く）、総炭素数が多すぎないイオン性脂質は、高いイオン化能を示すことが見出された。

そのメカニズム理解のため、分岐鎖を有するリン脂質は脂質膜のパッキングを乱すという知見に着目した。直鎖のイオン性脂質は密なパッキングを形成するため脂質同士の距離が近く、電荷反発によってプロトン化しない方向に平衡が移動する一方で、分岐のイオン性脂質はパッキングを乱すため、電荷反発が緩和されてプロトン化しやすくなると仮説を立てた。検証のため、イオン化能の低い LNP を界面活性剤で可溶化し、パッキングを乱したところ、可溶化前と比較してイオン化能が有意に向上し、仮説を支持する結果が得られた。続いて、酸性環境下で赤血球と LNP を混合し、漏出したヘモグロビン由来の吸光度を測定することで、各 LNP のエンドソーム膜に対する膜破壊活性を疑似的に評価した。その結果、LNP のイオン化能と膜破壊能に強い相関関係が認められた。続いて、32 種類のイオン性脂質から Fluc mRNA 封入 LNP を作製し、*in vivo* mRNA 送達効率を評価した。その結果、対称性の高い分岐脂質は高効率での mRNA 送達を実現することが見出された。したがって、脂質足場の分岐鎖は脂質間のパッキングを乱し、LNP のイオン化能や膜破壊能を高め、その結果 *in vivo* での機能的な mRNA 送達の向上に寄与する可能性が示された。

最後に、本研究で合成したイオン性脂質のうち、高い保存安定性と肝臓への効率的な mRNA 送達を両立する分岐脂質 CL4F 8-6 肝実質細胞における *in vivo* ゲノム編集への適用可能性を検討した。その結果、Cas9 mRNA と sgTTR を同時に封入した LNP を 2.5 mg kg^{-1} で単回投与により、血清 TTR 濃度は 77%減少し、肝臓において 54%の DNA が編集され、CL4F 8-6 が長鎖 RNA の送達やゲノム編集に応用できる可能性が示された。

結論

LNP による mRNA 送達において、分岐足場を有するイオン性脂質が有用であることが知られている。本研究では、この分岐鎖の役割を正確に理解することを目的とした。

第 1 章では、足場の分岐構造が系統的に異なる α 分岐脂質ライブラリを設計した。足場構造としての α 分岐脂肪酸は、各鎖長を容易に制御しながら合成できるため、多様で連続的な足場構造を有する α 分岐脂質が 32 種類得られた。それに加えて、 α 分岐は対称性と総炭素数という 2 つの単純なパラメータから記述できるため、構造活性相関の理解が容易になる。

第 2 章では、イオン性脂質の分岐構造（対称性と総炭素数）が LNP 内部の粘性増加に寄与することが示された。過去の報告を踏まえると、分岐鎖が脂質の分子運動を制限するためであると考えられる。また、粘性の高い LNP からは、粒子径が小さく、PDI が小さく、封入率の高い粒子が形成されることが示された。更に、LNP 内部の粘性値が LNP 長期保管後の物理的な劣化を類推する指標になる可能性が見出された。

第 3 章では、分岐鎖はイオン性脂質のイオン化能を最大化し、膜破壊能も向上することが示された。過去の報告を踏まえると、分岐鎖が脂質間のパッキングを乱し、電荷反発によるプロトン化の制限を緩和するためであると考えられ、直鎖のイオン性脂質から構成される LNP を可溶化してパッキングを緩めるとイオン化能が回復したという結果は本仮説を支持するものである。

以上より、イオン性脂質の化学構造と LNP 特性は強く結びついており、化学構造が LNP の保存安定性と生体内での mRNA 発現に影響を与えることが見出された。そして、イオン性脂質の足場の分岐鎖は LNP の保存安定性と生体内での mRNA 発現の両方を高める可能性が示された。

本研究で得られた知見が、今後のイオン性脂質設計の指針となり、mRNA 医薬の更なる発展に繋がることを期待し、本稿を終えたい。

実験手法

mRNA-LNP の調製

脂質組成はイオン性脂質:コレステロール:DSPC:DMG-PEG₂₀₀₀=50:38.5:10:1.5 とした。各脂質はエタノールで合計脂質濃度 8 mM となるように希釈した。mRNA は 46.1 µg/mL となるようにクエン酸緩衝液 (50 mM, pH 3.5) で希釈した。超高速ナノ医薬作製装置 NanoAssemblr (Precision NanoSystems) を用いて、脂質溶液と mRNA 溶液をそれぞれ 3 mL/min と 9 mL/min で混合・攪拌することで LNP 溶液を得た。20 mM HEPES 緩衝液 (9% sucrose, pH 7.45) で希釈し、Amicon Ultra-15 (MWCO 100 kDa, Millipore) で限外ろ過を実施した (25°C、1000×g)。濃縮後、20 mM HEPES 緩衝液 (9% sucrose, pH 7.45) を加え、再度限外ろ過を実施し (25°C、1000×g)、LNP 溶液を得た。LNP の粒子径、Polydispersity Index 及びζ電位は、Zetasizer Nano ZSP instrument (Malvern Instruments、Worcestershire、UK) を用いて測定した。mRNA の回収率と封入率は Ribogreen (Invitrogen) を用いたアッセイにより測定した。

Ribogreen assay

TE Buffer (20X) , RNase-free (Invitrogen) を利用して、TE 緩衝液と 2% (wt/vol) TritonX-100 含有 TE 緩衝液を調製した。mRNA を TE 緩衝液で段階希釈して、4000、3200、2400、1600、800、400、0 ng/mL mRNA 溶液を検量線用に調製した。LNP を TE 緩衝液で 8 µg RNA/mL へ希釈して LNP 非破壊用サンプルとした。また、LNP を TE 緩衝液で 2.4 µg RNA/mL へ希釈したのち 2% (wt/vol) TritonX-100 含有 TE 緩衝液で 2 倍希釈して LNP 破壊用サンプルとした。Ribogreen を TE 緩衝液で 200 倍希釈して Working solution とした。検量線サンプル・LNP 非破壊用サンプル・LNP 破壊用サンプルを 100 µL/well で蛍光測定用 96-well black plate に添加したのち、全てのウェルに対して Working solution を 100 µL/well で添加し、700 rpm, 5 min 振とう攪拌した。その後、EnSight マルチモードプレートリーダー (Perkin Elmer) で蛍光を測定 (Excitation/Emission=485/528 nm) し、mRNA の回収率や封入率を以下のように計算した。

mRNA 回収率 (%) = (LNP 破壊用サンプルの mRNA 濃度) / (回収率 100%とした時の理論上の mRNA 濃度) ×100

mRNA 封入率 (%) = { (LNP 破壊用サンプルの mRNA 濃度) - (LNP 非破壊用サンプルの mRNA 濃度) } / (LNP 破壊用サンプルの mRNA 濃度) ×100

粘性の測定

10 mM DCVJ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in DMSO を総脂質濃度の 0.1mol%となるように脂質溶液へ加えて製剤化することで、DCVJ 修飾 LNP を作製した。ただし、DCVJ 修飾 LNP は核酸なしで調製し、D-PBS (-) で透析した。得られた DCVJ 修飾 LNP (総脂質濃度 1.5 mM) 200 µL を 96-well black plates へ加え、設定温度 (30°C、40°C、50°C および 60°C) で 5 分インキュベートしたのち、EnSight マルチモードプレートリーダー (Perkin Elmer) で

蛍光を測定した (Excitation/Emission=440/460-650 nm)。DCVJ の分子数を補正するために、LNP を可溶化したのちに DCVJ 由来の吸光度を測定した。50 μ L の 10% SDS を 450 μ L LNP へ加え、攪拌しながらインキュベートした (60°C、10 min、700 rpm)。サンプル 320 μ L の吸光度スペクトル (350–550 nm) を測定した。粘性を見積るために、Chwastek らの手法を参考に R (fluorescence-absorption ratio) を計算した^[94]。具体的には、460–660 nm の蛍光スペクトルの積分値を、390–510 nm の吸光スペクトルの積分値で除算した。

脂質膜 pKa やイオン化能の測定 (TNS assay)

6-*p*-toluidino-2-naphthalenesulfonic acid (TNS) を終濃度 0.8 μ M となるように、20 mM Citrate buffer (150 mM NaCl, pH3.50-5.50)、20 mM phosphate buffer (150 mM NaCl, pH6.00-8.00)、20 mM Tris-HCl buffer (150 mM NaCl, pH8.50-9.50) で希釈して各 pH の TNS 溶液を調製した。また、LNP を脂質濃度 1.0 mM となるように生理食塩水で希釈した。LNP を可溶化してからイオン化能を測定する場合は、LNP を脂質濃度 1.0 mM となるように 0.1% or 1.0% Triton X-100 で希釈し、攪拌しながらインキュベートした (25°C, 10 min, 700 rpm)。188 μ L の TNS 溶液と 12 μ L の LNP を black 96-well plates へ加え、EnSight マルチモードプレートリーダー (Perkin Elmer) で蛍光を測定した (Excitation/Emission=321/447 nm)。最小値をブランクとして差し引き、最大値を 100%荷電状態として、各 pH における荷電率を求め、50%荷電時の pH を脂質膜 pKa とした。また、pH5.0 における蛍光強度をイオン化能とした。

動物実験

実験プロトコルはすべて、実験動物の管理と使用に関する指針に基づき、北海道大学動物実験委員会の審査を受け承認されたものである (承認番号: 20-0176)。マウスは Balb/c マウス (6-8 週齢、雌性) を使用し、三協ラボサービス (静岡、日本) より購入した。マウスは北海道大学の特定の設備にて、12 時間明期/12 時間暗期の規則的な周期で維持された。pelleted mouse diet (cat# 5053, LabDiet, US) や水は自由に摂取可能な条件で、5 匹のマウスが 1 ゲージで飼育された。

膜融合活性評価 (Hemolysis assay)

Balb/c マウスから血液を回収し、ヘパリン処理後に氷冷した。生理食塩水による希釈、遠心操作 (4°C、400 \times g、5 min) および上清除去を 5 回繰り返すことによってタンパク質を除去し、新鮮な赤血球懸濁液を得た。赤血球懸濁液を 20 mM DL- maleate buffer (pH 5.0、130 mM NaCl) で希釈した (後述の手法で Triton X-100 で赤血球を破壊した際に吸光度 1.0 となるような終濃度とした)。生理食塩水で段階希釈した LNP (総脂質濃度として 3.125–250 μ M) 100 μ L と赤血球懸濁液 100 μ L と混合し、37°C、900 rpm、30 min 振とう攪拌した。その後、膜破壊されなかった赤血球を遠心操作 (4°C、400 \times g、5 min) で除去し、得られた上清を 0.5% TritonX-100 で 2 倍希釈して 545 nm における吸光度を測定した。0.5 w/v% Triton X-100 を赤

