

物理化学的特性およびタンパク質発現能を
指標とした mRNA 封入脂質ナノ粒子の
保存安定性に影響を与える因子の解明に
関する研究

長崎大学大学院

医歯薬学総合研究科 医療科学専攻

医薬品情報学分野 博士課程

神谷万里子

目次

略語表	3
序論	5
第1章 mRNA 送達キャリアとしての脂質ナノ粒子についての文献調査	
緒言	9
1-1 mRNA の特徴と安定性	9
1-2 脂質ナノ粒子の特徴と安定性	10
1-3 mRNA 封入脂質ナノ粒子の安定性	16
第2章 物理化学的特性およびタンパク質発現能を指標とした mRNA 封入脂質ナノ粒子の保存安定性に影響を与える因子の評価	
緒言	18
実験方法	19
結果	
2-1 時間依存的な mRNA-LNP の物理化学的性質の安定性	22
2-2 保存温度による mRNA-LNP の安定性への影響	22
2-3 凍結保護剤が mRNA-LNP の凍結保存時の安定性に与える影響	23
2-4 振動による mRNA-LNP の安定性への影響	24
2-5 光曝露による mRNA-LNP の安定性への影響	26
2-6 シリンジへの吸引圧が mRNA-LNP に与える影響	27
2-7 LNP に内包された mRNA の鎖長についての評価	28
2-8 マウス生体内におけるルシフェラーゼ活性の評価	29
考察	32
結論	35
謝辞	37
引用文献	38

略語表

8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
A	adenine
ApoE	apolipoprotein E
C	cytosine
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DDS	drug delivery system
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMG	dimiristoylglycerol
DMG-PEG2000	(R)-2,3-bis(octadecyloxy)propyl-1-(methoxy poly (ethylene glycol)2000)propylcarbamate
DLin-DMA	N,N-dimethyl-2,3-bis[(9Z,12Z)-9,12-octadecadien-1-yloxy]-1-propanamine
DLin-MC3-DMA	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl 4-(dimethylamino)butanoate
DSPC	distearoylphosphatidylcholine
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor2 α
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovin serum
G	guanine
H	hour
HIV	human immunodeficiency virus
LNP	lipid nanoparticle
MHC class I	major histocompatibility complex I
MHC class II	major histocompatibility complex II
Min	minute
mRNA	messenger RNA
N1m Ψ	N ¹ -Methylpseudouridine
OTC	ornithine transcarbamylase
PBS	phosphate buffered saline
PDI	polydispersity index

PEG	polyethyleneglycol
Ψ	pseudouridine
RIG-I	retinoic acid inducible gene-I
ROI	region of interest
S.D.	standard deviation
Sec	second
siRNA	short interference RNA
SNALP	stable nucleic acid lipid particle
SPLP	stabilized plasmid lipid particles
TLR	Toll-like receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTR	transthyretin
U	uracil

序論

2020年12月に新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対するワクチンとして、Pfizer/BioNTech社のメッセンジャーRNA（mRNA）封入脂質ナノ粒子（LNP）は、アメリカ食品医薬品局（FDA）によって緊急使用が許可された。申請時の臨床試験における発症予防効果は約95%¹⁾と発表され、その高い臨床成績が注目を集めた。このmRNA-LNPワクチンという新しいモダリティの有用性には、有効成分としてのmRNAと製剤としてのLNPとの両方が寄与している。

mRNAは、宿主ゲノムのDNAに保持された遺伝情報がタンパク質として発現される過程で、情報の担体として合成されるRNAのことである。mRNAの転写や翻訳、分解が調節されることで、細胞の機能、分化や成長を調節する。mRNAを有効成分とする治療薬やワクチンは、目的タンパク質の遺伝情報をmRNAの形で投与し、細胞質でタンパク質に翻訳されて効果を発揮する^{1,2)}。また、mRNA医薬にはその特性から多くの利点がある。第一に、従来の遺伝子治療と比較して、宿主ゲノムへの挿入に関する懸念がなく、安全性に優れる^{3,4)}。第二に、核内に遺伝情報を伝達する必要がないため、有糸分裂能の低い細胞でも治療用タンパク質を効率的に発現させることができる。第三に、mRNA医薬とは治療用タンパク質をコードするmRNAそのものであり、短時間で設計・合成することが可能である^{5,6)}。実際にCOVID-19におけるmRNA-LNPワクチンは、コロナウイルスのゲノム配列が報告されてから、臨床試験に続いて英国で初めて承認されるまで、1年も必要としなかった⁷⁾。COVID-19ワクチンの成功を端緒とし、mRNA医薬は今後、様々なワクチンへの応用や、がんやアレルギーなど他の疾患治療への適用が期待されている^{8,9)}。国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部による調査¹⁰⁾を基に、2023年1月現在の臨床開発段階にあるmRNA医薬を用途別にみると、COVID-19ワクチンに代表されるように感染症予防用ワクチンが7割を占め、がん治療用ワクチン、疾患治療用医薬と続く（Figure 1-1）。感染症予防ワクチンではCOVID-19を

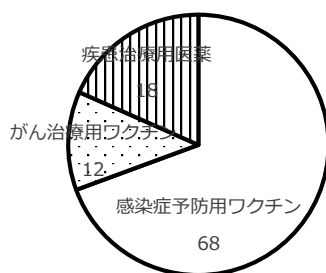


Figure 1-1 臨床開発段階の mRNA 医薬の用途

対象とするワクチンが大多数だが、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、マラリアにおいても開発が進められている。mRNA 医薬をワクチンとして適用した場合には、免疫機構の特徴からの利点加わる。その利点とは、液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導すること¹¹⁾である。例えば、mRNA-LNP ワクチンを筋肉内投与すると、筋細胞に取り込まれ、発現した抗原タンパク質が細胞外に分泌される。分泌された抗原タンパク質は、投与局所の炎症に対応して遊走してきた血中の好中球や単球、樹状細胞によって取り込まれ、特に抗原を取り込んだ樹状細胞は、リンパ節へ移動して MHC class II を介した抗原提示を行い、液性免疫を誘導する。液性免疫では、B 細胞から分化した形質細胞によって産生される抗体が主体であるが、血中で感染したウイルスの表面タンパク質の活性を中和し、新たな細胞への感染を防ぐ。一方、mRNA-LNP ワクチンが樹状細胞に直接取り込まれた場合、内因性のタンパク質が産生される。樹状細胞がリンパ節へ移動し、内因性の抗原を MHC class I を介して抗原提示を行うことで、細胞性免疫を誘導する。細胞性免疫では、CD8 陽性 T 細胞が活性化した細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によって、ウイルス等の感染した細胞やがん細胞が攻撃される。実際に、Pfizer/BioNTech 社 BNT162b2 および Moderna 社 mRNA-1273 において、ワクチンを 2 回投与後の抗原特異的な抗体の産生や、CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の応答が確認された^{11,12)}。

がん治療用ワクチンでは、Moderna 社の mRNA-4157 は個別がん抗原に対する mRNA を使用し、固形がん・メラノーマに対してフェイズ 2 の臨床試験へと進んでいる¹³⁾。これは、次世代の個別化医療に対応した医薬であるともいえる。また、疾患治療用医薬として、先天的な遺伝子異常による代謝異常症に対する酵素補充療法への適用が進められている。オルニチン・トランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損は、肝細胞における OTC の不足により、血中アンモニア濃度が増加する先天的な遺伝性疾患である。未治療では昏睡や死亡に至ることもあるが、根本的な治療法はなく、血中アンモニウム濃度を低下させる対症療法が用いられる。Arcturus Therapeutics 社の ARCT-810 は、OTC をコードする mRNA を脂質ナノ粒子に封入して投与することで、肝臓における正常な尿素サイクル活性を回復させることを目的とした医薬であり、現在は OTC 欠損症の患者に対する Phase 1b が進められている¹⁴⁾。

mRNA 医薬の原点として、1990 年の Wolff らの報告による、naked mRNA をマウスの骨格筋に直接投与し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼやルシフェラーゼの発現が認められた¹⁵⁾ことが挙げられる。しかし、naked mRNA の投与では、治療効果を得るために十分な量のタンパク質を発現させることは難しい。これは、mRNA が約 10^5 - 10^6 Da の

高分子であり、加えて負の電荷密度が高く、そのままでは細胞膜を通過することが難しいことに起因する¹⁶⁾。さらに、mRNA は生体内のあらゆる箇所に存在する分解酵素によって分解される不安定な分子であることから、naked mRNA として投与するには適さない。よって、mRNA 医薬の開発には、その製剤化が不可欠であるといえる。

また、1990年代から mRNA のワクチンへの適用が試みられてきたが、製剤としての実用化には至らなかった¹⁷⁾。これには、mRNA を細胞へ到達させた後の機構も影響している。外来性の mRNA が細胞へ到達すると、その発現は自然免疫によって妨害される。エンドソームに存在する Toll 様受容体 (TLR) や細胞質に存在する RIG-I などの受容体が、外来性の mRNA を認識し、それぞれに固有のアプター分子を介して下流のシグナル伝達経路を活性化する。最終的に炎症性サイトカインおよび I 型インターフェロンの産生を誘導することで、タンパク質合成を阻害し、分解酵素の発現を増加させるなどの機構で、外来性 mRNA 由来のタンパク質発現を低下させることが知られている¹⁸⁻²¹⁾。2008年に Karikó らは、シュードウリジン (Ψ) や N1-メチル-シュードウリジン (N1m Ψ) を組み込んだ mRNA が、eIF2 α のリン酸化を阻害することにより、不要な免疫反応の活性化を防ぎ、タンパク質の発現を向上させることを報告した²²⁾。ヌクレオシド修飾は、mRNA の安定性や翻訳能力を高めると同時に、生体内での免疫原性を低下させる有効な手段である²³⁾。このように生体内での酵素による mRNA の分解を抑制し、細胞における発現を向上させるため、mRNA の改良が進められてきた。

mRNA の改良とともに、細胞内への送達手段、すなわち製剤化でも目覚ましい発展が為されてきた。しかし、新しいモダリティは、臨床での使用において長所のみを示したわけではない。前述した COVID-19 mRNA-LNP ワクチンでは、極低温での輸送・保存や輸送時の振動を抑えることが必要とされる^{24,25)}など、新しい輸送・保存条件が提示された。高所得国では多少の混乱はありながらも接種が進められたが、低所得国では COVID-19 mRNA-LNP ワクチンは高額な販売価格や適切な冷凍輸送のインフラの不足によって、接種が十分に進められていない状況にある²⁶⁾。また、mRNA 医薬は、前述したようにワクチン以外への適用を含めた広範な使用が予想されることから、今後は十全な効果を得るための適切な保管条件に対する理解が必要である。

そこで、本稿の第 1 章では mRNA 送達技術としての脂質ナノ粒子について、文献調査により特性および安定性を整理する。第 2 章では、脂質ナノ粒子の保存安定性に影響を与える可能性がある因子について、物理化学的特性およびタンパク質発現能を指標として評価し、

因果関係を明らかにすることで、研究および臨床での mRNA-LNP の取り扱いについて有益な知見をもたらすものと考えた。

本論

第1章 mRNA 送達キャリアとしての脂質ナノ粒子についての文献調査

緒言

遺伝子や核酸を体内の標的部位に届けるため、DDS 技術は目覚ましく発展してきた。物理的な方法として、一次的に高電圧をかけることで細胞膜を不安定にさせて小孔を開け、そこから核酸を導入するエレクトロポレーション法、細胞に超音波を照射して小孔を開けるソノポレーション法等がある。化学的な方法としては、脂質ナノ粒子やポリマーなどの核酸を運ぶ運搬体（キャリア）の使用が挙げられる。物理的な方法は、皮膚という体表に対して非侵襲的に導入することが可能であるが、深部への導入は難しく、また細胞へのダメージが大きい。一方、キャリアによる導入は非侵襲的に生体への投与が可能であることから、現在まで様々な研究が行われている。特に mRNA を送達するキャリアで、近年注目を集めているのは脂質ナノ粒子（LNP）である²⁷⁾。広義の LNP とは、脂質で構成されたナノ粒子全般を指し、リポソームなど脂質二重膜構造を持つ粒子も含まれる。しかし、本稿では既報を参考に狭義の LNP として、脂質二重膜構造を示さず、水性のコアをもつ構造²⁸⁾と定義した。これに従い、内包する mRNA および外殻となる LNP、および mRNA-LNP 全体の項目に分け、物理化学的な特徴および安定性について論じた。

