

## 56. 新規機能性分子修飾核酸封入脂質ナノ粒子の開発と応用

川上 茂

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科・長崎大学薬学部 医薬品情報学分野

Key words : 脂質ナノ粒子 (LNP), 核酸医薬, ドラッグデリバリー, 標的指向化, mRNA

### 緒言

近年、mRNA ワクチンの実用化と共に核酸医薬の開発が世界中で進められている。広く核酸医薬を実用化していくためには、核酸医薬を病気の原因の細胞に特異的に送達させるための薬物送達システムの開発が必要不可欠である。一方、先天遺伝子欠損疾患患者への応用に対しては、世界で最も注目されている遺伝子操作技術であるゲノム編集技術の応用が必要であるが、Cas9 mRNA とガイド RNA の共送達性や安全性の観点から核酸封入脂質ナノ粒子 (LNP) の応用が *in vivo* 法と *ex vivo* 法の両面において期待されている。

mRNA/LNP の標的指向化に関しては、polyethylene glycol (PEG) 先端にリガンドを結合させる方法が研究されている。PEG は分子量分布を有しておりリガンド修飾体の品質管理が難しい上に、柔軟な構造をもっているため、リガンドが確実に粒子の外側を向くとは限らない。本研究では、脂質ナノ粒子の膜表面に配向性を制御して機能性分子を導入できる、水に高分散性を示すペプチドスペーサーを有する単一分子量となる新規ペプチド修飾高機能・高品質 (High Functionality and Quality : HFQ) 脂質を設計・合成した。HFQ 脂質の水和層は乏しいため、マイクロ流路内での希釈混和後のミセル崩壊に伴う、核酸封入脂質ナノ粒子に対する、フローによる連続大量調製可能かつシンプルな新たな機能性分子修飾法として、迅速後修飾・マイクロ流体法を新たな方法として提案する。

本研究では、(i) 細胞膜への結合を高める新規(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質の開発、(ii) (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の迅速後修飾・マイクロ流体法による調製法の開発、(iii) 配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP 開発に向けた Fc 領域 (FcR) 結合性ペプチドおよびクリック反応結合が可能な Alkyne 基-HFQ 脂質の開発、(iv) ゲノム編集ツールを搭載した mRNA/LNP 製剤の開発を行った。

### 方法

#### 1. リポペプチド (EK)<sub>n</sub>-脂質誘導体の合成

図 1 に示す (EK)<sub>n</sub>-脂質誘導体は、以前に記載されたように固相ペプチド合成によって合成した。FcR、Alkyne 基-HFQ 脂質も同様に合成した。化合物を精製し、RP-HPLC および MALDI-TOF-MS を用いて評価した。

#### 2. PEG リポソームの調製および (EK)<sub>4</sub>KK-HFQ 脂質誘導体修飾 PEG 化リポソームの調製

リポソームの脂質組成は DSPC/コレステロール/MPEG<sub>2000</sub>-DSPE [60 : 35 : 5 (モル比)] で、各脂質はメタノールに溶解した。蛍光標識には 0.5 mol% のローダミン-DOPE または NBD-DOPE を用いた。蒸発乾固後、脂質フィルムを滅菌水で 10 分間水合し、65°C で 3 分間超音波処理した。バルク混合後挿入法を用いた調製では、(EK)<sub>4</sub>-KK 脂質ミセル (6 mol%) を PEG 化リポソームと 60°C で 1 時間インキュベートした。マイクロ流体ポストインサージョン法を用いた調製では、NanoAssemblr Benchtop のヒートブロックを 60°C に設定し、PEG 化リポソームと 6 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質ミセルを総流量 (TFR) 1 mL、流速比 (FRR) 1 : 1 で前述のようにマイクロ流体チップ上で混合した。室温に達した後、10×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) を加

えてリポソームの等張溶液とし、 $0.45\ \mu\text{m}$  フィルターでろ過した。サンプルの物理化学的特性は、Zetasizer Nano ZS および Zetasizer Pro を用いて測定した。

