

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Scuola di Medicina e Chirurgia



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

MASTER DI II LIVELLO IN

PHARMAFORWARD: GLI ORIZZONTI DELLA FARMACIA DEI SERVIZI

TESI IN
FORME FARMACEUTICHE INNOVATIVE

**NANOPARTICELLE LIPIDICHE NELLA VEICOLAZIONE DI RNA
TERAPEUTICI: MECCANISMO D'AZIONE, APPLICAZIONI CLINICHE E
PROSPETTIVE FUTURE**

**LIPID NANOPARTICLES IN THERAPEUTIC RNA DELIVERY: MECHANISM
OF ACTION, CLINICAL APPLICATIONS AD FUTURE PROSPECTS**

RELATORE
**CH.MO PROF.
GIUSEPPE DE ROSA**

CANDIDATO
DR. ETTORE CASCONI
MATRICOLA: KDD000003

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

È per avere tempo.

Altro tempo.

INDICE

Introduzione: RNA e potenziali terapie a base di RNA	pag.	2
Problematiche relative alla somministrazione degli RNA terapeutici	pag.	10
Vettori virali e non virali	pag.	17
LNP: cosa sono, composizione e metodiche di preparazione	pag.	24
Destino delle LNP in seguito a somministrazione	pag.	39
Modalità di penetrazione intracellulare delle LNP	pag.	58
Medicinali a RNA approvati per uso umano	pag.	64
Prospettive cliniche per nuove terapie	pag.	69
Conclusioni	pag.	77
Bibliografia	pag.	78
Sitografia	pag.	92

1. INTRODUZIONE: RNA E POTENZIALI TERAPIE A BASE DI RNA

L'acido ribonucleico o RNA è una molecola biologica fondamentale che, insieme al DNA e alle proteine, costituisce uno dei pilastri della vita come la conosciamo.

Tradizionalmente, l'RNA è stato considerato soprattutto come un intermediario nel flusso dell'informazione genetica dal DNA alle proteine, secondo il dogma centrale della biologia molecolare, associato alla sola funzione di «trasportatore» delle informazioni genetiche per la biosintesi di proteine (RNA messaggero o mRNA). Tuttavia, negli ultimi decenni, la comprensione del ruolo dell'RNA si è notevolmente ampliata, rivelando anche una funzione regolatoria e di comunicazione tra le cellule evidenziandone la versatilità e il suo potenziale terapeutico (De Rosa G. 2024 fivs.org).

1.1 PANORAMICA DEGLI ACIDI NUCLEICI E RUOLO BIOLOGICO

Definizione e struttura dell'RNA

L'RNA è un polimero costituito da ribonucleotidi, ciascuno composto da una base azotata (adenina, guanina, citosina o uracile), uno zucchero, il ribosio, e un gruppo fosfato. A differenza del DNA, l'RNA è generalmente a singolo filamento, sebbene possa formare strutture secondarie complesse attraverso appaiamenti intramolecolari. La presenza del gruppo idrossile in posizione 2' del ribosio conferisce all'RNA una maggiore reattività chimica rispetto al DNA, ma lo rende anche più suscettibile alla degradazione enzimatica (Hou X. *et al.* 2021).

Differenze tra DNA e RNA

Le principali differenze strutturali tra DNA e RNA includono: (1) la presenza di ribosio nell'RNA invece del desossiribosio nel DNA; (2) la sostituzione della timina nel DNA con l'uracile nell'RNA; (3) la conformazione prevalentemente a doppio filamento del DNA rispetto alla struttura principalmente a singolo filamento dell'RNA. Queste differenze si riflettono nelle diverse funzioni biologiche delle due molecole: mentre il DNA funge principalmente da deposito stabile dell'informazione genetica necessarie per lo sviluppo fisico e comportamentale di uno specifico individuo (De Rosa G. 2024 fivs.org), l'RNA svolge ruoli più dinamici e diversificati nel metabolismo cellulare.

La ricerca scientifica ha consentito di capire che un gran numero di gravi malattie sono dovute a una o più mutazioni genetiche che impediscono il normale funzionamento di alcune cellule. Ciò ha promosso lo studio di nuove strategie terapeutiche mirate a correggere i «difetti» genetici di un individuo (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Per terapia genica si intende una tecnica che mira a trattare malattie genetiche correggendo la funzione di un gene difettoso, spesso introducendo una copia sana del gene nelle cellule. Si può inserire materiale genetico (DNA o RNA) all'interno della cellula umana allo scopo di prevenire o di combattere una malattia. Questi approcci sono oggi utilizzati nella pratica clinica per curare poche malattie rare causate da problemi in specifici geni, ma sono in fase di studio terapie geniche per la prevenzione o il trattamento di numerose altre patologie. Allo stesso modo, l'introduzione di un gene o del suo mRNA permette all'organismo di produrre una proteina estranea in grado di provocare una risposta immunitaria a scopo vaccinale (De Rosa G. 2024 fivs.org, Fondazione Mutagens).

Tipi di RNA e loro funzioni biologiche

Nel contesto cellulare, esistono numerosi tipi di RNA con funzioni specializzate:

- **RNA codificante (RNA messaggero o mRNA):** strutture macromolecolari che trasportano l'informazione genetica dal DNA ai ribosomi per la sintesi proteica;
- **RNA di trasferimento (tRNA):** trasporta gli aminoacidi ai ribosomi durante la sintesi proteica;
- **RNA ribosomiale (rRNA):** costituisce, insieme alle proteine, i ribosomi, le strutture cellulari responsabili della sintesi proteica;
- **RNA non codificanti (ncRNA):** RNA oligonucleotidici che includono microRNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), long non-coding RNA (lncRNA), ribozimi, aptameri che svolgono ruoli regolatori nell'espressione genica (Feng R. *et al.* 2021).

La scoperta di questi diversi tipi di RNA e delle loro funzioni ha rivoluzionato la comprensione della biologia cellulare e ha aperto nuove prospettive per lo sviluppo di terapie innovative basate sull'RNA.

1.2 RNA Terapeutici: tipologie e meccanismi d'azione.

Il potenziale terapeutico degli acidi nucleici va oltre la terapia genica e la vaccinazione: frammenti di DNA o RNA possono essere usati per regolare specifici processi fisio-patologici e rappresentano un approccio innovativo per il trattamento di numerose patologie. L'impiego di frammenti di DNA, oligonucleotidi antisense o di frammenti di RNA quali gli small interfering RNA (siRNA) o i microRNA (miRNA) ha dimostrato di poter essere in grado di

controllare l'espressione di proteine specifiche determinando l'evoluzione della terapia genica caratterizzata dal silenziamento genico e il genome editing.

Questo processo si basa sull'impiego di endonucleasi in grado di riconoscere specifiche sequenze di DNA in cui effettuare il taglio del doppio filamento. Tra le tecnologie esistenti, quella denominata CRISPR/Cas9 è senz'altro la più utilizzata (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Le terapie a RNA, grazie al potenziale di modulare l'espressione genica o di generare proteine terapeutiche, sono applicabili per trattare malattie caratterizzate dall'alterazione di specifici target genetici. È possibile, altresì, agire su proteine intracellulari che sono altrimenti difficili da raggiungere. Inoltre, i farmaci a RNA possono essere personalizzati e adattati alle anomalie genetiche specifiche del paziente, con minori effetti collaterali. Sono ampiamente considerati per numerose patologie, tra cui malattie infettive, neoplasie, disordini immunitari, malattie cardiache e disturbi neurologici (Paunovska K *et al.* 2022). Gli RNA terapeutici codificano proteine o facilitano l'editing del DNA o dell'RNA e sono generalmente classificati in due gruppi: RNA oligonucleotidici non codificanti (ad esempio siRNA, miRNA, aptameri RNA, sgRNA, ribozimi) che interferiscono con gli mRNA bersaglio attraverso l'appaiamento delle basi di Watson-Crick ed RNA codificanti macro-molecolari o mRNA (Crooke ST *et al.* 2018). Tuttavia, la traduzione clinica delle terapie a RNA incontra ostacoli significativi, tra cui l'instabilità, la vulnerabilità alla degradazione delle RNasi nel flusso sanguigno e nei tessuti, la clearance renale, la captazione da parte del sistema reticoloendoteliale (RES), la penetrazione intracellulare limitata a causa delle dimensioni e della carica negativa, la cattura negli endosomi, gli effetti off-target e l'immunogenicità (Zhang C. *et al.* 2023). Gli scienziati hanno sviluppato diverse strategie per superare queste sfide selezionando opportunamente le regioni non tradotte (UTR), l'aggiunta della coda di poli-A, il capping e le modifiche nucleosidiche (Burrows C. *et al.* 2024).

RNA messaggero (mRNA): struttura e funzione

L'mRNA terapeutico è progettato per codificare proteine di interesse terapeutico, sfruttando il meccanismo di traduzione cellulare dell'ospite. La struttura di un mRNA terapeutico include: (1) un cappuccio 5' per aumentare la stabilità e l'efficienza della traduzione; (2) una regione 5' non tradotta (5'-UTR) che influenza l'efficienza della traduzione; (3) una sequenza codificante specifica per la proteina da sintetizzare; (4) una regione 3' non tradotta (3'-UTR) che regola la stabilità dell'mRNA; (5) una coda di poli(A) che protegge l'mRNA dalla degradazione, minimizza le risposte immunitarie innate e ne aumenta l'efficienza di traduzione (Melamed JR. *et al.* 2022, Warminski M. *et al.* 2023). L'mRNA terapeutico può essere utilizzato per la terapia

sostitutiva, fornendo la sequenza codificante per proteine mancanti o difettose o, per la vaccinazione, inducendo la sintesi di antigeni che stimolano una risposta immunitaria protettiva (Sahin U. *et al* 2014), evitando modifiche irreversibili del genoma e i rischi genetici associati alle terapie basate sul DNA (Kaufmann KB. *et al.* 2013). L'mRNA ha suscitato un notevole interesse per il suo ruolo centrale nei vaccini a base di mRNA contro SARS-CoV-2, nella terapia genica e nelle tecniche di editing genico come CRISPR/Cas9. Inoltre, l'mRNA terapeutico offre possibilità di trattamento su misura per i disturbi genetici e il cancro (Haghighi E. *et al.* 2024).

Small interfering RNA (siRNA): meccanismo di silenziamento genico

I siRNA sono piccole molecole di RNA non codificante con una struttura ben definita a doppio filamento, tipicamente di 20-24 nucleotidi con due nucleotidi sporgenti ad ognuna delle due estremità 3' (Damase TR. *et al.* 2021), che mediano il silenziamento genico post-trascrizionale attraverso il meccanismo dell'RNA interference (RNAi). Queste estremità non appaiate svolgono un ruolo importante nel riconoscimento da parte delle proteine coinvolte nel processo di RNA interference, in particolare le proteine della famiglia Argonaute che costituiscono il nucleo del complesso RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Nella cellula, i siRNA vengono incorporati nel complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC), dove uno dei filamenti (il filamento guida o antisense) dirige il complesso verso l'mRNA bersaglio complementare. Il RISC quindi taglia l'mRNA bersaglio, impedendone la traduzione e determinando la sua degradazione (Cheng Q. *et al.* 2020). I siRNA richiedono una complementarità quasi perfetta con l'mRNA bersaglio e ne inducono principalmente la degradazione. I siRNA terapeutici sono progettati per silenziare specifici geni associati a patologie, come quelli che codificano per proteine mutate o sovraesprese nelle malattie genetiche o nel cancro. Il primo farmaco RNAi approvato dalla FDA nel 2018 è un siRNA chiamato Onpattro (patisiran), veicolato mediante LNP, che silenzia il gene della transtiretina mutata per il trattamento nell'amiloidosi ereditaria hATTR (Haghighi E. *et al.* 2024). I siRNA hanno riscosso un notevole successo nel silenziamento e nella regolazione dei geni in diverse patologie come i disturbi genetici, condizioni metaboliche e le infezioni virali.

MicroRNA (miRNA): regolazione dell'espressione genica

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti endogeni che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale e hanno rivoluzionato la comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica. Queste piccole molecole di RNA sono presenti in abbondanza in tutti i

tipi cellulari dei mammiferi e si stima che ciascun miRNA possa interagire con più di 200 RNA messaggeri (mRNA) bersaglio e, viceversa, che un singolo mRNA possa essere regolato da molteplici miRNA. La scoperta dei miRNA ha aggiunto un ulteriore livello di complessità e versatilità ai molteplici livelli di regolazione dell'espressione genica, rivelando un sofisticato sistema di controllo post-trascrizionale che modula finemente l'espressione proteica nelle cellule. Questo meccanismo di regolazione è particolarmente importante in contesti dove è richiesta una precisa modulazione dell'espressione genica, come nello sviluppo embrionale, nel differenziamento cellulare, nella risposta immunitaria e nella plasticità neuronale. L'importanza dei miRNA è ulteriormente evidenziata dal loro coinvolgimento in numerose patologie umane tra cui il cancro, malattie cardiovascolari, disturbi neurologici e metabolici. L'alterazione dell'espressione dei miRNA è stata associata a diverse condizioni patologiche, suggerendo il loro potenziale utilizzo come biomarcatori diagnostici e prognostici, nonché come possibili bersagli terapeutici. I miRNA sono caratterizzati da una lunghezza compresa tra 20 e 22 nucleotidi ed esercitano la loro funzione regolatoria principalmente attraverso il silenziamento genico post-trascrizionale, modulando l'espressione di specifici RNA messaggeri (mRNA) bersaglio. Questo processo avviene attraverso meccanismi che coinvolgono il complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC) e si basa sul riconoscimento di sequenze presenti sugli mRNA target. A differenza dei siRNA, che tipicamente hanno una complementarità perfetta con il loro mRNA bersaglio, i miRNA generalmente presentano una complementarità parziale e possono quindi regolare più geni contemporaneamente. I miRNA terapeutici possono essere utilizzati sia come «mimici», per ripristinare la funzione di miRNA sottoespressi, sia come «antagonisti» (anti-miR), per inibire miRNA sovraregolati in condizioni patologiche (Pardi N. *et al.* 2018). L'espressione anomala dei microRNA è stata associata a numerose condizioni patologiche, rilevando il loro ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi fisiologica.

Le applicazioni terapeutiche dei miRNA sono particolarmente promettenti nel campo dell'oncologia, delle malattie cardiovascolari, delle patologie metaboliche, nelle disfunzioni neurologiche e renali dove alterazioni nell'espressione dei miRNA sono spesso associate alla progressione della malattia.

CRISPR/Cas9: principi di base dell'editing genomico mediato da RNA

CRISPR/Cas9 rappresenta una delle più rivoluzionarie tecnologie nel campo dell'ingegneria genetica degli ultimi decenni. Questo sistema di editing genomico ha trasformato radicalmente il modo in cui gli scienziati possono modificare il DNA, offrendo uno strumento per intervenire sul genoma di organismi viventi. L'acronimo CRISPR significa «Clustered Regularly

Interspaced Short Palindromic Repeats» (Ripetizioni Palindromiche Corte Raggruppate e Separate da Intervalli Regolari); CRISPR/Cas9 è originariamente un sistema di difesa immunitaria adattativa utilizzato dai batteri per proteggersi dai virus (batteriofagi). Quando un batterio incontra un DNA estraneo, come quello di un virus, integra un frammento di tale DNA nel proprio genoma, in corrispondenza di una regione detta locus CRISPR. Questo permette al batterio di conservare memoria dell'incontro con virus patogeni. In caso di nuova infezione, il batterio trascrive: un mRNA chiamato CRISPR RNA (crRNA), che contiene le sequenze memorizzate e un altro mRNA chiamato tracrRNA (trans-activating crRNA). Queste due molecole si legano al DNA virale nella sequenza bersaglio, consentendo l'ancoraggio di Cas9, un enzima con attività nucleasica, che taglia gli acidi nucleici del virus, disattivandolo (AIRC, 2023). In questo sistema, un RNA guida (sgRNA) dirige l'endonucleasi Cas9 verso una specifica sequenza di DNA bersaglio, dove induce un taglio al doppio filamento. Questo taglio può essere riparato attraverso due principali meccanismi: la giunzione terminale non omologa (NHEJ), che spesso introduce inserzioni o delezioni che possono inattivare il gene, o attraverso la ricombinazione omologa (HDR), che può essere sfruttata per introdurre modifiche precise nel genoma utilizzando un DNA donatore. Questo processo consente di: inattivare geni specifici, correggere mutazioni genetiche, inserire nuovi geni o sequenze di DNA, modificare l'espressione genica senza alterare la sequenza (molecuradevise.com 2023). Le applicazioni terapeutiche del sistema CRISPR/Cas9 includono la correzione di mutazioni genetiche, l'inattivazione di geni patogeni o la modifica dell'espressione genica.

1.3 Evoluzione della terapia genica e dell'approccio basato su RNA

Con la scoperta dell'RNA interference nei primi anni 2000, si è aperta una nuova era per la terapia genica, focalizzata sul silenziamento genico anziché sull'aggiunta di geni. Questo approccio offre vantaggi significativi in termini di specificità e versatilità, consentendo di modulare l'espressione di geni endogeni senza alterare permanentemente il genoma. L'avvento delle tecnologie di editing genomico, in particolare CRISPR/Cas9, ha ulteriormente ampliato le possibilità della terapia genica, permettendo modifiche precise e permanenti del genoma. Queste tecnologie, che spesso utilizzano componenti RNA come guide per la specificità del targeting, rappresentano un ponte tra gli approcci classici di trasferimento genico e le strategie basate sull'RNA.