血球懸濁液に加えたサンプルをポジティブコントロール、LNP を添加しないサンプルをネガティブコントロールとして、各サンプルの Hemolysis の割合を算出した。Graphpad Prism 6 の 4-parameter logistic curve fit analysis を利用し、50% Hemolysis を誘起する LNP 濃度を計算した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡による肝臓内 EGFP 分布の評価

CleanCap EGFP mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, US) を封入した LNP を 0.5 もしくは 1.5 mg kg⁻¹ で Balb/c mice (6–8 週齢、雌性) に静脈内投与した。臓器回収の 10 分前に lycopersicon esculentum lectin, DyLight 649 Conjugate を 20 µg/mouse で静脈内投与した。LNP 投与 24 時間後に肝臓を回収し、2 µg/mL Hoechst33342 in PBS (-) に浸漬して氷冷し、遮光下で 10 分以上インキュベートした。CLSM Nikon A1 を用いて肝臓内 EGFP 分布を観察した。

In vivo Fluc mRNA 送達

CleanCap FLuc mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, US) を封入した LNP を 0.1 mg kg⁻¹ で Balb/c mice (6–8 週齢、雌性) に静脈内投与した。LNP 投与 6 時間後に PBS (-) で希釈した VivoGlo Luciferin In Vivo Grade (Promega, US) を 1.5 mg/mouse で静脈内投与した。投与 3 分後に各臓器を回収し、*in vivo* imaging system 200 series (Perkin Elmer, US) で発光強度を測定した。

mRNA の生体内分布

CleanCap Cyanine 5 FLuc mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, US) を封入した LNP を 0.5 mg kg⁻¹ で Balb/c mice (6–8 週齢、雌性) に静脈内投与した。LNP 投与 3 時間後に各臓器を回収し、*in vivo* imaging system 200 series (Perkin Elmer, US) で蛍光強度を測定した。

マウス TTR 遺伝子のゲノム編集

CleanCap Cas9 mRNA (5 moU) (TriLink BioTechnologies, US) と sgRNA (Integrated DNA Technologies, US) を 1:2 (重量比) で同時に封入した LNP を調製した。本 LNP を 0.75、1.5 もしくは 2.5 mg kg⁻¹ total RNA で Balb/c mice (6–8 週齢、雌性) に静脈内投与した。LNP 投与 9 日後と 30 日後に血液を回収し、25°C 1 時間静置したのち、遠心操作をすることで (25°C、1000 g、15 min)、血清を回収した。血清中 TTR タンパク質は Prealbumin ELISA Kit (Aviva Systems Biology Corp., US) を使って定量した。血清中 TTR 濃度は four parameter logistic curve model を使用して算出した。LNP 投与 30 日後、NucleoSpin Tissue (Takara Bio, Japan) を使って、肝臓と脾臓から DNA を抽出精製した。DNA は 2-step tailed PCR で増幅し、Illumina MiSeq のペアエンドモードでシーケンスした。TTR 領域を増幅するためのプライマーは次のものを使用した: forward 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GCT

TTG GAA ACA ATG CTG TCT AT-3'、reverse 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTG GGC TTT CTA CAA GCT TAC C-3'。ゲノム編集の結果は CRISPResso2 で解析した^[135]。

Table 4 ガイド RNA の配列 (標的部位)

sgTTR	5'-UUACAGCCACGUCUACAGCA-3'
sgGFP	5'-CUCGUGACCACCCUGACCUA-3'

データ解析

特に言及のない限り、結果は平均値±標準偏差で示した。LNP の物理化学的性質、粘性、*in vivo* mRNA 送達効率は JMP software (ver. 14.0.0) で可視化した。データの統計解析は Graphpad Prism 6 を使用し、unpaired Student's t-test もしくは one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post tests for comparison of multiple groups で行った。

脂質合成一般

全ての単純な化合物は東京化成工業 (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) もしくは富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入し、追加の精製は行わずに使用した。¹H NMR スペクトルは JEOL ECZ400 もしくは ECP400 (Tokyo, Japan) によって取得され、化学シフトは残留溶媒のピークを基準にして計算され、parts per million (ppm) で表された。s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet の略号で表現した。すべての反応は、ブロモクレーゾールグリーン溶液または p-アニスアルデヒド溶液で染色した TLC プレート (Millipore) を用い、薄層クロマトグラフィーでモニターされた。各化合物は Biotage Selekt 自動クロマトグラフィーシステムを使用して精製された。各化合物は、とりうるすべての立体異性体の混合物として合成された。

脂質の分析

200 ug/mL の脂質溶液を 0.5-2 μ L 注入し、下記条件で分析した。

装置: Waters UPLC

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm X 100 mm (Waters)

温度: 60°C

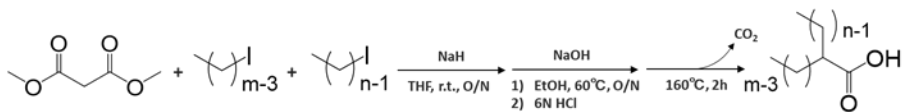
移動相 A: 5mM 酢酸アンモニウム, pH4.2

移動相 B: イソプロパノール/アセトニトリル/酢酸アンモニウム, pH4.2 (62/33/5)

流速: 0.3 mL/min

グラジエント : 0 min/50%B, 10 min/100%B, 15 min/100%B, 20 min/50%B,

マロン酸ジメチルを原料とした脂肪酸合成



① マロン酸ジメチルの α 炭素に対するジアルキルの付加

ナスフラスコに anhydrous THF 18 mL と NaH (60% dispersion) 7.56 mmol (1.0 eq., 302 mg) を加え、0°C で 10 min 攪拌した。マロン酸ジメチル 7.56 mmol (1.0 eq., 861 μ L) を滴下し、10 min 攪拌した。1つの分岐脂肪酸を得るためには2種類のヨウ化アルキルを使用する。1種類目のヨウ化アルキル 7.56 mmol (1.0 eq.) を滴下し、室温で O/N 攪拌した。0°C で追加の NaH (60% dispersion) を 11.34 mmol (1.5 eq., 2.799 mL) を何回かに分けて投入し、10 min 攪拌した。ヨウ化アルキル 11.34 mmol (1.5 eq.) を滴下し、室温で O/N 攪拌した。17.5 N 酢酸 10.7 mmol (1200 μ L) を滴下してクエンチした後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水や飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を綿栓ろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮すると、粗生成物が得られた。完全対称の分岐脂肪酸を合成する場合は、2.5 eq. の NaH と 3.0 eq. のヨウ化アルキルを投入した。

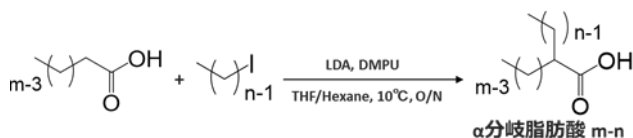
② メチルエステルの加水分解

得られたメチルエステルの粗生成物に対して 16 mL のエタノールと 5 mL の 8.0 N NaOH 水溶液を加え、60°C で O/N 攪拌した。6.0 N 塩酸 10 mL を滴下してクエンチした後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水や飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を綿栓ろ過で除き、ろ液を減圧下濃縮すると、粗生成物が得られた。

③ 脱炭酸反応

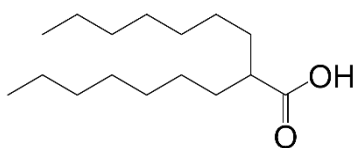
得られた粗生成物が入ったナスフラスコの溶媒を完全に除去したのちにスターラーチップを加え、160°C で 2 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認後、フラッシュクロマトグラフィ [ODS, H₂O (10 mM ammonium acetate) / acetonitrile:isopropanol=50:50 (10 mM ammonium acetate)] で逆相精製を行った。必要に応じて順相精製 (SiO₂, ヘキサン/酢酸エチル) も行い、分岐脂肪酸を得た。

直鎖脂肪酸を原料とした分岐脂肪酸合成

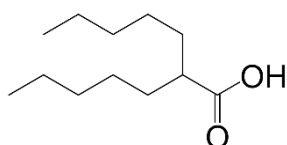


ナスフラスコに anhydrous THF 36 mL と対応する直鎖脂肪酸 10.28 mmol (1.0 eq.) を加え、-45°C に冷却したアルミブロック恒温槽にセットした。室温に戻した LDA solution 1.0 M in THF/hexanes 24 mmol (2.3 eq., 24 mL) を -20°C 以下を維持できるように、ゆっくり滴下した

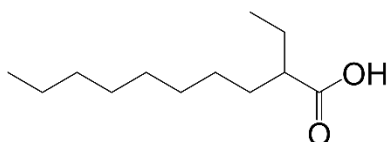
マロン酸ジメチルを原料として合成した分岐脂肪酸:



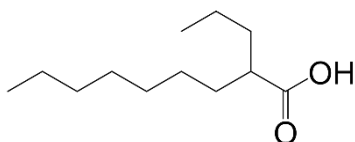
2-Heptylnonanoic acid (9-7): A colorless oil, 840 mg (98%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 24H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



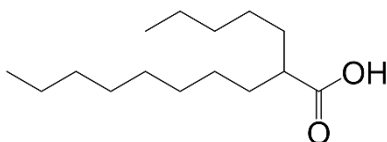
2-Pentylheptanoic acid (7-5): A colorless oil, 450 mg (60%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 12H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



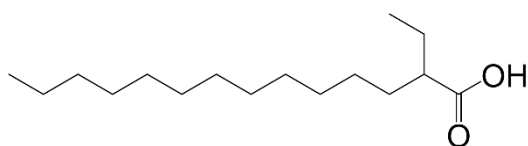
2-Ethyldecanoic acid (10-2): A colorless oil, 544 mg (30%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.18–1.35 (m, 12H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



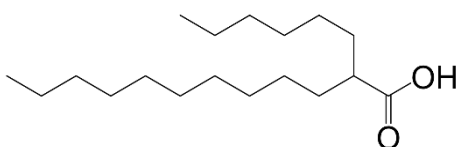
2-Propylnonanoic acid (9-3): A colorless oil, 960 mg (63%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.89 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 12H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.33 (m, 1H).