1-1 mRNA の特徴と安定性

タンパク質や DNA は機能的な構造を取ることが知られているが、同様に mRNA も単なる線状の鋳型分子ではなく、機能化された構造をもつ^{29,30)}。1次構造は、アミノ酸の配列に対応するポリヌクレオチドの塩基配列である。4種類の塩基アデニン (A)、ウラシル (U)、シトシン (C)、グアニン (G) およびリボースを、ホスホジエステル結合で繋いだポリヌクレオチドが RNA である。リボースとホスホジエステル結合においては同じ構造が繰り返され、塩基配列が翻訳後のアミノ酸配列に直結する。加えて、アミノ酸を指定しない場合にも塩基配列は機能をもつ。例えば、コドンの使用頻度は、コードするタンパク質の発現に影響を与える。連続した塩基 3 個を 1 組としてアミノ酸を指定するコドンは、複数のコドンが同一のアミノ酸を指定する同義コドンが存在する。しかし、異なる生物種では、特定のコドンが使用される頻度は異なる。したがって、特定の遺伝子を細胞へと導入した際に、発現宿主でほとんど使われないコドンを多く含むほど、特定遺伝子がコードするタンパク質の発現は低下する³¹⁾。2次構造は、1本鎖のポリヌクレオチドにおいて水素結合によって形成さ

れた塩基対を指す。リボースの 2'ヒドロキシル基に由来して、RNA は DNA よりも水素結合能が高く、A と U、C と G といった単なる相補的な塩基対を作るだけではなく、隣接しないヌクレオチド同士が多様な相互作用を示す。他にファンデルワールス力、スタッキング相互作用などの多様な相互作用を介して、ヘリックスやステムループなどの構造をとり、これらの構造が翻訳効率や mRNA の半減期に影響する^{32,33}。3次構造は、1次構造、2次構造をふまえたポリヌクレオチドの三次元的形状であり、二次構造が更に相互作用によって折り重なり、G 四重鎖構造などを形成する³⁴。3次構造は mRNA の熱力学的な安定性や翻訳伸長反応などに関与する³⁵。したがって、mRNA の高次構造はタンパク質への翻訳効率に影響し、その構造の破綻はタンパク質の発現効率を低下させると考えられる。

mRNA は熱力学的には安定である一方、化学的安定性が低く、分解されやすいことが特徴である。糖であるリボースおよび塩基は、加水分解および酸化の影響を受けやすいことが知られている³⁶。ヌクレオシドをつなぐホスホジエステル結合は、リボースの 2'ヒドロキシル基が脱プロトン化してリン酸を攻撃し、遷移状態を形成したのちに、RNA の鎖を切断する³⁶、すなわち mRNA の一次構造が破綻する。他にも核酸塩基に対する酸化の影響として、塩基の切断や鎖の切断に加え³⁷、変異原性をもつ安定生成物を産生することが報告されている³⁸。核酸塩基の光酸化は、直接的にラジカルカチオンを生成するが、電荷はイオン化ポテンシャルの最も低い残基に移動することができるため、4種類の塩基で最も酸化されやすいグアニンに集中する³⁹。グアニンが酸化されて生成する 8-オキシグアニン (8-oxoG) を含んだ mRNA は、翻訳速度が低下し⁴⁰、さらに翻訳エラーによって異常なタンパク質に翻訳される可能性がある⁴¹。その機構として、tRNA の選択時に 8-oxoG が A と塩基対を形成することが示唆されている⁴²。また、8-oxoG 修飾は RNA の A ヘリックスの形状にはほとんど影響を与えず⁴³、一方では 8-oxoG-C 二重鎖の融解温度は G-C に比べて 10°C も低下して熱力学的に不安定化した。これは塩基の親水性の変化および主要な溝のカチオン結合に与える影響に起因することを示唆している⁴⁴。したがって 8-oxoG は塩基対の形成、すなわち二次構造を変化させ、それに伴って 3次構造も変化させる可能性がある。mRNA が機能化した高次構造をもつことは、このような各次構造の変化によって、その活性が大きく影響を受けることも示している。

1-2 脂質ナノ粒子の特徴と安定性

狭義の LNP は、リポソームに核酸を封入する手法から発展してきた。SPLP (Stabilized

plasmid lipid particles) は、プラスミド DNA 水溶液と、カチオン性脂質および親水基をもつ PEG 脂質を含む脂質エタノール溶液を混合し、カチオン性脂質と負電荷をもつ核酸が静電的相互作用で会合する。一方で、脂質エタノール溶液が水を主とする極性溶媒で急速に希釈され、脂質の溶解度が低下し、疎水性相互作用による自己集合化を経て粒子が形成される⁴⁵⁾。しかし、カチオン性脂質には、*in vivo* において正電荷に由来して肺や肝臓へ集積して毒性や免疫原性を示し、血中のアニオン性タンパク質との相互作用によって脂質の正電荷が中和されて効力が低下するなどの問題がある⁴⁶⁾。この問題への改善策として、Cullis らによって pH に応じてイオン化する脂質、すなわち pH 応答性イオン化脂質である DODAP が開発された⁴⁷⁾。DODAP はその構造に第三級アミンをもち (Figure 1-2)、中性環境下では電荷をもたず、pKa 以下の酸性環境下では正電荷を帯びるといふ、環境に応じて電荷が変化する性質をもつ。

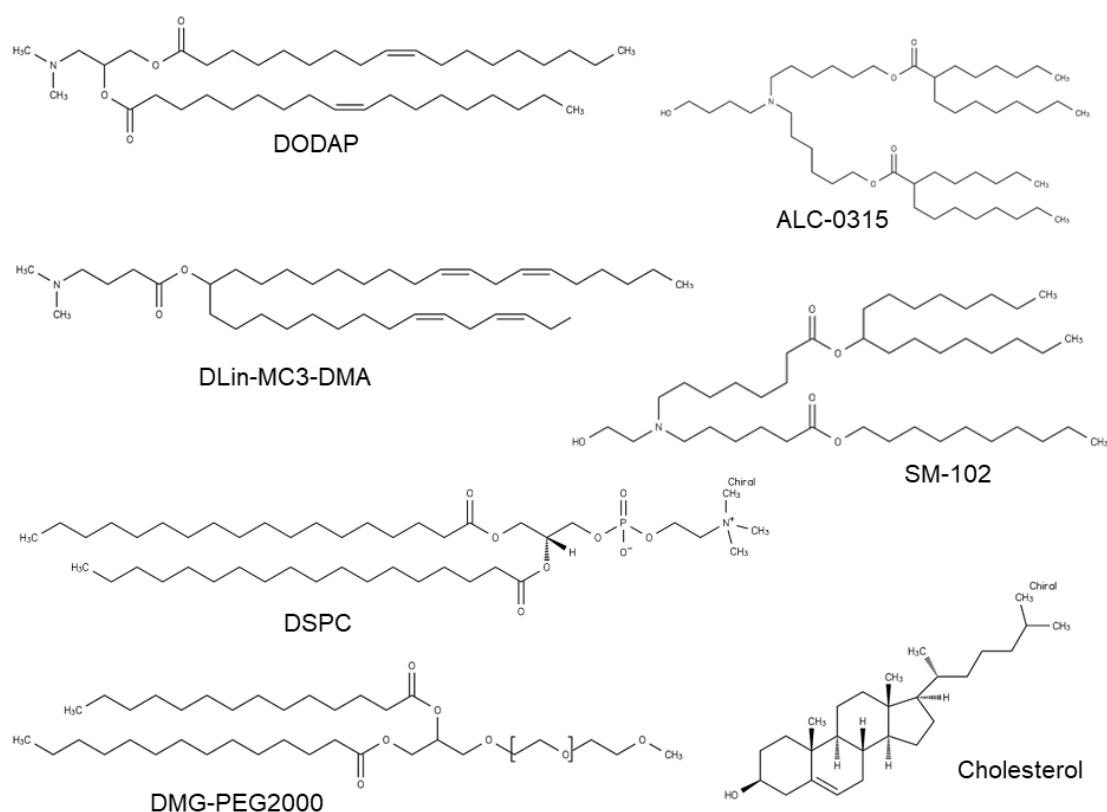


Figure 1-2 LNP の構成脂質

これを適用し、SPLP におけるカチオン性脂質の代わりにイオン化可能な脂質 (イオン化脂質)、DSPC、コレステロール、PEG 脂質の 4 つの脂質を含み、siRNA を封入した SNALP が

開発された⁴⁸⁾。SNALPの脂質組成と同様に、Pfizer/BioNTech社やModerna社のCOVID-19に対するmRNA-LNPワクチンも、イオン化脂質、リン脂質、コレステロール、PEG脂質から構成されている^{3,24,25)}。

粒子の形成時には、DODAPなどのイオン化脂質は、LNPを調製するpH 3~4において正電荷をもち、核酸と静電的相互作用で会合してLNPの自己組織化に貢献する (Figure 1-3)。

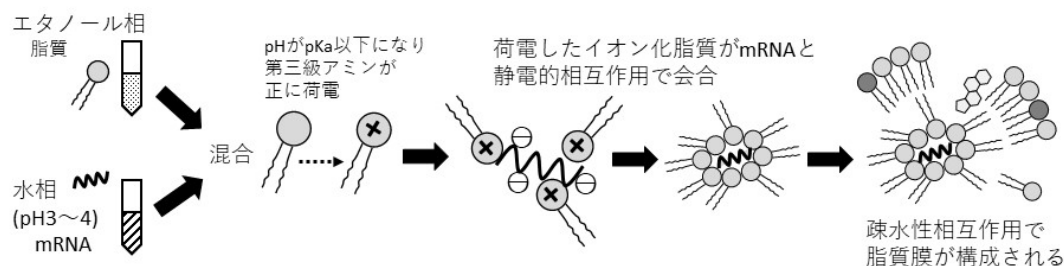


Figure 1-3 LNP 調製時のイオン化脂質の寄与

一方、イオン化脂質は血中の中性 pH では電荷をもたず、LNP としての表面電荷も中性付近を示すため、生体のタンパク質との相互作用は抑えられる。その後、細胞に取り込まれ、エンドソームに移行すると初期エンドソーム内の pH 下では正電荷をもつ。それによりエンドソーム中で正電荷をもったイオン化脂質は、負電荷をもつエンドソーム膜と相互作用することで膜を不安定化させ、エンドソーム脱出に貢献する^{49,50)}。加えて、エンドソーム内では、第三級アミンにプロトンが付加することで、細胞質からプロトンおよび対イオンが流入し、エンドソーム内のイオン浸透圧が上昇して崩壊を促進するプロトンスポンジ効果も得ることができる (Figure 1-4)。

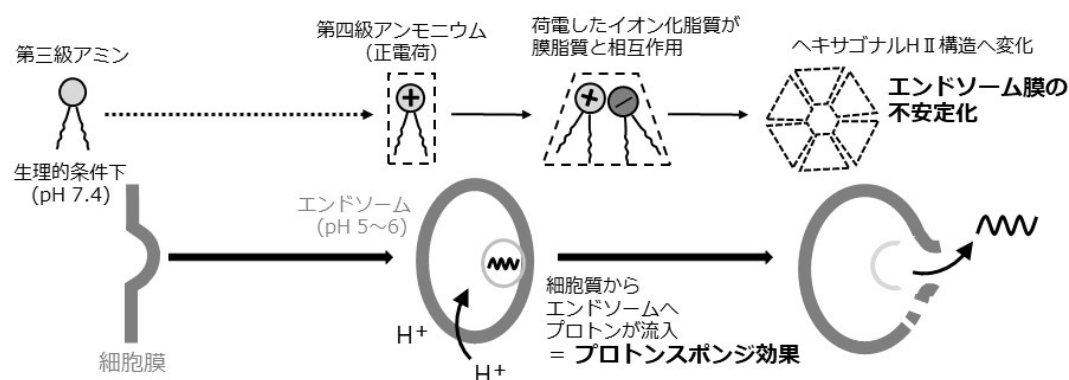


Figure 1-4 LNP のエンドソーム脱出機構

イオン化脂質のエンドソーム脱出能を向上させる重要な要素として、見かけの酸解離定数である pKa がある。この場合の pKa とは、イオン化脂質やそれを用いた LNP が正に帯電する見かけの pH を示し、イオン化脂質の鎖長を変化させて調整することが可能である⁵¹⁾。二

重結合を導入した、すなわち不飽和結合をもつイオン化脂質において不飽和度が増加するほどエンドソーム脱出能が増加した報告⁵²⁾があるが、不飽和結合は同時に酸化されやすいことも特徴である。Gilleron らの報告では、細胞に取り込まれた siRNA-LNP において、内包する siRNA を細胞質に放出するのは 2%未満であると推定されている⁵³⁾。また、Wittrup らによって、LNP に内包された siRNA のエンドソームからの放出が、エンドサイトーシスから 5~15 分以内に起こることを報告された⁵⁴⁾。したがって、効率的にエンドソーム脱出を行うことが、LNP の性能を決定する上で重要である。

