

mRNA の医療応用を加速する DDS 素材の設計と製剤化技術の開発

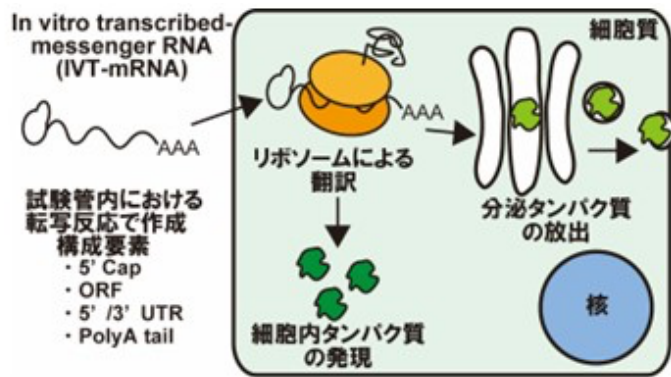
田中浩揮 (東北大学大学院薬学研究科)

1. はじめに

治療用タンパク質を生体に導入するための機能性核酸として、近年、人工的に転写されたメッセンジャーRNA (In Vitro Transcribed-messenger RNA (IVT-mRNA)) が注目を集めている(1-3)。IVT-mRNA は細胞質でタンパク質へと翻訳されることから、DNA を用いた遺伝子治療の場合のように核膜を突破する必要が無いため、非分裂細胞を含めた広範な細胞にタンパク質を導入できる。加えて、本核酸は自己複製能を持たず発現が一過的であり、ゲノムへの影響も懸念されないため、安全性が比較的高いと考えられている(図1)。これらの理由により、IVT-mRNA とその送達技術は、再生医療、RNA ワクチン、CAR-T 療法、遺伝子編集医療など、次世代の医療を実現するための中核技術になり得ると期待されてきた。

IVT-mRNA は核酸分解酵素に対して脆弱な分子であり、そのままの形で生体へ投与されるとすぐに分解され活性を失う。このため、細胞外で IVT-mRNA を保護し、細胞内へと送り届けるための Drug Delivery System (DDS) が必要となる。IVT-mRNA の送達に利用される DDS の中でも、脂質ナノ粒子

(Lipid Nanoparticle (LNP)) 技術を



・配列既知の任意のタンパク質を生体へ導入することができる
・核膜を突破する必要が無く非分裂細胞に遺伝子導入できる
・発現が一過的でゲノムへの影響もないため安全性に優れる

図1. mRNA 送達技術の特徴

用いた mRNA-LNP は高い遺伝子送達効率を有している(4-6)。2010 年代より RNA ワクチンへの応用が試みられてきた本技術であったが、2019 年に起きた Severe Acute Respiratory Corona Virus-2 (SARS-CoV-2) によるパンデミックをきっかけに実用化へ向けた動きが加速し、Comirnaty や Spikevax といった製剤が承認されるに至った(7, 8)。mRNA-LNP を基盤とする RNA ワクチン製剤の臨床試験は、SARS-CoV-2 の遺伝子配列の決定からわずか 66 日後に開始された。また、抗原タンパク質の設計にあたっては、類縁ウイルスである Middle East Respiratory Syndrome Corona Virus (MERS-CoV) の知見を参考にアミノ酸変異が施されている。この迅速な開発スピードと遺伝子工学の活用は、塩基配列の設計のみにより様々なタンパク質に対して柔軟に対応できる mRNA 創薬の利点を示すものである。こ

の成功を皮切りに、現在も多くの mRNA 医薬品の臨床開発が進められている。

mRNA-LNP には核酸送達効率等の観点から改善点が存在する。また、本技術は様々な用途への応用が期待される一方で、ナノ粒子製剤の製造に関する設備費やノウハウが研究領域の参入障壁となっている。加えて、ナノ粒子製剤に対する生体応答に関しても更なる理解が望まれる。本報告では、上記の課題に関する我々の検討について紹介する。