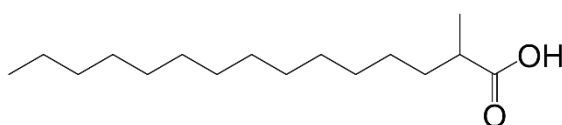
2-Pentyldecanoic acid (10-5): A colorless oil, 1600 mg (66%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 22H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



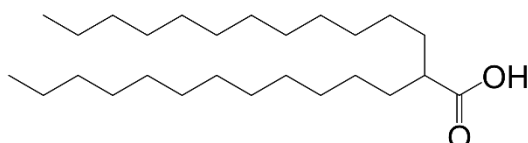
2-Ethyltetradecanoic acid (14-2): A colorless oil, 1160 mg (63%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 24H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.25 (m, 1H).



2-Hexyldodecanoic acid (12-6) : A colorless oil, 550 mg (26%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 28H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.33 (m, 1H).

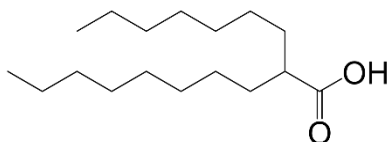


2-Methylpentadecanoic acid (15-1): A colorless oil, 1400 mg (55%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (t, 3H), 1.17 (d, 3H), 1.20–1.35 (m, 26H), 1.44 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), and 2.44 (m, 1H).

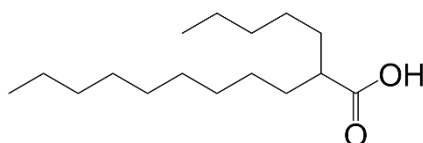


2-Dodecyltetradecanoic acid (14-12): A white powder, 3400 mg (86%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.19–1.35 (m, 44H), 1.47 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).

直鎖脂肪酸を原料として合成した分岐脂肪酸:

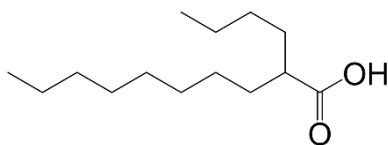


2-Heptyldecanoic acid (10-7): A colorless oil, 400 mg (29%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 26H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).

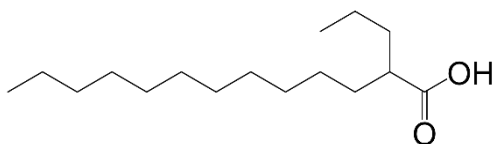


2-Pentylundecanoic acid (11-5): A colorless oil, 470 mg (18%). ^1H NMR (400 MHz,

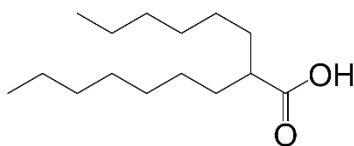
CDCl₃, ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 24H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



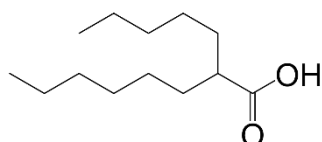
2-Butyldecanoic acid (10-4): A colorless oil, 900 mg (38%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 20H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.31 (m, 1H).



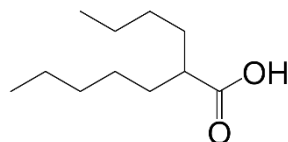
2-Propyltridecanoic acid (13-3): A colorless oil, 1300 mg (49%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.18–1.35 (m, 24H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.34 (m, 1H).



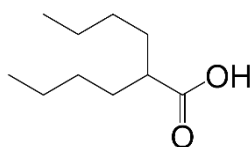
2-Hexylnonanoic acid (9-6): A colorless oil, 390 mg (16%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 0.85 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 22H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.32 (m, 1H).



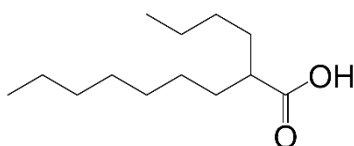
2-Pentyloctanoic acid (8-5): A colorless oil, 480 mg (22%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 18H), 1.47 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 2.32 (m, 1H).



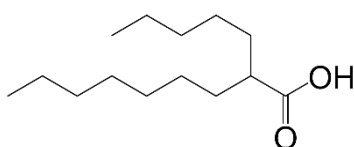
2-Butylheptanoic acid (7-4): A colorless oil, 1300 mg (67%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 14H), 1.45 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), and 2.34 (m, 1H).



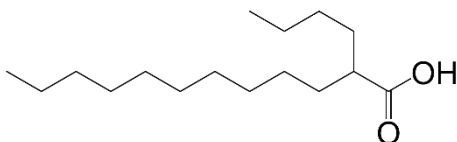
2-Butylhexanoic acid (6-4): A colorless oil, 1190 mg (46%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.25–1.32 (m, 12H), 1.50 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), and 2.33 (m, 1H).



2-Butylnonanoic acid (9-4): A colorless oil, 1160 mg (35%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.86 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 18H), 1.49 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), and 2.34 (m, 1H).

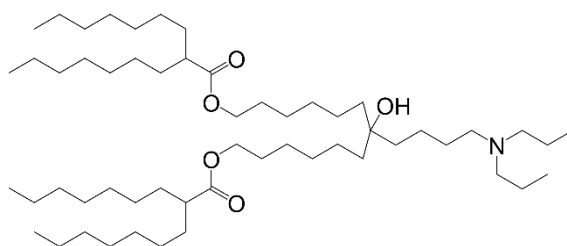


2-Pentylnonanoic acid (9-5): A colorless oil, 860 mg (24%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 6H), 1.20–.35 (m, 20H), 1.48 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), and 2.34 (m, 1H).

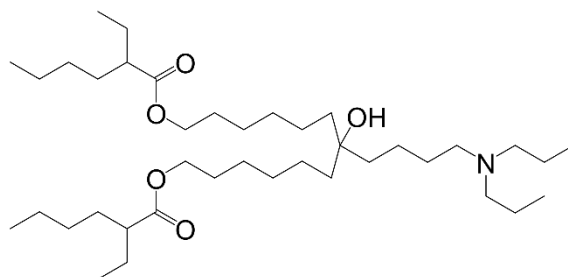


2-Butyl-dodecanoic acid (12-4): A colorless oil, 840 mg (22%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.88 (m, 6H), 1.20–1.35 (m, 24H), 1.48 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), and 2.34 (m, 1H).

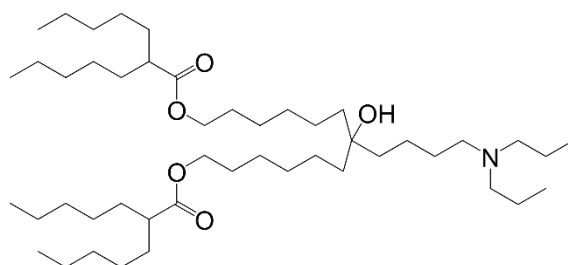
分岐脂肪酸と CL4 の縮合によって得られたイオン性脂質;



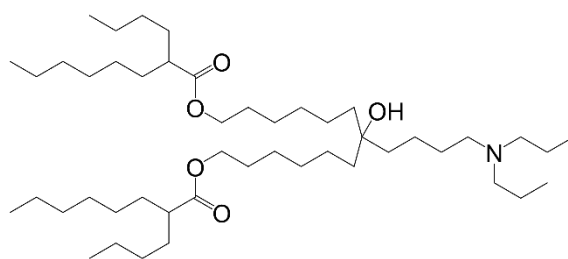
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-heptylnonanoate) (CL4F 9-7): A colorless oil, 260 mg (46.3%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 78H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 99.9%.



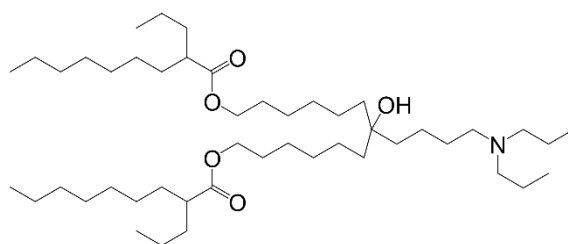
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-ethylhexanoate) (CL4F 6-2): A colorless oil, 175 mg (27.4%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.85 (m, 18H), 1.17–1.75 (m, 46H), 2.20–2.42 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 640.0 ; found (M+H), 641. Purity, 92.4%.



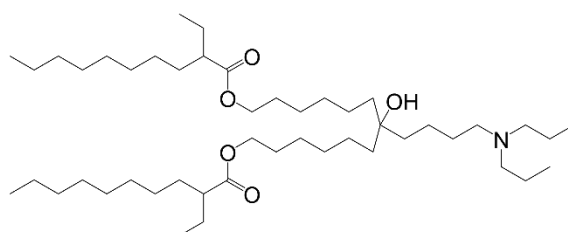
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-pentylheptanoate) (CL4F 7-5): A colorless oil, 470 mg (65.7%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.65 (m, 62H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 752.2 ; found (M+H), 753. Purity, 95.1%.



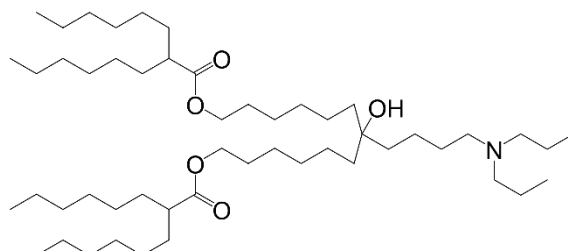
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butyl-octanoate) (CL4F 8-4): A colorless oil, 568 mg (88.8%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 62H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.03 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 752.2 ; found (M+H), 753. Purity, 97.6%.



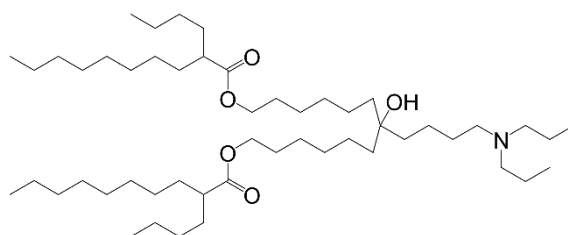
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-propylnonanoate) (CL4F 9-3): A colorless oil, 320 mg (42.6 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 62H), 2.25–2.41 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 752.2 ; found (M+H), 753. Purity, 94.5%.



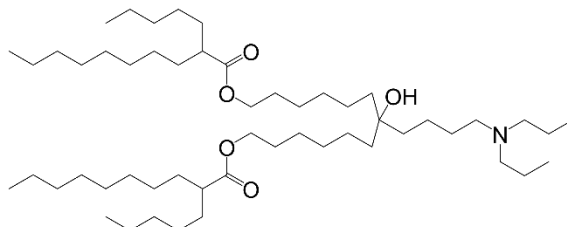
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-ethyldecanoate) (CL4F 10-2): A colorless oil, 600 mg (71.9%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.85 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 62H), 2.19–2.42 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 752.2 ; found (M+H), 753. Purity, 95.3%.