Vantaggi della terapia a RNA rispetto ad altri approcci terapeutici

Le terapie basate sull'RNA offrono numerosi vantaggi rispetto agli approcci terapeutici convenzionali, tra cui:

- **Specificità:** le terapie a RNA possono essere progettate per colpire specifiche sequenze nucleotidiche, offrendo un alto grado di selettività;
- **Versatilità:** possono essere utilizzate per aumentare o diminuire l'espressione di praticamente qualsiasi gene, ampliando notevolmente il repertorio di bersagli terapeutici;
- **Rapidità di sviluppo:** la sintesi e la modifica dell'RNA sono processi relativamente semplici e rapidi, consentendo un'accelerazione nello sviluppo di nuovi farmaci;
- **Natura transitoria:** a differenza delle modifiche genomiche permanenti, gli effetti delle terapie a RNA sono generalmente transitori, riducendo i rischi di effetti avversi a lungo termine;
- **Potenziale per la personalizzazione:** le terapie a RNA possono essere facilmente adattate alle specifiche mutazioni o varianti genetiche di ciascun paziente, aprendo la strada alla medicina personalizzata.

Potenziale applicativo in diverse aree terapeutiche

Il potenziale applicativo delle terapie a RNA si estende a numerose aree terapeutiche tra le quali si annoverano:

- **Malattie genetiche:** le terapie a RNA possono essere utilizzate per correggere o compensare mutazioni genetiche in patologie come la fibrosi cistica, l'amiloidosi ereditaria o le distrofie muscolari;
- **Oncologia:** possono agire su oncogeni specifici, ripristinare l'espressione di soppressori tumorali o modulare il microambiente tumorale;
- **Malattie infettive:** possono essere sviluppate rapidamente in risposta a nuovi agenti patogeni, come dimostrato dai vaccini a mRNA contro SARS-CoV-2;
- **Malattie cardiovascolari:** possono modulare l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nell'infiammazione o nella rigenerazione cardiaca;
- **Disturbi neurologici:** possono agire su geni associati a patologie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson o la sclerosi laterale amiotrofica.

Nonostante questo enorme potenziale, l'applicazione clinica delle terapie a RNA ha dovuto affrontare notevoli sfide, principalmente legate alla stabilità dell'RNA in vivo e alla necessità di una veicolazione efficiente alle cellule bersaglio.

Tali problematiche hanno stimolato lo sviluppo di sistemi di veicolazione avanzati, tra cui le nanoparticelle lipidiche (LNP), che rappresentano attualmente la sola piattaforma di tipo non virale per la somministrazione di RNA terapeutici divenuta una realtà.

2. PROBLEMATICHE RELATIVE ALLA SOMMINISTRAZIONE DEGLI RNA TERAPEUTICI

Le problematiche relative alla somministrazione degli RNA terapeutici hanno a lungo limitato la traduzione di queste promettenti terapie dalla ricerca alla pratica clinica. L'instabilità intrinseca dell'RNA, le barriere fisiologiche alla somministrazione, le limitazioni nella penetrazione cellulare e le preoccupazioni relative all'immunogenicità e alla tossicità hanno richiesto lo sviluppo di strategie innovative per superare questi ostacoli. Negli ultimi anni lo sviluppo di modifiche chimiche dell'RNA, sistemi di veicolazione avanzati e strategie di targeting hanno notevolmente migliorato l'efficacia e la sicurezza degli RNA terapeutici. Questi progressi hanno portato all'approvazione di diversi farmaci basati su RNA e hanno aperto la strada a numerose altre terapie attualmente in fase di sviluppo clinico. Tra i vari sistemi di veicolazione sviluppati, le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono emerse come l'unica piattaforma per la somministrazione di RNA terapeutici, offrendo una combinazione di efficienza di veicolazione, versatilità e scalabilità produttiva che ha contribuito in modo significativo ai recenti successi clinici, come i vaccini a mRNA contro SARS-CoV-2.

2.1 Instabilità e degradazione enzimatica

Suscettibilità alle RNasi endogene

Una delle principali limitazioni all'uso terapeutico dell'RNA è la sua elevata suscettibilità alla degradazione da parte delle ribonucleasi (RNasi), enzimi ubiquitari nei fluidi biologici e nei tessuti. L'RNA non modificato, una volta introdotto nel circolo ematico o in un tessuto (somministrazione locale), può avere un'emivita di pochi minuti rendendo estremamente difficile il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche (De Rosa G. 2024 fivs.org).

In particolare, le RNasi sieriche sono particolarmente problematiche per la somministrazione sistemica di RNA terapeutici, poiché possono degradare rapidamente l'RNA prima che questo raggiunga il tessuto bersaglio.

Emivita limitata in ambiente biologico

Oltre alla degradazione enzimatica, l'RNA è soggetto a idrolisi chimica in condizioni fisiologiche. La presenza del gruppo 2'-OH nel ribosio rende l'RNA intrinsecamente meno stabile rispetto al DNA, facilitando reazioni di transesterificazione che portano alla rottura del filamento. Questo processo è accelerato a pH fisiologico e in presenza di cationi divalenti come

Mg²⁺ che sono abbondanti nei fluidi biologici (Kauffman KJ. *et al.* 2015). L'instabilità dell'RNA si traduce in un'emivita estremamente limitata in vivo.

Strategie di stabilizzazione dell'RNA

Per superare queste limitazioni, sono state sviluppate diverse strategie di stabilizzazione dell'RNA:

- **Modifiche chimiche dei nucleotidi:** l'introduzione di modifiche chimiche come la 2'-O-metilazione, la 2'-fluoro-sostituzione o l'uso di nucleotidi con legami fosforotioati può aumentare significativamente la resistenza dell'RNA alle nucleasi, migliora la penetrazione cellulare aumentando l'idrofobicità e il legame alla proteine sieriche, aumentano l'affinità di legame e riducono l'attivazione immunitaria innata (Eckstein F. *et al.* 2014, Prakash TP 2011, Dirin M. *et al.* 2013, Setten RL. *et al.* 2019);
- **Capping e poliadenilazione:** per l'mRNA terapeutico, l'aggiunta di un cappuccio 5' modificato e di una coda di poli(A) ottimizzata può migliorare la stabilità e l'efficienza di traduzione. Queste modifiche mimano le caratteristiche degli mRNA endogeni, proteggendoli dalla degradazione esosomiale e minimizzando le risposte immunitarie innate (Melamed JR. *et al.* 2022, Warminski M. *et al.* 2023);
- **Modifiche della sequenza:** l'ottimizzazione della sequenza nucleotidica, come l'uso di codoni ottimizzati o la modifica delle regioni non tradotte (UTR), può migliorare la stabilità e l'espressione dell'mRNA senza alterare la proteina codificata (Melamed JR. *et al.* 2022, Warminski M. *et al.* 2023);
- **Incapsulamento in sistemi di veicolazione:** l'uso di vettori come le nanoparticelle lipidiche (LNP) fornisce una protezione fisica che salvaguarda l'RNA dalla degradazione enzimatica durante il trasporto verso le cellule bersaglio e permette il superamento delle barriere biologiche. I nanovettori offrono vantaggi fondamentali consentendo l'ottimizzazione delle loro proprietà chimiche, tra cui dimensioni, forma, composizione e chimica di superficie. È inoltre possibile personalizzare le proprietà della superficie, compresa la funzionalizzazione con ligandi mirati, migliorando potenzialmente la specificità e l'efficienza della somministrazione (Haghighi E. *et al.* 2024). Queste strategie hanno notevolmente migliorato la stabilità degli RNA terapeutici, contribuendo ai recenti successi clinici come i vaccini a mRNA contro SARS-CoV-2 e i farmaci siRNA approvati per diverse patologie.

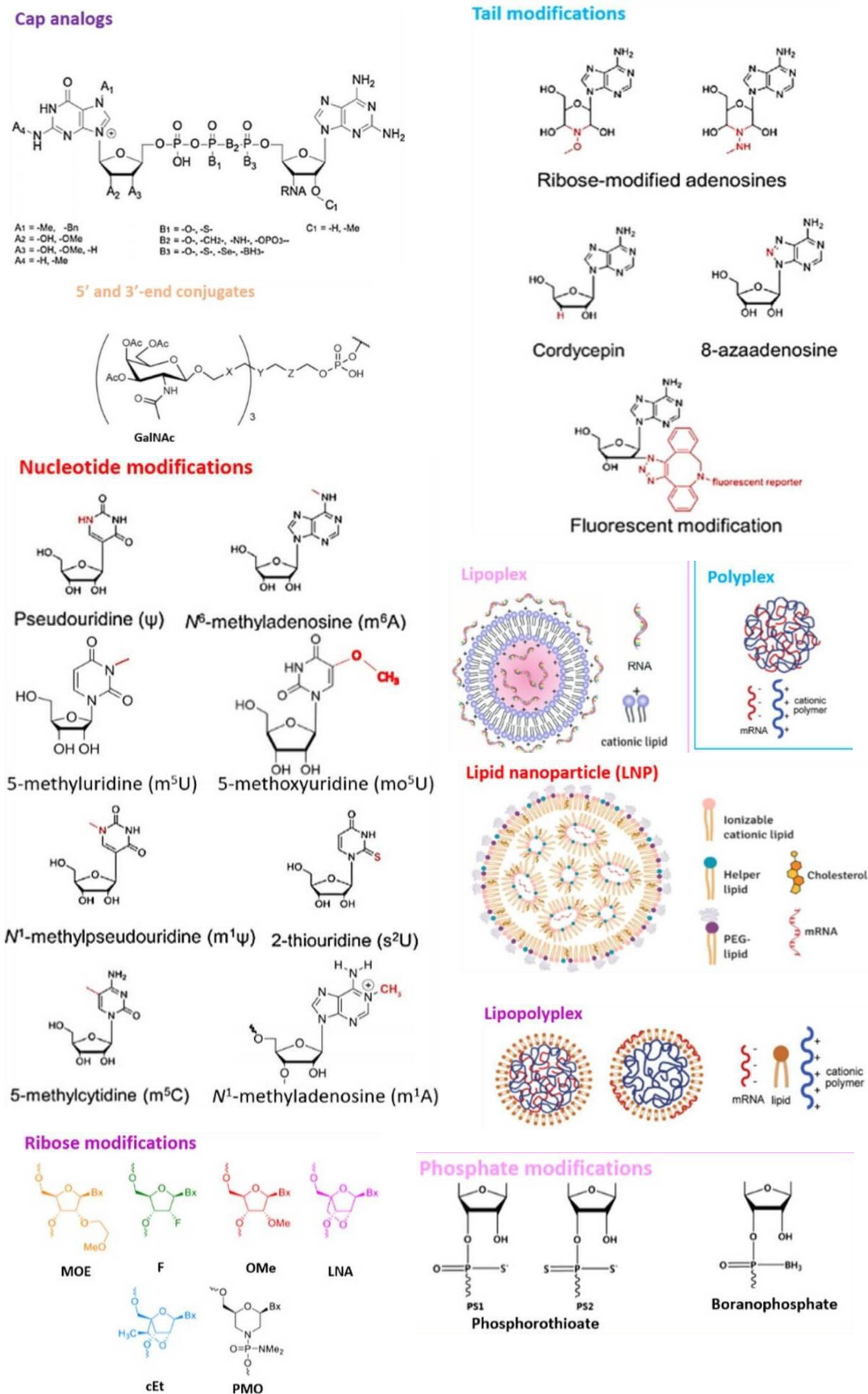


Fig. 1 Ostacoli nello sviluppo di terapie a base di RNA: modifiche chimiche che includono azioni alle estremità 5' e 3' (5'-capping, modifiche alla coda 3' e coniugazioni alle estremità 5' e 3'), modifiche nucleotidiche, sostituzioni dello zucchero ribosio in posizione 2'. Sistemi di rilascio di nanocarrier, tra cui nanoparticelle lipidiche (LNP), lipoplex, polyplex, lipopolyplex.

2.2 Barriere fisiologiche alla somministrazione

Clearance renale e sistema reticoloendoteliale (RES)

Una volta somministrati per via sistemica, gli RNA terapeutici devono affrontare diverse barriere fisiologiche che ne limitano la biodisponibilità. Tra queste si annoverano:

- **La filtrazione glomerulare:** le molecole di RNA di piccole dimensioni, come i siRNA e i miRNA vengono rimosse rapidamente dalla circolazione, riducendone l'emivita plasmatica;
- **Il sistema reticoloendoteliale (RES):** composto principalmente da macrofagi residenti nel fegato (cellule di Kupffer), nella milza e nei linfonodi, rappresenta un'altra importante barriera. Le cellule del RES possono riconoscere e fagocitare gli RNA nudi, o i sistemi di veicolazione, rimuovendoli dalla circolazione prima che possano raggiungere il tessuto bersaglio. Questo fenomeno è particolarmente rilevante per le piattaforme di veicolazione più grandi, come le nanoparticelle lipidiche, che possono essere rapidamente sequestrate dal fegato e dalla milza.

Barriere tissutali specifiche

L'RNA è una macromolecola idrofila recante una carica netta negativa dovuta alla presenza dei gruppi fosfato nel suo scheletro i quali creano una repulsione elettrostatica con la membrana cellulare anch'essa carica negativamente. Questa incompatibilità chimico-fisica rappresenta una barriera fondamentale per l'ingresso dell'RNA nelle cellule bersaglio.

Inoltre, le dimensioni delle molecole di RNA terapeutico, specialmente nel caso degli mRNA, limitano ulteriormente la loro capacità di attraversare le membrane biologiche, a differenza dei farmaci lipofili a basso peso molecolare, anche definiti *small molecules*, i quali diffondono dallo spazio extracellulare al citoplasma attraversando il doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare per diffusione passiva (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Queste caratteristiche rendono impossibile il passaggio delle membrane in assenza di meccanismi di trasporto attivo o di adeguati sistemi di veicolazione.

Oltre alle barriere generali, esistono barriere tissutali specifiche che possono limitare l'accesso degli RNA terapeutici a determinati organi o tessuti; questo problema è particolarmente rilevante in quei distretti caratterizzati dalla presenza di giunzioni strette tra le cellule.

Esempi possono essere rappresentati dalla:

- **Barriera emato-encefalica (BEE):** questa barriera altamente selettiva protegge il sistema nervoso centrale limitando il passaggio di molecole dal sangue al tessuto cerebrale. La BEE è caratterizzata da cellule endoteliali con giunzioni strette, una

membrana basale continua e processi astrocitari, che insieme creano una barriera quasi impenetrabile per la maggior parte delle macromolecole, inclusi gli RNA terapeutici;

- **Barriera epiteliale intestinale:** per la somministrazione orale, l'epitelio intestinale rappresenta una barriera significativa, con cellule epiteliali unite da giunzioni strette e uno strato di muco che limita l'assorbimento di macromolecole;
- **Matrice extracellulare:** nei tessuti solidi, la densa matrice extracellulare può limitare la diffusione degli RNA terapeutici o dei loro vettori, riducendo l'accesso alle cellule bersaglio. Questo è particolarmente rilevante per i tumori solidi, dove la matrice extracellulare e la pressione interstiziale elevata possono ostacolare la penetrazione dei farmaci.

Per superare queste barriere, sono state sviluppate diverse strategie, tra cui l'uso di ligandi di targeting per facilitare il trasporto attivo attraverso barriere specifiche, la modulazione temporanea della permeabilità delle barriere (ad esempio, mediante ultrasuoni focalizzati per la BEE) o l'uso di vie di somministrazione alternative che bypassano determinate barriere (Cheng Q. *et al.* 2018).

Cattura endosomiale

In presenza di sistemi di veicolazione appropriati, l'RNA può entrare nelle cellule principalmente attraverso diversi meccanismi di endocitosi, tra cui quella mediata da clatrina, da caveolina e la macropinocitosi. Le vescicole formatesi prendono la cosiddetta «via endocitica» che può portare alla degradazione lisosomiale del carico invece che al suo rilascio nel citoplasma (Chimica-on line).

La cattura endosomiale, infatti, rappresenta uno dei principali ostacoli all'efficacia degli RNA terapeutici. Dopo l'internalizzazione mediante endocitosi, l'RNA si trova confinato all'interno di vescicole separate dal citoplasma dove deve esercitare la sua funzione terapeutica. Gli endosomi precoci maturano progressivamente in endosomi tardivi e infine in lisosomi, dove il pH acido e la presenza di enzimi idrolitici portano alla degradazione del contenuto (Patel S. *et al.* 2019). Per essere efficace, l'RNA deve quindi sfuggire dall'endosoma prima della sua maturazione in lisosoma, un processo noto come «escape endosomiale». Questo rappresenta un punto critico per la veicolazione dell'RNA, con studi che suggeriscono che solo una piccola percentuale di materiale internalizzato riesce effettivamente a raggiungere il citoplasma.

Diverse strategie sono state sviluppate per migliorare l'escape endosomiale, tra cui:

- **Utilizzo di lipidi ionizzabili:** nei sistemi LNP, i lipidi ionizzabili possono cambiare la loro carica in risposta al pH acido dell'endosoma, interagendo con la membrana endosomiale e facilitando la sua destabilizzazione (Sago CD. *et al.* 2018);
- **Peptidi di fusione:** peptidi che cambiano conformazione a pH acido, interagendo e destabilizzando la membrana endosomiale (Paunovska K. *et al.* 2018);
- **Polimeri con capacità di effetto "proton sponge":** polimeri cationici come la polietilenimina (PEI) che tamponano il pH endosomiale, causando un afflusso di protoni e ioni cloruro che porta a un rigonfiamento osmotico e alla rottura dell'endosoma (Cheng Q. *et al.* 2021).

Nonostante questi espedienti, l'escape endosomiale rimane una limitazione significativa, e migliorare questo processo rappresenta un'area di intensa ricerca nel campo della veicolazione dell'RNA.

2.3 Immunogenicità

L'RNA esogeno può essere riconosciuto dal sistema immunitario innato come un potenziale pericolo associato a infezioni virali, portando all'attivazione di risposte infiammatorie che possono limitare l'efficacia terapeutica e causare effetti avversi. Questa risposta immunitaria può manifestarsi sia a livello sistemico che locale e può variare in intensità da lieve a potenzialmente letale in casi estremi (Miao L. *et al.* 2019). L'attivazione del sistema immunitario innato da parte dell'RNA può determinare la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-6, TNF- α e interferoni di tipo I che possono evocare sintomi simil-influenzali, febbre, e in casi gravi, la sindrome da rilascio di citochine. Inoltre, questa risposta immunitaria può accelerare la clearance dell'RNA terapeutico, riducendone l'efficacia (Kauffman KJ. *et al.* 2016).