2. 核酸放出能の向上と生体蓄積性の低減を目指した自己分解性材料の開発

現在までに、多くのカチオン性ポリマーやカチオン性脂質等を基盤とする核酸ベクターが開発されてきた。これらのカチオン性材料は、アニオン性を有する核酸と静電的に相互作用し、ナノ粒子を形成することで核酸を保護できる。また、カチオン性を帯びたナノ粒子は細胞膜上のプロテオグリカン等と相互作用し、核酸の細胞内取り込みを促進できる。一方、静電的相互作用による核酸の過剰なコンパクションは、転写因子や翻訳因子等との相互作用を阻害し、核酸 1 分子あたりのタンパク質導入効率を減少させることが明らかとなってきた(9, 10)。このため、タンパク質の導入効率を向上させるためには、保存液中や細胞外液中において核酸を保護するための頑強性と、細胞質内において核酸を積極的に放出するための崩壊性を兼ね備えた素材の開発が必須となる。

我々は上記の相反する特性を両立可能な脂質様材料として pH 感受性脂質である SS-cleavable Proton-Activated Lipid-like Materials (ssPalm) を開発してきた(11, 12)。本材料は疎水性足場、第三級アミン、ジスルフィド結合から構成されている(図2)。疎水性足場は疎水性相互作用による粒子形成に寄与している。第三級アミンを含む LNP(ssPalm)は生理的な条件下では電荷を持たず、核酸や生体分子との不必要な相互作用を回避することができる。

一方で、エンドソーム内の酸性環境においてのみ第三級アミンがプロトン化されカチオン性を帯びることで、搭載された核酸のエンドソーム脱出を促進することができる。さらに、細胞内還元環境でジスルフィド結合が切断されることにより、自己組織化能が低下し、核酸の放出を積極的に引き起こすことができる。細胞内還元環境を模倣した 10 mM グルタチオン溶液を用いて LNP(ssPalm)を処理すると、20 分以内にジスルフィド結合の開裂が確認された(4)。

LNP(ssPalm)は油滴用の構造を有するため、疎水性低分子の送達にも応用可能であると考えられる(13)。そこで我々はヒアルロン酸合成を阻害する 4 Methyl Umbelliferone (4-MU)

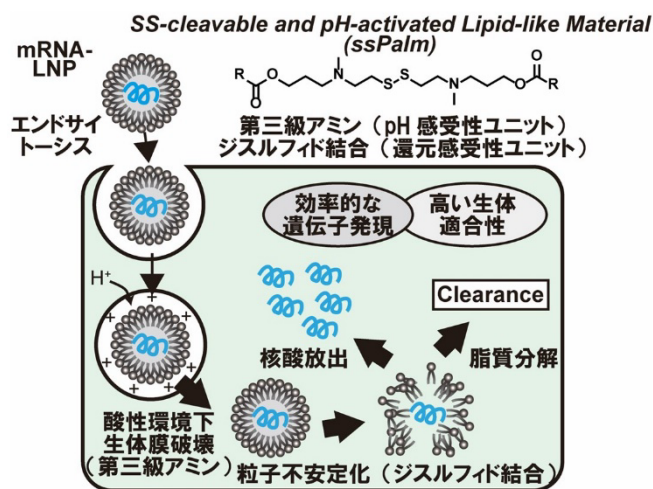
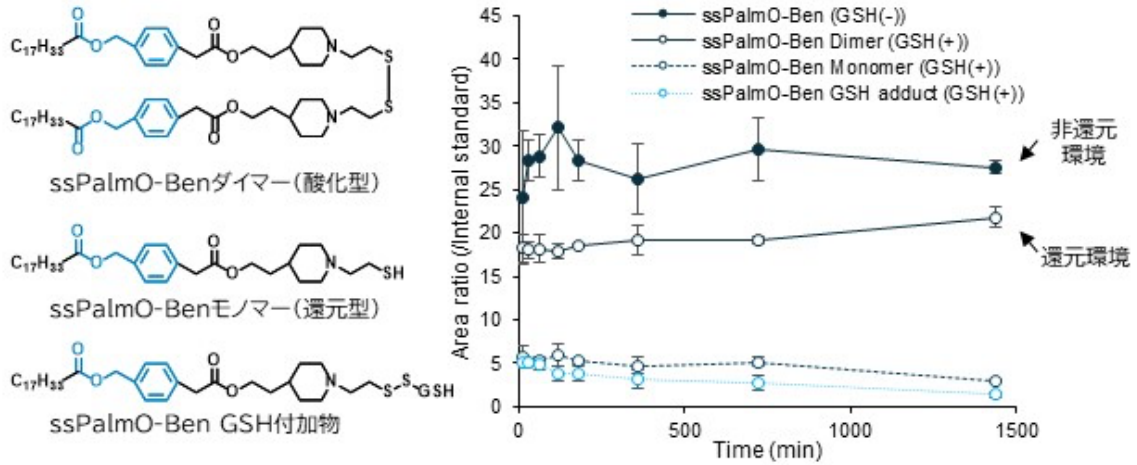