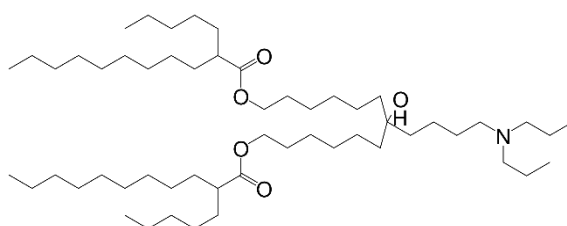
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-hexyloctanoate) (CL4F 8-6): A colorless oil, 519 mg (64.2%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.16–1.67 (m, 70H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.02 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 808.3 ; found (M+H), 809. Purity, 98.9%.



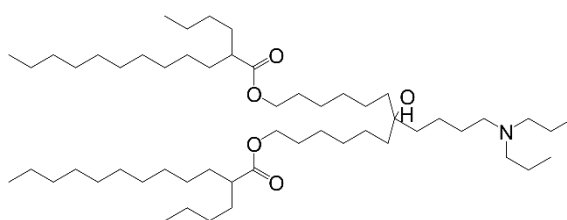
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butyldecanoate) (CL4F 10-4): A colorless oil, 450 mg (55.7%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.15–1.67 (m, 70H), 2.25–2.45 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 808.3 ; found (M+H), 809. Purity, 94.0%.



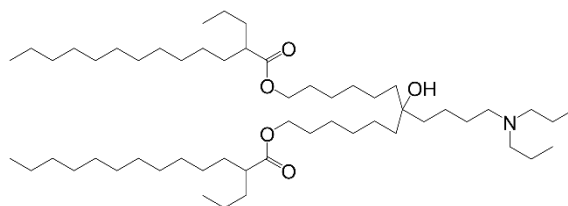
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-pentyldecanoate) (CL4F 10-5): A colorless oil, 360 mg (43.0%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 74H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.03 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 836.4 ; found (M+H), 837. Purity, 99.9%.



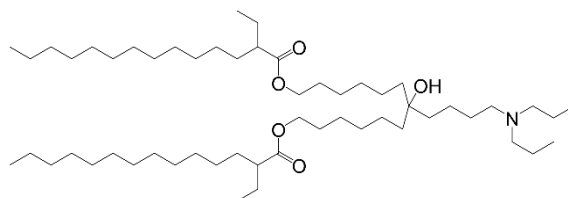
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-pentylundecanoate) (CL4F 11-5): A colorless oil, 350 mg (52.9%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.65 (m, 78H), 2.23–2.42 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 85.4%.



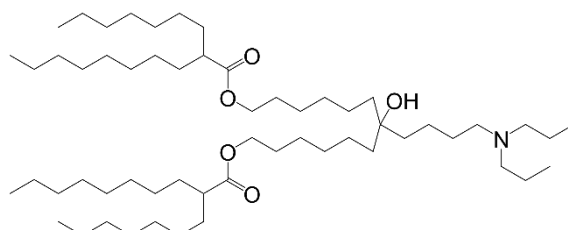
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butyl-dodecanoate) (CL4F 12-4): A colorless oil, 290 mg (55.8%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.85 (m, 18H), 1.17–1.65 (m, 78H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 92.8%.



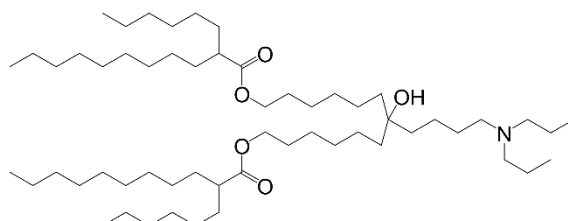
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-propyltridecanoate) (CL4F 13-3): A colorless oil, 580 mg (67.0%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 78H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.03 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 99.9%.



7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-ethyltetradecanoate) (CL4F 14-2): A colorless oil, 326 mg (44.8%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.65 (m, 78H), 2.23 (m, 2H), 2.30–2.42 (m, 6H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 98.4%.

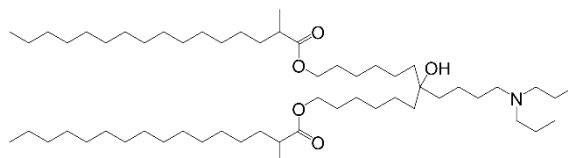


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-heptyldecanoate) (CL4F 10-7): A colorless oil, 230 mg (47.8%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.70 (m, 82H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.03 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 892.5 ; found (M+H), 893. Purity, 98.6%.

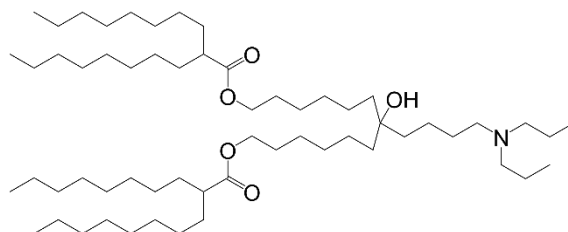


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-hexylundecanoate)

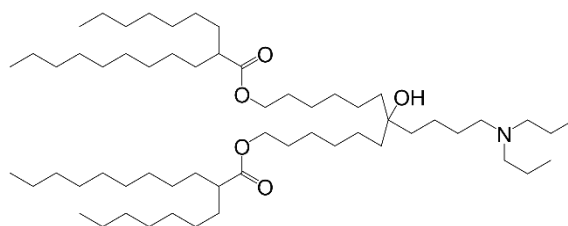
(CL4F 11-6): A colorless oil, 400 mg (44.8%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.18–1.67 (m, 82H), 2.25–2.42 (m, 8H), 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 892.5 ; found (M+H), 893. Purity, 96.4%.



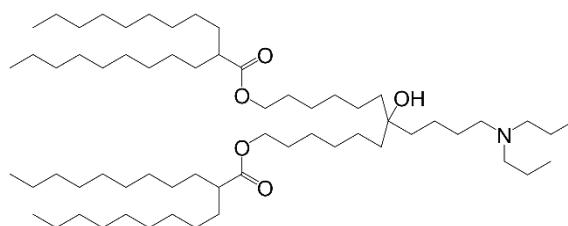
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-methylhexadecanoate) (CL4F 16-1): A colorless oil, 606 mg (67.9%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 12H), 1.12 (d, 6H), 1.17–1.67 (m, 82H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.02 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 892.5 ; found (M+H), 893. Purity, 98.8%.



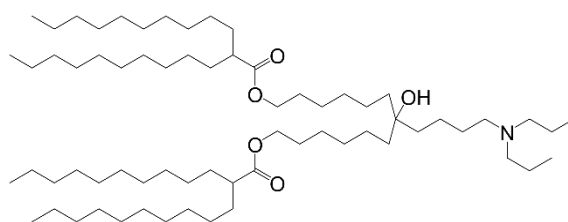
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-octyldecanoate) (CL4F 10-8): A colorless oil, 260 mg (43.5%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 86H), 2.23–2.45 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 920.5 ; found (M+H), 921. Purity, 84.0%.



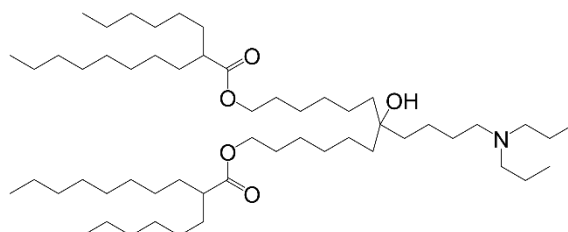
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-heptylundecanoate) (CL4F 11-7): A colorless oil, 1.07 g (77.3%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 86H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 920.5 ; found (M+H), 921. Purity, 97.2%.



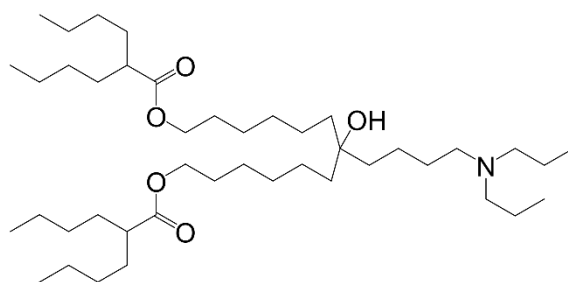
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-nonylundecanoate) (CL4F 11-9): A colorless oil, 680 mg (69.7%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 94H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 976.6 ; found (M+H), 977. Purity, 90.0%.



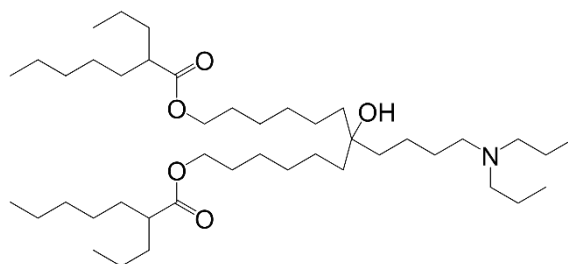
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-decyldodecanoate) (CL4F 12-10): A colorless oil, 1.20 g (77.3%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 102H), 2.25–2.42 (m, 8H), 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 1032.7 ; found (M+H), 1033. Purity, 99.9%.



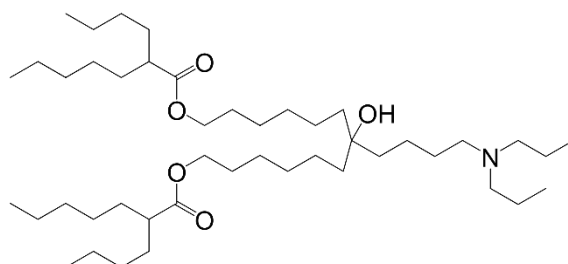
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-hexyldecanoate) (CL4F 10-6): A colorless oil, 1.16 g (67.0%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 78H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 99.9%.



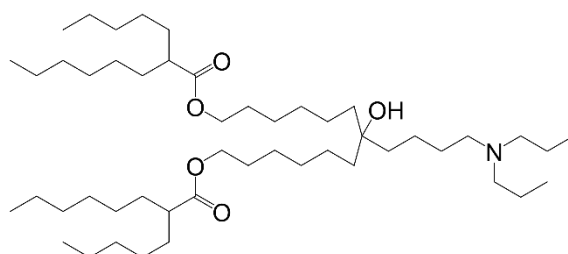
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butylhexanoate) (CL4F 6-4): A colorless oil, 360 mg (53.5%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 54H), 2.25–2.41 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 696.1 ; found (M+H), 697. Purity, 93.8%.



7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-propylheptanoate) (CL4F 7-3): A colorless oil, 465 mg (66.9%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ0.88 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 54H), 2.27–2.47 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 696.1 ; found (M+H), 697. Purity, 84.3%.