2.4 Effetti off-target e conseguenze indesiderate

Oltre all'immunogenicità, gli RNA terapeutici possono provocare effetti off-target dovuti a interazioni non specifiche con sequenze non bersaglio. Questo è particolarmente rilevante per i siRNA e i miRNA, che possono potenzialmente silenziare geni non target con sequenze parzialmente complementari.

Gli effetti off-target possono manifestarsi in diversi modi:

- **Silenziamento di geni non bersaglio:** i siRNA possono riconoscere e silenziare mRNA con complementarità parziale, specialmente se la regione "seed" (nucleotidi 2-8) del siRNA è complementare alla 3'UTR dell'mRNA;

- **Saturazione della macchina endogena di RNAi:** alti livelli di siRNA esogeni possono saturare componenti implicati nei processi di RNAi endogena, come la proteina Argonauta 2, interferendo con il normale funzionamento dei miRNA endogeni;
- **Tossicità associata ai vettori:** i sistemi di veicolazione stessi possono causare tossicità, come nel caso dei lipidi cationici che possono interagire con membrane cellulari e proteine, portando a citotossicità.

Per limitare queste criticità, sono state adottate diverse strategie, tra cui:

- **Modifiche chimiche:** l'introduzione di modifiche chimiche specifiche può ridurre l'immunogenicità dell'RNA, come l'uso di nucleosidi modificati (pseudouridina, 5-metilcitidina) che mimano l'RNA endogeno;
- **Design ottimizzato delle sequenze:** algoritmi avanzati possono aiutare a progettare sequenze di siRNA con minima complementarità a geni non bersaglio, riducendo gli effetti off-target;
- **Sistemi di veicolazione biocompatibili:** lo sviluppo di sistemi di veicolazione con migliore biocompatibilità e minore tossicità intrinseca, come le LNP di nuova generazione con lipidi ionizzabili biodegradabili.

Nonostante queste strategie, la gestione dell'immunogenicità e degli effetti off-target rimangono aspetti estremamente importanti nello sviluppo di farmaci a base di RNA terapeutici e richiedono un'attenta valutazione durante le fasi precliniche e cliniche dello sviluppo.

3. VETTORI VIRALI E NON VIRALI

L'uso terapeutico degli acidi nucleici non può prescindere dall'impiego di specifici sistemi per la loro somministrazione, meglio definiti come sistemi di veicolazione o *delivery systems*. Un sistema di veicolazione ideale dovrebbe essere in grado di proteggere l'acido nucleico in ambiente biologico, consentire il raggiungimento del tessuto o delle cellule bersaglio, promuovere l'ingresso nella cellula rilasciando l'acido nucleico nel sito (nucleo o citoplasma) di azione. Il sistema di veicolazione dovrà inoltre essere sicuro, facile da produrre su larga scala, adatto ad acidi nucleici di dimensioni diverse, in grado di assicurare un effetto di lunga durata, funzionare su cellule diverse indipendentemente dallo loro stadio di crescita (quiescenti o in proliferazione). Tali sistemi possono essere suddivisi in due grandi famiglie: vettori virali e vettori non virali (De Rosa G. 2024 fivs.org).

3.1 Vettori virali

I vettori virali sono virus modificati, non patogeni e incapaci di replicarsi, in cui viene inserito il gene di interesse con gli elementi regolatori che ne consentono l'espressione. Questi vettori mantengono la capacità di entrare nelle cellule bersaglio attraverso meccanismi specifici di riconoscimento e internalizzazione, ma sono progettati per essere incapaci di replicarsi autonomamente. In tal modo si fruisce della capacità naturale dei virus di infettare le cellule e trasferire il loro materiale genetico al loro interno (De Rosa G. 2024 fivs.org).

I vettori virali offrono diversi vantaggi per la veicolazione genica, tra cui:

- **Alta efficienza di trasfezione:** i virus hanno evoluto meccanismi altamente efficienti per entrare nelle cellule e rilasciare il loro materiale genetico, risultando in tassi di trasfezione significativamente più alti rispetto a molti vettori non virali;
- **Specificità cellulare:** alcuni virus mostrano tropismo naturale per specifici tipi cellulari, che può essere sfruttato o modificato per indirizzare il vettore verso le cellule bersaglio desiderate;
- **Espressione a lungo termine:** alcuni vettori virali, come quelli basati su lentivirus o virus adeno-associati (AAV), possono integrare il loro genoma in quello della cellula ospite o persistere come episomi, permettendo un'espressione prolungata del transgene.

Tuttavia, l'uso di vettori virali presenta anche significative limitazioni, tra cui la potenziale immunogenicità, rischi di mutagenesi inserzionale, limitata capacità di carico e complessità di produzione su larga scala. Se da un lato i vettori virali hanno assicurato una elevata efficienza

di transfezione nelle cellule bersaglio, dall'altro hanno sempre rappresentato l'approccio più complesso, per la maggiore pericolosità sia per un potenziale rischio di riattivazione del virus che di immunogenicità (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Tra i vettori virali più utilizzati a tale scopo vi sono:

- **Vettori adenovirali:** gli adenovirus sono virus a DNA a doppio filamento, non integrativi, che possono infettare sia cellule in divisione che non in divisione. I vettori adenovirali sono stati ampiamente studiati per la terapia genica grazie alla loro efficiente capacità di trasfezione su vari tipi cellulari. Inoltre, tra i vettori virali, sicuramente sono tra quelli più usati per applicazioni in vivo, grazie alla capacità di ospitare filamenti di DNA di maggiori dimensioni e alla capacità di infettare le cellule trasferendo elevate quantità (trasfezione) di materiale genetico (De Rosa G. 2024 fivs.org). Presentano delle criticità dovute alla forte risposta immunitaria che limita la somministrazione ripetuta e al tropismo prevalente per il fegato dopo somministrazione sistemica. I vettori adenovirali sono stati utilizzati in numerosi studi clinici, principalmente per il trattamento del cancro e per la vaccinazione. Un esempio recente è il vaccino contro COVID-19 di Johnson & Johnson/Janssen, che utilizza un vettore adenovirale per esprimere la proteina spike di SARS-CoV-2;
- **Vettori adenoassociati (AAV):** i virus adeno-associati sono piccoli virus a DNA a singolo filamento, non patogeni, che richiedono un virus helper (tipicamente adenovirus) per la replicazione. I vettori AAV sono diventati sempre più popolari per la terapia genica grazie al loro profilo di sicurezza favorevole e alla capacità di mediare un'espressione a lungo termine del transgene. I virus adenoassociati, come gli adenovirus, sono tra i vettori virali più usati per applicazioni in vivo (De Rosa G. 2024 fivs.org). Sono caratterizzati da una bassa immunogenicità, da capacità di trasfezione su cellule non in divisione e di promuovere l'espressione a lungo termine del transgene (anni in alcuni tessuti);
- **Vettori lentivirali:** i lentivirus sono un sottogruppo di retrovirus che possono infettare sia cellule in divisione che non in divisione. I vettori lentivirali, spesso derivati dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), sono ampiamente utilizzati per la terapia genica ex vivo, in particolare per la modificazione di cellule staminali ematopoietiche. Possiedono capacità di trasfezione su cellule non in divisione, promuovono l'integrazione nel genoma dell'ospite permettendo un'espressione stabile e a lungo termine, hanno una bassa immunogenicità intrinseca. Presentano, tuttavia, degli elementi di criticità come il rischio di mutagenesi inserzionale, complessità nella

produzione e nel controllo di qualità, limitata efficacia nella somministrazione sistemica in vivo e infine destano preoccupazioni sulla sicurezza legate all'origine da HIV.

I vettori lentivirali sono stati utilizzati con successo in diverse terapie geniche approvate, come Kymriah e Yescarta per il trattamento di leucemie e linfomi, dove vengono utilizzati per modificare geneticamente le cellule T del paziente ex vivo (AIFA).

La ricerca scientifica ha compiuto notevoli progressi per ottenere vettori virali sempre più sicuri, al punto che oggi abbiamo medicinali approvati basati su vettori virali e molti altri in fase di sperimentazione clinica. I primi successi si sono registrati a partire dal 2016 con l'approvazione in Europa di Strimvelis, per il trattamento della immunodeficienza severa combinata da deficit di adenosina deaminasi, una patologia genetica molto rara. Il medicinale prevede un vettore retrovirale per il trattamento ex-vivo di cellule successivamente somministrate al paziente mediante infusione. Nel 2017 è stato approvato negli USA il primo prodotto, con il nome commerciale di Luxturna, vettore adenoassociato, per terapia genica nel trattamento di una forma di distrofia retinica ereditaria. Sono seguiti a stretto giro altri prodotti nel 2019 (Zolgensma) e nel 2022 (Hemgenix, Zynteglo e Skysona).

A fronte della indubbia efficacia di tali prodotti, l'impiego di vettori virali, unitamente al fatto che tali trattamenti sono quasi sempre destinati a patologie rare, ha reso il costo di tali terapie proibitivo (De Rosa G. 2024 fivs.org).

3.2 Vettori non virali

Il settore dei vettori non virali a base lipidica è stato rivoluzionato dall'introduzione di lipidi ionizzabili utilizzati nella preparazione di vettori oggi noti con il termine di nanoparticelle lipidiche. Tali vettori, caratterizzati da una buona efficienza di transfezione, ma soprattutto da una sufficiente stabilità fisica nei fluidi biologici, sono stati rapidamente testati prima su primati non umani e poi in studi clinici (De Rosa G. 2024 fivs.org).

I sistemi di veicolazione non virali offrono numerosi vantaggi rispetto ai vettori virali, che li rendono particolarmente adatti per la veicolazione di RNA terapeutici:

- **Sicurezza:** i vettori non virali generalmente presentano un profilo di sicurezza più favorevole, con un minor rischio di immunogenicità severa, patogenicità residua o mutagenesi inserzionale (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Versatilità:** possono essere progettati e modificati più facilmente per adattarsi a specifiche applicazioni, molecole cargo e cellule bersaglio;

- **Capacità di carico:** non hanno limitazioni intrinseche sulla dimensione del materiale genetico che possono veicolare, permettendo il trasporto di RNA di grandi dimensioni come gli mRNA;
- **Produzione e scalabilità:** molti vettori non virali possono essere prodotti mediante processi chimici o fisici relativamente semplici, facilitando la produzione su larga scala e riducendo i costi. Ciò ha spinto i ricercatori a studiare strategie di veicolazione non virale che risultano molto più sicure ed economiche dei vettori virali (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Stabilità e conservazione:** alcuni sistemi non virali offrono maggiore stabilità durante la conservazione rispetto ai vettori virali, semplificando la logistica e la distribuzione;
- **Somministrazione ripetuta:** la minore immunogenicità permette somministrazioni ripetute senza significativa perdita di efficacia, importante per terapie croniche.

Classificazione dei vettori non virali

I vettori non virali per la veicolazione di acidi nucleici possono essere classificati in diverse categorie in base alla loro composizione e struttura.

Vettori lipidici

I vettori basati su lipidi includono:

- **Liposomi:** vescicole sferiche composte da un doppio strato lipidico che circonda un core acquoso. Possono incapsulare acidi nucleici nel loro interno acquoso o incorporarli nel doppio strato. I vettori non virali più studiati sono sicuramente quelli di natura lipidica, in particolare i liposomi cationici (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Nanoparticelle lipidiche (LNP):** strutture più complesse composte da lipidi ionizzabili, lipidi helper, colesterolo e lipidi PEGhilati, che formano particelle con un core lipidico in cui l'RNA è complessato con lipidi ionizzabili;
- **Complessi lipidici cationici:** formati dall'interazione elettrostatica tra lipidi cationici e acidi nucleici anionici, creando complessi che facilitano l'internalizzazione cellulare. I liposomi cationici possono, ad esempio, legarsi agli acidi nucleici formando complessi (lipoplexes) in grado di entrare nelle cellule per endocitosi e rilasciare l'acido nucleico nel citoplasma (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Vettori polimerici

I vettori basati su polimeri includono:

- **Poliplessi:** complessi formati tra polimeri cationici (come polietilenimina, PEI, o poli-L-lisina, PLL) e acidi nucleici anionici attraverso interazioni elettrostatiche. Questi sono stati ampiamente studiati per la veicolazione di acidi nucleici con lo scopo di trovare sistemi sempre più efficienti, ma allo stesso tempo molto più sicuri ed economici dei vettori virali (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Dendrimeri:** polimeri altamente ramificati con struttura tridimensionale ben definita, che possono legare acidi nucleici sulla loro superficie o incapsularli all'interno;
- **Nanoparticelle polimeriche:** particelle solide composte da polimeri biodegradabili come acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) o chitosano, che possono incapsulare o adsorbire acidi nucleici.

Vettori inorganici

I vettori basati su materiali inorganici includono nanoparticelle d'oro, nanoparticelle di silice, nanotubi di carbonio.

Tra queste diverse categorie, le nanoparticelle lipidiche (LNP) emergono come la sola piattaforma approvata per la veicolazione di RNA terapeutici (Han J. *et al.* 2023). Le LNP incapsulano efficacemente le molecole di RNA e le trasportano alle cellule bersaglio. Offrono un potenziale considerevole per la veicolazione degli acidi nucleici proteggendoli dalle nucleasi, evitando il sistema fagocitario mononucleare, mostrando bassa immunogenicità e tossicità, facilitando la penetrazione cellulare, prevenendo la degradazione endolisosomica, minimizzando le interazioni non specifiche e consentendo una facile sintesi e ingegnerizzazione (Hou X. *et al.* 2021). Inoltre, la formulazione delle LNP può essere regolata per migliorare la stabilità, l'efficacia di trasfezione e il targeting extraepatico (Nakamura T. *et al.* 2022, Xu X. *et al.* 2023). Negli ultimi anni, le LNP sono state impiegate con successo per applicazioni e sperimentazioni cliniche di vari farmaci a RNA, come siRNA, mRNA e CRISPR-Cas9, per il trattamento di malattie come il cancro, le infezioni e le malattie genetiche (Sahin U. *et al.* 2020). Nel 2017 e nel 2018 il primo prodotto a base di RNA è stato approvato rispettivamente in Usa e in Europa. Tale prodotto, noto con il nome commerciale di ONPATTRO (Patisiran), prevede l'impiego terapeutico di un siRNA attivo nel trattamento della amiloidosi ereditaria mediata da transtiretina, ma veicolato mediante nanoparticelle lipidiche. Tale prodotto, somministrato per via endovenosa, è in grado di accumularsi nelle cellule epatiche che rappresentano il vero

bersaglio terapeutico (De Rosa G. 2024 fivs.org). In seguito a questo successo, ma soprattutto dopo la pandemia da COVID-19, nel 2021 sono stati approvati i primi vaccini a base di mRNA, per evocare risposte immunitarie verso la proteina spike della SARS-CoV-2, veicolati mediante nanoparticelle lipidiche, noti con i nomi commerciali di Comirnaty (BNT162b2 Pfizer-BioNTech) e Spikevax (mRNA-1273 Moderna) (De Rosa G. 2024 fivs.org). Un altro terapeutico CRISPR-Cas/9, chiamato NTLA-2001, anch'esso veicolato da LNP è stato introdotto come primo farmaco in vivo ad essere somministrato per via sistemica per il trattamento dell'amiloidosi da transtiretina ed è attualmente in fase di ulteriore sperimentazione clinica (Haghighi E *et al.* 2024, Osservatorio Terapie Avanzate 2024).

Le formulazioni a base di vettori di tipo non virale offrono un minor rischio di immunogenicità, maggiore sicurezza d'uso e soprattutto costi di produzione drasticamente inferiori, rispetto a quelle che impiegano vettori virali. Ciò ha spinto gruppi di ricerca, e soprattutto molte aziende, ad investire sui vettori lipidici non virali soprattutto grazie alle tecniche di produzione relativamente semplici ed economiche (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Sfide e limitazioni dei vettori non virali

Nonostante i significativi progressi, i vettori non virali continuano ad affrontare sfide che ne limitano l'efficacia clinica, tra cui:

- **Efficienza di trasfezione:** storicamente, i vettori non virali hanno mostrato un'efficienza di trasfezione inferiore rispetto ai vettori virali, particolarmente in vivo. Sebbene le formulazioni più recenti abbiano migliorato significativamente questo aspetto, l'ottimizzazione dell'efficienza di trasfezione rimane un obiettivo chiave della ricerca (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Stabilità in ambiente biologico:** i vettori non virali possono essere soggetti a degradazione o aggregazione in ambiente biologico, particolarmente nel sangue dove l'interazione con proteine plasmatiche può alterarne le proprietà chimico-fisiche e la biodistribuzione;
- **Targeting specifico:** dirigere selettivamente i vettori non virali verso specifici tipi cellulari o tessuti rimane una sfida significativa. Sebbene siano state sviluppate diverse strategie di targeting attivo, la loro efficacia in vivo è spesso limitata da barriere biologiche e dalla complessità dell'ambiente fisiologico;
- **Risposta immunitaria:** sebbene siano generalmente meno immunogenici dei vettori virali, i vettori non virali possono comunque indurre risposte immunitarie,

particolarmente quando somministrati ripetutamente. Questo può limitare l'efficacia di trattamenti che richiedono somministrazioni multiple;

- **Variabilità e riproducibilità:** la preparazione di vettori non virali può essere soggetta a variabilità, con piccole differenze nei processi di produzione, che possono influenzare significativamente le proprietà chimico-fisiche e l'efficacia biologica. Tali variabili sperimentali hanno rappresentato un ostacolo significativo (De Rosa G. 2024 fivs.org);
- **Tossicità:** alcuni componenti dei vettori non virali, particolarmente lipidi cationici e polimeri cationici ad alto peso molecolare, possono esercitare effetti citotossici, limitando le dosi che possono essere somministrate in sicurezza (Feldman RA. *et al.* 2019).

Nonostante queste criticità, i recenti successi clinici, particolarmente nel campo dei vaccini a mRNA, e le innovazioni tecnologiche evidenziano l'enorme potenziale dei vettori non virali nell'offrire piattaforme efficaci per la veicolazione di RNA terapeutici rivoluzionando, in tal modo, il trattamento di numerose malattie attualmente considerate intrattabili.