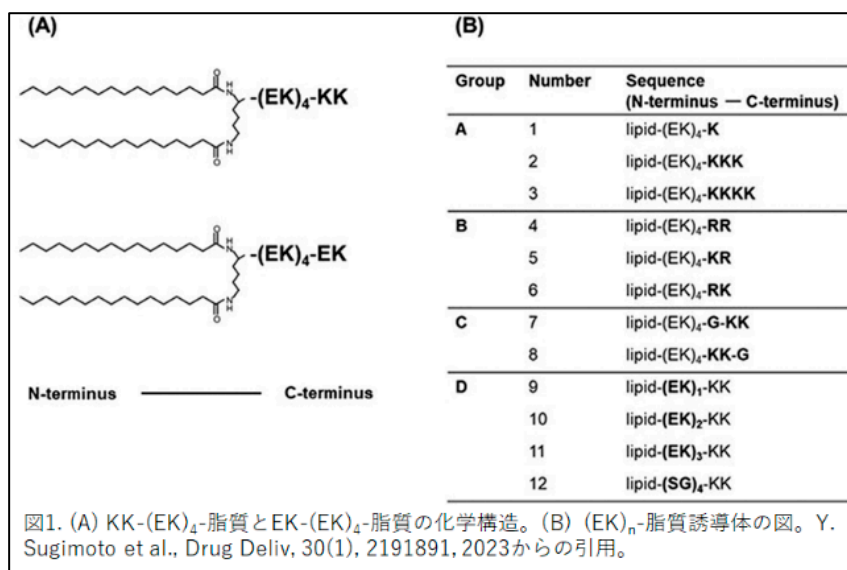


図 1. リポペプチド誘導体の構造

- A) KK-(EK)<sub>4</sub>-脂質とEK-(EK)<sub>4</sub>-脂質の化学構造。  
 B) (EK)<sub>n</sub>-脂質誘導体の図。  
 [1] からの引用。

### 3. PEG 化リポソームおよび (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質誘導体修飾 PEG 化リポソームの細胞結合性および細胞内取り込み機構の評価

無血清培地中のローダミン標識リポソーム ( $25\ \mu\text{M}$ ) または (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質誘導体修飾 PEG 化リポソーム ( $25\ \mu\text{M}$ ) を細胞に添加した。3 時間後、細胞を PBS で洗浄・回収した。細胞は BD LSR Fortessa フローサイトメトリー (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。細胞内取り込み機構を解析するため、阻害剤 [スクロース ( $0.4\ \text{M}$ )、ゲニステイン ( $200\ \mu\text{M}$ )、5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロリド (EIPA) ( $50\ \mu\text{M}$ )] 存在下、または  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。次に、各阻害剤の存在下、または  $4^\circ\text{C}$  で培養後、細胞を (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームと 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で洗浄・回収し、BD LSR Fortessa フローサイトメトリーを用いて解析した。

### 4. mRNA/LNP の調製および (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の調製

脂質組成は Dilinoleylmethyl-4-dimethylaminobutyrate (DLin-MC3-DMA) : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho choline (DSPC) : コレステロール : 1,2-Distearoyl-rac-glycero-3-methylpolyoxyethylene (DSG-PEG2000) 50 : 10 : 38.5 : 5 (mol/mol) とし、エタノールに溶解した。(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質 mRNA もエタノールに溶解した。100 mM クエン酸バッファーに溶解した。脂質溶液および mRNA 溶液はナノ医薬作製装置 NanoAssembler Benchtop®を用いて、流量比を脂質溶液 : mRNA = 1 : 3、流速  $4\ \text{mL}/\text{min}$  にて混合し、次いで PBS 中で透析して調製した。物理化学的性質 (粒子径、 $\zeta$  電位) および品質 (PDI : Polydispersity Index) は Zetasizer Pro にて測定した。