図2. 環境感受性脂質様物質 ssPalm

の脂肪酸エステルである 4 Methyl Umbelliferone Palmitate (4MU-Pal) を LNP(ssPalm)に搭載した。細胞内における低分子の放出を調べる目的で、本粒子を還元剤処理したところ、偶然にも、溶液の蛍光が上昇することを見出した。4MU-Pal は蛍光を示さない一方で、4MU は強い蛍光を示す分子であることから、本知見は LNP(ssPalm)に搭載された 4MU-Pal の加水分解を示唆するものであった。我々は、還元反応により生成したチオールが LNP 内部のナノ空間に濃縮され、求核剤として働くことで 4MU-Pal の加水分解を引き起こしたと仮説を立てた。そこで、ジスルフィド結合を持たない DODAP からなる LNP に 4MU-Pal を搭載し還元剤処理を行ったところ、想定通り加水分解は認められなかった。また、LNP(ssPalm)内における 4MU-Pal の加水分解が HPLC により直接確認された。これらの結果から、LNP(ssPalm)に特有の現象として還元応答性粒子内加水分解反応を見出した。

非分解性脂質: ssPalmO-Ben-P4C2



自己分解性脂質: ssPalmO-Phe-P4C2

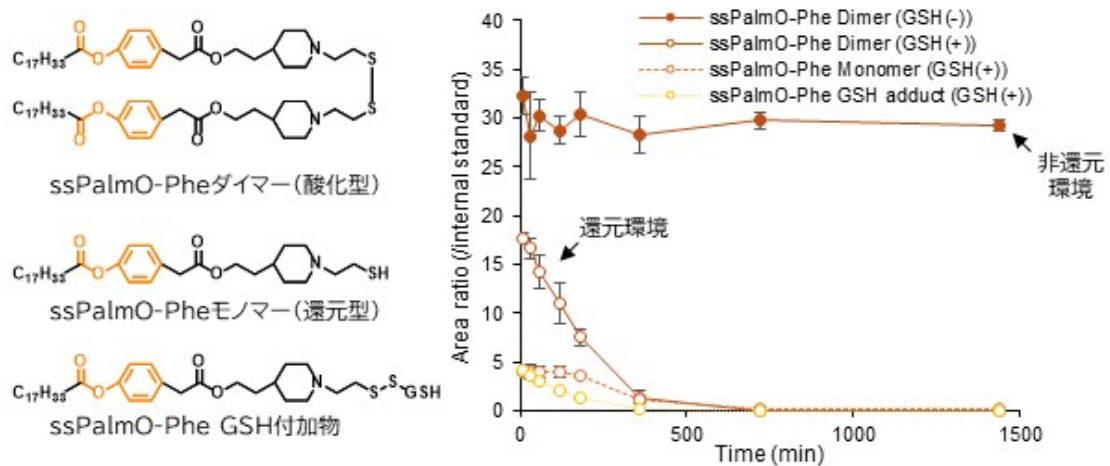


図3. ssPalmO-Phe-P4C2 の自己分解反応

核酸のコンパクションには、脂質-核酸間の静電的な相互作用に加えて、脂質-脂質間の疎水性相互作用が必要である。我々は粒子内加水分解反応を応用して第三級アミンと疎水性足場を分離することができれば、核酸放出をより積極的に促進でき、遺伝子導入効率が向上すると着想した。そこで、オレイン酸を足場とする ssPalmO-P4C2 に対し、粒子内加水分解反応の基質であるフェノールエステル構造をリンカーとして導入することで、自己分解性脂質である ssPalmO-Phe-P4C2 を開発した(14)。