4. NANOPARTICELLE LIPIDICHE (LNP)

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) rappresentano attualmente la piattaforma di veicolazione non virale più avanzata e clinicamente validata per gli RNA terapeutici. Il loro successo deriva da una combinazione unica di proprietà, tra cui l'alta efficienza di incapsulamento dell'RNA, protezione dalla degradazione, capacità di facilitare l'uptake cellulare e l'escape endosomiale, un profilo di sicurezza generalmente favorevole grazie alla loro biocompatibilità e facilità di produzione su larga scala (Samaridou E. *et al.* 2020).

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono sistemi di veicolazione su scala nanometrica (tipicamente ~ 150nm di diametro) composti principalmente da lipidi, progettati per incapsulare e proteggere molecole terapeutiche idrofile, in particolare acidi nucleici come mRNA e siRNA, e facilitarne la consegna alle cellule bersaglio (Kulkarni JA. *et al.* 2018). A differenza dei liposomi convenzionali, che possiedono una struttura a doppio strato lipidico che racchiude un core acquoso, le LNP moderne presentano una struttura più complessa e meno definita, spesso descritta come un core lipidico solido o semi-solido in cui l'RNA è complessato con lipidi ionizzabili, circondato da uno strato esterno stabilizzante. Questa struttura unica conferisce alle LNP proprietà distinte rispetto ai liposomi, tra cui maggiore efficienza di incapsulamento per l'RNA e meccanismi di rilascio differenti.

In genere, le LNP sono costituite da ICL (lipidi cationici ionizzabili), lipidi helper (ausiliari), colesterolo e lipidi PEGhilati, ciascuno dei quali svolge un ruolo cruciale nella loro funzionalità (Fig. 2).

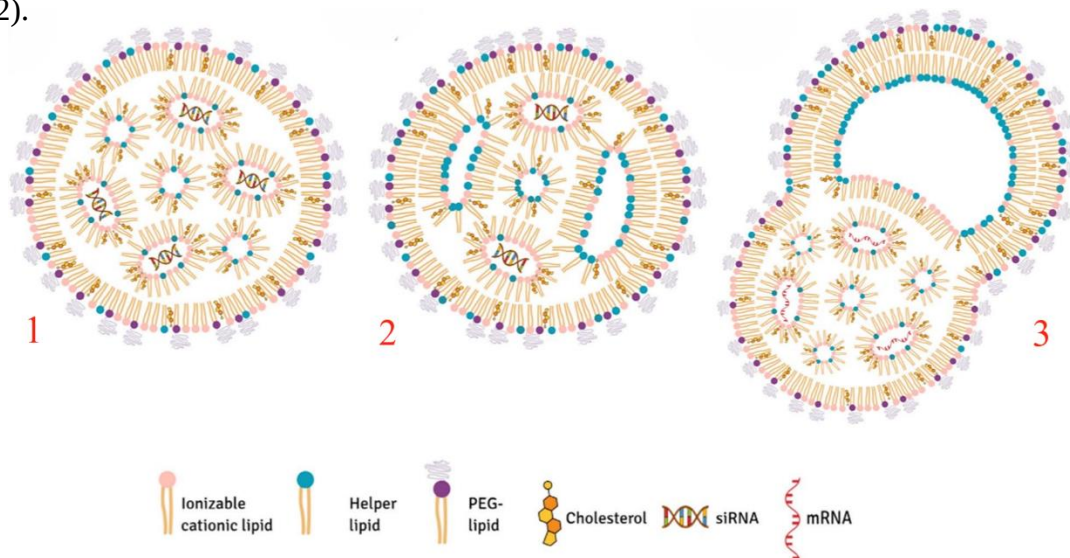


Fig.2 Struttura della nanoparticella lipidica (LNP) che incapsula acidi nucleici. Le LNP presentano un nucleo compatto, ricco di elettroni, in cui il siRNA è aggroviato con lipidi carichi positivamente che formano strutture a micelle invertite, racchiuse da colesterolo e lipidi ausiliari (Helper); 2 l'assemblaggio multilamellare presenta un bilayer esterno e un nucleo interno denso; configurazione 3 "Bleb". Il lipide cationico interagisce prevalentemente con l'mRNA, creando un nucleo solido, mentre il lipide helper è principalmente distribuito in un bilayer "bleb".

I rapporti molari di questi componenti lipidici variano tipicamente come segue: 40-50 % di ICL, 10-12 % di lipidi helper, 38-45 % di colesterolo e 1-2 % di lipidi PEGhilati. Il rapporto tra lipidi ed RNA è espresso dal rapporto N:P, che indica la proporzione tra gli atomi di azoto degli ICL ed atomi di fosforo presenti negli RNA.

Di seguito sono riportati ulteriori dettagli relativi ai componenti delle LNP.

I **lipidi ionizzabili cationici (ICL)** rappresentano la componente fondamentale delle LNP moderne, responsabili della complessazione dell'RNA e della promozione dell'escape endosomiale. Questi lipidi sono caratterizzati dalla presenza di:

- **Una testa polare contenente un gruppo amminico terziario** il quale, per avere un'attività ottimale in vivo, deve possedere un pKa compreso nell'intervallo 6.2-6.5 permettendo al lipide di essere prevalentemente neutro a pH fisiologico e di diventare cationico a pH acido (< 6.0);
- **Una o più code idrofobiche** (catene alchiliche o alcheniliche) che conferiscono proprietà anfifiliche al lipide e ne influenzano l'impaccamento nella struttura della LNP;
- **Un linker** che collega il gruppo amminico alla coda lipidica la cui natura è fondamentale e può influenzare l'efficienza di trasfezione, la stabilità e la biodegradabilità (Maier MA. *et al.* 2013). È rappresentato da un legame estereo, etero, ammidico o altro gruppo che connette la testa polare alle code idrofobiche la cui lunghezza e spaziatura influenzano l'efficienza di trasfezione (Ponti F. *et al.* 2020).

La struttura chimica, in particolare la testa amminica, influisce significativamente sull'incapsulamento dell'mRNA e sull'efficienza di rilascio (Zhang Y. *et al.* 2021). La flessibilità della carica è essenziale durante la preparazione delle LNP, che mantengono una carica superficiale neutra a pH fisiologico per prevenire le risposte immunitarie, mentre diventano cariche positivamente in ambiente endosomiale (pH 5.5-6) per la fusione della membrana e l'efficace rilascio citoplasmatico (Eygeris Y. *et al.* 2022). Nello specifico la carica positiva acquisita facilita l'interazione con i lipidi anionici della membrana endosomiale (come il fostatidilserina) portando alla formazione di coppie ioniche che determinano la destabilizzazione della membrana. Tale processo promuove la fusione tra la LNP e la membrana endosomiale o la formazione di pori permettendo il rilascio dell'RNA nel citoplasma.

Le caratteristiche delle code lipidiche, come la saturazione e l'insaturazione, la lunghezza, il livello di sostituzione e la struttura, influenzano l'efficienza di trasfezione (Buck J. *et al.* 2019). La struttura della coda lipidica influisce, inoltre, sull'internalizzazione delle particelle, con alcuni lipidi capaci di promuovere una penetrazione cellulare ottimale (Heyes J. *et al.* 2005) come ad esempio accade per l'endocitosi mediata da recettori (ApoE che si lega ai recettori

LDL). Esaminando i vari gradi di insaturazione delle code lipidiche, le catene linoleiche, offrono un'ottimale internalizzazione delle particelle e rilascio endosomiale (Heyes J. *et al.* 2005). I recenti progressi hanno portato alla creazione di una nuova classe di ICL per un'efficiente veicolazione dell'mRNA, tra cui SM-102, L319, ALC-0315 e Lipid 5 (Fig. 3A) (Witzigmann D. *et al.* 2020, Schoenmaker L. *et al.* 2021). SM-102 e ALC-0315 sono gli ICL utilizzati nei vaccini Moderna Spikevax e BioNTech Pfizer Comirnaty COVID-19 (Witzigmann D. *et al.* 2020, Schoenmaker L. *et al.* 2021). Sono stati identificati nuovi ICL per un rilascio mirato a cellule specifiche e una migliore efficienza di rilascio dell'mRNA (Fig. 3). Ad esempio A6, un lipide ionizzabile caratterizzato dalla presenza di legami alchilici, è impiegato per veicolare l'mRNA dell'eritropoietina umana agli epatociti (Miao L. *et al.* 2020). Un altro esempio è rappresentato dalle LNP sensibili ai ROS contenenti BAmPTK-12 le quali hanno mostrato un rilascio mirato di mRNA con aumento dell'espressione di proteine nelle cellule tumorali (Cai W. *et al.* 2022).

I **lipidi Helper** tipicamente fosfolipidi saturi a catena lunga come DSPC (1,2-distearoil-*sn*-glicerolo-3-fosfocolina) o DOPE (1,2-di-(9Z-octadecenoil)-*sn*-glicerolo-3-fosfoetanolamina), costituiscono circa il 10-20 % della formulazione delle LNP. Svolgono ruoli strutturali importanti, tra cui:

- **Stabilizzazione della LNP:** interagiscono con gli altri componenti lipidici, contribuendo a formare una struttura stabile;
- **Modulazione della fluidità:** la natura di questi lipidi contribuisce alla rigidità della LNP a temperatura corporea, influenzando la stabilità e il rilascio del contenuto;
- **Facilitazione della fusione:** possono partecipare ai processi di fusione con le membrane endosomiali, sebbene il loro ruolo esatto sia ancora oggetto di studio;
- **Miglioramento dell'incapsulamento:** la loro presenza può influenzare l'organizzazione dei lipidi durante la formulazione, migliorando l'efficienza di incapsulamento dell'RNA.

La scelta del fosfolipide specifico può influenzare le proprietà finali della LNP come la stabilità e l'efficienza di trasfezione. Il DSPC, ad esempio, forma bilayer stabili, che contribuiscono alla stabilità e alla rigidità delle LNP, mentre il DOPE, con caratteristiche fusogeniche, promuove una migliore fusione delle LNP con le membrane endosomiali, favorendo così il rilascio dell'RNA (Fig. 3) (Cheng X *et al.* 2016). Per incapsulare efficacemente i siRNA all'interno delle LNP, è stato determinato che è necessario ~ il 30-40 mol % di lipidi helper, fornendo ulteriori informazioni sul ruolo di queste molecole (Kulkarni JA *et al.* 2019). I lipidi helper operano come sistema di spaziatura tra i lipidi ionizzabili e studi approfonditi sulle diverse

proprietà (neutre, cationiche e anioniche) hanno dimostrato che i cambiamenti nella chimica e nella concentrazione di questi composti influenzano la carica superficiale delle nanoparticelle, influenzando sulla distribuzione e l'efficacia in tessuti specifici (LoPresti ST. *et al.* 2022).

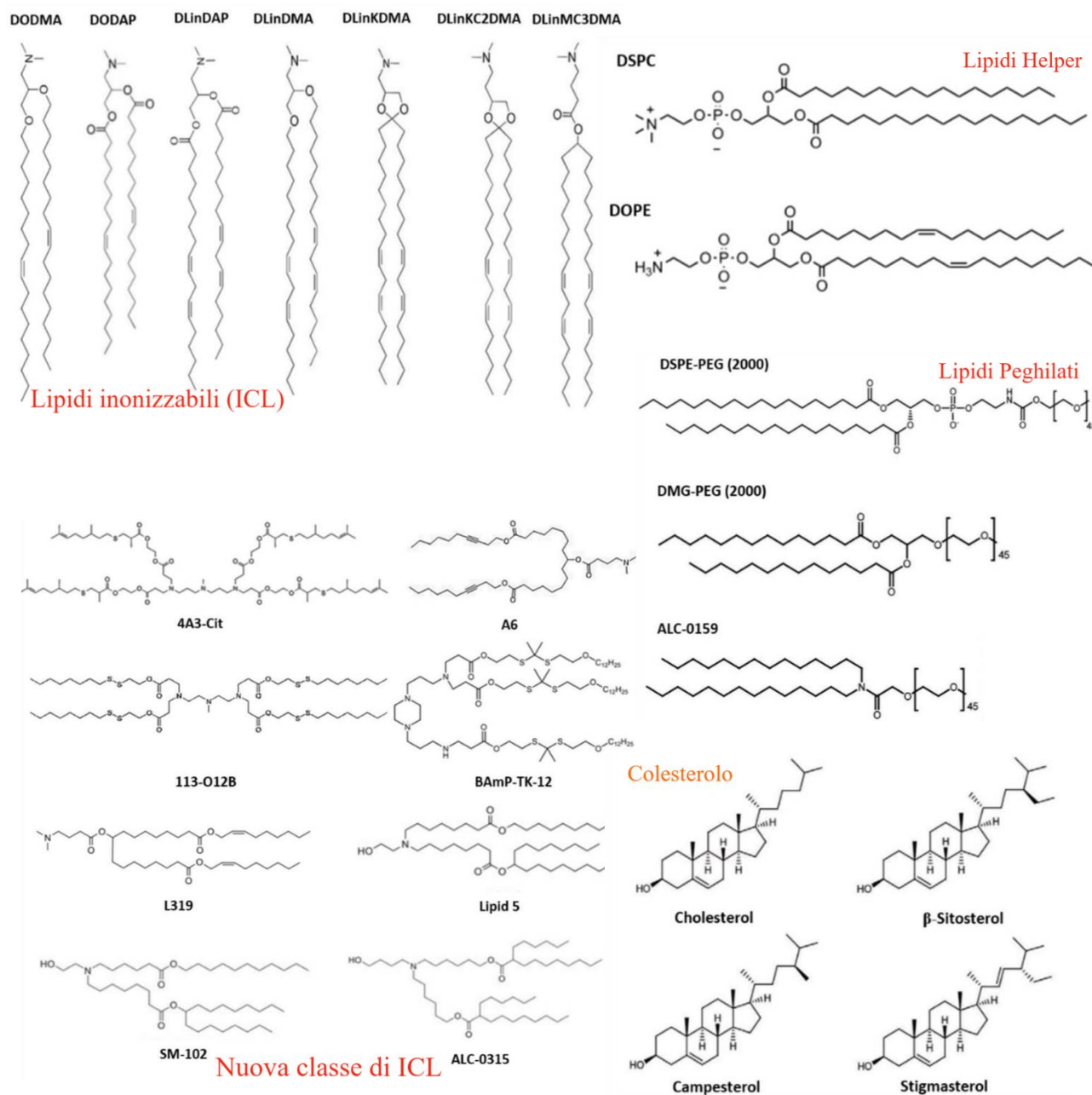


FIG.3 Composizioni chimiche delle nanoparticelle lipidiche (LNPs): lipidi cationici ionizzabili (ICL); lipidi helper; colesterolo e suoi derivati; lipidi PEGhilati.

Un altro componente è rappresentato dal **colesterolo** molecola essenziale delle membrane biologiche che svolge ruoli critici anche nelle LNP, dove costituisce circa il 30-40 % dei lipidi totali. Il colesterolo stabilizza le LNP intercalandosi tra le catene idrofobiche degli altri lipidi dove riduce la permeabilità, aumenta la stabilità e protegge dalle interazioni con le proteine del siero (Anindita J. *et al.* 2024). Esercita un'azione di modulazione della fluidità dove aumenta

la rigidità delle LNP a temperature elevate e la fluidità a basse temperature contribuendo alla stabilità strutturale in diverse condizioni. Il ruolo del colesterolo nei sistemi di rilascio dell'RNA non è del tutto chiaro. Tuttavia, le particelle che ne sono prive possono estrarre il colesterolo dalle lipoproteine dalla circolazione sanguigna, causandone potenzialmente la destabilizzazione. Il colesterolo migliora la veicolazione intracellulare promuovendo la fusione con le membrane cellulari ed endosomiali, soprattutto se combinato con lipidi insaturi (Tenchov BG. *et al.* 2006). Anche le dimensioni delle LNP sono influenzate dal contenuto di colesterolo, con una riduzione delle dimensioni delle particelle all'aumentare dei livelli di colesterolo nell'intervallo 10-60 mol% (Roces CB. *et al.* 2020). Il colesterolo è una molecola interscambiabile che può accumularsi all'interno delle LNP durante la circolazione, riducendo significativamente le proteine legate alla superficie e aumentando l'emivita in circolazione (Semple SC. *et al.* 1996). È fondamentale per l'incapsulamento degli acidi nucleici: in particolare, è necessario almeno il 40 mol% di colesterolo per ottenere un incapsulamento quasi completo del siRNA (Hald Albertsen C. *et al.* 2022). Per i loro effetti sull'efficacia della trasfezione cellulare e la formulazione di LNP, sono stati studiati diversi tipi di colesterolo (Fig. 3). Ad esempio, l'incorporazione di colesterolo 20 α -OH può reindirizzare i sistemi mRNA-LNP dagli epatociti alle cellule endoteliali epatiche e alle cellule di Kupffer, alterando l'affinità di superficie delle LNP per distinti sottotipi di proteine apolipoidi o recettori scavenger (Paunovska K *et al.* 2019). Si è scoperto, poi, che l'uso del β -sitosterolo, al posto del colesterolo nelle formulazioni delle LNP, può migliorare il trasferimento di mRNA sulle cellule immunitarie e aumentare la proliferazione delle cellule T e la produzione di IL-2 (Zeng Y. *et al.* 2022). I derivati del colesterolo, con code alchiliche C24, determinano la formazione di diverse strutture morfologiche, con modifiche come i gruppi metilici ed etilici che aumentano le strutture multilamellari e i doppi legami che promuovono la compartimentazione dei lipidi, migliorando l'efficienza di rilascio del contenuto (Eygeris Y. *et al.* 2020). Infine il colesterolo facilita l'uptake cellulare come nel caso dell'interazione con proteine sieriche quali l'ApoE che mediano l'uptake epatico attraverso i recettori delle LDL.