改良を重ねたイオン化脂質の例として、DLin-MC3-DMA が挙げられる。Alnylam Pharmaceuticals 社が開発したイオン化脂質 DLin-DMA を改良した DLin-MC3-DMA は、mRNA 封入率静脈内投与における肝臓への siRNA 送達効率を向上させた⁵⁵⁾。標的遺伝子を TTR とした siRNA-LNP を用いた家族性アミロイド多発ニューロパチーに対する臨床試験において、DLin-DMA を用いた LNP では最大投与量 1 mg/kg とした場合に平均で 40%程度の抑制効率を示したが、DLin-MC3-DMA では最大投与量 0.3 mg/kg とした場合に 80%以上の遺伝子抑制効率を示した⁵⁶⁾。この DLin-MC3-DMA は、世界初の siRNA-LNP 医薬品であるオンパットに使用されている。siRNA は、細胞内において RNA 干渉という現象により mRNA を切断し、その発現を抑制する。一本鎖 RNA である mRNA は、大部分が二本鎖となる siRNA の 100 倍以上の分子量をもつ³⁾ため、LNP 内部の siRNA と mRNA の立体構造が異なることは明らかである。すなわち、siRNA-LNP に対して最適な組成が mRNA-LNP に対して最適とは限らない。DLin-MC3-DMA は、当初は siRNA 送達を目的に開発されたイオン化脂質であるが、mRNA-LNP への応用例も既に多数が報告されており、mRNA 送達においてもベンチマークであるイオン化脂質である⁵⁷⁾。

さらに mRNA の送達に適したイオン化脂質の改良が進められており、Sabnis らは、DLin-MC3-DMA と比較し、エステラーゼによる加水分解が効率的に行われるようなエステル導入部位、pKa、脂質鎖長の最適化を行い、エンドソーム脱出効率を DLin-MC3-DMA の 2.5% に対して 15%へと改良することで送達効率を向上させ、迅速な生体内代謝、および低毒性を示す脂質 lipid 5 を開発した⁵⁸⁾。この Lipid 5 は更に最適化されて、その後 Moderna 社の SM-102 へと至った。この SM-102 や Pfizer/BioNTech 社の ALC-0315 の構造 (Figure 1-2) が示す通り、現在、上市されている mRNA-LNP に使用されるイオン化脂質は、不飽和結合を持たずに分岐鎖をもつイオン化脂質が主流となっている。分岐鎖を導入することで、頭部のアミノ基のイオン化能力を高め⁵⁹⁾、膜輸送や膜結合酵素の機能、受容体結合に重要な微小

粘度が増加し⁶⁰、分岐鎖が脂質二重層中の分子の回転運動を制限することが示唆された^{61,62}。

他の LNP の構成脂質として、PEG 脂質は、親水的な PEG 部分と疎水的な脂質部分から構成される。脂質部分は粒子の膜構造内に埋没し、親水性の PEG 部分は脂質粒子の表面から伸長する形態をとる⁵¹。PEG が立体的な障壁となって表面に親水部のバリアを作ることによって、LNP 同士の凝集や血中のタンパク質との非特異的な結合を回避し、生体内の安定性を高めることに加え、細網内皮系による認識を回避し、循環半減期を延長して免疫原性を低減する⁶³。加えて、LNP の調製時の自己組織化に大きく貢献し、PEG 脂質の割合を変化させることで粒子径や PDI を調節できる^{64,65}。一方で、過剰な PEG 脂質はエンドソーム脱出を妨げ、mRNA の翻訳効率を低下させるため、目的に応じて PEG 脂質の割合を最適化する必要がある。PEG 脂質は、それを使用した mRNA-LNP の複数回投与による抗 PEG 抗体の産生⁶⁶や、好塩基球の活性化によるアレルギー⁶⁷の可能性が示されており、PEG 脂質の代替としてポリサルシコリンなど PEG 様ポリマーの検討⁶⁸も進められている。

ヘルパー脂質であるリン脂質やコレステロールも、LNP の構造安定化や膜融合能に寄与する重要な要素である⁶⁵。リン脂質である DSPC は、PEG 水和層の下部の安定な膜構造の形成に寄与している⁶⁹。コレステロールは、粒子の間隙を充填して構造を安定化させ、エンドソームにおける膜融合にも寄与すると考えられている。また、生体内で PEG が LNP から脱離すると、LNP 表面に露出したコレステロールに循環血中の ApoE タンパク質が結合する。この複合体が肝臓に多く発現する LDL 受容体を介して肝細胞への LNP の取り込みに寄与する⁷⁰。生体に mRNA-LNP を投与すると、主に発現が確認されるのは肝臓であり、投与経路によっては投与局所での発現も認められる⁷¹⁻⁷³。肝臓への LNP の集積は副作用の懸念とともに、標的臓器への送達に対する障害ともなりうるため、LNP の肝臓への集積を低下させることが課題である。

mRNA-LNP は、一般的に高い mRNA 封入率と低分散性を示す高品質な粒子が得られることが知られているが^{74,75}、仮に同じ脂質を用いたとしても、脂質組成の割合を変化させると LNP の粒子径や mRNA の封入率が大きく変化する⁷⁶。LNP として一般的な組成は存在せず、使用する脂質や標的臓器に対して最適化する必要がある。

脂質ナノ粒子の安定性について化学的および物理的側面から検証すると、各脂質分子および全体としての粒子の観点に分けられる。化学的安定性を損ねる要因として、脂質分子の加水分解や酸化が挙げられる。イオン化脂質のもつ第三級アミンは酸化されると N-オキシド分解され、更に加水分解されて第二級アミンとアルデヒドを生成する⁷⁷。アルデヒドは

核酸塩基に付加することが知られており⁷⁸⁾、不純物を生成する可能性がある。リン脂質に対する化学的不安定性の要因として、不飽和結合をもつ場合には酸化され、リン酸エステル部分は水溶液中で加水分解される。リン酸エステルの加水分解は、pH や温度の影響で促進される⁷⁹⁾。また、エステルの加水分解は、エンドソーム脱出能を増強する目的で設計された部分であるカルボン酸エステルにおいて、標的箇所への送達以前に進行する可能性がある⁸⁰⁾。

粒子の物理的安定性が低下する要因として、粒子の凝集、融合、内包物の漏出が挙げられる。凝集では、個々の脂質ナノ粒子が物理的な完全性を保持した状態で、粒子が組み合わされた凝集体としてのサイズが大きくなる。一方で、融合による粒子成長は、新たなコロイド構造の形成を伴う。一般的に粒子径および PDI が同時に増大した場合、粒子の凝集を示すと解釈される⁸¹⁾ことが多いが、現在汎用されている動的光散乱法では凝集と融合を判別することは難しく、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法などによる多角的な解析が必要である。また、凍結融解や振動などの機械的ストレスは、粒子に物理的変化を与えることが知られている。ボルテックスやシリンジへの注入といった機械的ストレスにより、mRNA-LNP の粒子径および多分散指数 (polydispersity index; PDI) が著しく増加し、またボルテックスによる機械的ストレスが LNP 内部の mRNA を分解したことが示唆された⁸²⁾。また、凍結・融解の繰り返しという強い物理的ストレスにより粒子内部の小胞構造が変化し、LNP が会合してより大きなサブミクロン粒子を形成した⁸³⁾。機械的ストレスは、粒子の内包物質を漏出させることも知られており、Pfizer/BioNTech 社の mRNA-LNP ワクチンをシリンジに高速で繰り返し注入することで、最大 50% の mRNA の漏出が認められたことが報告されている⁸⁴⁾。4°C の長期保存では、水溶液で粒子の融合、加水分解、薬物の漏出が多くポリマーおよびリポソームによって示されたのと同様に、siRNA-LNP においても 14 日間までの保存で内包する siRNA が漏出した⁸¹⁾。一方、低分子量かつ非対称なイオン化脂質を使用した場合に、4°C で長期間保存すると粒子径と PDI が増加するという不安定性は、オルトワールド熟成によるものと示された⁸⁵⁾ことから、脂質分子の構造も粒子の物理的安定性に寄与すると考えられる。また、総体としての粒子に加えて、脂質膜の構造も安定性へ寄与する。本研究の第 2 章で使用したものと同一の、DLin-MC3-DMA を含む脂質組成で mRNA を封入した LNP はラメラ構造をもち、コアの大部分がイオン化脂質、mRNA、コレステロールで構成され、外側を DSPC と PEG 脂質の層で囲まれていること、加えて LNP の粒子径と構造の両方が細胞内タンパク質産生に大きな影響を与えることが示された⁸⁶⁾。また、LNP 脂質膜のラ

メラ構造が非ラメラ構造へと変化した場合に、mRNA 送達効率に影響を与えることも報告されている⁸⁷⁾。したがって、粒子の物理的安定性は、内包する mRNA の送達能へ影響を与えることが示唆される。

1-3. mRNA 封入脂質ナノ粒子の特徴と安定性

mRNA においては構造安定性と化学的安定性の間に密接な関係があり^{88,89)}、脂質ナノ粒子に封入された mRNA は、遊離型の mRNA とは異なり、よりコンパクトな構造をとって熱的に安定であることが報告されている⁸⁸⁾。粒子の調製条件にもよるが、mRNA の立体構造保持という点で、粒子への封入は安定性を向上させる手段となりうる。

一方で、LNP への封入が、mRNA の安定性を低下させる要素ともなる。mRNA-LNP を 40°C で保存して抽出した mRNA には、イオン化脂質の第 3 級アミンに由来する酸化物であるアルデヒドなどが付加した不純物がみられ、この不純物が増えるほど mRNA の翻訳能が低下し、タンパク質の発現を減少させることが報告されている⁷⁷⁾。また、脂質のカチオン性部分の影響で、内包された mRNA の 2' ヒドロキシル基の pKa が低下し、加水分解が促進される可能性も示されており³⁶⁾、LNP 構成脂質の化学的な不安定性が、内包する mRNA の化学的安定性へ影響する可能性がある。また、LNP のコアは、siRNA ではほとんど水が内包されていないのに対し、mRNA を内包する場合には体積分率において 24% が水で構成され⁸⁶⁾、酸化や加水分解を受けやすい環境であることが推定される。

粒子の物理的な変化が mRNA の活性に影響を与えた例としては、LNP の凝集あるいは融合は、内包する siRNA の活性低下を引き起こした⁸¹⁾。凍結させて粒子径が増大した mRNA-LNP は、内包する mRNA がコードするタンパク質の発現を減少させる⁹⁰⁾ことも報告されている。これは、単に LNP のエンドソーム脱出能などの機能が失われたことに加え、LNP の形態、脂質膜の構造、および内包された mRNA の微小環境は送達効率と密接に関係する⁸⁶⁾ことが示唆されていることから、mRNA と LNP の両方に関連する高次構造が重要であることも明らかである。

したがって、粒子の脂質分子および内包する mRNA の化学的分解を防ぎ、高次構造を保持することにより、mRNA-LNP の安定性を保持することができる。化学的な不安定性への対処として、溶解させる緩衝液の組成を変更した例がある。Pfizer/BioNTech 社の mRNA-LNP ワクチンは、当初 PBS/スクロース製剤を使用していたが、第二世代として Tris/スクロース製剤へ変更された⁹¹⁾。これにより、凍結したバイアルを解凍して 2~8°C で保存する

期間は、第一世代では最大 1 か月であったが、第二世代では最大 10 週間となった。バイアルの室温保存の時間においても、第一世代では最大 6 時間、第二世代では 12 時間と延長された。この理由として、ナトリウムイオンが存在する PBS は凍結中に pH が変化する可能性があったことや、Tris がアルデヒドの受け皿となり (Figure 1-5)、mRNA とアルデヒドによる付加体の形成を抑制すること⁸⁰⁾が考えられる。

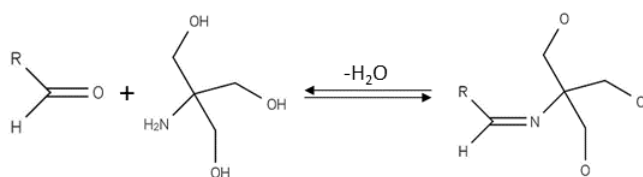


Figure 1-5 Tris とアルデヒドとの反応

また、凍結による凝集から保護するスクロースやトレハロースを添加した極低温での保存⁸¹⁾は、実用化されている安定的な保存法²⁴⁾であるが、mRNA-LNP 製剤における今後の広範な適用を考慮した場合に、極低温での輸送・保管が律速となる。また、凍結乾燥法^{92,93)}や噴霧乾燥法⁹⁴⁾によって製剤化した報告もあるが、実用化までには至っていない。mRNA、LNP および mRNA-LNP として、それぞれが不安定化する要因を明確にした上で、影響を最小化できる適切な保存法へと改良することが必要である。

第2章 物理化学的特性およびタンパク質発現能を指標とした mRNA 封入脂質ナノ粒子の保存安定性に影響を与える因子の評価

緒言

mRNA-LNP 製剤は、輸送・保管時にかなり低温に保つ必要があるなど、厳密な管理が必要であることが指摘されている^{24,25)}。mRNA のみを室温で保存した場合、RNase を厳密に除去した条件下では、14 日後でも *in vitro* での翻訳効率が若干低下するに留まる⁹⁵⁾。一方、外部からの物理的刺激により、ナノ粒子の凝集や mRNA のナノ粒子からの漏出が起り、発現効率が顕著に低下することが報告されている⁸⁴⁾。第一章で述べた通り、mRNA-LNP が不安定化する要因を明確にした上で保存法の改良に取り組むべきであるが、mRNA-LNP 製剤は新しいモダリティであり、保存条件が mRNA-LNP の物理化学的性質やタンパク質発現能にどのような影響を与えるか、系統的に検討した情報が不足している。