はじめに、還元環境下における自己分解性の検証を行った（図3）。フェノールエステルは水酸基と芳香環が共役しているため、粒子内加水分解反応の基質になったと考えられる。そこで非分解性のコントロール化合物として、水酸基と芳香環が共役していないベンジルエステル構造をリンカーとして導入し、**ssPalmO-Ben-P4C2** を設計した。**ssPalmO-Ben-P4C2**（非分解性コントロール）からなるナノ粒子をグルタチオン溶液で処理したところ、還元剤処理から5分以内に全体の約30%の脂質が還元型へと変化した。酸化型と還元型の量比は横ばいとなり、24時間にわたって一定であった。これは、ジスルフィド結合の開裂反応が5分で平衡状態に達することを示している。**ssPalmO-Phe-P4C2**の場合も同様に、還元剤処理から5分以内に全体の約30%の脂質が還元型へと変化した。一方で、酸化型分子と還元型分子はどちらも経時的に単調減少し、6時間後には消失した。加えて、加水分解産物である第三級アミン頭部ユニットがHPLCで検出された。このことから、**ssPalmO-Phe-P4C2**は還元反応をトリガーとして、自己分解反応を引き起こすことが確認された。また、IVT-mRNAを搭載し還元剤処理することで、還元依存的な核酸放出が認められた。

複数の細胞種において、**ssPalmO-Phe-P4C2**は非分解性コントロールと比べて高い遺伝子導入効率を示した。また、マウス肝臓へのmRNA送達効率は従来技術に比べ有意に向上した。このことから、自己分解性によるmRNA送達効率の向上が確認された。さらに、**ssPalmO-Phe-P4C2**は細胞毒性をほぼ示さない一方、ジスルフィド結合をメチレン構造に置換した**ccPalmO-Phe-P4C2**は高い細胞毒性を示した。このため、細胞内における分解性の向上は毒性の回避にも寄与すると考えられる。**ssPalmO-Phe-P4C2**のラットにおける単回投与毒性は従来技術と比較して低く、生体への蓄積性の低減が安全性の向上にもつながることが明らかとなった。

化学修飾されたヒトエリスロポエチンのmRNAを1週間に1回、5週間投与したところ、反復的な血中ヒトエリスロポエチン濃度の上昇が認められ。また、マウストラंसサイレチンを標的とするshort guide RNA (sgRNA) (15)とCas9をコードしたmRNAを共封入しマウスに2回投与したところ、肝臓ゲノム中のトランスサイレチン遺伝子の55%が破壊され、血中トランスサイレチン濃度は95%以上低下した。以上の結果から、粒子内加水分解反応を利用した自己分解性脂質である**ssPalmO-Phe-P4C2**を開発し、その機能を検証することができた。本脂質はshort interfering RNA (siRNA) や Antisense Oligonucleotide (ASO) の生体導入にも応用可能であった(16)。

3. 誰でも簡単に mRNA-LNP を調製可能な Ready-to-Use 型製剤の開発

mRNA-LNPは**ssPalmO-Phe-P4C2**などのイオン性脂質に加えて、粒子を安定化するためのリン脂質、コレステロール、ポリエチレングリコール結合型脂質(PEG脂質)などが含まれる。これらの材料は脂溶性が高く、通常はエタノール等の有機溶媒にのみ溶解できる。水溶性のIVT-mRNAと脂溶性の脂質からLNPを調製する方法として、エタノール

希釈法が用いられてきた(17-20)。本方法では、脂質のエタノール溶液と核酸の水溶液をマイクロ流体デバイスなどで迅速に混合し、核酸を内封する。

エタノール希釈法は連続調製が可能でありスケールアップが容易であるという利点を持つ。一方で、適切に実施するためにはマイクロ流体デバイスの

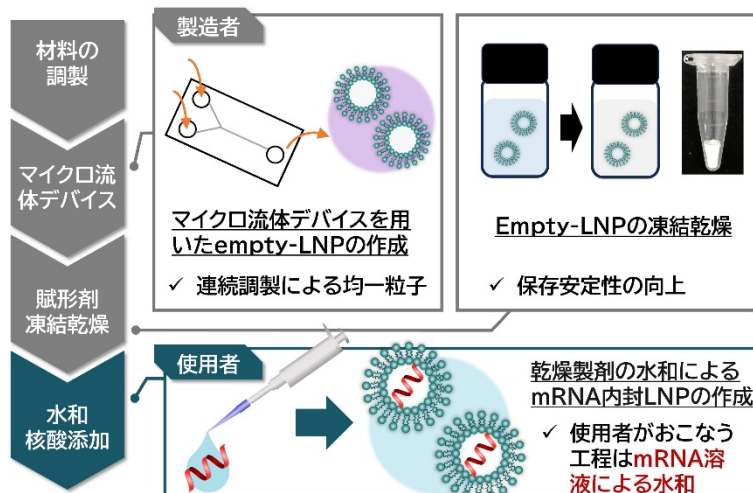
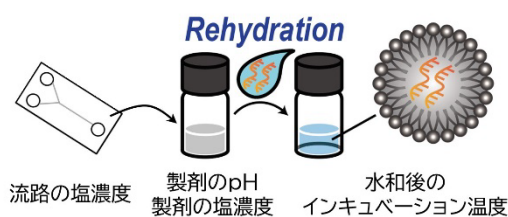