### 5. mRNA/LNP および (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の細胞結合性、発現の評価

24 well plate に細胞を播種した 24h 後、DiD にて蛍光標識した mRNA/LNP を mRNA 量として  $0.2\ \mu\text{g}/\text{well}$

として添加し、3 h 後に細胞を回収した。細胞は、フローサイトメトリーにて測定し、解析した。発現については、細胞播種 24 h 後、mRNA/LNP を mRNA 量として  $0.1 \mu\text{g}/\text{well}$  を添加した。さらに 24 h 後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーター PSN にてルシフェラーゼ活性を測定し、BCA assay にてタンパク質量を補正した。また、ddY マウス（雄性、5 週齢）に対し、mRNA/LNP を mRNA 量として  $3 \mu\text{g}/\text{mouse}$  として筋肉内投与した。Balb/c マウス（雄性、5 週齢）に、Colon-26 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) を背部皮下に移植し、腫瘍体積が  $100 \text{mm}^3$  を超えたのちに実験に用いた。腫瘍体積は、(短径 (mm))<sup>2</sup> × 長径 (mm) / 2 として算出した。Colon-26 皮下腫瘍モデルマウスに対し、mRNA/LNP を mRNA 量として  $3 \mu\text{g}/\text{mouse}$  として腫瘍内投与した。各投与 0.5、4.5、9、24、48 h 後に D-ルシフェリンを  $7.5 \text{mg}/\text{mouse}$  として腹腔内投与し、IVIS Lumina II にて撮像した。また、ddY マウス（雄性、5 週齢）に対し、mRNA/LNP を mRNA 量として  $2 \mu\text{g}/\text{mouse}$  として筋肉内投与し、4.5 h 後に筋肉および肝臓を採取した。Colon-26 皮下腫瘍モデルマウスに対しては、mRNA/LNP を mRNA 量として  $2 \mu\text{g}/\text{mouse}$  として腫瘍内投与し、9 h 後に腫瘍および肝臓を採取した。各組織はホモジナイズし、ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。

## 結果および考察

### 1. (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質誘導体の合成と (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質誘導体 PEG リポソームの開発

(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質誘導体の構造は、図 1 に示す。(B) のグループ A : C 末端のリジン (K) の数を変えた配列、グループ B : C 末端のリジン (K) をアルギニン (R) に変えた配列、グループ C : C 末端の KK の隣にグリシン (G) を加えた配列、グループ D : リジンとグルタミン酸の (EK) リピートの長さを変えた配列、および (EK) リピートを (SG) リピートに変えた配列を指す。

(EK)<sub>n</sub>-HFQ 脂質誘導体修飾 PEG 化リポソームは、PEG 化リポソームと 6 mol% の (EK)<sub>n</sub>-HFQ 脂質誘導体をバルク混合後挿入法でインキュベートして調製した。本研究結果の学術論文である [1] に物理化学的性質として平均粒子径 (nm)、 $\zeta$  電位 (mV)、品質として PDI の詳細データを示している。(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質 PEG 化リポソームの平均粒子径は PEG 化リポソームと同等であり、PDI は約 0.1 と等分散であった。 $\zeta$  電位はほぼ中性で、PEG 化リポソームおよび (EK)<sub>4</sub>-EK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームよりもわずかに陽性であった。K1、K2 では PEG 化リポソームと比較して  $\zeta$  電位は有意に変化しなかったが、K3、K4 では増加した。B 群では、K を R に変えても粒子径、 $\zeta$  電位、PDI にはほとんど影響がなかったが、(EK)<sub>4</sub>-KR-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームは PDI がわずかに高かった。C 群では、(EK)<sub>4</sub>-GKK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームでは粒子径と PDI がわずかに増加する傾向がみられたが、KKG-(EK)<sub>4</sub>-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームでは  $\zeta$  電位が増加する傾向が見られた。D 群では、配列評価したすべての HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームで、粒子径と PDI のわずかな増加が観察された。また、EK リピート数を減少させた配列の HFQ 脂質で修飾した PEG 化リポソームは、粒子径にばらつきがある傾向がみられた [1]。