L'ultimo componente è rappresentato dai **lipidi PEGhilati** che sono coniugati lipidici caratterizzati dalla presenza di una catena di polietilenglicole (PEG) legata alla testa polare di una catena idrofobica. Il polietilenglicole è un polimero biocompatibile con formula generale $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ dove "n" determina la lunghezza della catena: tale modifica è chiamata peghilazione. Costituiscono una piccola frazione (1-5%) delle LNP, ma svolgono ruoli fondamentali, tra i quali:

- **Controllo dimensionale durante la formulazione:** la presenza di PEG sulla superficie delle LNP nascenti limita la loro crescita e fusione durante il processo di auto-assemblaggio, permettendo di ottenere particelle di dimensioni controllate e uniformi;
- **Stabilizzazione sterica:** il PEG forma uno strato idratato sulla superficie (attenuazione spaziale idrofila) della LNP, prevenendo l'aggregazione delle particelle e aumentando la stabilità colloidale;
- **Prolungamento dell'emivita circolatoria ("effetto stealth"):** lo strato di PEG riduce l'adsorbimento di proteine sieriche (opsonizzazione) e il riconoscimento da parte del sistema reticoloendoteliale evitando una rapida eliminazione e prolungando il tempo di permanenza delle LNP in circolo dopo somministrazione sistemica (Samaridou E. *et al.* 2020).

Tuttavia, la presenza di PEG può anche ostacolare l'interazione delle LNP con le cellule bersaglio e l'escape endosomiale, il cosiddetto "PEG dilemma" (Fang Y. *et al.* 2017), rendendo necessario trovare un equilibrio per una efficace penetrazione cellulare (Hafez I. *et al.* 2001). Per bilanciare questi effetti, vengono spesso utilizzati lipidi peghilati con catene idrofobiche relativamente corte o legami labili, che permettono al PEG di dissociarsi gradualmente dalla superficie della LNP dopo la somministrazione, esponendo i componenti sottostanti e facilitando l'uptake cellulare. Nello specifico PEG molto corti (< 1 kDa) non hanno un tempo di circolazione efficiente, mentre la penetrazione cellulare è ridotta da catene PEG molto lunghe (> 5 kDa) o da frazioni molari elevate (> 15 mol%). In genere, per la formulazione delle LNP si impiegano molecole di PEG con peso molecolare pari 2 kDa in un rapporto inferiore al 5%, preferibilmente 0,5 mol% (Ge X. *et al.* 2021). È stato riscontrato che le formulazioni senza lipidi PEGhilati hanno dato luogo a LNP instabili e polidisperse con un diametro superiore a 200 nm (Lokugamage MP. *et al.* 2021). Aumentando il rapporto molare dei lipidi PEGhilati si ottengono LNP significativamente più piccole, indipendentemente dagli altri componenti lipidici. I lipidi PEGhilati influenzano l'efficienza di incapsulamento degli acidi nucleici, la distribuzione in vivo, l'efficienza di trasferimento e la risposta immunitaria. Queste caratteristiche sono legate al rapporto molare dei lipidi PEGhilati, alla struttura e alla lunghezza della catena PEG e della coda lipidica (Hald Albertsen C. *et al.* 2022). I lipidi PEGhilati diffondibili contribuiscono alla stabilità delle particelle e facilitano il trasporto intracellulare (Logan A *et al.* 2024, Verbeke R. *et al.* 2021). Alcuni esempi possono essere rappresentati dal PEG-DMPE e il PEG-DMG, con catena acilica a 14 atomi di carbonio, i quali si dissociano rapidamente dalle LNP durante la circolazione, mentre il PEGDSPE e il PEG-DSG, con catena acilica a 18 atomi di carbonio, rimangono associati prolungando la loro emivita ad alte

concentrazioni (Chen S. *et al.* 2016). Il vaccino COVID-19 di Moderna contiene l'1,5% di PEG2000-DMG, mentre il vaccino di BioNTech-Pfizer contiene l'1,6% di ALC-0159 (Fig. 3).

4.1 Metodiche di preparazione delle LNP

La preparazione di LNP efficaci richiede metodi che permettano un controllo preciso sulla composizione, dimensione, omogeneità ed efficienza di incapsulamento. Le tecniche moderne si basano principalmente sulla miscelazione rapida di soluzioni lipidiche e acquose. La formazione delle LNP è un processo di auto-assemblaggio guidato dalle proprietà anfifiliche dei lipidi e dalle interazioni elettrostatiche con l'RNA. Quando una soluzione lipidica in solvente organico (tipicamente etanolo) viene rapidamente miscelata con una soluzione acquosa tamponata a pH acido contenente l'RNA, si verificano diversi eventi:

- **Aumento della polarità:** la rapida diluizione dell'etanolo aumenta la polarità del solvente, riducendo la solubilità dei lipidi idrofobici;
- **Protonazione dei lipidi ionizzabili:** a pH acido (~ 4), i gruppi amminici dei lipidi ionizzabili si protonano, acquisendo una carica positiva;
- **Interazione elettrostatica:** i lipidi ionizzabili cationici interagiscono con l'RNA polianionico;
- **Precipitazione e nucleazione:** i lipidi precipitano formando nuclei iniziali che incorporano l'RNA;
- **Crescita e stabilizzazione:** i nuclei crescono attraverso l'aggiunta di ulteriori lipidi fino a raggiungere una dimensione stabile, limitata dalla presenza dei lipidi peghilati che si accumulano sulla superficie.

La velocità di miscelazione gioca un ruolo cruciale unitamente alla cinetica di questi processi che è fondamentale per determinare le proprietà finali delle LNP.

La produzione delle LNP implica l'interazione orchestrata di diversi derivati lipidici, cruciale per ottimizzare il rilascio di RNA. L'mRNA anionico inizia l'aggregazione con i lipidi cationici, formando LNP attraverso forze di van der Waals. In un tampone acido, ad esempio pH 4, gli ICL in etanolo interagiscono con l'RNA carico negativamente, formando micelle invertite. La successiva diffusione di etanolo nella fase acquosa fa precipitare i lipidi, dando luogo a interazioni idrofobiche (Seo H. *et al.* 2022). Il meccanismo dettagliato suggerisce la migrazione degli ICL non legati nei nuclei delle LNP, formando potenzialmente strutture multilamellari che ricordano la forma di una «cipolla» o esagonali invertite (H_{II}) (Eygeris Y. *et al.* 2020). Una miscelazione rapida e omogenea dei lipidi solubilizzati in etanolo con un tampone acquoso contenente RNA disciolto è essenziale per la generazione coerente delle particelle. Per la sintesi

delle LNP sono stati impiegati diversi metodi convenzionali di miscelazione, tra cui l'idratazione a film sottile, la diffusione di solventi, l'estrusione attraverso pori, l'ultrasonificazione, l'emulsione per fusione, l'iniezione di solventi e la nanoprecipitazione in massa; tuttavia, gli approcci convenzionali possono dare risultati incoerenti (Fig. 4). Questi metodi per la sintesi delle LNP presentano diversi svantaggi, come la scarsa riproducibilità dovuta a variazioni nel processo di sintesi; la necessità di un'elevata quantità di tensioattivo, che può influire sulla stabilità e sulla funzionalità delle LNP; il controllo limitato su parametri critici come la dimensione delle particelle, il PDI (indice di polidispersibilità) e l'EE (efficienza di incapsulamento); la limitata conservabilità delle LNP a causa della degradazione chimica dell'mRNA e delle impurità nella soluzione. Alcuni metodi tradizionali richiedono condizioni difficili che possono avere un impatto negativo sull'integrità dell'mRNA incapsulato o di altri agenti terapeutici. Questi svantaggi evidenziano la necessità di tecniche di preparazione delle LNP migliori e più controllate per garantire una somministrazione coerente ed efficace degli agenti terapeutici (Mehta M. *et al.* 2023, Carvalho BG. *et al.* 2022). Sebbene siano stati proposti metodi post trattamento come l'estrusione della membrana e l'ultrasonificazione per l'omogeneizzazione delle LNP, rimangono dei problemi. La stabilità del carico e la deformazione del vettore durante questi processi sono ancora irrisolti (Pattni BS. *et al.* 2015). La tecnica microfluidica offre un metodo più stabile e riproducibile per creare formulazioni a base di LNP. Questa tecnica offre una sintonizzazione precisa, un breve tempo di miscelazione, un basso consumo di campioni, una distribuzione monodispersa delle dimensioni delle particelle, la riproducibilità e la possibilità di scalare la produzione. Gli aspetti chiave della microfluidica includono l'elevata controllabilità della TFR (portata totale) dell'FRR (rapporto di portata), nonché delle condizioni di miscelazione, la scalabilità, il monitoraggio in tempo reale e le geometrie personalizzate dei microcanali (Maeki M. *et al.* 2022). Per migliorare l'efficienza del processo di miscelazione e ottenere una rapida formazione delle LNP, sono stati studiati diversi modelli di miscelatori, come quelli a giunzione T, a HFF (flusso idrodinamico focalizzato), SHM (micro miscelatore a spina di pesce sfalsato), ad anelli o toroidale, miscelatore a deflettori e Tesla (Maeki M. *et al.* 2022) (Fig. 4). Il metodo che prevede la giunzione a T facilita la miscelazione rapida con elevato TFR combinando un mezzo acquoso con un solvente lipidico/organico (etanolo), con conseguente autoassemblaggio lipidico supersaturo in LNP senza necessità di riduzione dimensionale. L'HFF comporta la miscelazione di soluzioni organiche lipidiche con soluzioni acquose in un canale microfluidico, consentendo un controllo preciso delle dimensioni e dell'EE delle LNP. L'SHM determina una miscelazione caotica, offrendo una dimensione e una forma controllate regolando il TFR e l'FRR.

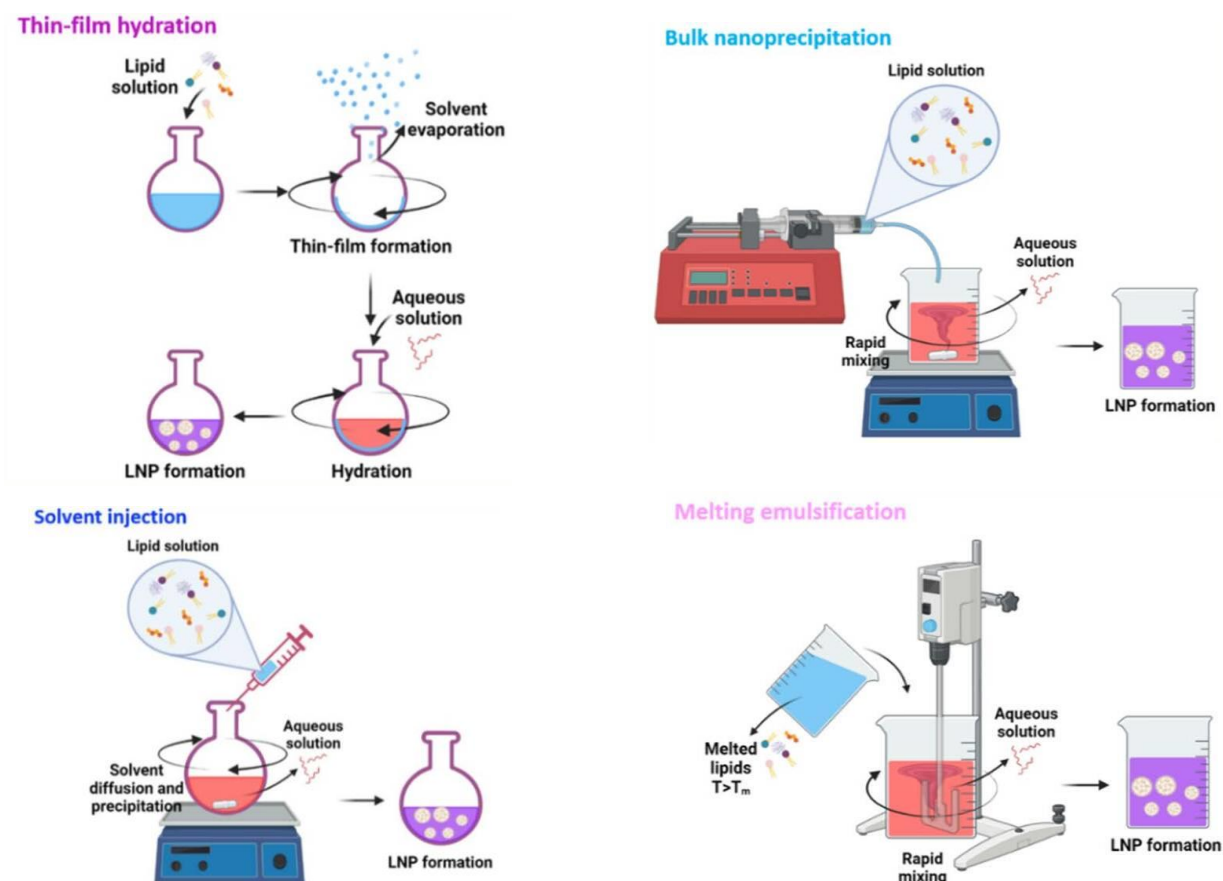
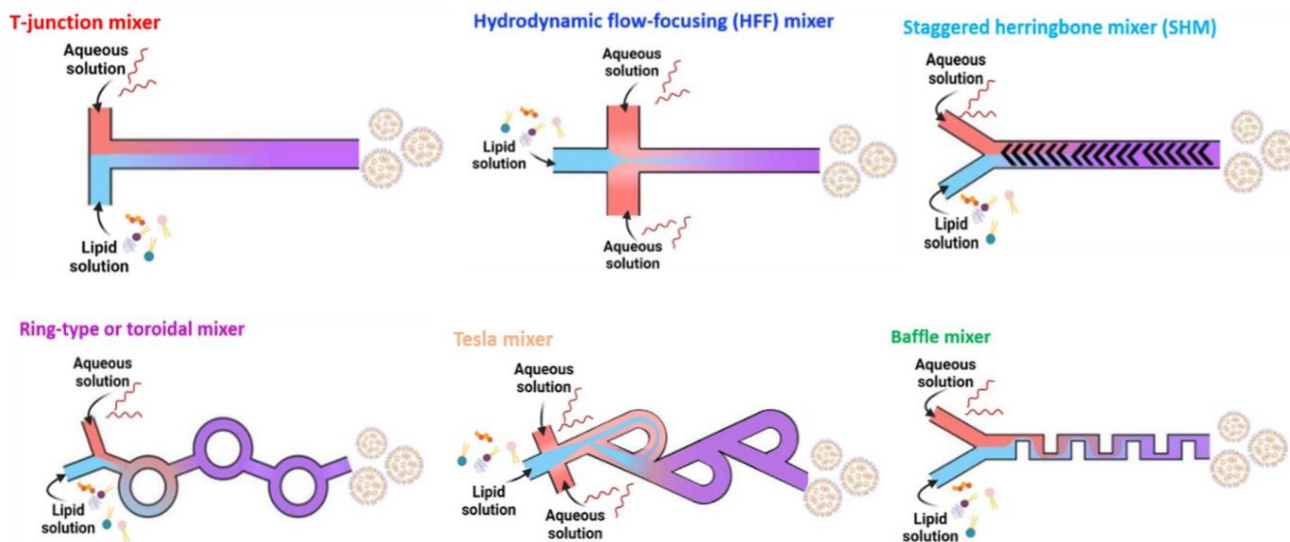


Fig. 4 Rappresentazione schematica delle varie tecniche di fabbricazione delle nanoparticelle lipidiche (LNP): **Sopra:** metodi di miscelazione in massa che includono l'idratazione a film sottile, l'iniezione di solvente, la nanoprecipitazione in massa e l'emulsificazione per fusione; **Sotto:** metodi microfluidici che utilizzano diversi modelli di miscelatori come la giunzione a T, l'HFF, l'SHM, ad anello o toroidale, il Tesla e il miscelatore delle soluzioni.



I miscelatori toroidali consentono di produrre su larga scala LNP uniformi. I miscelatori a baffle introducono turbini successivi per una miscelazione rapida, consentendo una regolazione fine delle dimensioni delle LNP. Il miscelatore Tesla realizza in modo efficiente una miscelazione caotica, consentendo l'applicazione di un'ampia gamma di velocità di flusso per la produzione

di LNP più piccole (Amreen K. *et al.* 2021, Hanna AR. *et al.* 2024). Ogni metodica microfluidica può essere applicata per far fronte ad esigenze diverse, offrendo opzioni flessibili per la produzione controllata e riproducibile di LNP. Tuttavia, i metodi di miscelazione microfluidica possono evidenziare problemi di produzione di rifiuti e spese ambientali in caso di utilizzo di cartucce monouso, variabilità tra le cartucce e compatibilità dei materiali delle cartucce con i solventi organici, richiedendo un'attenta progettazione e applicazione. Alcuni studiosi hanno cercato di progettare LNP a conversione di carica utilizzando una tecnica di miscelazione microfluidica per la loro preparazione e rivestimento. È stato evidenziato che la microfluidica offre vantaggi significativi per la produzione di LNP, in particolare in termini di scalabilità, riproducibilità e rapidità di preparazione. Sono stati valutati i fattori critici che influenzano le caratteristiche delle LNP, tra cui FRR e TFR, che esercitano entrambi un impatto significativo sulle dimensioni delle particelle. Inoltre, anche la selezione di amino lipidi, dei tamponi e il contenuto di acidi nucleici (AN) hanno svolto un ruolo cruciale nel determinare le proprietà delle LNP. Questi risultati rappresentano un valido riferimento per lo sviluppo e la scalabilità di sistemi a base di LNP che utilizzano la microfluidica (Roces CB. *et al.* 2020). È stato sviluppato un metodo scalabile per sintetizzare LNP utilizzando miscelatori microfluidici inerziali a scala isometrica in tre dimensioni. A tal proposito, è stato impiegato un modello teorico predittivo per garantire un tempo di miscelazione coerente tra i vari chip, ottenendo così l'uniformità delle dimensioni e della distribuzione delle particelle. Le siRNA-LNP prodotte a vari TFR presentano caratteristiche fattibili per la produzione scalabile di LNP, promuovendo potenzialmente l'avanzamento dello sviluppo di farmaci a base di acidi nucleici in applicazioni cliniche (Ma Z. *et al.* 2024).