図4. Ready-to-Use 製剤の概念図

の設備費や、材料を取り扱うためのノウハウが必要となる。我々は多くの研究者と連携する中で、創薬シーズの探索を専門とする生命科学者にとって、mRNA-LNP の製剤化がハードルになっていることを認識した。我々は独自に、このハードルが技術の普及を妨げる大きな課題点であると着想し、誰でも簡単に mRNA-LNP を調製することが可能な技術の開発に着手した。

我々は、核酸を含まない empty-LNP を作成し、IVT-mRNA を後封入することができれば、任意の IVT-mRNA を含む mRNA-LNP が容易に作成できると仮説を立てた。保存性等の観点から、凍結乾燥製剤が取り扱いやすいと考えた。これらのアイデアを基に、empty-LNP の凍結乾燥体である Ready-to-Use 型製剤の開発を行った(21) (図4)。

pHと温度が封入率や活性に与える影響



★mRNA-LNPs
ssPalmO-Phe/DOPC/Chol/DMG-PEG2000 = 52.5/7.5/40/1.5
CleanCap® Flucl

★Transfection
HeLa cells (96 well)
mRNA 20 ng/well,
20 h transfection

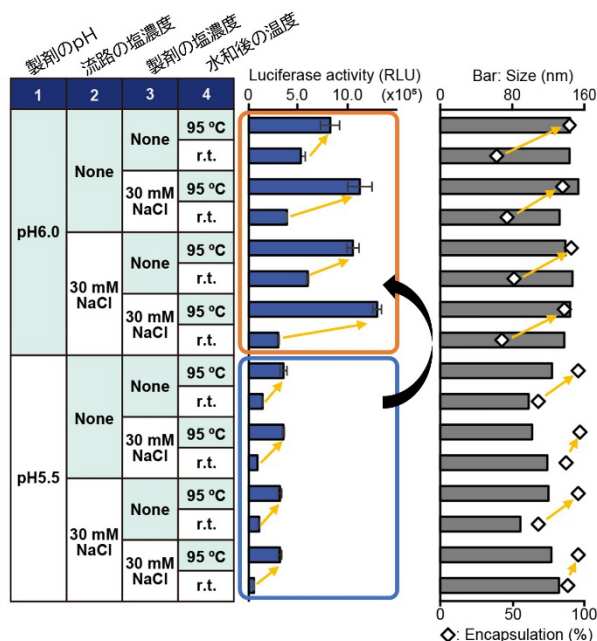


図5. 製剤のパラメーターが Ready-to-Use 製剤の機能に与える影響

はじめに、直交表を用いた実験計画法により、IVT-mRNA の内封効率に關与するパラメーターを探索した。結果として、pH が弱酸性領域であること、および、empty-LNP と IVT-mRNA の混合物の加熱が重要であることを見出した。遺伝子発現を基に検証実験を行った結果、pH6.0 で作成した乾燥体を IVT-mRNA 水溶液で再水和し、95°C で 5 分加熱することにより、in vitro において高い遺伝子発現活性が得られることを明らかとした (図 5)。