### 2. (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームの細胞結合性および細胞内取り込み機構の解析

(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 修飾 PEG 化リポソームの選択性を調べるため、正常細胞株と癌細胞株 (MIA Paca-2、A549、Colon-26、NIH3T3 細胞) を用いて (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームの細胞結合性を評価した (図 2)。(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質の対照として、C 末端のリジン (K) をグルタミン酸 (E) に変化させた非荷電 (EK)<sub>4</sub>-EK-HFQ 脂質を用いた。(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームは、すべての細胞株において、PEG 化リポソームおよび (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームよりも高い細胞会合性を示した。細胞内経路を決定するために、エンドサイトーシス阻害剤 (スクロース : クラスリン介在エンドサイトーシス阻害剤、ゲニステイン : カベオレ介在エンドサイトーシス阻害剤、EIPA : マクロピノサイトーシス阻害剤、4°C : すべてのエンドサイトーシスを阻害する条件として使用) を用いて、A549 細胞における (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームの細胞内会合を評価した。阻害剤または条件下で前処理した後、6 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾

PEG 化リポソームを添加し、リポソームの細胞内会合を評価した。阻害剤または条件下で前処理した細胞では、細胞内への取り込みの有意な減少が観察された [1]。

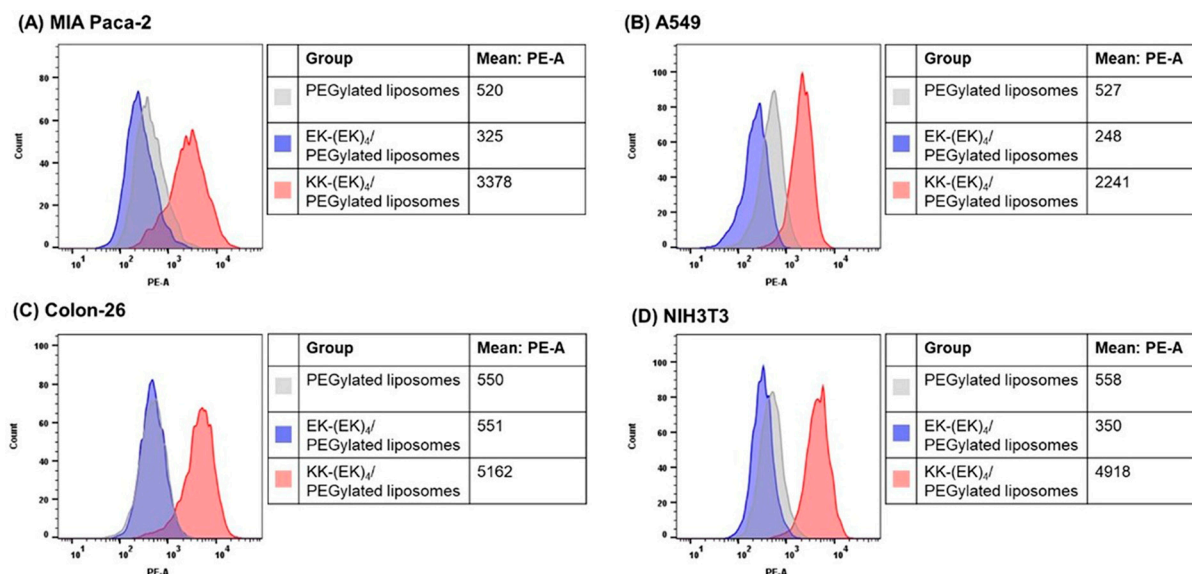


図 2. 各種細胞に対する細胞結合性の評価

(A) MIA Paca-2 細胞、(B) A549 細胞、(C) Colon-26 細胞、(D) NIH3T3 細胞を用いたフローサイトメトリーによる KK-(EK)<sub>4</sub>/PEG 化リポソーム (修飾量 6%) の細胞会合。細胞は、25 μM のローダミン標識リポソームで 3 時間処理した。[1] からの引用。