本研究では、標準的な LNP として、イオン化脂質 DLin-MC3-DMA を用いた組成を選択した。その脂質組成は、Alnylam Pharmaceuticals 社が siRNA-LNP 製剤である Onpattro で使用した組成と同じく、イオン化脂質 : DSPC : cholesterol : DMG-PEG2000 = 50 : 10 : 38.5 : 1.5 mol%とした⁷⁰⁾。これは、mRNA も含む核酸封入 LNP のベンチマークとされた脂質組成であり⁵⁶⁾、Moderna 社のワクチンも含めて広範に参照されている。我々は、Kis らが挙げた条件²⁶⁾を参考に、工場での生産から接種までの全工程において保存安定性に影響を与えると考えられる様々な物理条件を選択し、mRNA-LNP をこれらの条件に晒して物理化学的性質やタンパク質発現能への影響を検討した。具体的には、保存温度、凍結保護剤、振動、光照射、バイアルからのシリンジ吸引が、ナノ粒子サイズの多分散性指数、ゼータ電位、mRNA 保持率、ルシフェラーゼをレポーターとして *in vitro* および *in vivo* タンパク質発現に与える影響を評価した。

実験方法

細胞培養

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞は、理化学研究所バイオリソースセンター（日本、茨城）から購入した。培地として 10% v/v FBS、1000 units/mL penicillin、および 100 µg/mL streptomycin を添加した DMEM を使用し、5.0% CO₂、37°C、湿潤環境下で培養した。

実験動物

実験には ddY マウス（4～5 週齢、雄性）を SLC（静岡、ジャパン）から購入して使用した。動物実験は、長崎大学動物実験指針および長崎大学動物実験施設委員会の承認を得た上で実施した（承認番号：1812251497-7）。

mRNA の in vitro 転写

mRNA は、Ogawa らの報告⁹⁶⁾と同様に、鋳型プラスミド DNA から in vitro 転写にて合成した。Poly A を組み込み、ホタルルシフェラーゼをコードする鋳型プラスミド DNA を制限酵素 SapI で切断し、HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) と CleanCap® Rea-gent AG (TriLink BioTechnologies, NorthPark, CA, USA) を使用して mRNA を転写した。次いで、合成した mRNA を精製した。

mRNA-LNP 調製（マイクロ流体法）

mRNA-LNP は、既報^{74,75)}を参考にして調製した。具体的に、水相はルシフェラーゼをコードする mRNA を最終濃度 50 mM クエン酸バッファー（pH 3.0）に溶解させた。エタノール相は、イオン化脂質 DLin-MC3-DMA (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)、DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti)、コレステロール (nacalai tesque, Kyoto, Japan) および DMG-PEG2000 (NOF CORPORATION, Tokyo, Japan) を 50 : 10 : 38.5 : 1.5 のモル比にて調製した。水相とエタノール相を NanoAssemblr Benchtop (Precision NanoSystems Inc., Vancouver, BC, Canada) およびマイクロ流体デバイスを用いて 3:1 の流量比で混合した。調製した mRNA-LNP は直ちに SnakeSkin™ Dialysis Tubing (10,000 MWCO, Thermo Fischer Scientific Inc.) へ移し、4°C で 18～20 時間かけて PBS (pH7.4) 中で透析し、エタノールを除去した。透析時のバッファーの液量は、サンプルに対して約 500～1000 量とした。透析後、Amicon Ultra (100,000 Da, Merck KGaA) を用いてサンプルを濃縮し、0.45µm メ

ンブランフィルターで濾過した。

粒子の物理化学的性質の測定

粒子の物理化学的性質は、ZetaSizer Nano (Malvern Panalytical, UK) にて、強度平均粒子径 (Z-average)、多分散指数 (PDI)、ゼータ電位を測定した。LNP 内部に封入および保持された mRNA の割合と mRNA 濃度は、Ogawa らの報告⁹⁶⁾と同様に Quant-iT RiboGreen RNA Reagent Kit (Life Technologies, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。LNP 内部の mRNA 量を定量するため、LNP を TE バッファーで 100 倍に希釈し、10%v/v ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan) を添加した。蛍光 (励起波長 485 nm、発光波長 530 nm) は、SpectraMax iD3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて検出した。ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテルを添加しないサンプルから得られた RNA 濃度は LNP 外部の mRNA 濃度を示し、ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル処理を行ったサンプルは、LNP の外部および内部の総 mRNA 濃度を示すものと定義し、mRNA 保持率を計算した。

In vitro ルシフェラーゼ活性の評価

HepG2 細胞を 48 ウェル平底プレートに 4×10^3 cells/cm² で播種し、24 h 後に mRNA として 0.1 µg/well の mRNA-LNP を添加した。プレートに細胞を播種して 48 h 後、細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、150 µL の溶解バッファーを添加した。氷上に 20 分間静置して溶解し、チューブに回収したサンプルを遠心分離し、100 µL の上清を回収した。ルシフェラーゼ活性は PicaGene (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて測定し、同時に測定したタンパク質濃度を用いて補正した。

mRNA-LNP より抽出した mRNA 鎖長の評価

脂質ナノ粒子の膜構造を崩壊させるため、100 µL の mRNA-LNP に対して 10% v/v ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル 4 µL を加え、数秒間ボルテックスした後、15 分間インキュベートした。mRNA-LNP 半量となる 8 M 塩化リチウム溶を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、溶液を 20,600×g で 30 分間、4°C で遠心分離した。上清を捨て、ペレットを 70%エタノールで 2 回洗浄した。ペレットはデシケーターで乾燥

させてから、20 μ L の RNase-free water に再懸濁した。0.2 μ g の mRNA に、50%ホルムアミド、0.4 M ホルムアルデヒド、1×MOPS バッファー、および 0.02%エチジウムブロマイドからなる変性バッファーを 10 μ L 添加して変性させ、アガロースゲル電気泳動を行った。

マウス生体における経時的なルシフェラーゼ活性の評価

体毛による光子の散乱と吸収を抑えるため、あらかじめマウスは剃毛した。mRNA として 2 μ g の mRNA-LNP を右後肢の筋肉内に投与した。PBS に溶解させた D-ルシフェリン溶液 (30 mg/mL, Syd Labs, Boston, MA, USA) 150 μ L をマウスの腹腔内に投与し、IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) にて、露光時間を 1 min として経時的な生体内発光を測定した。ROI における発光量は、Living Image 3.0 ソフトウェア (Caliper Life Sciences) を使用して解析した。

マウス臓器におけるルシフェラーゼ活性の評価

マウス生体における各組織のルシフェラーゼアッセイは、既報^{97,98)}を参考に実施した。mRNA として 2 μ g の mRNA-LNP をマウスの右後肢筋肉内に投与した。4.5 時間後、マウスを屠殺し、肝臓と筋肉を回収した。各組織は、冷 PBS で 2 回洗浄し、溶解バッファーでホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離し、ルシフェラーゼ活性は PicaGene (東洋紡績) を用いて測定し、タンパク質濃度を用いて補正した。

統計解析

統計解析は Tukey または Dunnett の検定による一元配置分散分析で行った。データは平均値 \pm 標準偏差(S.D.)で示した。* $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ は統計的に有意であるとみなした。すべての in vitro の実験において、少なくとも 3 つの独立した試行を行った。

結果

2-1 時間依存的な mRNA-LNP の物理化学的性質の安定性

まず初めに、4°Cにおける mRNA-LNP の時間依存的な物理化学的性質の変化を評価した。調製直後の LNP の粒子径は 112.2 nm、ゼータ電位は -5.723 mV、mRNA 保持率は 93.96%であった (Table 2-1)。7 日間、mRNA-LNP の粒子径、PDI、ゼータ電位、および mRNA 保持率は維持された。

Table 2-1 時間依存的な mRNA-LNP の物理化学的性質の評価

Time (Days)	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
0	112.2 ± 1.3	0.081 ± 0.022	-5.72 ± 1.41	93.96 ± 1.19
1	114.9 ± 2.9	0.086 ± 0.039	-6.29 ± 2.34	95.67 ± 5.06
3	113.1 ± 2.2	0.061 ± 0.018	-6.13 ± 1.26	93.00 ± 2.50
5	111.6 ± 2.0	0.047 ± 0.043	-4.88 ± 0.67	95.45 ± 0.96
7	112.5 ± 1.0	0.065 ± 0.027	-4.15 ± 1.62	95.58 ± 1.46

データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は Tukey's test によって行った。

2-2 保存温度による mRNA-LNP の安定性への影響

複数の温度条件下での安定性を評価した。Pfizer/BioNTech 社の COVID-19 mRNA ワクチンは-90~-60°C、Moderna 社の COVID-19 mRNA ワクチンは-25~-15°Cでの保管が推奨されている^{24,25}。それらの条件を参考に、LNP はディープフリーザー (-80°C)、フリーザー (-30°C)、冷蔵庫 (4°C)、室温 (25°C) のいずれかで7日間保存した。7日後、各 LNP 溶液を冷蔵庫で4時間静置し、解凍されたことを確認して物理化学的性質を評価した。

-80°Cで保存した LNP は、粒子径および PDI が増加し、mRNA 保持率 (Table 2-2) およびルシフェラーゼ発現量 (Figure 2-1) は減少した。しかし、4°Cおよび 25°Cで保存した LNP は、粒子径、PDI、mRNA 保持率は維持したが、ルシフェラーゼの発現量は減少した。

Table 2-2 温度変化による mRNA-LNP の物理化学的特性への影響

Storage Temperature	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
-80 °C	904.6 ± 107.7 **	0.695 ± 0.055	-20.06 ± 1.01	50.51 ± 10.37 **
-30 °C	170.8 ± 6.8	0.235 ± 0.028	-4.20 ± 1.19	92.97 ± 2.48
4 °C	112.5 ± 2.3	0.081 ± 0.040	-5.46 ± 1.43	97.34 ± 0.73
25 °C	113.4 ± 6.8	0.083 ± 0.005	-6.61 ± 2.15	96.72 ± 0.40

データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は 4 °C 群を対照とした Dunnett's test により行った (** $p < 0.01$)。

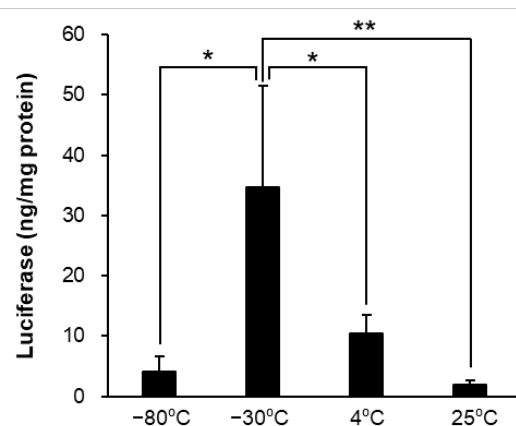


Figure 2-1 保存温度による in vitro ルシフェラーゼ活性への影響。mRNA-LNP は、-80, -30, 4, 25 °C で各 7 日間保存し、解凍した。各 mRNA-LNP を HepG2 細胞に添加した 24 h 後のルシフェラーゼの発現を測定した。データは平均+S.D. (n = 3) で表した。統計解析は Tukey's test により行った (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

2-3 凍結保護剤が mRNA-LNP の凍結保存時の安定性に与える影響

凍結保護剤について、Pfizer/BioNTech 社と Moderna 社のワクチンにおいてスクロースの最終濃度は 10%(w/v)^{24,25)}であり、スクロースはナノ粒子の物理化学的性質および siRNA の活性に影響を与えないことが報告されている⁹⁹⁾。そこで、-80 °C で凍結保存した際の LNP の凝集を防ぐために、凍結保護剤としてスクロースを添加して実験を行った。スクロースの添加により、-80 °C で保存した LNP の物理化学的性質 (Table 2-3) およびルシフェラーゼ発現が改善された (Figure 2-2)

Table 2-3 凍結保護剤による mRNA-LNP 凍結時の物理化学的特性への影響

	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
-80 °C, Sucrose (-)	383.2 ± 41.9 **	0.593 ± 0.065	-10.65 ± 0.92	50.83 ± 11.24 **
-80 °C, Sucrose (+)	118.4 ± 5.9	0.098 ± 0.011	-8.71 ± 0.60	83.66 ± 3.22
4°C	110.7 ± 1.5	0.065 ± 0.038	-7.75 ± 2.75	87.25 ± 4.30

mRNA-LNP は、-80 °C (スクロース添加有もしくは無) または 4 °C で 7 日間保存し、解凍した後に各測定を行った。データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は 4 °C 群を対照とした Dunnett's test により行った (** $p < 0.01$)。