次に、Ready-to-Use 型製剤を用いて作成した mRNA-LNP と、従来のマイクロ流体デバイスで作成した LNP が同等の内部構造を持つナノ粒子であるか、X 線小角散乱法 (SAXS) を用いて検証した。IVT-mRNA の有無や化学修飾、加温の有無、製剤の pH 等が異なる製剤を作成し、X 線小角散乱法により評価した。得られた複数の SAXS チャートをそのまま比較することは困難であるため、各点における傾きの値を主成分分析による次元削減とワード法によるクラスタリングを用いて解析した (図 6)。結果として、核酸の添加と加熱処理は粒子の内部構造を段階的に変化させることが明らかとなった。最も重要な知見は、核酸存在化で加熱した Ready-to-Use 型 mRNA-LNP とマイクロ流体デバイスで作成した mRNA-LNP が同じクラスターに分類され、内部構造に差が認められなかった点である。主成分係数を参考に IVT-mRNA の添加および加熱がどのような内部構造に影響したかを考察した。IVT-mRNA の添加は $q = \text{約 } 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ のピークの出現と対応していた。本ピークは約 6 nm 程度の繰り返し構造を示唆するものであり、現在までに DNA や siRNA を含む様々な脂質-核酸複合体において類似した構造が観察されている。製剤の加熱は $q = 0.185 \text{ \AA}^{-1}$ および、 $q = 0.369 \text{ \AA}^{-1}$ のピークの消失と対応していた。文献情報より、本ピークは粒子内におけるコレステロールクラスターの形成に対応すると考えられる (22, 23)。このことから、凍結乾燥中に empty-LNP を構成する脂質の一部が相分離し、コレステロールが自己集合している可能性が考えられた。この構造体は加熱により外部からエネルギー

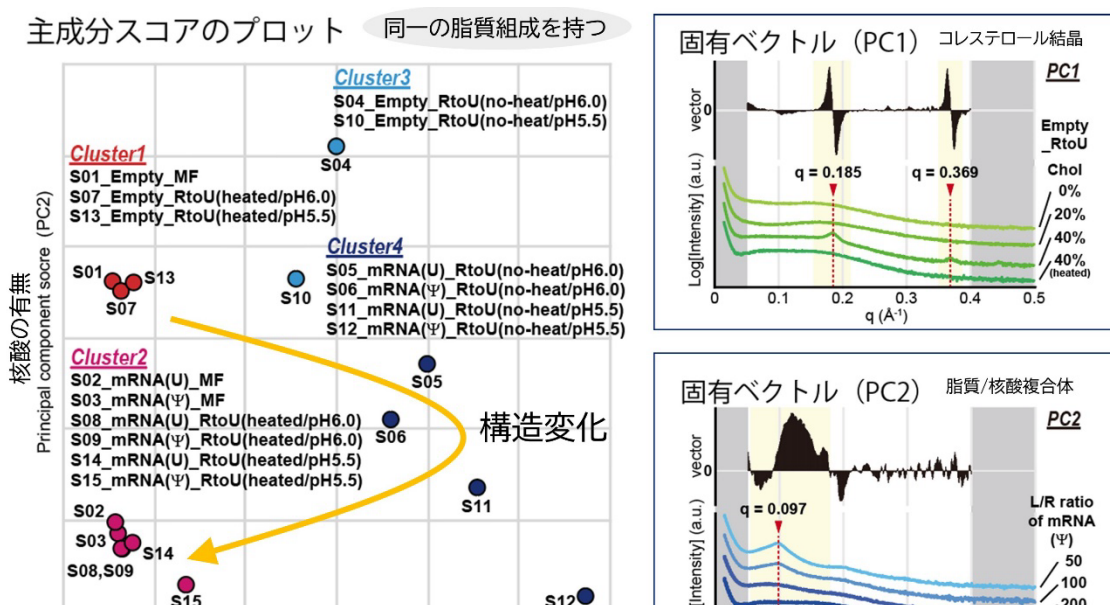


図 6. 凍結乾燥 Ready-to-Use 製剤の内部構造の変化

ギーを加えることで消失することが示唆された。本ピークの温度依存性を解析したところ、75°C以上の加熱で消失することが明らかとなった。このため、Ready-to-Use 型製剤を用いた IVT-mRNA の後封入は 75°Cの加熱で完了することが示された。

凍結乾燥 Ready-to-Use 製剤で作成した mRNA-LNP とマイクロ流体デバイスで作成した mRNA-LNP はマウス肝臓において同等の遺伝子発現活性を示した。また、マウストランスサイレチンを標的とする sgRNA(15)と Cas9 をコードした mRNA を同時に後封入しマウスに 2 回投与したところ、血中トランスサイレチン濃度は 90%以上低下した。以上の結果から、任意の IVT-mRNA 水溶液を添加し、75°Cで 5 分加熱することで、誰でも mRNA-LNP を作成可能な Ready-to-Use 型製剤の開発に成功した。