### 3. (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP 製剤の開発と細胞における発現および発現に至る因子の影響の解析

(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾による物理化学的性質 (粒子径、ζ 電位) および品質 (多分散指数 (polydispersity index : PDI)) への影響を検討した。5 mol% までの修飾量では、粒子径および PDI には顕著な変化は認められなかった。ζ 電位は修飾量に伴って増加する傾向を示したが、中性付近の電荷に留まった。これにより、カチオン性による生体毒性および細胞毒性を回避した高品質な製剤調製が可能となった。次に、発現に及ぼす影響について解析した。ヒト肺がん由来細胞株 A549 細胞において、1 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP は、未修飾群と比較して 20 倍高いルシフェラーゼ発現を示した。そこで他の細胞への影響を解析した。マウス樹状細胞由来細胞株 DC2.4 細胞およびマウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞における発現増強効果を確認した。DC2.4 細胞において、3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP は、未修飾群に対してルシフェラーゼ発現量が約 85 倍増加させた。樹状細胞における発現増強法は様々なデザイナー樹状細胞として応用できると考えて現在研究を進めている。

さらに、C2C12 細胞において、3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP は、未修飾群に対してルシフェラーゼ発現量を約 250 倍増加させた。以上、(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質は、mRNA/LNP への修飾を行うことで、約 20~300 倍もの顕著に高い発現を得ることができることが明らかになった。そこで C2C12 細胞における (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾による発現増加機構を明らかにしていくことを目的として、発現と密接に関係する細胞結合性の変化について評価を行った。その結果、3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP では、未修飾群に対して 230 倍程度の細胞結合性の増加が認められ、発現増加の程度とほぼ同等であったことから、細胞結合性の増大が大きく関与している可能性が示された。

筋芽細胞 C2C12 細胞で高い発現を示したことから、マウス筋肉内投与への応用について検討した。3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾および未修飾 mRNA/LNP をマウスへ筋肉内投与し、経時的なルシフェラーゼ発現量の変化を IVIS にて確認したところ、未修飾群に対して 3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾群では、投与 0.5 時間

以降で顕著に発現量の増加が認められた。次に、組織をホモジナイズしてルシフェラーゼ活性の定量的な評価を行った。筋肉において、3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾群では、未修飾群に対して発現量は約 10 倍の増加が認められ、一方で、mRNA/LNP 筋肉内投与後の腫瘍は発現臓器である肝臓では 10 分の 1 程度に減少して、筋肉/肝臓における発現比を大きく改善できることが明らかになった。さらに腫瘍内投与時の影響について解析を行った。3 mol% (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾群で、未修飾群に対して腫瘍における発現量で 4.8 倍程度の増加が認められたが、肝臓での発現は増加傾向を示して、特に肝臓での発現に関して、筋肉内投与とは異なる傾向が認められた。これは、腫瘍における新生血管が発達などの解剖学的な特徴により、局所投与後の全身循環血への移行に違いが生じたためと推察される。