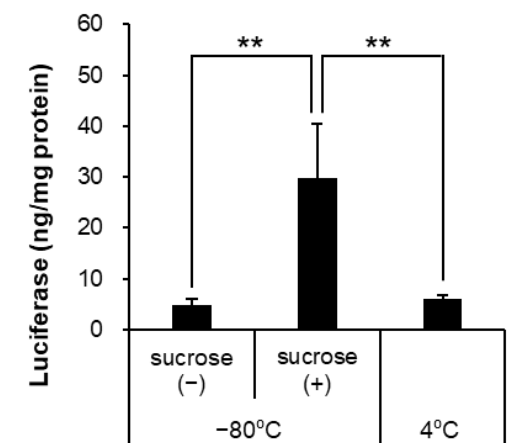


Figure 2-2 凍結保護剤による mRNA-LNP 凍結時の in vitro ルシフェラーゼ活性への影響。mRNA-LNP は、-80 °C (スクロース添加有もしくは無) または 4 °C で 7 日間保存し、解凍した。各 mRNA-LNP を添加した 24 時間後の HepG2 細胞におけるルシフェラーゼ発現量を測定した。データは平均+S.D. (n = 3) で表した。統計解析は Tukey's test により行った (** $p < 0.01$)。

2-4 振動による mRNA-LNP の安定性への影響

mRNA-LNP の保管における重要な要素として振動がある。Pfizer/BioNTech 社 および Moderna 社のワクチンは、振動を与えないように警告されている^{24,25)}。そこで、弱い振動および強い振動が mRNA-LNP に与える影響について検証した。タッピングを弱い振動、ボルトックスを強い振動と仮定した。強い振動は、同じ 5 分間でも弱い振動に比べ、粒子径および PDI を増加させ、内包する mRNA を流出させた (Table 2-4)。弱い振動および短い強い振

動はルシフェラーゼの発現に影響を与えなかった (Figure 2-3)。

Table 2-4 振動による mRNA-LNP の物理化学的性質への影響

Vibration	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
No vibration	114.5 ± 2.9	0.076 ± 0.027	-10.69 ± 5.29	89.84 ± 1.24
Tapping 10 s	120.5 ± 20.7	0.139 ± 0.081	-8.73 ± 3.19	93.51 ± 3.09
Tapping 30 s	114.7 ± 4.5	0.084 ± 0.055	-8.93 ± 1.86	91.85 ± 2.13
Tapping 5 min	119.6 ± 5.2	0.154 ± 0.067	-11.58 ± 4.51	85.62 ± 4.04
Vortex 10 s	115.5 ± 6.4	0.100 ± 0.043	-9.29 ± 2.21	88.29 ± 2.59
Vortex 30 s	116.7 ± 5.9	0.085 ± 0.024	-11.47 ± 1.01	93.69 ± 1.39
Vortex 5 min	242.8 ± 55.3 **	0.427 ± 0.202	-15.35 ± 0.17	41.58 ± 30.61 **

mRNA-LNP は、それぞれ 10 秒間、30 秒間、5 分間タッピングまたはボルテックスにて振動に曝露させた後に各測定を行った。データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は No vibration 群を対照として Dunnett's test により行った (** $p < 0.01$)。

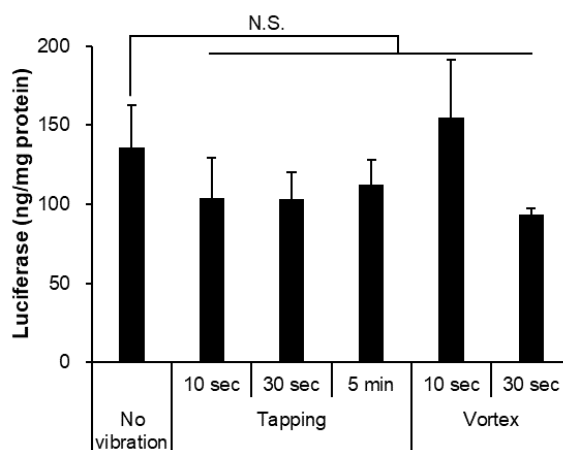


Figure 2-3 振動による in vitro ルシフェラーゼ活性への影響。mRNA-LNP は、それぞれ 10 秒間、30 秒間、5 分間タッピングまたはボルテックスにて振動に曝露させた。各 mRNA-LNP を添加した 24 時間後の HepG2 細胞におけるルシフェラーゼの発現を測定した。ボルテックスで 5 分間の振動を与えた mRNA-LNP は、mRNA が著しく漏出して細胞に添加する量を確保できなかった。データは平均+SD (n = 3) で表した。統計解析は No vibration 群を対照として Dunnett's test により行った (N.S. not significant difference)。

2-5 光曝露による mRNA-LNP の安定性への影響

Pfizer/BioNTech 社および Moderna 社のワクチンは、光に不安定であることが報告されているが、mRNA-LNP に対する光曝露の影響についての詳細な情報は公表されていない。そこで、光曝露が mRNA の安定性に与える影響について検討するため、限定された条件下での mRNA-LNP の物理化学的特性とルシフェラーゼの発現について検討した。25°Cにおいて、通常の蛍光灯下で 20 h の曝露 (1000 lx, 総曝露量 2×10^4 lx·h) を行った群と、6000 lx で 20 h の曝露 (総曝露量 1.2×10^6 lx·h) を行った群、同じく 20 h の遮光を行った群を設定して比較した。光曝露により、粒子径、PDI、mRNA 保持率に変化はなかったが (Table 2-5)、ルシフェラーゼ発現量は光曝露量に依存して減少する傾向が認められた (Figure 2-4)。

Table 2-5 光曝露による mRNA-LNP の物理化学的性質への影響

Condition	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
No exposure	116.8 ± 5.8	0.045 ± 0.016	-4.37 ± 0.32	93.06 ± 2.32
Light exposure (2×10^4 lx·h)	116.1 ± 6.8	0.079 ± 0.060	-4.71 ± 2.29	94.77 ± 1.54
Light exposure (1.2×10^6 lx·h)	114.3 ± 5.1	0.050 ± 0.009	-5.24 ± 1.06	95.11 ± 1.30

mRNA-LNP は、それぞれ光曝露 (総曝露量 2×10^4 lx·h、 1.2×10^6 lx·h) もしくは遮光 (No exposure) した後に各測定を行った。データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は No exposure 群を対照とした Dunnett's test により行った。

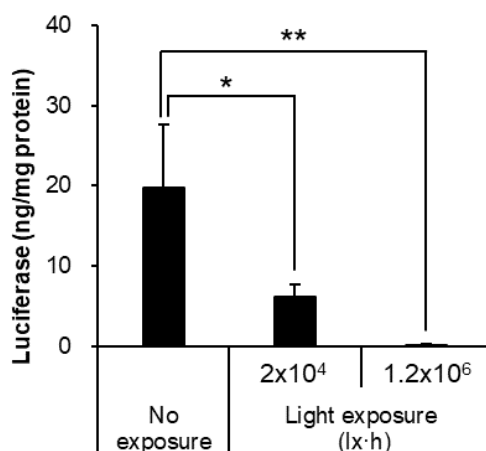


Figure 2-4 光曝露による in vitro ルシフェラーゼ活性への影響。mRNA-LNP は、mRNA-LNP は、それぞれ光曝露 (総曝露量 2×10^4 lx·h、 1.2×10^6 lx·h) もしくは遮光 (No exposure)

した。各 mRNA-LNP を添加した 24 時間後の HepG2 細胞におけるルシフェラーゼの発現を測定した。データは平均±SD (n = 3) で表した。統計解析は No exposure 群を対照とした Dunnett's test により行った (* p < 0.05, ** p < 0.01)。

2-6 シリンジへの吸引圧が mRNA-LNP に与える影響

Salmin らの報告によると、mRNA-LNP は吸引したシリンジの材質に依存せず、約 1 日間その物理化学的特性を維持したが、手動で 40 回ポンピングするという強い機械的ストレスによって粒子は凝集した⁸²⁾。そこで、バイアルからシリンジおよび注射針を通して採取した LNP の吸引圧によって凝集するかどうかを検討した。5 本のシリンジを用いて同じバイアルから各 50 μL を採取し、粒子の物理化学的性質および生物学的活性を評価した。結果として、粒子径、PDI、mRNA 保持率 (Table 2-6)、HepG2 細胞におけるルシフェラーゼ発現量 (Figure 2-5) において有意な変化は認められなかった。

Table 2-6 バイアルからのシリンジを用いた吸引による mRNA-LNP の物理化学的性質への影響

The Number of Suctions	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)	mRNA Retention Rate (%)
1	90.6 ± 2.2	0.072 ± 0.020	-11.16 ± 0.37	91.47 ± 1.57
2	90.5 ± 1.5	0.062 ± 0.040	-10.81 ± 1.55	89.52 ± 4.22
3	92.0 ± 1.8	0.074 ± 0.016	-12.08 ± 1.95	94.44 ± 2.09
4	91.4 ± 1.1	0.071 ± 0.026	-10.18 ± 2.13	92.29 ± 2.88
5	90.2 ± 1.8	0.064 ± 0.016	-11.53 ± 1.80	92.81 ± 2.57

mRNA-LNP は、バイアルから 25G 注射針で 5 回吸引し、各測定を行った。データは平均±S.D. (n=3) で表した。統計解析は Tukey's test により行った。

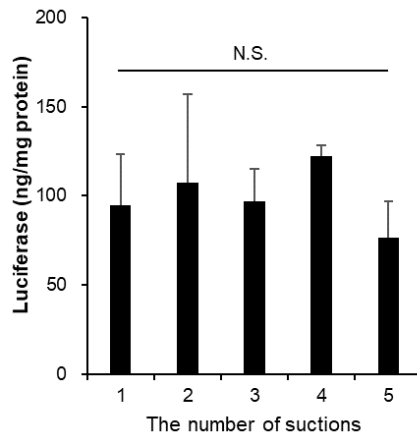


Figure 2-5 バイアルからのシリンジを用いた吸引による *in vitro* ルシフェラーゼ活性への影響。mRNA-LNP は、バイアルから 25G 注射針で 5 回吸引した。各 mRNA-LNP を添加した 24 時間後の HepG2 細胞におけるルシフェラーゼの発現を測定した。統計解析は Tukey's test により行った (N.S. not significant difference)。

2-7 LNP に内包された mRNA の鎖長についての評価

mRNA-LNP の発現低下の原因として、mRNA の一次構造の分解^{100,101)}が考えられることから、アガロースゲル電気泳動により mRNA の鎖長の完全性を確認した。mRNA-LNP を添加した細胞で発現が減少する保存条件のうち、LNP の凝集が想定される -80°C 保存群および mRNA 活性が低下する可能性のある光曝露群について比較した。ルシフェラーゼをコードする mRNA の鎖長は 1950 nt であり、非曝露群、光曝露群、 -80°C 保存群で同じ鎖長のバンドが認められた (Figure 2-6)。したがって、これらの条件下では mRNA の一次構造は分解されていないことが示された。

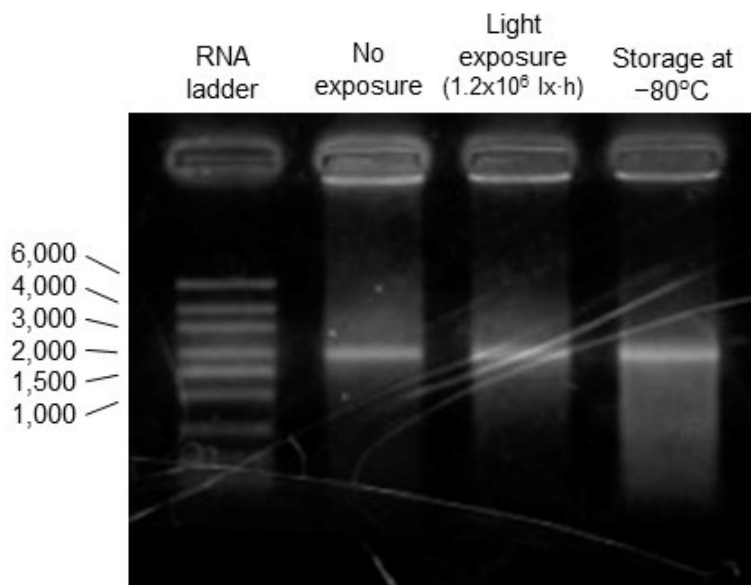


Figure 2-6 LNP に内封された mRNA のアガロースゲル電気泳動による評価。LNP の膜構造崩壊させるため、非曝露群、光曝露 (1.2×10^6 lx·h) 群、 -80°C 保存群の各 mRNA-LNP にポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテルを添加した。LNP に内封された mRNA の鎖長は、MOPS バッファーを用いたアガロースゲル電気泳動により確認した。