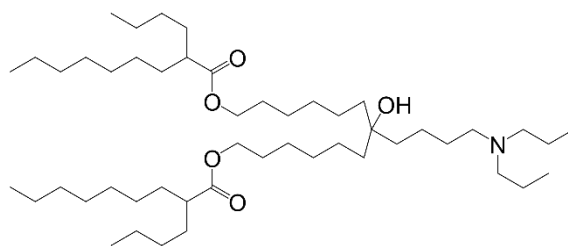


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butylheptanoate) (CL4F 7-4): A colorless oil, 550 mg (76.0%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ0.87 (m, 18H), 1.17–1.65 (m, 58H), 2.25–2.42 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 724.2 ; found (M+H), 725. Purity, 99.1%.

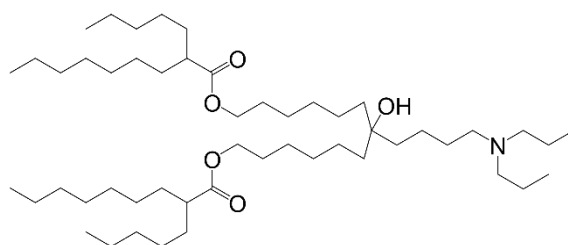


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-pentyl octanoate) (CL4F 8-5): A colorless oil, 361 mg (49.5%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 66H), 2.25–2.44 (m, 8H), 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 780.3 ; found

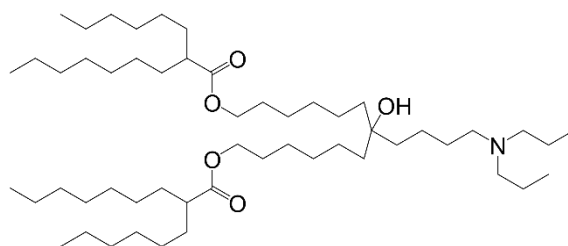
(M+H), 781. Purity, 98.6%.



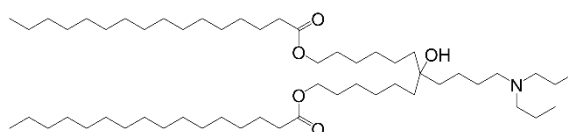
7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-butylnonanoate) (CL4F 9-4): A colorless oil, 510 mg (65.4%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.15–1.67 (m, 66H), 2.25–2.47 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 780.3 ; found (M+H), 781. Purity, 84.5%.



7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-pentylnonanoate) (CL4F 9-5): A colorless oil, 362 mg (60.3%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.85 (m, 18H), 1.15–1.67 (m, 70H), 2.25–2.50 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 808.3 ; found (M+H), 809. Purity, 83.4%.

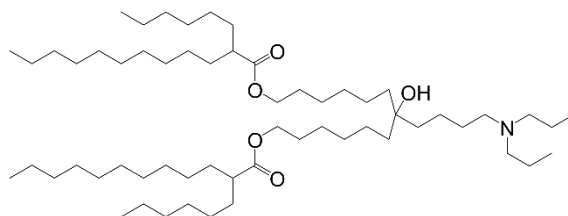


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-hexylnonanoate) (CL4F 9-6): A colorless oil, 400 mg (70.1%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 74H), 2.25–2.48 (m, 8H), and 4.05 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 836.4 ; found (M+H), 937. Purity, 95.0%.

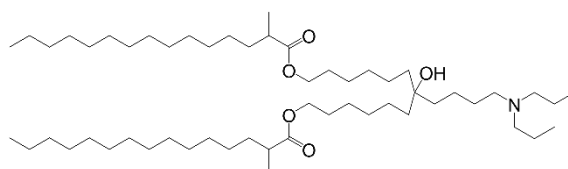


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl dipalmitate (CL4F 16-0): A

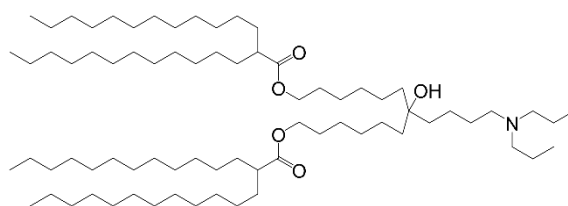
colorless oil, 514 mg (59.5%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 12H), 1.17–1.65 (m, 84H), 2.25 (m, 4H), 2.32–2.52 (m, 4H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865. Purity, 91.4%.



7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-hexyldodecanoate) (CL4F 12-6): A colorless oil, 400 mg (65.9%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.67 (m, 86H), 2.25–2.47 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 920.5 ; found (M+H), 921. Purity, 84.3%.

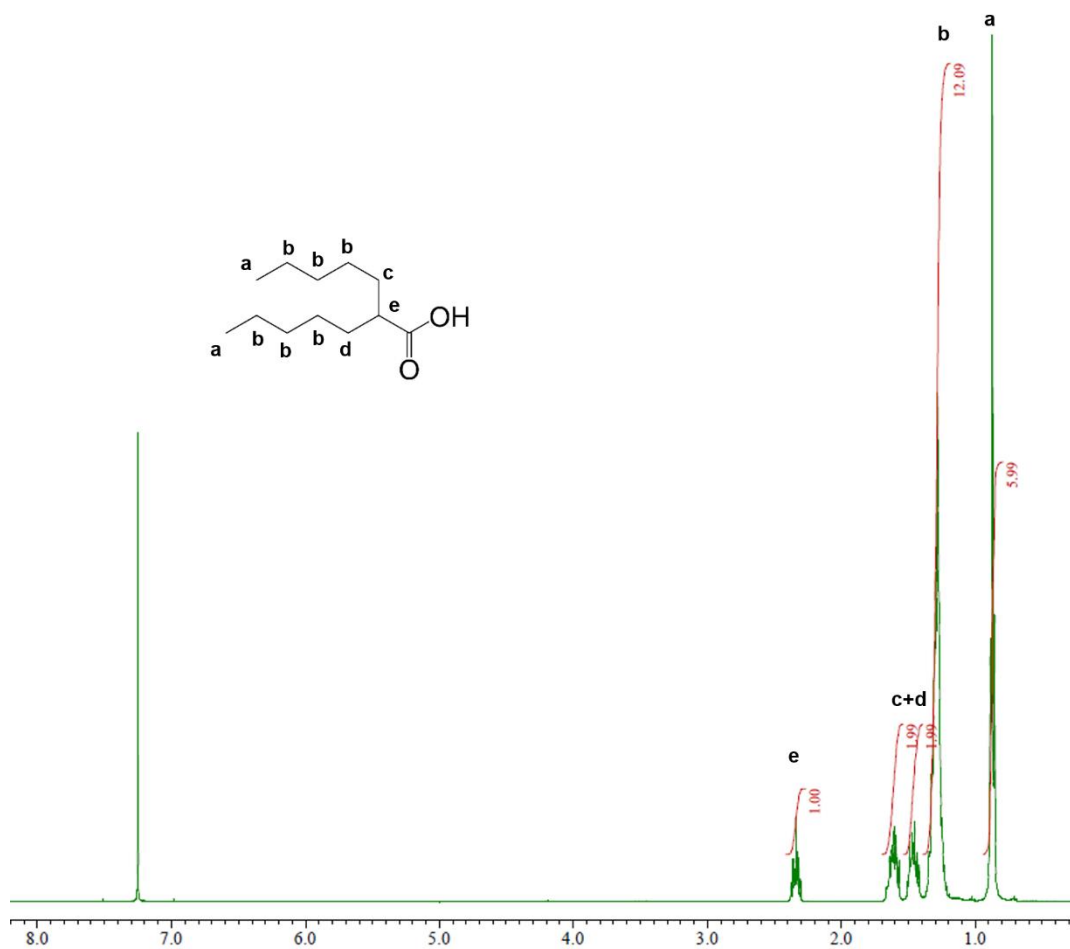


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-methylpentadecanoate) (CL4F 15-1): A colorless oil, 380 mg (60.1%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.78–0.99 (m, 12H), 1.12 (d, 6H), 1.17–1.67 (m, 78H), 2.35–2.82 (m, 8H), and 4.06 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 864.4 ; found (M+H), 865.

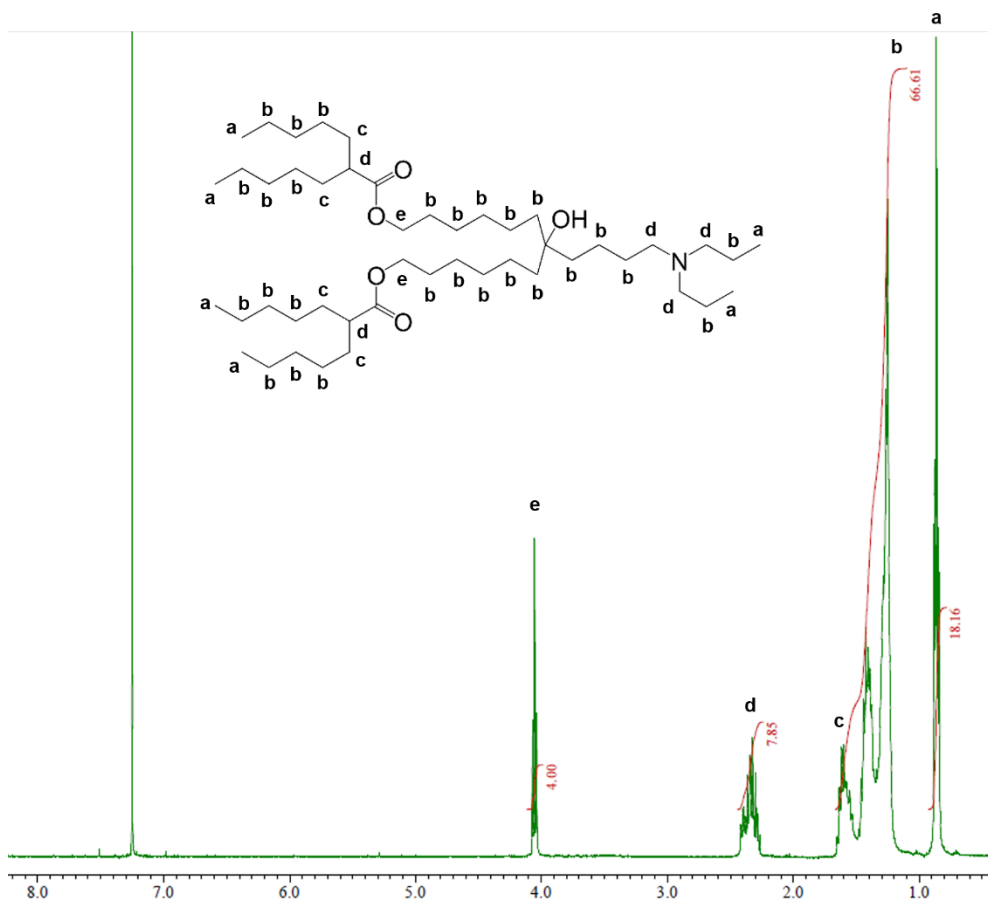


7-(4-(dipropylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl bis(2-dodecyltetradecanoate) (CL4F 14-12): A colorless oil, 750 mg (65.5%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , ppm) δ 0.87 (m, 18H), 1.17–1.69 (m, 118H), 2.25–2.70 (m, 8H), and 4.04 (t, 4H). MS (ESI): m/z calcd, 1145.0 ; found (M+H), 1146.