#### 4. 迅速後修飾・マイクロ流体法による (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソーム、mRNA/LNP の調製

本研究では、我々の研究室で開発した HFQ 脂質の迅速後修飾・マイクロ流体法 (図 3) [2] による調製法で (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 PEG 化リポソームが調製できるかについて評価を行った [1]。マイクロ流体装置を用いて水系溶媒と均一に混合することで、機能性脂質をリポソームに修飾することができるため、実用化に向けた大量調製法の開発で重要となる。そこで、(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 修飾脂質は水系溶媒への分散性が高いことから、マイクロ流体ポストインサクション法を用いて (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 修飾 PEG 化リポソームを調製できないか検討した。(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 修飾 PEG 化リポソームは、バルク混合後挿入法で調製したリポソームと同様の粒子径と PDI を示したが、 $\zeta$  電位はわずかに高かった。さらに、マイクロ流体後挿入法で調製した (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 修飾 PEG 化リポソームは、PEG 化リポソームよりも高い細胞会合を示し、バルク混合後挿入法で調製したリポソームと同程度であった。これらの結果は、マイクロ流体デバイスを用いて (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質を PEG 化リポソーム表面に配向性を制御した形で修飾して機能化できることを強く示唆している [1]。この結果を得て、mRNA/LNP への (EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質のマイクロ流体・後挿入法による機能化が可能であることを確認した。さらに近年、エクソソームを含む小型細胞外小胞 (Small Extracellular Vehicles : sEVs) は新規治療薬あるいは薬物送達キャリアとしての応用が期待されている。sEVs への配向性を制御した形での高機能化は、sEVs の治療薬や薬物送達キャリアとしてのポテンシャルを増強することができる。しかしながら、簡便かつ大量調製可能な機能化手法に関する報告例は殆どない。そこで本知見を基に、sEVs (牛乳由来 sEVs) に応用し、(EK)<sub>4</sub>-KK-HFQ 脂質修飾 sEVs をマイクロ流体・迅速後修飾法を用いて調製することに成功した [3]。なお、本論文は現在投稿中である。よって、HFQ 脂質と迅速後修飾・マイクロ流体法の利用は、今後の sEVs の高機能化手法として応用できる可能性がある。

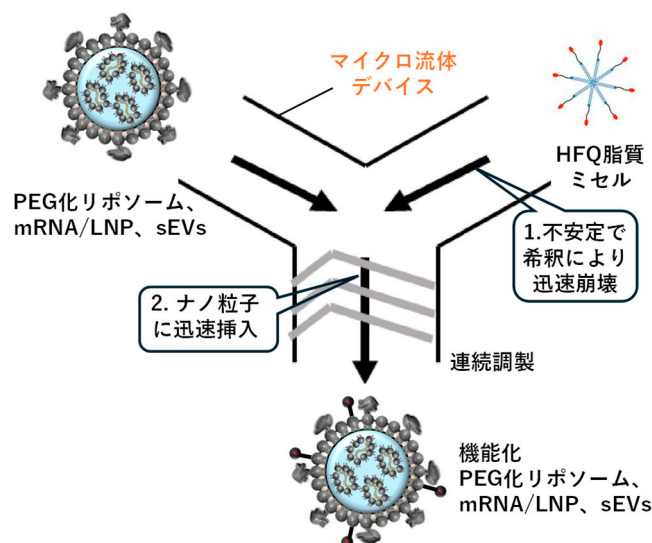


図 3. PEG 化リポソーム、mRNA/LNP、sEVs のマイクロ流体・迅速後修飾法

## 5. FcBP-HFQ 修飾脂質の開発

本研究では、配向性を制御した形でモノクローナル抗体をナノ粒子表面に修飾する新たな手法の開拓を行った。従来法は PEG 脂質を利用しているため、配向性の制御化が十分に行われていない。まず、Fc 領域に結合するペプチドで修飾した HFQ 脂質 (FcBP-HFQ 修飾脂質) を設計・合成した。次に、FcBP-HFQ 修飾脂質を mRNA/LNP に対して、迅速後修飾・マイクロ流体法により修飾を行った。その後、モノクローナル抗体と混合し、配向性を制御したモノクローナル抗体修飾 mRNA/LNP の開発を行った。配向性を制御したモノクローナル抗体修飾 mRNA/LNP の物理化学的性質や品質は、オリジナルの mRNA/LNP とほぼ同程度であり、物理化学的性質や品質を維持していた。一方、標的の抗原が高発現する細胞においては有意に高い結合性を示して、モノクローナル抗原による認識により細胞選択的に移行していることが示唆された [4]。