2-8 マウス生体内におけるルシフェラーゼ活性の評価

mRNA-LNP は、筋肉内投与した部位や肝臓に集積することが複数の報告で示されている⁶⁰⁻⁶²)。そこで、ホタルルシフェラーゼをコードした mRNA を封入した LNP をマウスの右後脚に筋肉内投与し、投与から 0.5、4.5、9、24、48 h 後に基質となるルシフェリンを腹腔内投与し、ルシフェラーゼを介した発光を画像化した (Figure 2-7a)。画像解析により、腹部 (Figure 2-7b) および右後脚を投与部位とした ROI の総光量を評価した (Figure 2-7c)。その結果、腹部と投与部位である右後脚の両方で、光曝露群および -80°C 保存群の mRNA-LNP のルシフェラーゼ活性が減少していることが認められた。

また、mRNA-LNP を投与後の肝臓と筋肉のルシフェラーゼ活性について定量的に評価した。ホタルルシフェラーゼをコードした mRNA-LNP をマウスの右後肢に筋肉内投与し、4.5 時間後に肝臓と投与部位の筋肉を摘出した。これらの組織は溶解バッファーを用いてホモジナイズし、遠心分離して上清を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。in vitro の結果と同様に、光曝露群および -80°C で保存群の mRNA-LNP は、肝臓 (Figure 2-7d) および筋肉 (Figure 2-7e) の両方でルシフェラーゼ活性の減少を示した。

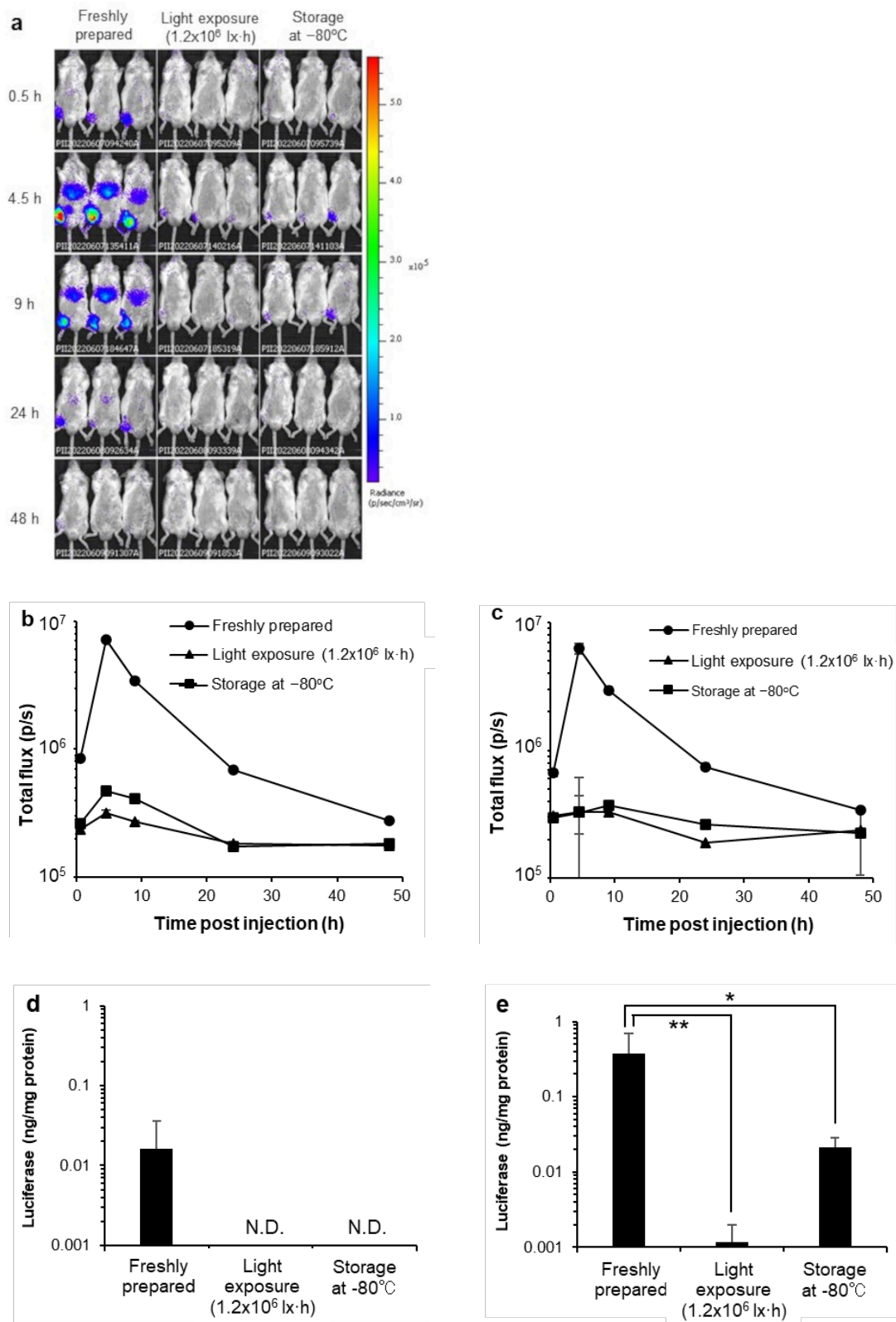


Figure 2-7 マウス生体内におけるルシフェラーゼ活性の評価。(a) mRNA-LNP の経時的な体内動態および発現量の変化。調製直後の mRNA-LNP を対照群とし、光曝露 (1.2×10⁶ lx·h)

群、 -80°C 保存群の各 mRNA-LNP をマウスの右後肢に筋肉内投与した。(b)腹部と(c)投与部位である右後肢のルシフェラーゼ活性を比較した。また、同様に調製直後の mRNA-LNP、光曝露 ($1.2 \times 10^6 \text{ lx} \cdot \text{h}$) 群、 -80°C 保存群の各 mRNA-LNP をマウス右後肢に筋肉内投与し、4.5 時間後に解剖して各部位をホモジナイズし、(d) 肝臓と (e) 筋肉におけるルシフェラーゼ活性を測定した。データは平均+SD で表した ($n = 5$)。

考察

本研究では、標準的な組成の mRNA-LNP を用い、温度、凍結保護剤、振動、光照射、バイアルからのシリンジによる吸引が脂質ナノ粒子の物理化学的性質に及ぼす影響を、*in vitro* および *in vivo* のタンパク質発現能と関連付けて評価した。凍結保護剤を添加せずに凍結させるという特殊な状況を設定することで、mRNA-LNP の物理化学的性質とタンパク質発現の変化を明確に確認することができた。例えば、 -80°C で凍結保護剤なしで保存すると、振動による粒子の凝集や特定の条件下での同様の变化に起因すると思われるタンパク質発現の減少が認められた。mRNA-LNP を凝集させる因子について、研究・開発時および臨床での運用時に注意が必要であることが示唆された。

保存温度の影響については、研究開発中の実験室での保存や病院への納品後の保存を想定し、7日間の保存とその後の解凍が、mRNA-LNP の物理化学的性質とタンパク質発現能に及ぼす影響を主に検討した。凍結保護剤を添加しない -80°C での保存では、mRNA-LNP の凝集が起こり (Table 2-2)、*in vitro* において HepG2 細胞でのルシフェラーゼ発現は著しく減少した (Figure 2-1)。同様に、この条件で保存した mRNA-LNP をマウスに筋肉内投与したところ、ルシフェラーゼの発現は新鮮な mRNA-LNP と比較して著しく減少し、投与部位の筋肉にわずかに発現が認められたのみであった。しかし、 -80°C 保存した mRNA-LNP から抽出した mRNA は、アガロースゲル電気泳動で鎖長が保持されていることが示された。これにより、LNP 構造の崩壊がタンパク質発現低下の主な原因である可能性が示唆され、mRNA-LNP の凝集が細における発現低下を引き起こすという以前の報告⁸¹⁾と一致した。粒子の凍結時には、氷の形成によりナノ粒子の濃度が上昇し、粒子間の距離が短くなる⁸¹⁾。さらに、イオン強度が上昇し、粒子間の相互作用における静電反発力が阻害される。これらは凝集の一因となる可能性がある¹⁰²⁾。実際に凍結保護剤としてスクロースを添加すると、 -80°C で保存した後の mRNA-LNP の凝集が抑制され、タンパク質発現能は回復した (Table 2-3)。Pfizer/BioNTech 社や Moderna 社の COVID-19 ワクチンにもスクロースが添加されていることから、研究室での研究開発時に同一ロットの mRNA-LNP で継続的に実験する場合には、凍結保護剤を用いた -80°C での保存が有効であると考えられる。一方、 4°C および 25°C で7日間保存しても、LNP に保持される mRNA の量に変化はなく、物理化学的性質も変わらなかった (Table 2-1, 2-2)。しかし、*in vitro* でのルシフェラーゼ発現活性は、温度依存的に著しく減少した (Figure 2-1)。この mRNA-LNP の品質低下は、これまでに報告されている脂質や mRNA の酸化が原因である可能性がある。LNP を構成する脂質の酸化は、LNP に

内包された mRNA の酸化も引き起こすことが報告されており³⁾、酸化されやすい脂質を用いた LNP では、より mRNA の酸化を引き起こすものと考えられる。mRNA の酸化や加水分解によって mRNA の構造が変化し、mRNA の活性が著しく低下する^{103,104)}ことに加え、mRNA の構造が変化することで、タンパク質の発現量が低下することも報告されている⁷⁷⁾。このような理由から、mRNA-LNP を数日以上保存する場合は、実験室での研究開発であっても、凍結保護剤を添加して-80°Cで凍結保存するなど適切に保存することが推奨される。

臨床での投与前の操作と研究開発中の実験室での操作を想定して、溶液中の mRNA-LNP に対する振動の影響を調べた。Pfizer/BioNTech 社や Moderna 社のワクチンで推奨されている範囲内の短時間のタッピングでは、mRNA-LNP の物性や *in vitro* でのタンパク質発現能のいずれにも影響を与えなかった。しかし、ボルテックスによる振動を与えた場合には、本研究で使用した mRNA-LNP は 30 秒間の曝露に耐えたが、5 分間連続で曝露した後、ナノ粒子構造の明らかな崩壊が観察された。ボルテックスによる混合は実験室では一般的な操作であるが、できるだけ避け、少なくとも 30 秒以内にとどめるべきである。Selmin らは、ボルテックスのような強い機械的ストレスが LNP の凝集と封入された mRNA の分解を引き起こすと報告しており⁸²⁾、この結果は本研究の結果と一致するものであった。また、バイアルから吸引して凝集の可能性を検討したが、同じバイアルから 5 回に分けて吸引しても、LNP の物理化学的性質や生物活性は毎回変わらなかった (Figure 2-5)。この圧力では、粒子の活性が低下しないことが確認された。

光曝露に関しては、通常の実験室や病院環境の 6 倍の光量に 20 時間暴露しても、mRNA-LNP の粒子径と PDI、ゼータ電位、mRNA の鎖長、LNP 内の保持率に明確な変化は現れなかった (Figure 2-7)。しかし、mRNA-LNP の *in vitro* での発現は光曝露量依存的に減少し (Figure 2-4)、 $1.2 \times 10^6 \text{ lx} \cdot \text{h}$ 曝露後の mRNA-LNP はマウスに筋肉内投与後、投与部位にわずかに発現するのみであった。光曝露により脂質や mRNA が酸化されることは報告されており、25°Cまたは 4°Cで 7 日間保存した場合と同様に、酸化による mRNA-LNP の品質変化がタンパク質発現能の低下に関与している可能性がある^{3,77)}。本研究で用いたイオン化脂質 DLin-MC3-DMA は不飽和結合を含み、酸化されやすい⁷⁰⁾ことを考慮する必要がある。一方、現在 Pfizer/BioNTech 社 や Moderna 社のワクチンで使用されているイオン化脂質 ALC-0315 や SM-102 は、構造中に不飽和結合を持たず^{24,25)}、酸化されにくいことが予想される。実際に Pfizer/BioNTech 社のワクチンでは、解凍後 1 ヶ月まで冷蔵保存が可能であることが示されている²⁴⁾。我々は、酸化に敏感なイオン化脂質を用いることで、酸化が mRNA-

LNP の能力にどのような影響を与えるかを明確に示した。しかし、より酸化されにくい構造のイオン化脂質を用いた mRNA-LNP は、酸化の原因とされる 4°C や 25°C での保存や光曝露の影響はより少ないことが予想される。しかし、比較的影響が少ないとしても、Pfizer/BioNTech 社ワクチンと Moderna 社ワクチンの両方で遮光条件下での保管が推奨されており、mRNA-LNP への光曝露は、実験室内であっても頻繁に遮光するなどによって最小限に留める必要がある。

本研究で使用した mRNA-LNP の組成は、Pfizer/BioNTech 社および Moderna 社の COVID-19 ワクチンと完全に一致するものではなく、様々な添加物も異なっている。また、現在研究開発が進められている mRNA-LNP 製剤には、様々な化学的性質を持つイオン化脂質が使用されているため、本研究の結果をすべての mRNA-LNP 製剤に外挿することはできない。しかし、今回使用した mRNA-LNP の組成は現時点での標準的な組成であり、様々な環境下での安定性に関する知見は、他の mRNA-LNP 製剤とある程度類似していることが予想される。さらに、本研究の結果は、検出が困難な脂質や mRNA の酸化による mRNA-LNP の品質低下が、実験室や病院での取り扱い中に起こりうることを示唆している。本研究のように、mRNA-LNP 製剤の開発過程において、保存後の物理化学的性質やタンパク質発現能を事前に評価することで、再現性の高い研究開発・医療を実現することが可能となると考えられる。