4. 粒子構造と生体応答の関係性の解析

外来核酸の細胞内侵入はウイルス感染等の特徴であることから、mRNA の細胞内導入はパターン認識受容体を介した I 型インターフェロンの産生や細胞死といった極めて強い炎症応答を引き起こす(24)。本問題点を解決するため、mRNA に対する種々の構造改変が試みられ、Cap1 構造の付加、化学修飾塩基の導入、2 本鎖 RNA の除去などといった方法で、IVT-mRNA の免疫刺激性を低減できることが報告されてきた(1)。

一方で、IVT-mRNA 自体の免疫刺激性を低減してもなお、mRNA-LNP は高い免疫刺激性を示す。この性質は RNA ワクチンの実現に大きく貢献したといえよう。しかし、遺伝子治療を目的にタンパク質を導入する場合、mRNA-LNP の免疫刺激性は不必要な炎症応答の惹起や免疫寛容の破綻などと言った問題点を引き起こし得る。近年、empty-LNP もまた自然免疫の活性化を引き起こすことが報告された(25, 26)。これらの報告では、empty-LNP からイオン性脂質を除くことで免疫刺激性が劇的に低下したため、イオン性脂質それ自体に対する免疫系の応答が重要であると考えられてきた。

しかし、イオン性脂質の除去は粒子の形態にも大きな影響を与え得る。このため、粒子の構造が免疫刺激性に与える影響もまた考慮しなければならない。また我々は、様々な研究グループから報告される異なった化学構造を持つイオン性脂質が、どれも免疫刺激性を示す点に疑問を抱き、LNP に広く共通する特性が免疫刺激性に寄与するのではないかと考えた。

そこで我々は、ほぼ全ての LNP に含まれるコレステロールに着目した(27)。発現量の寄与を排除するため、種々の empty-LNP を抗原タンパク質と混合して投与し、抗体価を計測した。文献と同様、イオン性脂質を完全に除去すると免疫刺激性は失われた。しかし、イオン性脂質の量と免疫刺激性の強さは相関しなかった。コレステロール量が 38.5%含まれる、従来ワクチン用組成において免疫刺激性が最大となり、コレステロール量が 58.5%の場合、および 0%または 18.5%の場合には低下した。

電子顕微鏡観察により粒子の形態を解析したところ、イオン性脂質の除去は油滴様のナノ構造からベシクル構造への変化を引き起こした。また、油滴様構造体はコレステロ

ールが 38.5%以下の領域では球体だった一方、コレステロールが 58.5%の場合は部分的に直線的な辺を持つ非球状の構造体が観察された。次に、粒子の内部構造を SAXS で観察したところ、コレステロール量が 58.5%の場合に結晶様構造に由来すると思われる短距離の繰り返しが検出された。一方、コレステロールが 38.5%以下の場合、コレステロールのクラスターと思われるピークが検出された。本ピークはブロードであり、ゆらぎのある Intermediate な構造体であることが示唆された。我々はこの構造体を Cholesterol-induced Phase (ChiP) と名付けた。コレステロール量と免疫刺激性の関係を解析したところ、ChiP の増加に伴い免疫刺激性が増加した一方で、結晶様構造の出現により免疫刺激性が低下したことが示唆された。これらの結果から、コレステロールからなる中間的な構造体が免疫刺激性に部分的に寄与すると考えられる。また、イオン性脂質の存在は、ChiP 形成の場である油滴様構造に重要であると考えられる。

5. おわりに

本研究で我々は、自己分解反応を利用した脂質様材料を開発した。本材料を用いて誰でも簡単に mRNA-LNP を作成可能な Ready-to-Use 型製剤を開発した。これらの技術により IVT-mRNA の医療応用が加速することを願う。また、mRNA-LNP に対する生体応用について、コレステロールの存在状態が影響する可能性を見出した。今後、これらの知見をベースとして、免疫原性を排除した Immune stealth LNP の開発を進めたいと考えている。

6. 謝辞

北海道大学在籍時より、原島秀吉先生（北海道大学）、秋田英万先生（東北大学）、ほか様々な先生方に DDS 研究について多大なるご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。米持悦生先生（星薬科大学）、森部久仁一先生（千葉大学）、東颯二郎先生（千葉大学）、植田圭祐先生（千葉大学）には、X線小角散乱や電子顕微鏡観察について多大なるご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。また、共に研究を進めて頂いた千葉大学および東北大学の学部生・大学院生の皆様に感謝申し上げます。