4.2 Caratteristiche chimico fisiche delle LNP a RNA

Le caratteristiche chimico fisiche delle LNP sono fondamentali nel determinare la loro stabilità e funzionalità, influenzando direttamente il destino in vivo e l'efficienza di rilascio dei geni (Cheng X. *et al.* 2016) oltre a garantire la qualità, l'efficacia e la sicurezza (QTTP) del prodotto finale. La struttura e la morfologia delle LNP sono influenzate da diversi fattori, tra cui i componenti lipidici e i loro rapporti, i metodi di preparazione e il tipo di AN.

Morfologia

La morfologia delle LNP influenza l'assorbimento cellulare, la biodistribuzione e la tossicità. I metodi comuni per valutare la morfologia delle LNP includono la TEM (microscopia elettronica a trasmissione), la SEM (microscopia elettronica a scansione) e l'AFM (microscopia

a forza atomica). La crio TEM e le tecniche di scattering, come XRD, SAXS e SANS, offrono preziose informazioni sulla struttura interna, la forma e le dimensioni delle forme delle LNP che possono essere difficili da identificare con altri mezzi (Hallan SS. *et al.* 2021). Le LNP contenenti un'elevata quantità di ICL (più del 40 mol%), DSPC e colesterolo possono formare micelle invertite attorno agli RNA. Al contrario, quelli con una minore quantità di ICL (20 mol%) e un maggiore contenuto di DSPC (30 mol%) danno luogo a nuclei solidi composti principalmente da micelle invertite, con ICL, colesterolo e DSPC che si accumulano nell'area del bilayer (Leung AKK. *et al.* 2015) (Fig. 2.2). L'uso di DSPC e colesterolo nelle formulazioni di LNP si basa sull'interazione del DSPC con gli ICL attraverso il suo gruppo fosfato e sulla complessazione con l'RNA attraverso il proprio gruppo colinico. Il colesterolo occupa lo spazio all'interno della piegatura creata dall'interazione degli ICL con l'RNA (Ponti F. *et al.* 2020, Leung AKK. *et al.* 2012). I lipidi PEGhilati ricoprono lo strato esterno delle LNP per via della loro natura idrofilica e delle loro dimensioni steriche (Ge X. *et al.* 2021). A differenza dei siRNA, l'mRNA porta alla formazione di strutture particolari che influenzano la morfologia e l'EE (Lee SM. *et al.* 2021) (Fig. 2.3). Inoltre, la sostituzione del DOPE con il DSPC ha determinato l'assenza della struttura a bolle, sviluppando un nucleo condensato caratterizzato da strutture micellari invertite (Ponti F. *et al.* 2020).

Dimensione e polidispersità

Le dimensioni delle LNP influenzano in modo significativo la loro stabilità, l'EE e le prestazioni biologiche. Tecniche come l'NTA (Nanoparticle Tracking Analysis), la DLS (Dynamic Light Scattering) e la TEM sono comunemente utilizzate per misurare le dimensioni delle LNP. Quelle più piccole presentano in genere una migliore stabilità, una minore aggregazione, una maggiore EE e un tempo di circolazione più lungo rispetto alle LNP più grandi. Tuttavia, LNP molto piccole possono ridurre l'efficienza dell'espressione genica e aumentare la clearance. Una dimensione ideale per la penetrazione cellulare è di circa 100 nm, che rientra nell'intervallo di dimensioni accettabili di 20-200 nm (Eygeris Y. *et al.* 2022). Fattori come il tipo e il rapporto tra i lipidi, la concentrazione di AN, il metodo di preparazione e le condizioni di conservazione influenzano le dimensioni delle LNP. Aumentando il contenuto degli ICL dal 50 all'80 mol% e diminuendo il contenuto di colesterolo dal 37,5 al 7,5 mol% si ottengono LNP con dimensioni crescenti da 50 a 100 nm (Leung AKK. *et al.* 2015). Oltre alla dimensione media, il PDI (indice di polidispersità) indica l'omogeneità nella distribuzione delle dimensioni e viene valutato con tecniche come DLS ed NTA. Un PDI elevato può provocare una riduzione della stabilità, una

maggiore aggregazione, un maggiore riconoscimento immunitario e determinare capacità di trasfezione incoerente.

Potenziale Zeta

Il potenziale Zeta, che influenza la circolazione e l'assorbimento tissutale delle LNP, può essere modificato dal tipo e dal rapporto tra i lipidi, in particolare quelli con gruppi amminici ionizzabili o coniugati con PEG. Tecniche come l'analisi del potenziale zeta e la diffusione elettroforetica della luce misurano la carica delle LNP. Sebbene le LNP cariche positivamente abbiano una maggiore affinità per gli AN carichi negativamente, facilitandone l'incapsulamento e la protezione, possono anche presentare rischi di tossicità più elevati a causa di una maggiore internalizzazione, interazione con la membrana cellulare, minore stabilità, maggiore aggregazione ed una risposta immunitaria più forte rispetto alle LNP neutre o cariche negativamente. Una carica superficiale elevata, sia + 30 mV che - 30 mV, di solito determina a una rapida eliminazione dal flusso sanguigno e promuove un maggiore sequestro da parte del RES. Al contrario, le LNP con una carica neutra o compresa tra - 10 e + 10 mV, tendono a circolare nel sangue con una captazione ridotta da parte del RES.

Efficienza di incapsulamento (EE)

Mentre l'incapsulazione di RNA (o RNA loading) indica la quantità di RNA rispetto alla massa totale della formulazione, l'efficienza di incapsulamento (EE %) rappresenta la percentuale di RNA iniziale che viene effettivamente incapsulato nelle LNP. Questi parametri sono cruciali per determinare la dose e l'efficacia del prodotto. L'EE, inoltre, è un parametro essenziale per l'efficacia della veicolazione genica e il rapporto costo/efficacia delle LNP, riflette il grado di salvaguardia degli AN dalla degradazione e la loro azione verso le cellule bersaglio. Per quantificare l'EE vengono comunemente utilizzate diverse tecniche tra cui, l'ultracentrifugazione, l'elettroforesi su gel di agarosio, la spettrofotometria UV-vis, la spettrofotometria a fluorescenza e il saggio di intercalazione con bromuro di etile. Fattori come il tipo e il rapporto tra i lipidi, la concentrazione e il peso molecolare degli AN, il metodo di preparazione e le condizioni di conservazione influenzano l'EE. Ad esempio, le variazioni del contenuto degli ICL influiscono notevolmente sull'EE, come dimostra un aumento del 30% del rapporto molare di ICL, che porta a una riduzione proporzionale della quantità di colesterolo e a una conseguente diminuzione dell'EE del siRNA (Ponti F. *et al.* 2020). Rapporti molari inadeguati, in particolare il colesterolo, possono determinare una riduzione dell'interazione tra

gli ICL e gli AN, con conseguente diminuzione dell'EE del siRNA. Inoltre, proporzioni elevate di PEG-lipidi (2,5 o 5 mol%) riducono l'EE (Leung AKK. *et al.* 2015).

Stabilità

La stabilità delle LNP è un parametro critico per la loro applicazione clinica e commercializzazione. Viene valutata monitorando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche (dimensioni, PDI, potenziale zeta) e nell'integrità dell'RNA incapsulato durante la conservazione in diverse condizioni. Gli studi di stabilità sono fondamentali per trasporre le formulazioni di LNP-RNA dalla ricerca all'applicazione pratica, garantendo la determinazione della durata di conservazione e delle condizioni ottimali di stoccaggio. Le LNP instabili possono andare incontro a problemi come aggregazione, degradazione, perdita o transizione di fase, mettendo a rischio l'efficacia e la sicurezza della loro veicolazione genica. I test di stabilità devono essere condotti nelle prime fasi dello sviluppo preclinico. Le tecniche comuni per la valutazione della stabilità includono DLS, analisi del potenziale zeta, TEM, spettrofotometria UV-vis, spettrofotometria di fluorescenza e saggi di espressione genica in vitro/vivo, in linea con le linee guida ICH (International Council for Harmonisation) (Schoenmaker L. *et al.* 2021, Zhao P. *et al.* 2020). La stabilità delle formulazioni di LNP-RNA dipende da fattori quali il pH, la temperatura, la luce, l'umidità, la forza ionica, il tipo e il rapporto tra i lipidi e le proprietà degli AN (Zhang Y. *et al.* 2021, Schoenmaker L. *et al.* 2021). Per aumentare la stabilità delle LNP-RNA vengono impiegate tecniche come l'incorporazione di tamponi e tensioattivi, l'applicazione di rigorosi controlli di lavorazione e l'uso di crioprotettori durante la liofilizzazione (Zhao P. *et al.* 2020). Ad esempio, sia Moderna che BioNTech/Pfizer utilizzano il saccarosio come crioprotettore nei loro vaccini COVID-19 a base di mRNA, incorporando sistemi tampone specifici. Moderna utilizza il tampone Tris HCl per mantenere il pH finale tra 7 e 8, mentre BioNTech/Pfizer utilizza il tampone fosfato. La scelta dell'agente tampone e dell'osmolita appropriato è di fondamentale importanza a causa delle potenziali variazioni di pH durante il congelamento e la conservazione a temperature ultrabasse (Schoenmaker L. *et al.* 2021, Crommelin DJA. *et al.* 2021). Il controllo delle caratteristiche delle LNP come la dimensione media, la distribuzione dimensionale, il potenziale zeta, l'integrità strutturale, la capacità di carico e la stabilità sono cruciali per il successo del rilascio e dell'applicazione terapeutica dell'RNA.

Le LNP contenenti RNA sono instabili a temperatura ambiente a causa della degradazione dell'RNA e di potenziali riarrangiamenti strutturali. Per migliorare la stabilità a lungo termine, vengono adottate diverse strategie:

- **Liofilizzazione:** la rimozione dell'acqua mediante liofilizzazione può migliorare significativamente la stabilità, ma richiede l'aggiunta di crioprotettori appropriati (come saccarosio o trealosio) per prevenire danni durante il congelamento e l'essiccamento e per migliorarne la stabilità quando conservati a basse temperature;
- **Conservazione a basse temperature:** le formulazioni liquide vengono comunemente conservate a -20°C o -80°C per prevenire la degradazione dell'RNA e mantenere l'integrità strutturale delle LNP;
- **Ottimizzazione della formulazione:** l'aggiunta di antiossidanti, tamponi stabilizzanti e la rimozione di ossigeno disciolto può migliorare ulteriormente la stabilità.

I vaccini a mRNA in LNP attualmente approvati richiedono conservazione a temperature ultra-basse (-70°C per Pfizer/BioNTech) o in freezer standard (-20°C per Moderna), evidenziando le criticità ancora presenti nella stabilizzazione di queste formulazioni.

Sterilizzazione e formulazione finale

Prima dell'uso clinico, le LNP devono essere sterilizzate. Essendo sensibili al calore, la sterilizzazione mediante autoclave non è praticabile. Il metodo standard è la filtrazione sterilizzante: la dispersione di LNP purificata viene fatta passare attraverso filtri con pori di dimensioni nominali di 0.22 µm, che trattengono batteri e altri microrganismi ma permettono il passaggio delle LNP (solitamente con valori <150 nm).

La formulazione finale viene quindi preparata aggiustando la concentrazione, il pH e la tonicità secondo le specifiche desiderate.

4.3 Vantaggi delle LNP come sistemi di veicolazione per RNA

Le LNP offrono numerosi vantaggi specifici per la veicolazione di RNA terapeutici:

- **Protezione dell'RNA:** il core lipidico protegge l'RNA dalla degradazione da parte delle RNasi presenti nei fluidi biologici;
- **Alta efficienza di incapsulamento:** i metodi di preparazione moderni permettono di incapsulare oltre il 90% dell'RNA aggiunto;
- **Facilitazione dell'uptake cellulare:** le LNP possono essere internalizzate dalle cellule attraverso meccanismi di endocitosi;
- **Promozione dell'escape endosomiale:** i lipidi ionizzabili facilitano il rilascio dell'RNA dagli endosomi al citoplasma;

- **Modulazione della farmacocinetica:** l'incorporazione di lipidi PEGhilati aumenta l'emivita circolatoria e riduce la clearance da parte del sistema reticoloendoteliale;
- **Scalabilità della produzione:** metodi come la microfluidica permettono una produzione controllata e scalabile delle LNP con caratteristiche riproducibili;
- **Successo clinico comprovato:** le LNP sono alla base di diversi farmaci approvati, tra cui Onpattro, Givlaari, Oxlumio, Leqvio, Amvuttra e i vaccini a mRNA contro COVID-19.

Confronto con altri sistemi di veicolazione

Rispetto ad altri sistemi di veicolazione, le LNP presentano un profilo di vantaggi e svantaggi specifico. Rispetto ai vettori virali le LNP offrono maggiore sicurezza (minore immunogenicità, assenza di rischi di integrazione genomica), maggiore versatilità e più facile produzione, ma generalmente minore efficienza di trasfezione intrinseca. Rispetto ai polimeri cationici le LNP mostrano generalmente minore tossicità e maggiore efficienza di trasfezione in vivo, sebbene i polimeri possano offrire maggiore versatilità chimica. Infine, rispetto ai coniugati diretti (es. GalNAc), le LNP offrono protezione all'RNA e non richiedono modifiche chimiche estese del loro contenuto, permettendo la veicolazione di molecole più grandi come l'mRNA. Tuttavia, i coniugati possono offrire maggiore semplicità formulativa e specificità di targeting (attualmente limitata al fegato).

5. DESTINO DELLE LNP-RNA IN SEGUITO A SOMMINISTRAZIONE

Il destino in vivo delle LNP e del carico di RNA è un processo complesso influenzato da numerosi fattori tra cui la composizione delle LNP, le dimensioni, la carica superficiale, la PEGhilazione, la via di iniezione, il tessuto bersaglio, la risposta immunitaria e le caratteristiche biologiche dell'organismo ospite. La comprensione di questi fattori è fondamentale per lo sviluppo di formulazioni a base di LNP efficaci e sicure (Haghighi E. *et al.* 2024).

Proprietà chimico fisiche delle LNP

- **Composizione lipidica:** la scelta degli ICL, dei lipidi helper, del colesterolo e dei lipidi PEGhilati influisce sulla stabilità, sulla fusogenicità, sulla fluidità, sull'escape endosomiale, sulla captazione cellulare e sull'efficienza di trasfezione. Tali parametri impattano sulla biodistribuzione; ad esempio un maggiore contenuto di colesterolo può aumentare la rigidità e la stabilità in circolo, mentre la percentuale e il tipo di lipidi PEGhilati influenzano l'opsonizzazione e la clearance (Haghighi E. *et al.* 2024);
- **Le dimensioni:** influenzano il tempo di circolazione, la biodistribuzione, l'aggregazione, l'extravasazione, l'uptake cellulare e la clearance. Le particelle più grandi (80-150 nm) aumentano l'efficienza del rilascio dei geni mostrando, altresì, una maggiore ritenzione vascolare, ma una minore capacità di extravasazione. Quelle più piccole (30-50 nm) consentono un migliore controllo della distribuzione corporea, tendono ad avere una maggiore penetrazione tissutale, ma anche una più rapida clearance renale (Haghighi E. *et al.* 2024);
- **La carica superficiale:** determinata dai lipidi ionizzabili e dai loro valori di pKa, influenza le interazioni con le proteine del siero, le membrane cellulari, gli endosomi e le cellule immunitarie. Il trasporto ottimale dell'RNA richiede un equilibrio tra cariche positive e negative: LNP fortemente cationiche tendono ad interagire non specificamente con cellule e proteine, portando ad una rapida clearance e potenziale tossicità. LNP neutre o leggermente anioniche generalmente mostrano una maggiore emivita circolatoria (Haghighi E. *et al.* 2024);
- **La PEGhilazione:** forma una barriera sterica idrofila che impedisce l'aggregazione e migliora la durata della circolazione, ma potenzialmente può inibire l'assorbimento cellulare. La chimica e la densità della peghilazione sulla superficie delle LNP possono anche influenzare la permeabilità della membrana, la biodistribuzione e la risposta immunitaria (Haghighi E. *et al.* 2024).

La via di iniezione influenza l'esposizione iniziale delle LNP alla circolazione sanguigna e agli organi, determinando modelli di biodistribuzione e livelli di espressione genica diversi. Il tessuto di destinazione, l'organo o il tipo di cellula a cui è destinato l'mRNA, influisce sulla biodistribuzione delle LNP influenzando le interazioni con i recettori, i trasportatori, gli enzimi e le cellule immunitarie specifiche del tessuto. La risposta immunitaria, che coinvolge i sistemi innato e adattativo, influenza la biodistribuzione delle LNP attraverso l'opsonizzazione, la fagocitosi, la produzione di citochine e la formazione di Ab. Le LNP con elevata carica superficiale o PEGhilazione possono attivare il complemento e subire la captazione da parte dei macrofagi, mentre quelle con bassa carica superficiale o PEGhilazione possono eludere il riconoscimento immunitario, prolungando il tempo di circolazione (Fumoto S. *et al.* 2021). Diverse strategie di progettazione razionale possono migliorare il destino degli RNA terapeutici caricati nelle LNP. Ad esempio, l'aggiunta di elettroliti, come il cloruro di sodio, può attenuare la repulsione tra i liposomi cationici e gli intermedi lipoplex durante la formazione del complesso. Ciò contribuisce a stabilizzare l'incapsulamento dell'mRNA, a ridurre le dimensioni delle particelle, a prevenire l'aggregazione in miscele saline, a migliorare la stabilità dell'mRNA nel siero e a migliorare l'espressione genica (Kawakami S. *et al.* 2005).