結論

以上、著者は mRNA 封入脂質ナノ粒子の特性および安定性について関して新たな知見を得るとともに、以下の結論を得た。

I

mRNA は機能化された構造をもち、酸化や加水分解の影響を受けやすい化学的に不安定な高分子である。mRNA を分解から保護し、細胞質へ送達する DDS キャリアとして脂質ナノ粒子 (LNP) は優れている。LNP を構成する脂質はイオン化脂質、リン脂質、コレステロール、PEG 脂質の 4 種類で、それぞれ異なる機能をもち、内部に mRNA を封入した構造をとる。LNP は脂質分子の酸化や加水分解による化学的な側面および粒子の凝集・融合・内包物の漏出という物理的側面で安定性を損なう可能性がある。また、LNP に内包された mRNA は高次構造を保持しやすくなるが、脂質の酸化生成物が mRNA に結合、あるいは脂質の構造の影響で mRNA 分解が促進される側面もある。mRNA および LNP、そして mRNA-LNP の物理的・化学的安定性を損なう要因を明らかにした上で、これらの影響を最小化する安定的な保存法の必要性が示された。

II

本研究では、mRNA-LNP を標準脂質組成で凍結保護剤なしに -80°C で保存すると、ナノ粒子の凝集によると考えられるタンパク質発現の低下が起こること、振動や光への曝露も条件によっては同様の変化を引き起こすことを示した。実験室や病院での取り扱いにおいて、これらの要因に曝露される可能性がある。mRNA-LNP の物理化学的性質やタンパク質発現能の安定性については、再現性のある研究開発・医療を行うために、早い段階から十分な知見を得ることが必要であり、本研究は mRNA-LNP の臨床利用を行う上での有益な知見となりうる。

以上、mRNA の送達キャリアとしての LNP の特性を整理し、mRNA-LNP の物理化学的性質やタンパク質発現能の安定性について検討することで、再現性のある研究開発や医療のための有益な知見を得ることができた。ワクチン製剤として現在上市されている mRNA-LNP は、感染症ワクチン以外にも、がん治療用ワクチン、遺伝性稀少疾患に対する酵素補充療法などを含めた疾患に対する治療用製剤など広範に適応されると想定される。本研究は

mRNA-LNP の医薬の開発における安定性評価に関する有益な基礎的情報となりうるもの
を考える。

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、また適切なご指導、御鞭撻を賜りました長崎大学大学院医歯薬総合研究科 医薬品情報学分野教授・川上 茂先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多大なるお時間を割いていただき研究内容への適切な御助言・御教示を賜りました長崎大学大学院医歯薬総合研究科 医薬品情報学分野准教授・向井英史先生に深く感謝いたします。

博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野教授・平山謙二先生に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多くのご支援、ご指導を賜りました長崎大学熱帯医学研究所 シオノギグローバル感染症連携部門免疫病態制御学分野准教授・水上修作先生に心より感謝いたします。また、研究生活をご支援賜りました免疫病態制御学分野の特任研究員・中前早百合先生、簡君宇先生、協力研究員・宮川聡史先生、技能補佐員・谷口真由美氏、野口亜紀子に心より感謝いたします。

研究に向かう姿勢をはじめとして多岐にわたりご指導を賜りました長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野助教・成瀬妙子先生に心より感謝いたします。研究や大学院についての様々な手続きにおいてご支援賜りました長崎大学熱帯医学研究所 NTD イノベーションセンター事務補佐員・迎保子氏に心より感謝いたします。

研究に打ち込める研究環境を築いて頂きました、医歯学総合教育研究棟の皆様にも心より感謝いたします。

有益な御助言を頂きました医薬品情報学分野の諸先輩、同輩、後輩の皆様にも感謝いたします。

最後に、これまで自分の道を進むことに対し、温かく見守り辛抱強くご支援を頂いた両親、妹に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

2023 年 2 月

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科医療科学専攻

医薬品情報学分野

神谷 万里子

引用文献

- 1) Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, Bailey R, Swanson KA, Roychoudhury S, Koury K, Li P, Kalina WV, Cooper D, Frenck RW Jr, Hammitt LL, Türeci Ö, Nell H, Schaefer A, Ünal S, Tresnan DB, Mather S, Dormitzer PR, Şahin U, Jansen KU, Gruber WC. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603-2615 (2020).
- 2) Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Roupheal N, Creech CB, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, Janes H, Follmann D, Marovich M, Mascola J, Polakowski L, Ledgerwood J, Graham BS, Bennett H, Pajon R, Knightly C, Leav B, Deng W, Zhou H, Han S, Ivarsson M, Miller J, Zaks T. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **382**, 403-416 (2021).
- 3) Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, Crommelin DJ. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int. J. Pharm.* **601**, 120586 (2021).
- 4) Domazet-Lošo T. mRNA Vaccines: Why Is the Biology of Retroposition Ignored? *Genes.* **13**, 719-743 (2022).
- 5) Linares-Fernández S, Moreno J, Lambert E, Mercier-Gouy P, Vachez L, Verrier B, Exposito JY. Combining an optimized mRNA template with a double purification process allows strong expression of in vitro transcribed mRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **26**, 945-956 (2021).
- 6) Nakanishi H, Itaka K. Synthetic mRNA for ex vivo therapeutic applications. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **44**, 10044 (2022).
- 7) Ball P. The lightning-fast quest for COVID vaccines-and what it means for other diseases. *Nature.* **589**, 16-18 (2021).
- 8) Mukai H, Ogawa K, Kato N, Kawakami S. Recent advances in lipid nanoparticles for delivery of nucleic acid, mRNA, and gene editing-based therapeutics. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **44**, 100450 (2022).
- 9) Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **154**, 37-63 (2020).

- 10) 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部, 臨床開発中の mRNA 医薬,
<<https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section3-2.pdf>>, accessed 25 January, 2023
- 11) Verbeke R, Hogan MJ, Loré K, Pardi N. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*. **55**, 1993-2005 (2022).
- 12) Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Gálvez RI, Cortes FH, Grifoni A, Tarke A, Chang J, Escarrega EA, Kim C, Goodwin B, Bloom NI, Frazier A, Weiskopf D, Sette A, Crotty S. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell*. **185**, 2434-2451.e17 (2022).
- 13) Burris HA, Patel MR, Cho DC, Clarke JM, Gutierrez M, Zaks TZ, Frederick J, Hopson K, Mody K, Berube AB, Tissot CR, Goldstein B, Breton B, Sun J, Zhong S, Pruitt SK, Keating K, Meehan RS, Gainor JF. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. *J Clin Oncol*. **37**, 2523-2523 (2019).
- 14) Arcturus Therapeutics Holdings Inc. Arcturus Therapeutics Announces Initiation of Dosing ARCT-810 in Patients with Ornithine Transcarbamylase (OTC) Deficiency, <<https://ir.arcturusrx.com/node/10256/pdf>>, accessed 25 January, 2023
- 15) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. **247**, 1465-1468 (1990).
- 16) Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceut. Med.* **36**, 11-20 (2022).
- 17) Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol*. **9**, 1319-1330 (2012).
- 18) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. **413**, 732-738 (2001).
- 19) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. **303**, 1529-1531 (2004).
- 20) Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. **303**, 1526-1529 (2004).

- 21) Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. **314**, 994-997 (2006).
- 22) Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability. *Mol Ther*. **16**, 1833-1840 (2008).
- 23) Roy B. Effects of mRNA Modifications on Translation: An Overview. *Methods Mol Biol*. **2298**, 327-356 (2021)
- 24) U.S. Food and Drug Administration. Comirnaty Package Insert, Summary Basis for Regulatory Action. 2021. <<https://www.fda.gov/media/151707/download>>, accessed 12 April, 2022.
- 25) U.S. Food and Drug Administration. Spikevax Package Insert, Summary Basis for Regulatory Action 2021. <<https://www.fda.gov/media/155675/download>>, accessed 12 April, 2022.
- 26) Kis Z. Stability Modelling of mRNA Vaccine Quality Based on Temperature Monitoring throughout the Distribution Chain. *Pharmaceutics*. **14**, 430-445 (2022).
- 27) Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*. **65**, 14-20 (2020).
- 28) Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol*. **30**, 1-7 (2000).
- 29) Solayman M, Litfin T, Singh J, Paliwal K, Zhou Y, Zhan J. Probing RNA structures and functions by solvent accessibility: an overview from experimental and computational perspectives. *Brief Bioinform*. **23**, bbac112 (2022).
- 30) Vicens Q, Kieft JS. Thoughts on how to think (and talk) about RNA structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **119**, e2112677119 (2022).
- 31) Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. **22**, 346-353 (2004).
- 32) Georgakopoulos-Soares I, Parada GE, Hemberg M. Secondary structures in RNA synthesis, splicing and translation. *Comput Struct Biotechnol J*. **20**, 2871-2884 (2022).
- 33) Gupta P, Khadake RM, Panja S, Shinde K, Rode AB. Alternative RNA Conformations: Companion or Combatant. *Genes (Basel)*. **13**, 1930 (2022).

- 34) Zhang J, Fei Y, Sun L, Zhang QC. Advances and opportunities in RNA structure experimental determination and computational modeling. *Nat Methods*. **19**, 1193-1207 (2022).
- 35) Mortimer SA, Kidwell MA, Doudna JA. Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. **15**, 469-479 (2014).
- 36) Wayment-Steele HK, Kim DS, Choe CA, Nicol JJ, Wellington-Oguri R, Watkins AM, Parra Sperberg RA, Huang PS, Participants E, Das R. Theoretical basis for stabilizing messenger RNA through secondary structure design. *Nucleic Acids Res*. **4**, 10604-10617 (2021).
- 37) Burrows CJ, Muller JG. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev*. **98**, 1109-1152 (1998).
- 38) Pogoeki D., Schöneich C. Chemical stability of nucleic acid-derived drugs. *J Pharm Sci*. **89**, 443-456 (2000).
- 39) Melvin T, Cunniffe SM, O'Neill P, Parker AW, Roldan-Arjona T. Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes. *Nucleic Acids Res*. **26**, 4935-4942 (1998).
- 40) Simms CL, Hudson BH, Mosior JW, Rangwala AS, Zaher HS. An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. *Cell Rep*. **9**, 1256-64 (2014).
- 41) Dai DP, Gan W, Hayakawa H, Zhu JL, Zhang XQ, Hu GX, Xu T, Jiang ZL, Zhang LQ, Hu XD, Nie B, Zhou Y, Li J, Zhou XY, Li J, Zhang TM, He Q, Liu DG, Chen HB, Yang N, Zuo PP, Zhang ZX, Yang HM, Wang Y, Wilson SH, Zeng YX, Wang JY, Sekiguchi M, Cai JP. Transcriptional mutagenesis mediated by 8-oxoG induces translational errors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **115**, 4218-4222 (2018).
- 42) Thomas EN, Simms CL, Keedy HE, Zaher HS. Insights into the base-pairing preferences of 8-oxoguanosine on the ribosome. *Nucleic Acids Res*. **47**, 9857-9870 (2019).
- 43) Choi YJ, Gibala KS, Ayele T, Deventer KV, Resendiz MJE. Biophysical properties, thermal stability and functional impact of 8-oxo-7,8-dihydroguanine on oligonucleotides of RNA—a study of duplex, hairpins and the aptamer for preQ1 as models. *Nucleic Acids Res*. **45**, 2099-2111 (2017).
- 44) Singh SK, Szulik MW, Ganguly M, Khutsishvili I, Stone MP, Marky LA, Gold B. Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Res*. **39**, 6789-801 (2011).

- 45) Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M, MacLachlan I, Graham RW, Zhang YP, Hope MJ, Scherrer P, Cullis PR. Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther.* **6**, 271-281 (1999)
- 46) Hajj KA, Whitehead KA. Tools for translation: Non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat. Rev. Mater.* **2**, 1–17 (2017).
- 47) Bailey AL, Cullis PR. Modulation of membrane fusion by asymmetric transbilayer distributions of amino lipids. *Biochemistry.* **33**, 12573-12580 (1994)
- 48) Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release.* **107**, 276-287 (2005).
- 49) Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, Sah DW, Stebbing D, Crosley EJ, Yaworski E, Hafez IM, Dorkin JR, Qin J, Lam K, Rajeev KG, Wong KF, Jeffs LB, Nechev L, Eisenhardt ML, Jayaraman M, Kazem M, Maier MA, Srinivasulu M, Weinstein MJ, Chen Q, Alvarez R, Barros SA, De S, Klimuk SK, Borland T, Kosovrasti V, Cantley WL, Tam YK, Manoharan M, Ciufolini MA, Tracy MA, de Fougères A, MacLachlan I, Cullis PR, Madden TD, Hope MJ. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* **28**, 172-176 (2010).
- 50) Cullis PR, Hope MJ. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther.* **25**, 1467-1475 (2017).
- 51) Samaridou E, Heyes J, Lutwyche P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* **154–155**, 37-63 (2020).
- 52) Heyes J, Palmer L, Bremner K, MacLachlan I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release.* **107**, 276-287 (2005).
- 53) Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, Borodovsky A, Marsico G, Schubert U, Manygoats K, Seifert S, Andree C, Stöter M, Epstein-Barash H, Zhang L, Kotliansky V, Fitzgerald K, Fava E, Bickle M, Kalaidzidis Y, Akinc A, Maier M, Zerial M. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol.* **31**, 638-46 (2013).
- 54) Wittrup A, Ai A, Liu X, Hamar P, Trifonova R, Charisse K, Manoharan M, Kirchhausen T, Lieberman J. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol.* **33**, 870-6 (2015).