7. 利益相反開示

本論文の一部は「日油株式会社」との共同研究として実施された。本研究の一部は JSPS 科研費（18K18377、21K18035）、公益財団法人 加藤記念バイオサイエンス振興財団、公益財団法人 猪之鼻奨学会の助成を受け実施された。

8. リファレンス

1. U. Şahin, K. Karikó, Ö. Türeci, mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 759–780 (2014).

2. P. S. Kowalski, A. Rudra, L. Miao, D. G. Anderson, Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol. Ther.* **27**, 710–728 (2019).
3. N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 261–279 (2018).
4. H. Tanaka, Y. Sakurai, J. Anindita, H. Akita, Development of lipid-like materials for RNA delivery based on intracellular environment-responsive membrane destabilization and spontaneous collapse. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **154–155**, 210–226 (2020).
5. R. Tenchov, R. Bird, A. E. Curtze, Q. Zhou, Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano* **15**, 16982–17015 (2021).
6. W. Li, C. Wang, Y. Zhang, Y. Lu, Lipid Nanocarrier-Based mRNA Therapy: Challenges and Promise for Clinical Transformation. *Small*, e2310531 (2024).
7. K. S. Corbett, *et al.*, SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* **586**, 567–571 (2020).
8. F. P. Polack, *et al.*, Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2603–2615 (2020).
9. S. Hama, H. Akita, S. Iida, H. Mizuguchi, H. Harashima, Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1533–1543 (2007).
10. S. Hama, *et al.*, Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Mol. Ther.* **13**, 786–794 (2006).
11. M. Ukawa, *et al.*, Neutralized nanoparticle composed of SS-cleavable and pH-activated lipid-like material as a long-lasting and liver-specific gene delivery system. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1222–1229 (2014).
12. H. Akita, *et al.*, A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like material as a carrier for plasmid DNA. *Adv. Healthc. Mater.* **2**, 1120–1125 (2013).
13. H. Tanaka, *et al.*, Temperature and pH sensitivity of a stabilized self-nanoemulsion

formed using an ionizable lipid-like material via an oil-to-surfactant transition. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **151**, 95–101 (2017).

14. H. Tanaka, *et al.*, Self - degradable lipid - like materials based on “hydrolysis accelerated by the intra - particle enrichment of reactant (HyPER)” for messenger RNA delivery. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1910575 (2020).
15. J. D. Finn, *et al.*, A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* **22**, 2227–2235 (2018).
16. H. Tanaka, *et al.*, Delivery of Oligonucleotides Using a Self-Degradable Lipid-Like Material. *Pharmaceutics* **13** (2021).
17. I. V. Zhigaltsev, *et al.*, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing. *Langmuir* **28**, 3633–3640 (2012).
18. N. Maurer, *et al.*, Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. *Biophys. J.* **80**, 2310–2326 (2001).
19. N. M. Belliveau, *et al.*, Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **1**, e37 (2012).
20. S. J. Shepherd, *et al.*, Scalable mRNA and siRNA Lipid Nanoparticle Production Using a Parallelized Microfluidic Device. *Nano Lett.* **21**, 5671–5680 (2021).
21. H. Tanaka, *et al.*, Ready-to-Use-Type Lyophilized Lipid Nanoparticle Formulation for the Postencapsulation of Messenger RNA. *ACS Nano* **17**, 2588–2601 (2023).
22. M. Yanez Arteta, *et al.*, Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E3351–E3360 (2018).
23. J. Huang, J. T. Buboltz, G. W. Feigenson, Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1417**, 89–100 (1999).
24. J. Devoldere, H. Dewitte, S. C. De Smedt, K. Remaut, Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger. *Drug Discov. Today* **21**, 11–25

(2016).

25. M.-G. Alameh, *et al.*, Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* **54**, 2877-2892.e7 (2021).
26. S. Ndeupen, *et al.*, The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience* **24**, 103479 (2021).
27. J. Anindita, *et al.*, The Effect of Cholesterol Content on the Adjuvant Activity of Nucleic-Acid-Free Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* **16** (2024).

Received: 2024.05.07

Accepted: 2024.06.25