Interazioni con componenti biologici

Una volta in circolo, le LNP interagiscono con vari componenti biologici che ne influenzano il destino. Al momento dell'ingresso nell'organismo, i geni nudi entrano in contatto con diversi componenti biologici, a seconda degli specifici fluidi biologici presenti nel sito di somministrazione, come i surfattanti polmonari durante l'inalazione, il fluido interstiziale con l'iniezione locale e il plasma sanguigno dopo la somministrazione endovenosa (Alp G. *et al.* 2020). L'efficacia della veicolazione dell'RNA in vivo dipende in modo significativo dalle interazioni con i componenti del sangue, tra cui cellule ematiche, ioni e proteine plasmatiche. Immediatamente dopo l'ingresso nel flusso sanguigno, le LNP acquisiscono uno strato di proteine plasmatiche adsorbite sulla loro superficie formando la cosiddetta «corona proteica» composta da diverse biomolecole come apolipoproteine, elementi del complemento, immunoglobuline e fattori di coagulazione (Francia V. *et al.* 2020). La composizione di questa corona, determinata dalle caratteristiche delle LNP e dalla presenza dell'RNA, altera in modo critico caratteristiche fisiologiche, influenzando la distribuzione, la longevità nel flusso sanguigno, l'internalizzazione cellulare, il riconoscimento immunitario, la stabilità e la farmacocinetica (Zhang R. *et al.* 2021, Francia V. *et al.* 2019). La superficie delle LNP è prevalentemente rivestita da biomolecole come ApoE, vitronectina, albumina e β 2-

glicoproteina I, le quali formano interazioni stabili che influenzano ulteriori associazioni. La corona proteica comprende una corona «dura» saldamente attaccata e una corona «morbida» più transitoria, che interagisce dinamicamente con le proteine circostanti. Dotata di capacità di targeting intrinseche, la corona proteica migliora le interazioni specifiche con i recettori e la captazione tramite endocitosi (Francia V. *et al.* 2020). Fattori come il tipo di biofluido, la concentrazione, la temperatura e l'origine modellano in modo cruciale la corona, determinando la clearance delle LNP, il targeting tissutale e l'efficacia terapeutica. Gli ICL, modificando la loro carica in base al pH, utilizzano l'ApoE per migliorare la veicolazione mirata al fegato; mentre il livello di ApoE influenza l'efficienza della veicolazione, le lipoproteine generalmente sopprimono l'espressione genica. Nei liposomi contenenti DOTAP e colesterolo, la fibronectina svolge un ruolo fondamentale nell'espressione genica a livello polmonare, così come la corona di albumina in condizioni infiammatorie del fegato e tumorali (Yoshikawa N. *et al.* 2020). Pertanto, la progettazione delle LNP richiede un'attenta modulazione delle interazioni proteiche per il targeting naturale e/o la minimizzazione delle interazioni con le cellule del sangue per il targeting passivo o attivo.

5.1 Distribuzione a livello di organi e tessuti

La distribuzione dei vettori non virali nei tessuti bersaglio è eterogenea e non completamente compresa, influenzata dalle variazioni del flusso sanguigno e dalla diversità dell'espressione dei recettori. La barriera vascolare rappresenta una sfida significativa, in quanto ostacola la consegna dell'RNA alle cellule al di là dei vasi sanguigni; le caratteristiche dell'endotelio variano significativamente tra i diversi organi e in condizioni patologiche, influenzando la capacità delle LNP di extravasare nei tessuti. Alcuni tessuti, come il fegato, la milza e i tumori, presentano fenestrazioni endoteliali che favoriscono la consegna dell'RNA alle cellule al di fuori del flusso sanguigno. In particolare, le dimensioni delle fenestrate endoteliali sinusoidali del fegato variano da 100 a 160 nm, con variazioni nelle diverse specie (Wisse E. *et al.* 2008).

Accumulo epatico

Il fegato rappresenta il sito primario di accumulo per la maggior parte delle formulazioni a base di LNP somministrate per via endovenosa, con il 60-90% della dose che si localizza in questo organo entro poche ore dall'iniezione. Questa forte affinità per il fegato, rende le LNP vettori ideali per il targeting epatico (Li X. *et al.* 2023). La Presenza di ApoE nella corona proteica delle LNP facilita la loro interazione con i recettori cellulari come LDLR, VLDLR ed LRP, prevalentemente nel fegato. L'elevata affinità di ApoE per LDLR sugli epatociti aumenta la

captazione delle LNP attraverso l'endocitosi mediata da recettore. È stato osservato che la componente lipidica PEGhilata delle LNP può staccarsi, permettendo all'ApoE di adsorbire sulla superficie delle LNP (Cheng Q. *et al.* 2020). Inoltre la presenza delle cellule di kupffer, può determinare la captazione attiva delle LNP specialmente se opsonizzate. A livello epatico, la distribuzione cellulare delle LNP varia in base alle loro peculiarità: LNP più grandi, o fortemente opsonizzate, tendono ad accumularsi nelle cellule di Kupffer, mentre LNP di dimensioni ottimali (50-100 nm), con adeguata PEGhilazione, mostrano un maggiore uptake da parte degli epatociti che rappresenta il target cellulare desiderato per molte applicazioni terapeutiche.

Accumulo splenico

La milza rappresenta il secondo sito di accumulo delle LNP somministrate per via endovenosa, con circa il 5-30% della dose che vi si localizza. L'accumulo splenico è principalmente dovuto ad una struttura vascolare caratterizzata dalla presenza sia di un sistema chiuso che di uno aperto, con quest'ultimo che permette alle LNP di entrare in diretto contatto con le cellule immunitarie residenti. A livello splenico vi è abbondanza di macrofagi i quali, localizzati nella polpa rossa e nella zona marginale, possono catturare efficacemente le LNP circolanti. Infine, la struttura reticolare della polpa rossa può intrappolare fisicamente le LNP mediante una sorta di filtrazione meccanica, specialmente quelle di dimensioni maggiori o aggregate. L'accumulo splenico può rappresentare una limitazione per applicazioni che richiedono un targeting specifico ad altri organi, ma può essere vantaggioso per immunoterapie o vaccini che mirano a interagire con le cellule immunitarie spleniche.

Altri organi e tessuti

Oltre a fegato e milza, le LNP possono distribuirsi in vari altri organi e tessuti, sebbene generalmente in misura minore. A livello renale le LNP di piccole dimensioni (<5-6 nm) possono essere filtrate attraverso i glomeruli, mentre LNP più grandi mostrano un accumulo limitato, principalmente nel compartimento vascolare e nelle cellule mesangiali. L'accumulo polmonare è generalmente limitato per LNP ben formulate, ma può aumentare significativamente per LNP aggregate o fortemente cationiche, che possono rimanere intrappolate nei capillari polmonari. Tessuti quali cuore e muscolo scheletrico mostrano comunemente un basso accumulo di LNP a causa dell'endotelio continuo e della limitata permeabilità vascolare. A livello del sistema nervoso centrale la barriera emato-encefalica (BEE) limita significativamente l'accesso delle LNP al cervello dopo somministrazione

sistemica, pertanto un semplice controllo delle dimensioni delle particelle è insufficiente. Tuttavia, in condizioni patologiche associate a compromissione della BEE (come neoplasie cerebrali o infiammazione) o con l'uso di strategie specifiche di targeting, una frazione limitata di LNP può raggiungere il tessuto cerebrale. Nello specifico, una strategia efficace può consistere nello sfruttare la transitosi da parte delle cellule endoteliali e nel puntare su recettori specifici, come il recettore della transferrina (Boado RJ. 2007). In alternativa, stimoli fisici come gli ultrasuoni possono indebolire l'integrità della parete dei vasi, facilitando il trasferimento del gene nel tessuto (Song K-H. *et al.* 2017).

Per quanto riguarda i tessuti neoplastici, i tumori solidi spesso presentano vascolarizzazione anomala con endotelio fenestrato e drenaggio linfatico compromesso, caratteristiche che possono favorire l'accumulo passivo delle LNP attraverso l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention). I diversi componenti della corona proteica, oltre al targeting epatico, possono indirizzare le LNP verso tessuti o organi extraepatici (Wang S. *et al.* 2023, Simonsen JB. 2024). Alcuni esempi possono essere rappresentati da:

- **L'HDL** delle LNP interagisce con i recettori SR-BI (scavenger) delle cellule endoteliali linfatiche (Liu M. *et al.* 2024);
- **La vitronectina** facilita la consegna mirata delle LNP alle cellule tumorali attraverso interazioni con le integrine $\alpha_{(v)}\beta_3$. Una corona ricca di vitronectina può indirizzare verso i polmoni e i tumori, mentre l'affinità di b2-GPI per la fosfatidilserina consente di colpire la milza (Chen D. *et al.* 2021); infine una corona ricca di vitronectina determina la consegna ridotta alle cellule HepG2 che esprimono recettori LDL rispetto a quelle con una corona ricca di apolipoproteine (Chen D. *et al.* 2019);
- **Le corone ricche di albumina** prolungano il tempo di circolazione e facilitano il drenaggio linfatico (Cai R. *et al.* 2019). I recettori Gp60 e la proteinina SPARC sono i bersagli chiave per il rilascio di LNP recanti una corona ricca di albumina (Ji Q. *et al.* 2024).

Da quanto scritto è evidente come le caratteristiche della corona possano essere impiegate come strategia per il targeting naturale delle LNP. La composizione della corona delle LNP, arricchita con proteine specifiche, risulta essere cruciale; in particolare, le differenze nella composizione proteica tra le LNP mirate al fegato e ai polmoni non sono correlate alla carica superficiale, suggerendo che l'introduzione di legami ammidici influisce sulle caratteristiche della corona, facilitando così la veicolazione di mRNA verso i polmoni (Qiu M. *et al.* 2022). È stato dimostrato che la modifica della lunghezza della coda idrofobica nei lipidi derivati dal 2,5-piperazinedione consente la veicolazione di RNA indipendentemente da ApoE o LDLR,

evidenziando l'importanza della struttura chimica dei lipidi nel veicolare le LNP (Paunovska K *et al.* 2022). Un altro studio ha rilevato che la modifica dei lipidi helper delle LNP può modulare il tropismo tissutale: le LNP contenenti DSPC si concentrano nella milza, mentre le LNP contenenti DOPE diffondono nel fegato a causa della diversa affinità per ApoE (Zhang R. *et al.* 2021). La presenza di proteine nella corona delle LNP non garantisce, tuttavia, un'interazione mirata con un target. Fattori come la disponibilità, la conformazione e l'orientamento delle proteine sono cruciali, poiché non tutte le proteine operano come agenti di targeting; pertanto, capire come le proteine adsorbite sulle LNP influenzino il riconoscimento cellulare è fondamentale per una somministrazione mirata (Zhang Y. *et al.* 2020). In un studio è stata utilizzata «l'impronta digitale» della corona delle LNP d'oro, suggerendo che la previsione della captazione cellulare è più accurata quando si basa sulla corona piuttosto che sulle dimensioni delle particelle, sulla carica o sul cluster. Tuttavia, nelle LNP, solo una quota minoritaria di proteine della corona migliora quello che è il direccionamento cellulare, evidenziando la complessità dello sviluppo di sistemi di rilascio mirato per terapie geniche al di là delle applicazioni epatiche (Wilhelm S. *et al.* 2016). Approcci come l'innesto di siti di targeting sulle superfici delle LNP o la regolazione della chimica di superficie migliorano la veicolazione specifica per i tessuti o le cellule (Wilhelm S. *et al.* 2016).

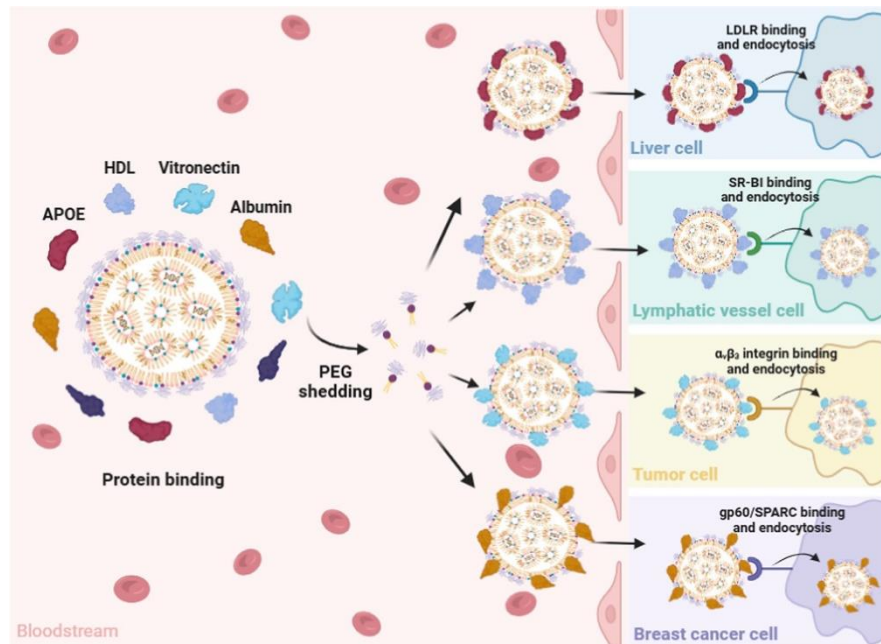


Fig 5. Il targeting naturale di varie cellule da parte di LNP-RNA terapeutici influenzato dalla dispersione dei lipidi PEGhilati e dalla composizione della corona proteica. ApoE, le lipoproteine ad alta densità (HDL), la vitronectina e l'albumina possono indirizzare naturalmente le LNP rispettivamente al parenchima epatico, ai vasi linfatici e alle cellule tumorali e del cancro al seno.

Circolazione sistemica e clearance sanguigna

Il destino delle LNP all'interno dell'organismo è determinato dalla loro stabilità, dalla circolazione, dall'interazione con il sistema immunitario, dalla clearance sanguigna; tutti fattori cruciali per il successo della terapia (Giulimondi F. *et al.* 2019). Alcune formulazioni a base di

LNP sono inefficaci nel trasporto dell'RNA a causa della loro instabilità nei fluidi biologici, evidenziando la necessità di valutarne l'integrità in queste condizioni. Ad esempio, le LNP prive di colesterolo contenenti lipidi cationici sensibili al pH, sfingomielina d'uovo e lipidi PEGhilati dimostrano instabilità nel sangue, con conseguente rilascio prematuro di siRNA (Sato Y. *et al.* 2020). L'adsorbimento di proteine sulle LNP innesca processi di coagulazione e l'attacco di opsonine, che portano al loro riconoscimento e all'eliminazione da parte dell'MPS (Hayashi Y. *et al.* 2020). Questi eventi riducono la consegna delle LNP agli organi bersaglio e si traducono in una riduzione dell'efficacia terapeutica. L'attrazione elettrostatica tra le LNP cariche positivamente e le proteine cariche negativamente causa l'agglomerazione delle particelle, che abbrevia il tempo di circolazione e riduce l'internalizzazione cellulare. Inoltre, la corona proteica può compromettere l'integrità delle particelle, portando a un rilascio prematuro del carico influenzando la distribuzione biologica e il tempo di circolazione (Abstiens K. *et al.* 2019). Le proteine del siero possono destabilizzare le LNP, il che richiede un'analisi approfondita per l'agglomerazione, il rilascio prematuro di RNA e il test di dye leakage nei fluidi biologici. Le LNP possiedono caratteristiche simili a quelle dei virus, tra cui un involucro lipidico, dimensioni e curvatura comparabili. I virus presentano anche una corona biomolecolare che influisce sull'infettività e sull'attivazione delle CC (Ezzat K. *et al.* 2019), indicando un ruolo evolutivo nell'eludere il sistema immunitario. Di conseguenza, una sfida significativa nella somministrazione di LNP è quella di eludere il sistema immunitario (Saha K. *et al.* 2016). Le LNP spesso, negli studi preclinici, sono oggetto di forti criticità a causa delle vigorose risposte immunitarie evocate dopo l'iniezione. Varie strategie, tra cui la modificazione della composizione delle LNP mediante l'aggiunta di colesterolo con fosfolipidi ad alta temperatura di transizione, possono ridurre la clearance delle LNP alterando l'adsorbimento delle proteine sulla superficie delle LNP (Sieber S. *et al.* 2017). La tecnologia della PEGhilazione induce un "effetto stealth" sulle LNP ostacolando l'adsorbimento e l'opsonizzazione delle proteine. Ciò aumenta la stabilità in circolazione delle LNP, riduce la fagocitosi dei macrofagi e prolunga la permanenza nel sangue. Proteine come la clusterina nella corona delle LNP PEGhilate potenziano ulteriormente l'effetto stealth. L'efficacia dei lipidi PEGhilati dipende dalla quantità, dalla dimensione molecolare e densità superficiale. In particolare, l'aumento del contenuto di lipidi PEGhilati con catene più lunghe (C18) aumenta la durata della circolazione, mentre le catene più corte (C14) non presentano lo stesso effetto. È necessario avere almeno l'1,5 mol% di lipidi PEGhilati per influenzare la farmacocinetica delle LNP. Inoltre, un elevato contenuto di PEG riduce le interazioni tra le proteine, mentre la lunghezza della catena condiziona la composizione della corona proteica (Kulkarni JA. *et al.*

2019, Chen D. *et al.* 2019). L'utilizzo dei PEG e delle relative modifiche richiede una valutazione meticolosa a causa delle potenziali limitazioni. Il "PEGdilemma" si riferisce alla ridotta internalizzazione cellulare e al rilascio endosomico associati alla PEGhilazione. Le soluzioni a questo problema prevedono l'uso di lipidi PEGhilati sensibili al pH, rimovibili dagli enzimi e staccabili. Le ricerche sulle cinetiche di de-PEGhilazione per la veicolazione di siRNA indicano che i PEG con code corte e sature sono essenziali per una de-PEGhilazione efficace e per il silenziamento genico, come esemplificato da Onpattro. Tali PEG possono scambiarsi con proteine come l'ApoE dopo la somministrazione, migliorando il targeting degli epatociti e dimostrando l'uso strategico della formazione della corona per il controllo della circolazione e il targeting dei tessuti (Zhu X. *et al.* 2017).