- 55) Jayaraman M, Ansell SM, Mui BL, Tam YK, Chen J, Du X, Butler D, Eltepu L, Matsuda S, Narayanannair JK, Rajeev KG, Hafez IM, Akinc A, Maier MA, Tracy MA, Cullis PR, Madden TD, Manoharan M, Hope MJ. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl.* **51**, 8529-8533 (2012).
- 56) Coelho T, Adams D, Silva A, Lozeron P, Hawkins PN, Mant T, Perez J, Chiesa J, Warrington S, Tranter E, Munisamy M, Falzone R, Harrop J, Cehelsky J, Bettencourt BR, Geissler M, Butler JS, Sehgal A, Meyers RE, Chen Q, Borland T, Hutabarat RM, Clausen VA, Alvarez R, Fitzgerald K, Gamba-Vitalo C, Nochur SV, Vaishnaw AK, Sah DW, Gollob JA, Suhr OB. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* **369**, 819-829 (2013).
- 57) Li S, Hu Y, Li A, Lin J, Hsieh K, Schneiderman Z, Zhang P, Zhu Y, Qiu C, Kokkoli E, Wang TH, Mao HQ. Payload distribution and capacity of mRNA lipid nanoparticles. *Nat. Commun.* **13**, 5561 (2022).
- 58) Sabnis S, Kumarasinghe ES, Salerno T, Mihai C, Ketova T, Senn JJ, Lynn A, Bulychev A, McFadyen I, Chan J, Almarsson Ö, Stanton MG, Benenato KE. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Mol Ther.* **26**, 1509-1519 (2018)
- 59) Hajj KA, Ball RL, Deluty SB, Singh SR, Strelkova D, Knapp CM, Whitehead KA. Branched-Tail Lipid Nanoparticles Potently Deliver mRNA In Vivo due to Enhanced Ionization at Endosomal pH. *Small.* **5**, e1805097 (2019).
- 60) Hashiba K, Sato Y, Taguchi M, Sakamoto S, Otsu A, Maeda Y, Shishido T, Murakawa M, Okazaki A, Harashima H. Branching Ionizable Lipids Can Enhance the Stability, Fusogenicity, and Functional Delivery of mRNA. *Small Sci.* online early view, 2200071 (2022)
- 61) Yamagami M, Tsuchikawa H, Cui J, Umegawa Y, Miyazaki Y, Seo S, Shinoda W, Murata M. Average Conformation of Branched Chain Lipid PGP-Me That Accounts for the Thermal Stability and High-Salinity Resistance of Archaeal Membranes. *Biochemistry.* **58**, 3869-3679 (2019).
- 62) Lim JB, Klauda JB. Lipid chain branching at the iso- and anteiso-positions in complex Chlamydia membranes: a molecular dynamics study. *Biochim Biophys Acta.* **1808**, 323-331 (2011).

- 63) Bao Y, Jin Y, Chivukula P, Zhang J, Liu Y, Liu J, Clamme JP, Mahato RI, Ng D, Ying W, Wang Y, Yu L. Effect of PEGylation on biodistribution and gene silencing of siRNA/lipid nanoparticle complexes. *Pharm Res.* **30**, 342-351 (2013).
- 64) Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, Tam YYC, Cullis PR. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale.* **11**, 21733-21739 (2019).
- 65) Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **188**, 114416 (2022).
- 66) Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan HA, Szebeni J, Ishida T. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater.* **20**, 710-724 (2019).
- 67) Troelnikov A, Perkins G, Yuson C, Ahamdie A, Balouch S, Hurtado PR, Hissaria P. Basophil reactivity to BNT162b2 is mediated by PEGylated lipid nanoparticles in patients with PEG allergy. *J Allergy Clin Immunol.* **148**, 91-95 (2021).
- 68) Nogueira SS, Schlegel A, Maxeiner K, Weber B, Barz M, Schroer MA, Blanchet CE, Svergun DI, Ramishetti S, Peer D, Langguth P, Sahin U, Haas H. Polysarcosine-Functionalized Lipid Nanoparticles for Therapeutic mRNA Delivery. *ACS Appl. Nano Mater.* **3**, 10634-10645 (2020).
- 69) Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel).* **9**, 65 (2021).
- 70) Akinc A, Maier MA, Manoharan M, Fitzgerald K, Jayaraman M, Barros S, Ansell S, Du X, Hope MJ, Madden TD, Mui BL, Semple SC, Tam YK, Ciufolini M, Witzigmann D, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol.* **14**, 1084-1087 (2019).
- 71) Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, Madden TD, Hope MJ, Weissman D. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J. Control. Release.* **217**, 345-351 (2015).
- 72) Sinegra AJ, Evangelopoulos M, Park J, Huang Z, Mirkin CA. Lipid Nanoparticle Spherical Nucleic Acids for Intracellular DNA and RNA Delivery. *Nano Lett.* **21**, 6584-6659 (2021).
- 73) Carrasco MJ, Alishetty S, Alameh MG, Said H, Wright L, Paige M, Soliman O, Weissman D, Cleveland TE 4th, Grishaev A, Buschmann MD. Ionization and structural properties of mRNA

lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration. *Commun. Biol.* **4**, 956-971 (2021).

- 74) Maugeri M, Nawaz M, Papadimitriou A, Angerfors A, Camponeschi A, Na M, Hölttä M, Skantze P, Johansson S, Sundqvist M, Lindquist J, Kjellman T, Mårtensson IL, Jin T, Sunnerhagen P, Östman S, Lindfors L, Valadi H. Linkage between endosomal escape of LNP-mRNA and loading into EVs for transport to other cells. *Nat. Commun.* **10**, 1-15 (2019).
- 75) Hobo W, Novobrantseva TI, Fredrix H, Wong J, Milstein S, Epstein-Barash H, Liu J, Schaap N, van der Voort R, Dolstra H. Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 285-297 (2013).
- 76) Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, Fenton OS, Anderson DG. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* **15**, 7300-7306 (2015).
- 77) Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, Schariter J, White PA. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. *Nat. Commun.* **12**, 6777-6788 (2021).
- 78) Garaycoechea JI, Crossan GP, Langevin F, Mulderrig L, Louzada S, Yang F, Guilbaud G, Park N, Roerink S, Nik-Zainal S, Stratton MR, Patel KJ. Alcohol and endogenous aldehydes damage chromosomes and mutate stem cells. *Nature.* **553**, 171-177 (2018).
- 79) Grit M, Crommelin DJ. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids.* **64**, 3-18 (1993).
- 80) Oude Blenke E, Örnskov E, Schöneich C, Nilsson GA, Volkin DB, Mastrobattista E, Almarsson Ö, Crommelin DJA. The Storage and In-Use Stability of mRNA Vaccines and Therapeutics: Not A Cold Case. *J Pharm Sci.* **112**, 386-403 (2023).
- 81) Ball RL, Bajaj P, Whitehead KA. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: Examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *Int. J. Nanomed.* **12**, 305-315 (2017).
- 82) Selmin F, Musazzi UM, Franzè S, Scarpa E, Rizzello L, Procacci P, Minghetti P. Pre-Drawn Syringes of Comirnaty for an Efficient COVID-19 Mass Vaccination: Demonstration of Stability. *Pharmaceutics.* **13**, 1029 (2021).

- 83) Brader ML, Williams SJ, Banks JM, Hui WH, Zhou ZH, Jin L. Encapsulation state of messenger RNA inside lipid nanoparticles. *Biophys J.* **120**, 2766-2770 (2021).
- 84) Kudsova L, Lansley A, Scutt G, Allen M, Bowler L, Williams S, Lippett S, Stafford S, Tarzi M, Cross M, Okorie M. Stability testing of the Pfizer-BioNTech BNT162b2 COVID-19 vaccine: A translational study in UK vaccination centres. *BMJ Open Sci.* **12**, e100203 (2021).
- 85) Gindy ME, Feuston B, Glass A, Arrington L, Haas RM, Schariter J, Stirdivant SM. Stabilization of Ostwald ripening in low molecular weight amino lipid nanoparticles for systemic delivery of siRNA therapeutics. *Mol Pharm.* **11**, 4143-53 (2014).
- 86) Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, Wallin S, Wu X, Kvist AJ, Dabkowska A, Székely N, Radulescu A, Bergenholtz J, Lindfors L. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **115**, E3351-E3360 (2018).
- 87) Eygeris Y, Patel S, Jozic A, Sahay G. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano Lett.* **20**, 4543-4549 (2020).
- 88) Kloczewiak M, Banks JM, Jin L, Brader ML. A Biopharmaceutical Perspective on Higher-Order Structure and Thermal Stability of mRNA Vaccines. *Mol Pharm.* **19**, 2022-2031 (2022).
- 89) Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res.* **27**, 544-75 (2010).
- 90) Zhao P, Hou X, Yan J, Du S, Xue Y, Li W, Xiang G, Dong Y. Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery. *Bioact Mater.* **5**, 358-363 (2020).
- 91) Lewis LM, Badkar AV, Cirelli D, Combs R, Lerch TF. The Race to Develop the Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine: From the Pharmaceutical Scientists' Perspective. *J Pharm Sci.* S0022-3549(22)00416-6 (2022).
- 92) Muramatsu H, Lam K, Bajusz C, Laczko D, Karikó K, Schreiner P, Martin A, Lutwyche P, Heyes J, Pardi N. Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine. *Mol Ther.* **30**, 1941-1951 (2022).
- 93) Kim B, Hosn RR, Remba T, Yun D, Li N, Abraham W, Melo MB, Cortes M, Li B, Zhang Y, Dong Y, Irvine DJ. Optimization of storage conditions for lipid nanoparticle-formulated self-replicating RNA vaccines. *J Control Release.* **353**, 241-253 (2022).

- 94) Process of Preparing mRNA-Loaded Lipid Nanoparticles. U.S. patent 2018153822-A1(2018): <<https://patentimages.storage.googleapis.com/bc/f8/b1/ce992e0f0047e4/US20180153822A1.pdf>>, accessed 25 January, 2023
- 95) Roesler E, Weiss R, Weinberger EE, Fruehwirth A, Stoecklinger A, Mostböck S, Ferreira F, Thalhamer J, Scheiblhofer, S. Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 1070-1077 (2009).
- 96) Ogawa K, Kato N, Yoshida M, Hiu T, Matsuo T, Mizukami S, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Mukai H, Kawakami S. Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain. *J. Control. Release.* **348**, 34-41 (2022).
- 97) Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. *Pharm. Res.* **17**, 306-313 (2000).
- 98) Oyama N, Kawaguchi M, Itaka K, Kawakami S. Efficient Messenger RNA Delivery to the Kidney Using Renal Pelvis Injection in Mice. *Pharmaceutics.* **13**, 1810-1821 (2021).
- 99) Ayat NR, Sun Z, Sun D, Yin M, Hall RC, Vaidya AM, Liu X, Schilb AL, Scheidt JH, Lu ZR. Formulation of Bio-compatible Targeted ECO/siRNA Nanoparticles with Long-Term Stability for Clinical Translation of RNAi. *Nucleic Acid Ther.* **29**, 195-207 (2019).
- 100) Démoulin T, Ebensen T, Schulze K, Englezou PC, Pelliccia M, Guzmán CA, Ruggli N, McCullough KC. Self-replicating RNA vaccine functionality modulated by fine-tuning of polyplex delivery vehicle structure. *J. Control. Release.* **266**, 256-271 (2017).
- 101) Gerhardt A, Voigt E, Archer M, Reed S, Larson E, Van Hoeven N, Kramer R, Fox C, Casper C. A flexible, thermostable nanostructured lipid carrier platform for RNA vaccine delivery. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **25**, 205-214 (2022).
- 102) Trenkenschuh E, Friess W. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **165**, 345-360 (2021).
- 103) Pogoćki D, Schöneich C. Chemical stability of nucleic acid-derived drugs. *J. Pharm. Sci.* **89**, 443-456 (2000).
- 104) Mauger DM, Cabral BJ, Presnyak V, Su SV, Reid DW, Goodman B, Link K, Khatwani N, Reynders J, Moore MJ, McFadyen IJ. mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 24075-24083 (2019).