分岐脂肪酸の代表的な ^1H NMR スペクトル (7-5)



イオン性脂質の代表的な ^1H NMR スペクトル (CL4F 7-5)



謝辞

本研究を遂行するにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、また適切なお指導、ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室教授・原島秀吉先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日頃から活発な議論をして頂くと共に、的確かつ有益なる御助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室助教・佐藤悠介先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益なる御助言と深い理解を頂きました北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授・山田勇磨先生、同助教・中村孝司先生に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として、日頃から活発な議論をして頂くと共に、試験計画・実施にご協力くださいました日東電工株式会社 伊勢浩文様、上田武司様、岡崎有道様、村川正男様、江部宏史様、宍戸卓矢様、坂元左知子様、前田佳己様、田口将光様、大津彩夏様、松縄彩子様、光島正浩様、高木義和様、大久保勝之様に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日頃から活発な議論をして頂くと共に、的確かつ有益なる御助言を頂くと共に、快適な研究環境の場を提供して頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室 鈴木裕一様、奥田健斗様、小沼はるの様、小池隆太郎様、岩川和樹様、種田陸人様、伊藤里奈様、清水りな様に深く感謝致します。

有益な御助言を頂きました日東電工株式会社の諸先輩、同輩、後輩の皆様に感謝いたします。

2023年2月 橋場 一毅

参考文献

- [1] J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner, *Science* (80-.). **1990**, *247*, 1465.
- [2] Y. Furuichi, A. LaFiandra, A. J. Shatkin, *Nat. 1977 2665599* **1977**, *266*, 235.
- [3] J. STEPINSKI, C. WADDELL, R. STOLARSKI, E. DARZYNKIEWICZ, R. E. RHOADS, *RNA* **2001**, *7*, 1486.
- [4] T. Schlake, A. Thess, M. Thran, I. Jordan, *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 301.
- [5] D. R. Gallie, *Genes Dev.* **1991**, *5*, 2108.
- [6] S. Holtkamp, S. Kreiter, A. Selmi, P. Simon, M. Koslowski, C. Huber, Ö. Türeci, U. Sahin, *Blood* **2006**, *108*, 4009.
- [7] M. Mockey, C. Gonçalves, F. P. Dupuy, F. M. Lemoine, C. Pichon, P. Midoux, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340*, 1062.
- [8] G. Cannarrozzi, N. N. Schraudolph, M. Faty, P. von Rohr, M. T. Friberg, A. C. Roth, P. Gonnet, G. Gonnet, Y. Barral, *Cell* **2010**, *141*, 355.
- [9] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, R. A. Flavell, *Nat. 2001 4136857* **2001**, *413*, 732.
- [10] S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis E Sousa, *Science* (80-.). **2004**, *303*, 1529.
- [11] F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer, *Science* (80-.). **2004**, *303*, 1526.
- [12] M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, T. Fujita, *Nat. Immunol. 2004 57* **2004**, *5*, 730.
- [13] M. Yoneyama, M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y.-M. Loo, M. Gale, S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, T. Fujita, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 2851.
- [14] C. Bourquin, L. Schmidt, V. Hornung, C. Wurzenberger, D. Anz, N. Sandholzer, S. Schreiber, A. Voelkl, G. Hartmann, S. Endres, *Blood* **2007**, *109*, 2953.
- [15] L. E. Sander, M. J. Davis, M. V. Boekschoten, D. Amsen, C. C. Dascher, B. Ryffel, J. A. Swanson, M. Müller, J. M. Blander, *Nat. 2011 4747351* **2011**, *474*, 385.
- [16] L. Miao, L. Li, Y. Huang, D. Delcassian, J. Chahal, J. Han, Y. Shi, K. Sadtler, W. Gao, J. Lin, J. C. Doloff, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol. 2019 3710* **2019**, *37*, 1174.
- [17] Y. Suzuki, T. Miyazaki, H. Muto, K. Kubara, Y. Mukai, R. Watari, S. Sato, K. Kondo, S. ichi Tsukumo, K. Yasutomo, M. Ito, K. Tsukahara, *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2022**, *30*, 226.
- [18] S. Ndeupen, Z. Qin, S. Jacobsen, A. Bouteau, H. Estanbouli, B. Z. Igyártó, *iScience* **2021**, *24*, DOI 10.1016/j.isci.2021.103479.
- [19] K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, *Immunity* **2005**, *23*, 165.
- [20] K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh, J. Ludwig, H. Kato, S. Akira, D. Weissman, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1833.
- [21] V. Hornung, J. Ellegast, S. Kim, K. Brzózka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K.

- Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, G. Hartmann, *Science (80-.)*. **2006**, *314*, 994.
- [22] S. R. Nallagatla, P. C. Bevilacqua, *RNA* **2008**, *14*, 1201.
- [23] B. R. Anderson, H. Muramatsu, S. R. Nallagatla, P. C. Bevilacqua, L. H. Sansing, D. Weissman, K. Karikó, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5884.
- [24] I. Vlatkovic, *Biomed. 2021, Vol. 9, Page 530* **2021**, *9*, 530.
- [25] K. Karikó, H. Muramatsu, J. Ludwig, D. Weissman, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, e142.
- [26] S. M. Rittig, M. Haentschel, K. J. Weimer, A. Heine, M. R. Muller, W. Brugger, M. S. Horger, O. Maksimovic, A. Stenzl, I. Hoerr, H. G. Rammensee, T. A. W. Holderried, L. Kanz, S. Pascolo, P. Brossart, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 990.
- [27] V. F. Van Tendeloo, A. Van De Veldea, A. Van Driesschea, N. Coolsa, S. Anguille, K. Ladell, E. Gostick, K. Vermeulen, K. Pieters, G. Nijs, B. Stein, E. L. Smits, W. A. Schroyens, A. P. Gadisseur, I. Vrelust, P. G. Jorens, H. Goossens, I. J. De Vries, D. A. Price, Y. Oji, Y. Oka, H. Sugiyama, Z. N. Berneman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 13824.
- [28] C. Krienke, L. Kolb, E. Diken, M. Streuber, S. Kirchhoff, T. Bukur, Ö. Akilli-Öztürk, L. M. Kranz, H. Berger, J. Petschenka, M. Diken, S. Kreiter, N. Yorgev, A. Waisman, K. Karikó, Ö. Türeci, U. Sahin, *Science (80-.)*. **2021**, *371*, 145.
- [29] N. N. Parayath, S. B. Stephan, A. L. Koehne, P. S. Nelson, M. T. Stephan, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1.
- [30] J. G. Rurik, I. Tombácz, A. Yadegari, P. O. Méndez Fernández, S. V. Shewale, L. Li, T. Kimura, O. Y. Soliman, T. E. Papp, Y. K. Tam, B. L. Mui, S. M. Albelda, E. Puré, C. H. June, H. Aghajanian, D. Weissman, H. Parhiz, J. A. Epstein, *Science (80-.)*. **2022**, *375*, 91.
- [31] F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, J. L. Perez, G. Pérez Marc, E. D. Moreira, C. Zerbini, R. Bailey, K. A. Swanson, S. Roychoudhury, K. Koury, P. Li, W. V. Kalina, D. Cooper, R. W. Frenck, L. L. Hammitt, Ö. Türeci, H. Nell, A. Schaefer, S. Ünal, D. B. Tresnan, S. Mather, P. R. Dormitzer, U. Şahin, K. U. Jansen, W. C. Gruber, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603.
- [32] L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, D. Diemert, S. A. Spector, N. Rouphael, C. B. Creech, J. McGettigan, S. Khetan, N. Segall, J. Solis, A. Brosz, C. Fierro, H. Schwartz, K. Neuzil, L. Corey, P. Gilbert, H. Janes, D. Follmann, M. Marovich, J. Mascola, L. Polakowski, J. Ledgerwood, B. S. Graham, H. Bennett, R. Pajon, C. Knightly, B. Leav, W. Deng, H. Zhou, S. Han, M. Ivarsson, J. Miller, T. Zaks, *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 403.
- [33] J. Bauman, H. Burris, J. Clarke, M. Patel, D. Cho, M. Gutierrez, R. Julian, A. Scott, P. Cohen, J. Frederick, C. Robert-Tissot, H. Zhou, K. Mody, K. Keating, R. Meehan, J. Gainor, *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, A477.1.
- [34] M. Frank-Kamenetsky, A. Grefhorst, N. N. Anderson, T. S. Racie, B. Bramlage, A. Akinc, D. Butler, K. Charisse, R. Dorkin, Y. Fan, C. Gamba-Vitalo, P. Hadwiger, M. Jayaraman, M. John,

- K. N. Jayaprakash, M. Maier, L. Nechev, K. G. Rajeev, T. Read, I. Röhl, J. Soutschek, P. Tan, J. Wong, G. Wang, T. Zimmermann, A. De Fougérolles, H. P. Vornlocher, R. Langer, D. G. Anderson, M. Manoharan, V. Koteliansky, J. D. Horton, K. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 11915.
- [35] T. S. Zimmermann, A. C. H. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racie, I. Röhl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, I. MacLachlan, *Nat. 2006 4417089* **2006**, *441*, 111.
- [36] S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Y. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. De Fougérolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, *Nat. Biotechnol.* **2010** *28*, 172.
- [37] M. Jayaraman, S. M. Ansell, B. L. Mui, Y. K. Tam, J. Chen, X. Du, D. Butler, L. Eltepu, S. Matsuda, J. K. Narayanannair, K. G. Rajeev, I. M. Hafez, A. Akinc, M. A. Maier, M. A. Tracy, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. Manoharan, M. J. Hope, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 8529.
- [38] A. Akinc, M. A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M. J. Hope, T. D. Madden, B. L. Mui, S. C. Semple, Y. K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni, R. van der Meel, P. R. Cullis, *Nat. Nanotechnol.* **2019** *14*, 1084.
- [39] Y. Sato, H. Hatakeyama, Y. Sakurai, M. Hyodo, H. Akita, H. Harashima, *J. Control. Release* **2012**, *163*, 267.
- [40] T. Watanabe, H. Hatakeyama, C. Matsuda-Yasui, Y. Sato, M. Sudoh, A. Takagi, Y. Hirata, T. Ohtsuki, M. Arai, K. Inoue, H. Harashima, M. Kohara, *Sci. Reports* **2014** *4*, 1.
- [41] N. Yamamoto, Y. Sato, T. Munakata, M. Kakuni, C. Tateno, T. Sanada, Y. Hirata, S. Murakami, Y. Tanaka, K. Chayama, H. Hatakeyama, M. Hyodo, H. Harashima, M. Kohara, *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 547.
- [42] A. Gallud, M. J. Munson, K. Liu, A. Idström, H. M. G. Barriga, S. R. Tabaei, N. Aliakbarinoddehi, M. Ojansivu, Q. Lubart, J. J. Douth, M. N. Holme, L. Evenäs, L. Lindfors, M. M. Stevens, A. Collén, A. Sabirsh, F. Höök, E. K. Esbjörner, *bioRxiv* **2021**, 2021.08.20.457104.
- [43] S. C. Wilson, J. L. Baryza, A. J. Reynolds, K. Bowman, M. E. Keegan, S. M. Standley, N. P. Gardner, P. Parmar, V. O. Agir, S. Yadav, A. Zunic, C. Vargeese, C. C. Lee, S. Rajan, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 386.
- [44] A. Akinc, W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman,