## 6. Alkyne 基-HFQ 修飾脂質の応用

我々の研究グループでは、クリック反応を利用してアジド化環状ペプチドを HFQ 脂質に結合できる Alkyne 基-HFQ 修飾脂質の開発に成功し、独自性の高い機能性 HFQ 脂質を保有している [5]。しかしながら、マイクロ流体・後修飾法により修飾を行う際は、金属イオンが残留することが問題であった。そこで本研究では、試験管の中で、Alkyne 基-HFQ 修飾脂質とアジド化抗体を結合させ、その反応溶液を透析することで金属イオンを除去し、限外ろ過で濃縮後にマイクロ流体・後修飾法により配向性を制御した形で抗体修飾 mRNA/LNP の調製を行う新たな手法の開発を行った。現在、Alkyne 基-HFQ 修飾脂質とアジド化抗体が結合していることを確認することに成功している。5.の方法論と比べ、生体内で置換により別の抗体との置き換わりや離脱が起こらないため、今後、高品質な配向性制御型ナノ粒子の抗体修飾法としての応用が期待できる。

## 7. 機能性分子修飾 mRNA/LNP を用いたゲノム編集治療薬への応用

ゲノム編集療法においては標的臓器以外での非意図的なゲノム編集の抑制及び mRNA/LNP の高い肝臓移行性が課題である。本研究では、標的遺伝子への高い選択性をもつ CRISPR/Cas9 システムに必要な Cas9 mRNA の鋳型プラスミド作製を行い、鋳型プラスミドから転写した mRNA の鎖長を電気泳動で確認した。なお、鋳型プラスミドには、3' UTR 以降の配列に poly A 構造を組み込み、効率的な翻訳を可能とした。次いで、がん抑制遺伝子 PTEN を認識する sgRNA を設計・合成した。今後は (EK)<sub>4</sub>-KK 脂質修飾 mRNA/LNP を用いゲノム編集への応用に関する研究を行う。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医薬品情報学分野の向井英史准教授ならびに同研究科薬剤学分野の麓伸太郎准教授である。

## 文 献

- 1) Sugimoto Y, Suga T, Umino M, Yamayoshi A, Mukai H, Kawakami S. Investigation of enhanced intracellular delivery of nanomaterials modified with novel cell-penetrating zwitterionic peptide-lipid derivatives. *Drug Deliv.* **2023**, 30(1):2191891. PMID: 36964673, DOI: 10.1080/10717544.2023.2191891.
- 2) Sugimoto Y, Suga T, Kato N, Umino M, Yamayoshi A, Mukai H, Kawakami S. Microfluidic Post-Insertion Method for the Efficient Preparation of PEGylated Liposomes Using High Functionality and Quality Lipids. *Int J Nanomed.* **2022**, 17:6675-6686. PMID: 36597433, doi: 10.2147/IJN.S390866.

- 3) Geng L, Matsumoto M, Yao F, Umino M, Kamiya M, Mukai H, Kawakami S. Microfluidic post-insertion for one-step modification of two functional lipids (polyethylene glycol and KK- or RGD-peptide-modified high-functionality and -quality lipids) in extracellular vesicles. (submitted)
- 4) Kato N, Moriya N, Matsumoto M, Matuo A, Yoshida M, Hiu T, Matsuo T, Takashima Y, Kamiya M, Mukai H, Kawakami S. Synthesis of a novel adapter lipid using Fc-region mediated antibody modification for post-insert preparation of transferrin receptor targeted messenger RNA-loaded lipid nanoparticles. (submitted)
- 5) Kato N, Sato T, Fuchigami Y, Suga T, Geng L, Tsurumaru M, Hagimori M, Mukai H, Kawakami S. Synthesis and evaluation of a novel adapter lipid derivative for preparation of cyclic peptide-modified PEGylated liposomes: Application of cyclic RGD peptide, *Eur J Pharm Sci*, **2022**, 176:106239. PMID: 35714942, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106239.