- K. G. Rajeev, W. L. Cantley, J. R. Dorkin, J. S. Butler, L. Qin, T. Racie, A. Sprague, E. Fava, A. Zeigerer, M. J. Hope, M. Zerial, D. W. Sah, K. Fitzgerald, M. A. Tracy, M. Manoharan, V. Koteliansky, A. De Fougères, M. A. Maier, *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1357.
- [45] Y. Sato, Y. Kinami, K. Hashiba, H. Harashima, *J. Control. Release* **2020**, *322*, 217.
- [46] J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer, A. Borodovsky, G. Marsico, U. Schubert, K. Manyoats, S. Seifert, C. Andree, M. Stöter, H. Epstein-Barash, L. Zhang, V. Koteliansky, K. Fitzgerald, E. Fava, M. Bickle, Y. Kalaidzidis, A. Akinc, M. Maier, M. Zerial, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 638.
- [47] A. Wittrup, A. Ai, X. Liu, P. Hamar, R. Trifonova, K. Charisse, M. Manoharan, T. Kirchhausen, J. Lieberman, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 870.
- [48] Y. Xu, M. Ou, E. Keough, J. Roberts, K. Koeplinger, M. Lyman, S. Fauty, E. Carlini, M. Stern, R. Zhang, S. Yeh, E. Mahan, Y. Wang, D. Slaughter, M. Gindy, C. Raab, C. Thompson, J. Hochman, *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 1424.
- [49] Y. Sato, K. Hashiba, K. Sasaki, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, *J. Control. Release* **2019**, *295*, 140.
- [50] P. R. Cullis, M. J. Hope, *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1467.
- [51] R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 967.
- [52] K. J. Kauffman, J. R. Dorkin, J. H. Yang, M. W. Heartlein, F. Derosa, F. F. Mir, O. S. Fenton, D. G. Anderson, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7300.
- [53] M. Kim, M. Jeong, S. Hur, Y. Cho, J. Park, H. Jung, Y. Seo, H. A. Woo, K. T. Nam, K. Lee, H. Lee, *Sci. Adv.* **2021**, *7*, DOI 10.1126/SCIADV.ABF4398/SUPPL_FILE/ABF4398_SM.PDF.
- [54] M. A. Maier, M. Jayaraman, S. Matsuda, J. Liu, S. Barros, W. Querbes, Y. K. Tam, S. M. Ansell, V. Kumar, J. Qin, X. Zhang, Q. Wang, S. Panesar, R. Hutabarat, M. Carioto, J. Hettinger, P. Kandasamy, D. Butler, K. G. Rajeev, B. Pang, K. Charisse, K. Fitzgerald, B. L. Mui, X. Du, P. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, M. Manoharan, A. Akinc, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1570.
- [55] K. A. Whitehead, J. R. Dorkin, A. J. Vegas, P. H. Chang, O. Veiseh, J. Matthews, O. S. Fenton, Y. Zhang, K. T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1.
- [56] J. E. Dahlman, C. Barnes, O. F. Khan, A. Thiriout, S. Jhunjunwala, T. E. Shaw, Y. Xing, H. B. Sager, G. Sahay, L. Speciner, A. Bader, R. L. Bogorad, H. Yin, T. Racie, Y. Dong, S. Jiang, D. Seedorf, A. Dave, K. Singh Sandhu, M. J. Webber, T. Novobrantseva, V. M. Ruda, A. K. R. Lytton-Jean, C. G. Levins, B. Kalish, D. K. Mudge, M. Perez, L. Abezgauz, P. Dutta, L. Smith, K. Charisse, M. W. Kieran, K. Fitzgerald, M. Nahrendorf, D. Danino, R. M. Tuder, U. H. Von Andrian, A. Akinc, D. Panigrahy, A. Schroeder, V. Koteliansky, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 648.
- [57] M. M. Abd Elwakil, T. Gao, T. Isono, Y. Sato, Y. H. A. Elewa, T. Satoh, H. Harashima, *Mater.*

- Horizons* **2021**, *8*, 2251.
- [58] S. Sabnis, E. S. Kumarasinghe, T. Salerno, C. Mihai, T. Ketova, J. J. Senn, A. Lynn, A. Bulychev, I. McFadyen, J. Chan, Ö. Almarsson, M. G. Stanton, K. E. Benenato, *Mol. Ther.* **2018**, *26*, 1509.
- [59] K. A. Hajj, J. R. Melamed, N. Chaudhary, N. G. Lamson, R. L. Ball, S. S. Yerneni, K. A. Whitehead, *Nano Lett.* **2020**, *20*, 5167.
- [60] X. Zhang, W. Zhao, G. N. Nguyen, C. Zhang, C. Zeng, J. Yan, S. Du, X. Hou, W. Li, J. Jiang, B. Deng, D. W. McComb, R. Dorkin, A. Shah, L. Barrera, F. Gregoire, M. Singh, D. Chen, D. E. Sabatino, Y. Dong, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, DOI 10.1126/SCIADV.ABC2315/SUPPL_FILE/ABC2315_SM.PDF.
- [61] K. A. Hajj, R. L. Ball, S. B. Deluty, S. R. Singh, D. Strelkova, C. M. Knapp, K. A. Whitehead, *Small* **2019**, *15*, 1805097.
- [62] J. D. Finn, A. R. Smith, M. C. Patel, L. Shaw, M. R. Youniss, J. van Heteren, T. Dirstine, C. Ciullo, R. Lescarbeau, J. Seitzer, R. R. Shah, A. Shah, D. Ling, J. Growe, M. Pink, E. Rohde, K. M. Wood, W. E. Salomon, W. F. Harrington, C. Dombrowski, W. R. Strapps, Y. Chang, D. V. Morrissey, *Cell Rep.* **2018**, *22*, 2227.
- [63] X. Han, H. Zhang, K. Butowska, K. L. Swingle, M. G. Alameh, D. Weissman, M. J. Mitchell, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1.
- [64] “WO2018087753A1 - Cationic lipids for nucleic acid delivery and preparation thereof - Google Patents,” can be found under <https://patents.google.com/patent/WO2018087753A1>, **n.d.**
- [65] D. Meyer, H. Jangra, F. Walther, H. Zipse, P. Renaud, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, DOI 10.1038/S41467-018-07196-9.
- [66] Y. Yoshinori, M. Kenji, M. Satoru, **2020**.
- [67] W. He, M. J. Bennett, L. Luistro, D. Carvajal, T. Nevins, M. Smith, G. Tyagi, J. Cai, X. Wei, T. A. Lin, D. C. Heimbrook, K. Packman, J. F. Boylan, *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 359.
- [68] G. Landrum, **n.d.**
- [69] Q. N. Hu, Y. Z. Liang, H. Yin, X. L. Peng, K. T. Fang, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 1193.
- [70] L. B. Kier, *Quant. Struct. Relationships* **1986**, *5*, 1.
- [71] L. B. Kier, *Quant. Struct. Relationships* **1985**, *4*, 109.
- [72] A. J. Da Silva Sanchez, K. Zhao, S. G. Huayameres, M. Z. C. Hatit, M. P. Lokugamage, D. Loughrey, C. Dobrowolski, S. Wang, H. Kim, K. Paunovska, Y. Kuzminich, J. E. Dahlman, *J. Control. Release* **2023**, *353*, 270.
- [73] E. Wisse, F. Jacobs, B. Topal, P. Frederik, B. De Geest, *Gene Ther.* **2008**, *15*, 1193.
- [74] F. Jacobs, E. Wisse, B. De Geest, *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 14.
- [75] K. Sasaki, Y. Sato, K. Okuda, K. Iwakawa, H. Harashima, *Pharmaceutics* **2022**, *14*, DOI 10.3390/PHARMACEUTICS14081572.

- [76] S. A. Dilliard, Q. Cheng, D. J. Siegwart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118*, e2109256118.
- [77] K. J. Hassett, J. Higgins, A. Woods, B. Levy, Y. Xia, C. J. Hsiao, E. Acosta, Ö. Almarsson, M. J. Moore, L. A. Brito, *J. Control. Release* **2021**, *335*, 237.
- [78] K. Okuda, Y. Sato, K. Iwakawa, K. Sasaki, N. Okabe, M. Maeki, M. Tokeshi, H. Harashima, *J. Control. Release* **2022**, *348*, 648.
- [79] J. A. Kulkarni, M. M. Darjuan, J. E. Mercer, S. Chen, R. Van Der Meel, J. L. Thewalt, Y. Y. C. Tam, P. R. Cullis, *ACS Nano* **2018**, *12*, 4787.
- [80] Q. Cheng, T. Wei, L. Farbiak, L. T. Johnson, S. A. Dilliard, D. J. Siegwart, *Nat. Nanotechnol.* **2020**, *15*, 313.
- [81] M. Cornebise, E. Narayanan, Y. Xia, E. Acosta, L. Ci, H. Koch, J. Milton, S. Sabnis, T. Salerno, K. E. Benenato, M. Cornebise, E. Narayanan, Y. Xia, E. Acosta, L. Ci, H. Koch, J. Milton, S. Sabnis, T. Salerno, K. E. Benenato, *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32*, 2106727.
- [82] X. Wang, S. Liu, Y. Sun, X. Yu, S. M. Lee, Q. Cheng, T. Wei, J. Gong, J. Robinson, D. Zhang, X. Lian, P. Basak, D. J. Siegwart, *Nat. Protoc.* **2022**, *17*, 1.
- [83] J. A. Kulkarni, M. M. Darjuan, J. E. Mercer, S. Chen, R. Van Der Meel, J. L. Thewalt, Y. Y. C. Tam, P. R. Cullis, *ACS Nano* **2018**, *12*, 4787.
- [84] M. Yamagami, H. Tsuchikawa, J. Cui, Y. Umegawa, Y. Miyazaki, S. Seo, W. Shinoda, M. Murata, *Biochemistry* **2019**, *58*, 3869.
- [85] J. B. Lim, J. B. Klauda, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2011**, *1808*, 323.
- [86] W. Shinoda, M. Mikami, T. Baba, M. Hato, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14030.
- [87] S. J. Lord, N. R. Conley, H. L. D. Lee, S. Y. Nishimura, A. K. Pomerantz, K. A. Willets, Z. Lu, H. Wang, N. Liu, R. Samuel, R. Weber, A. Semyonov, M. He, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 55.
- [88] S. Seiffert, W. Oppermann, *J. Microsc.* **2005**, *220*, 20.
- [89] M. K. Levin, J. H. Carson, *Differentiation* **2004**, *72*, 1.
- [90] A. Marczak, *Bioelectrochemistry* **2009**, *74*, 236.
- [91] S. C. Lee, J. Heo, H. C. Woo, J. A. Lee, Y. H. Seo, C. L. Lee, S. Kim, O. P. Kwon, *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24*, 13706.
- [92] S. C. Lee, J. Heo, J. W. Ryu, C. L. Lee, S. Kim, J. S. Tae, B. O. Rhee, S. W. Kim, O. P. Kwon, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13695.
- [93] R. O. Loutfy, B. A. Arnold, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 4205.
- [94] G. Chwastek, E. P. Petrov, J. P. Sáenz, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 836.
- [95] M. Y. Arteta, T. Kjellman, S. Bartesaghi, S. Wallin, X. Wu, A. J. Kvist, A. Dabkowska, N. Székely, A. Radulescu, J. Bergholtz, L. Lindfors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E3351.
- [96] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 415.

- [97] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669.
- [98] Z. Ling, L. Yun, L. Liu, B. Wu, X. Fu, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4214.
- [99] A. A. Pashkovskaya, M. Vazdar, L. Zimmermann, O. Jovanovic, P. Pohl, E. E. Pohl, *Biophys. J.* **2018**, *114*, 2142.
- [100] P. Pierrat, L. Lebeau, *Langmuir* **2015**, *31*, 12362.
- [101] M. J. Carrasco, S. Alishetty, M. G. Alameh, H. Said, L. Wright, M. Paige, O. Soliman, D. Weissman, T. E. Cleveland, A. Grishaev, M. D. Buschmann, *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 1.
- [102] E. Roesler, R. Weiss, E. E. Weinberger, A. Fruehwirth, A. Stoecklinger, S. Mostböck, F. Ferreira, J. Thalhamer, S. Scheiblhofer, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 1070.
- [103] A. L. Fabre, M. Colotte, A. Luis, S. Tuffet, J. Bonnet, *Eur. J. Hum. Genet.* **2013**, *22*, 379.
- [104] L. Schoenmaker, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni, R. Verbeke, G. Kersten, W. Jiskoot, D. J. A. Crommelin, *Int. J. Pharm.* **2021**, *601*, 120586.
- [105] D. Pogocki, C. Schöneich, *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 443.
- [106] S. Kyu Han, J. S. Kim, Y. S. Lee, M. Kim, *Arch. Pharmacol. Res.* **1990**, *13*, 192.
- [107] M. Packer, D. Gyawali, R. Yerabolu, J. Schariter, P. White, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1.
- [108] S. McCafferty, A. K. M. A. Haque, A. Vandierendonck, B. Weidensee, M. Plovyt, M. Stuchlíková, N. François, S. Valembos, L. Heyndrickx, J. Michiels, K. K. Ariën, L. Vandekerckhove, R. Abdelnabi, C. S. Foo, J. Neyts, I. Sahu, N. N. Sanders, *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 2968.
- [109] E. A. Voigt, A. Gerhardt, D. Hanson, M. F. Jennewein, P. Battisti, S. Reed, J. Singh, R. Mohamath, J. Bakken, S. Beaver, C. Press, P. Soon-Shiong, C. J. Paddon, C. B. Fox, C. Casper, *npj Vaccines* **2022**, *7*, 1.
- [110] K. M. Pollock, H. M. Cheeseman, A. J. Szubert, V. Libri, M. Boffito, D. Owen, H. Bern, J. O'Hara, L. R. McFarlane, N. M. Lemm, P. F. McKay, T. Rampling, Y. T. N. Yim, A. Milinkovic, C. Kingsley, T. Cole, S. Fagerbrink, M. Aban, M. Tanaka, S. Mehdipour, A. Robbins, W. Budd, S. N. Faust, H. Hassanin, C. A. Cosgrove, A. Winston, S. Fidler, D. T. Dunn, S. McCormack, R. J. Shattock, *EClinicalMedicine* **2022**, *44*, DOI 10.1016/J.ECLINM.2021.101262.
- [111] M. I. Henderson, Y. Eygeris, A. Jozic, M. Herrera, G. Sahay, *Mol. Pharm.* **2022**, *19*, DOI 10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.2C00587.
- [112] E. O. Blenke, E. Örnkvist, C. Schöneich, G. Nilsson, D. B. Volkin, E. Mastrobattista, Ö. Almarsson, D. J. A. Crommelin, *J. Pharm. Sci.* **2022**, DOI 10.1016/J.XPHS.2022.11.001.
- [113] H. Muramatsu, K. Lam, C. Bajusz, D. Laczkó, K. Karikó, P. Schreiner, A. Martin, P. Lutwyche, J. Heyes, N. Pardi, *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 1941.
- [114] M. Ripoll, M. C. Bernard, C. Vaure, E. Bazin, S. Commandeur, V. Perkov, K. Lemdani, M. C. Nicolaï, P. Bonifassi, A. Kichler, B. Frisch, J. Haensler, *Biomaterials* **2022**, *286*, DOI

- 10.1016/J.BIOMATERIALS.2022.121570.
- [115] K. A. Whitehead, J. R. Dorkin, A. J. Vegas, P. H. Chang, O. Veiseh, J. Matthews, O. S. Fenton, Y. Zhang, K. T. Olejnik, V. Yesilyurt, D. Chen, S. Barros, B. Klebanov, T. Novobrantseva, R. Langer, D. G. Anderson, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4277.
- [116] C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, H. Yin, K. M. Luly, R. Langer, D. G. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 12881.
- [117] A. L. Bailey, P. R. Cullis, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12573.
- [118] X. Ma, Q. Zhu, Y. Chen, Y. G. Liu, *Mol. Plant* **2016**, *9*, 961.
- [119] S. Shan, P. S. Soltis, D. E. Soltis, B. Yang, *Appl. Plant Sci.* **2020**, *8*, DOI 10.1002/APS3.11314.
- [120] S. Liu, Q. Cheng, T. Wei, X. Yu, L. T. Johnson, L. Farbiak, D. J. Siegwart, *Nat. Mater.* **2021**, *20*, 701.
- [121] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, A. P. R. Johnston, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, *9*, e1452.
- [122] O. Zelphati, F. C. Szoka, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 11493.
- [123] K. Hashiba, Y. Sato, H. Harashima, *J. Control. Release* **2017**, *262*, 239.
- [124] M. Herrera, J. Kim, Y. Eygeris, A. Jozic, G. Sahay, *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 4289.
- [125] P. Paramasivam, C. Franke, M. Stöter, A. Höijer, S. Bartesaghi, A. Sabirsh, L. Lindfors, M. Yanez Arteta, A. Dahlén, A. Bak, S. Andersson, Y. Kalaidzidis, M. Bickle, M. Zerial, *J. Cell Biol.* **2022**, *221*, DOI 10.1083/JCB.202110137/212896.
- [126] L. Zheng, S. R. Bandara, C. Leal, *bioRxiv* **2022**, 2022.05.20.492895.
- [127] S. Patel, N. Ashwanikumar, E. Robinson, Y. Xia, C. Mihai, J. P. Griffith, S. Hou, A. A. Esposito, T. Ketova, K. Welsher, J. L. Joyal, Ö. Almarsson, G. Sahay, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1.
- [128] G. Settanni, W. Brill, H. Haas, F. Schmid, *Macromol. Rapid Commun.* **2022**, *43*, 2100683.
- [129] S. Park, Y. K. Choi, S. Kim, J. Lee, W. Im, *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 5192.
- [130] L. Miao, J. Lin, Y. Huang, L. Li, D. Delcassian, Y. Ge, Y. Shi, D. G. Anderson, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1.
- [131] J. Seitzer, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *147*, AB147.
- [132] K. Musunuru, A. C. Chadwick, T. Mizoguchi, S. P. Garcia, J. E. DeNizio, C. W. Reiss, K. Wang, S. Iyer, C. Dutta, V. Clendaniel, M. Amaonye, A. Beach, K. Berth, S. Biswas, M. C. Braun, H. M. Chen, T. V. Colace, J. D. Ganey, S. A. Gangopadhyay, R. Garrity, L. N. Kasiewicz, J. Lavoie, J. A. Madsen, Y. Matsumoto, A. M. Mazzola, Y. S. Nasrullah, J. Nneji, H. Ren, A. Sanjeev, M. Shay, M. R. Stahley, S. H. Y. Fan, Y. K. Tam, N. M. Gaudelli, G. Ciaramella, L. E. Stolz, P. Malyala, C. J. Cheng, K. G. Rajeev, E. Rohde, A. M. Bellinger, S. Kathiresan, *Nat.* **2021**, *593*, 429.
- [133] J. P. Han, M. J. Kim, B. S. Choi, J. H. Lee, G. S. Lee, M. Jeong, Y. Lee, E. A. Kim, H. K. Oh, N. Go, H. Lee, K. J. Lee, U. G. Kim, J. Y. Lee, S. Kim, J. Chang, H. Lee, D. W. Song, S. C. Yeom,

Sci. Adv. **2022**, *8*, 6901.

- [134] Y. Suzuki, H. Onuma, R. Sato, Y. Sato, A. Hashiba, M. Maeki, M. Tokeshi, M. E. H. Kayesh, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara, H. Harashima, *J. Control. Release* **2021**, *330*, 61.
- [135] K. Clement, H. Rees, M. C. Canver, J. M. Gehrke, R. Farouni, J. Y. Hsu, M. A. Cole, D. R. Liu, J. K. Joung, D. E. Bauer, L. Pinello, *Nat. Biotechnol.* *2019 373* **2019**, *37*, 224.