Vie di somministrazione

La via di somministrazione ha un impatto significativo sulla distribuzione, sulla cinetica e sull'efficacia dell'RNA-LNP (Hou X. *et al.* 2021). La somministrazione endovenosa di RNA senza un vettore causa una rapida degradazione nel sangue e promuove una modulazione genica minima (Kawabata K. *et al.* 1995). Contrariamente, la somministrazione locale determina un'espressione genica tracciabile (Yang J. 2000). Dopo l'iniezione endovenosa, le LNP si localizzano prevalentemente in vari tipi di cellule epatiche, tra cui epatociti, LSEC (cellule endoteliali sinusoidali epatiche) e cellule di Kupffer (Byrne BJ. *et al.* 2011). Le LNP diffondono principalmente al fegato a causa delle loro proprietà chimico-fisiche e alle caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'organo, quali l'elevato flusso sanguigno e la discontinuità dei capillari epatici (Lorenzer C. *et al.* 2015). Per ampliare il potenziale terapeutico delle LNP, è essenziale ottenere una biodistribuzione in organi diversi dal fegato. Le iniezioni intra-arteriose e intraportali possono eludere l'effetto di primo passaggio, mentre l'iniezione endovenosa mira principalmente ai polmoni come organo di primo passaggio. La somministrazione intraperitoneale, comunemente utilizzata nella ricerca animale anziché negli studi sull'uomo, è associata ad una minore tossicità sistemica rispetto a quella endovenosa. È stato osservato che questa via di somministrazione, applicata alle LNP con fosfolipidi cationici, ha promosso una significativa espressione proteica nel pancreas. Questa scoperta suggerisce nuovi potenziali trattamenti per le malattie del pancreas, tra cui il cancro e il diabete (Melamed JR. *et al.* 2023). La somministrazione locale di LNP, comprese le iniezioni intradermiche, sottocutanee e intramuscolari, può evocare risposte immunitarie sistemiche trasportando l'mRNA ai linfonodi, dove sono presenti APC e cellule T (Hou X. *et al.* 2021). Rispetto all'iniezione endovenosa, queste vie portano spesso a un'espressione prolungata della proteina nel sito di iniezione

(Hassett KJ. *et al.* 2019) aggirando potenzialmente la circolazione sistemica e offrendo effetti terapeutici sostenuti. Tuttavia, l'mRNA e/o i componenti lipidici possono diffondersi anche in altre sedi, come polmoni, fegato, linfonodi non drenanti e milza (Hassett KJ. *et al.* 2019). Le LNP impiegate nei vaccini a base di mRNA, compresi i vaccini COVID-19, promuovono l'espressione dell'antigene prevalentemente nel muscolo deltoide e nei linfonodi drenanti (Roltgen K. *et al.* 2022). La via intramuscolare consente volumi di iniezione maggiori rispetto alle vie intradermica e sottocutanea (Mendonca MCP. *et al.* 2023) mentre la via intranodale è promettente per il rilascio di mRNA nudo (Kreiter S. *et al.* 2010). La somministrazione intraoculare rappresenta una via efficace per trattare le patologie oculari, poiché i metodi convenzionali non riescono a raggiungere la regione posteriore dell'occhio (Wang J. *et al.* 2018). Tecniche come le iniezioni intravitreali e sottoretiniche si sono dimostrate efficaci nel raggiungere la retina e l'epitelio pigmentato retinico con le LNP (Janoria KG. *et al.* 2007). Una ricerca ha dimostrato che le LNP con caratteristiche chimiche specifiche, come un basso pKa e la presenza di code insature, aumentano l'espressione genica nell'epitelio pigmentato retinico dopo l'iniezione subretinica (Patel S. *et al.* 2019). Analogamente, le LNP progettate con una minima PEGhilazione hanno mostrato un aumento dell'espressione nelle cellule retiniche dopo la somministrazione subretinica e intravitreale. La retina neurale e i fotorecettori, tipicamente di difficile accesso, sono stati raggiunti attraverso l'assorbimento mediato dai recettori utilizzando LNP modificate con peptidi specifici per la retina; questo metodo ha un potenziale significativo per il progresso dei trattamenti delle malattie retiniche ereditarie (Herrera-Barrera M. *et al.* 2023). Le vie polmonari, come l'intratracheale, l'intranasale e l'inalazione di aerosol, offrono una somministrazione diretta dei farmaci mirata ai polmoni, riducendo gli effetti avversi sistemici. Questo metodo aggira il sequestro delle mRNA-LNP da parte delle cellule di Kupffer nel flusso sanguigno (Sadauskas E. *et al.* 2007). La somministrazione intratracheale di LNP, non modificate, cationiche o legate a un ligando, è efficace per la somministrazione di siRNA; le LNP modificate con il mannosio sono particolarmente efficaci verso la fibrosi polmonare (Jin H. *et al.* 2023). Rimanendo in ambito polmonare, formulazioni a base di LNP per la veicolazione in questo distretto attraverso un nebulizzatore, denominato NLD1, sono state perfezionate con lipidi PEGhilati e lipidi cationici ausiliari, ottenendo una veicolazione superiore di mRNA nei polmoni rispetto alle LNP progettate per la circolazione sistemica (Lokugamage MP. *et al.* 2021). Le vie orali e transdermiche presentano notevoli difficoltà per la somministrazione di LNP a causa delle barriere fisiologiche. I microneedles offrono una soluzione promettente per la veicolazione delle LNP-RNA attraverso la pelle (Yang T. *et al.* 2021); tuttavia, la veicolazione orale di tali formulazioni incontra diversi ostacoli nel tratto

gastrointestinale, tra cui l'acidità gastrica, i sali biliari, gli enzimi digestivi, il muco e la permeabilità della membrana (Busignies V. *et al.* 2017). Per superare questi ostacoli sono state adottate diverse strategie di formulazione, con modifiche volte a migliorare la stabilità, la ritenzione e l'efficacia (El-Mayta R. *et al.* 2021). Ad esempio, i rivestimenti polimerici sensibili al pH possono prevenire la digestione della pepsina e l'interazione con i sali biliari, mentre la liofilizzazione consente una regolare somministrazione orale attraverso forme di dosaggio solide (El-Mayta R. *et al.* 2021). I siRNA disponibili per via orale si sono dimostrati promettenti negli studi preclinici e clinici, grazie a tecnologie di coniugazione con GalNAc (N-acetilgalattosammina) e a formule contenenti potenziatori della permeazione intestinale (Gennemark P. *et al.* 2020).

Le barriere fisiologiche alla somministrazione di LNP devono essere attentamente considerate per sviluppare metodi di somministrazione non invasivi, perfezionare le interazioni LNP-RNA e migliorare gli effetti terapeutici.

5.2 Le LNP per la veicolazione genica tessuto-specifica

Come evidenziato dall'autorizzazione all'immissione in commercio d'emergenza dei vaccini a mRNA verso il COVID-19, le LNP sono risultate essere estremamente promettenti quali vettori di terapie a RNA negli organismi viventi. Tuttavia, persistono delle criticità tra cui la veicolazione extraepatica ostacolata da fenomeni di accumulo epatico, tramite l'interazione ApoE-LDL, e la clearance delle LNP da parte degli organi emuntori principali e del RES (Poon W. *et al.* 2019). Strategie efficaci per raggiungere organi e tessuti specifici sono fondamentali per espandere le applicazioni delle RNA-LNP; i sistemi di somministrazione mirata dei farmaci puntano a trasportare con precisione gli agenti terapeutici in cellule o tessuti specifici, migliorando l'efficacia del trattamento e minimizzando gli effetti collaterali legati all'mRNA, in particolare nell'editing del genoma. Il controllo della distribuzione delle LNP è fondamentale per affrontare condizioni localizzate in tessuti o organi specifici. Il targeting attivo e passivo sono due strategie utilizzate per migliorare l'efficacia e la specificità degli agenti terapeutici. Le condizioni fisiopatologiche possono creare ambienti unici per la somministrazione di farmaci specifici ai tessuti. Il targeting passivo si basa sulle naturali differenze fisiologiche e patologiche tra tessuti sani e malati. I tumori hanno spesso una vascolarizzazione non ben definita e uno scarso drenaggio linfatico, per cui, ad esempio, l'effetto EPR consente alle LNP di accumularsi maggiormente nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale. Nelle condizioni ischemiche, le aree con flusso sanguigno ridotto possono essere mirate, poiché le LNP possono accumularsi in queste regioni a causa dell'interruzione del flusso sanguigno. Il targeting attivo prevede l'uso

di ligandi specifici che si legano ai recettori delle cellule malate. I tumori spesso presentano una vascolarizzazione anomala, recettori sovraespressi e un ambiente acido. Queste caratteristiche possono essere prese in considerazione progettando LNP funzionalizzate e reattive agli stimoli (Haghighi E. *et al.* 2024). Condizioni infiammatorie come l'artrite reumatoide o le malattie infiammatorie intestinali presentano marcatori infiammatori sovraespressi che possono essere bersagliati con ligandi specifici coniugati con le LNP (Attia MF. *et al.* 2019). Altre alterazioni fisiopatologiche, tra cui l'eccitotossicità da glutammato, lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale, la morte cellulare, la mutazione di geni driver, l'angiogenesi e le aberrazioni nel ciclo cellulare e nelle vie di segnalazione, hanno delineato potenziali bersagli per i sistemi di rilascio di farmaci basati su nanoparticelle (Xu J. *et al.* 2024, Liu W. *et al.* 2024).

Targeting Passivo

Il targeting passivo si riferisce all'accumulo preferenziale delle LNP in specifici tessuti o siti patologici basato esclusivamente sulle loro proprietà chimico-fisiche e sulle caratteristiche anatomiche e fisiologiche dei tessuti bersaglio, senza l'utilizzo di ligandi di targeting specifici. Il targeting passivo delle LNP è influenzato principalmente dall'adsorbimento della corona proteica, che ne determina la biodistribuzione la quale è influenzata anche dalle caratteristiche chimico-fisiche delle LNP, tra cui dimensioni, carica, morfologia, composizione e rapporto tra i componenti. Le LNP interagiscono con l'ApoE, dopo il distacco del PEG, facilitando la captazione passiva. La modulazione delle dimensioni delle particelle rappresenta una strategia per ottenere una somministrazione mirata agli organi (Nakamura T. *et al.* 2020, Di J. *et al.* 2022). Le LNP di dimensioni inferiori a 10 nm sono rapidamente eliminate a livello renale, si raccolgono prevalentemente nel fegato e passano nel sistema linfatico. Al contrario, le LNP più grandi tendono ad accumularsi nella milza e nei polmoni o possono persistere nel sito di somministrazione (Nakamura T. *et al.* 2020). Le LNP di dimensioni intermedie, intorno ai 78 nm, presentano un'efficienza di rilascio ottimale nel fegato. Le LNP che incorporano pSar al posto dei lipidi PEGhilati hanno mostrato livelli elevati di espressione di mRNA nella milza, con una tendenza all'aumento dell'accumulo a livello splenico al diminuire delle dimensioni (Nogueira SS. *et al.* 2020). L'imperfetta vascolarizzazione dei tessuti tumorali consente il targeting passivo delle LNP ai tumori attraverso l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention) (Fang J. *et al.* 2011). L'effetto EPR è un fenomeno che porta all'accumulo preferenziale di nanoparticelle, incluse le LNP, nei tumori solidi e in altri siti di infiammazione. Questo effetto si basa su due caratteristiche principali di questi tessuti: l'aumentata permeabilità vascolare e il drenaggio linfatico compromesso. I tumori solidi stimolano l'angiogenesi per

soddisfare il loro crescente fabbisogno di ossigeno e nutrienti. Tuttavia, i vasi neoformati presentano numerose anomalie strutturali quali fenestrazioni dell'endotelio di dimensioni variabili (fino a 200-1200 nm in alcuni tumori), significativamente più grandi rispetto ai vasi normali (eccetto in organi con endotelio naturalmente fenestrato come fegato e milza). La membrana basale che supporta l'endotelio è spesso incompleta o assente nei vasi tumorali unitamente ad una ridotta copertura di periciti che contribuisce all'instabilità e alla permeabilità dei vasi tumorali. L'organizzazione irregolare dei vasi tumorali crea regioni di flusso sanguigno variabile e spesso compromesso. Queste caratteristiche permettono alle LNP di dimensioni appropriate di extravasare più facilmente nel tessuto tumorale rispetto ai tessuti normali. Il secondo componente dell'effetto EPR è rappresentato dal ridotto drenaggio linfatico nei tumori i quali spesso presentano un sistema linfatico compromesso o assente nelle regioni centrali, con vasi linfatici funzionali principalmente nella periferia tumorale. L'aumentata permeabilità vascolare, combinata con il drenaggio linfatico compromesso, porta ad un aumento della pressione del fluido interstiziale, che può ostacolare l'ulteriore extravasazione di nanoparticelle ma anche trattenere quelle già presenti nel tessuto tumorale; questa combinazione di aumentata permeabilità vascolare e ridotto drenaggio linfatico porta all'accumulo e alla ritenzione delle LNP nel tessuto tumorale, potenzialmente aumentando l'efficacia terapeutica e riducendo gli effetti collaterali sistemici. Tuttavia, l'efficacia dell'effetto EPR è generalmente limitata nei tumori umani (Danhier F. 2016). Di conseguenza, le LNP più piccole (in particolare quelle inferiori a 50 nm) sono considerate più efficaci per il trattamento del cancro umano. Inoltre, la carica superficiale delle LNP ha un impatto significativo sulla biodistribuzione e sull'efficienza di rilascio dell'mRNA. Le LNP con carica positiva si dirigono verso i polmoni, quelle con carica neutra entrano di preferenza nel fegato e quelle con carica negativa si accumulano soprattutto nella milza (Kranz LM. *et al.* 2016, Fenton OS. *et al.* 2017). I componenti delle LNP, in particolare gli ICL, che interagiscono con specifiche proteine del siero, sono cruciali per la progettazione di nuovi materiali di somministrazione destinati agli organi. Ad esempio, sono stati sviluppati fosfolipidi ionizzabili (iPhos) a coda multipla per migliorare l'escape endosomiale e la consegna di mRNA/sgRNA per l'editing del genoma in vivo. Questi lipidi possono funzionare insieme ai lipidi ausiliari, variamente caricati, per consentire la veicolazione organo-specifica (Liu S. *et al.* 2021). La modifica della struttura del linker degli ICL ha un impatto sull'adsorbimento delle proteine, influenzando, di conseguenza, la veicolazione dell'mRNA dal fegato ai polmoni (Qiu M. *et al.* 2022). Le LNP recanti code lipidiche alchiliche possono aumentare significativamente la fusione delle membrane per migliorare il rilascio di mRNA nel fegato (Miao L. *et al.* 2020). Negli ultimi anni gli studi al

riguardo sono aumentanti considerevolmente portando alla sintesi di molecole che hanno fornito elementi incoraggianti, come ad esempio:

- **Il 4A3-Cit**, sintetizzato utilizzando tioli insaturi, il quale ha mostrato un miglioramento di 18 volte dell'efficienza di trasfezione in vitro ed un significativo targeting epatico (Lee SM. *et al.* 2021);
- La sintesi di un **lipide cationico coniugato ad un gruppo adamantanico**, che forma una struttura a «tubolare» in grado di veicolare siRNA alle cellule T in vivo (Lokugamage MP. *et al.* 2019);
- Il lipide ionizzabile **OF-Deg-Lin**, con legami estere, genera un acido grasso non tossico che facilita il targeting della milza e la trasfezione dei linfociti B (Fenton OS. *et al.* 2017);
- L'editing della testa amminica dei lipidi con gruppi derivati dalla spermina, una poliammina, ha mostrato una maggiore veicolazione dell'mRNA in vivo evidenziando una più forte captazione cellulare, un migliore escape endosomiale e una superiore potenza di trasfezione di IL-12 siRNA nell'insufficienza epatica cauta (Ding F. *et al.* 2021);
- L'incorporazione di componenti silossaniche nella struttura chimica dei lipidi ionizzabili può indirizzare le LNP verso tessuti specifici come fegato, polmoni e milza (Xue L. *et al.* 2024);
- Ammino-poliesteri, sintetizzati a partire da ammino-alcoli terziari e lattoni, promuovono una più efficace espressione dell'mRNA nell'endotelio polmonare e negli epatociti del fegato, con il risultato di un'efficacia di distribuzione dell'mRNA sistemico quasi dieci volte superiore (Kowalski PS. *et al.* 2018);
- Le modifiche al colesterolo rappresentano un'altra opzione per il targeting passivo. Sono state formulate LNP con colesterolo esterificato, dimostrando una maggiore efficienza nella veicolazione alle cellule del microambiente epatico rispetto al colesterolo normale o ossidato (Paunovska K. *et al.* 2019). Le LNP contenenti colesteril oleato hanno veicolato in modo efficiente gli sgRNA CRISPR alle cellule endoteliali epatiche in vivo (Paunovska K. *et al.* 2018). LNP contenenti colesterolo modificato con istidinamide presentano un migliorato rilascio intracellulare dell'mRNA codificante per la proteina spike SARSCoV-2 (Jung O. *et al.* 2024).

Il targeting passivo delle LNP può essere ottenuto anche attraverso la modificazione dei fosfolipidi e dei lipidi PEGhilati. Sono state sviluppate LNP contenenti fosfolipidi legati con gruppi adamantilici, migliorando il targeting alle cellule endoteliali epatiche e alle cellule

Kupffer rispetto ai fosfolipidi non legati (Gan Z. *et al.* 2020). Modifiche alle code idrofobiche dei lipidi PEGhilati hanno determinato un maggiore tropismo delle LNP verso le BMEC (Cellule Endoteliali Microvascolari del Midollo Osseo) (Sago CD. *et al.* 2018). Inoltre, le LNP ibride, lipidi-polimeri, hanno dimostrato efficacia nel veicolare l'RNA attraverso l'epitelio ricoperto di muco delle vie aeree umane, indicando il loro potenziale nella terapia con siRNA per via inalatoria per il trattamento della fibrosi cistica (Conte G. *et al.* 2022). L'approccio SORT (targeting d'organo selettivo) prevede l'incorporazione di una molecola SORT aggiuntiva nei componenti delle LNP standard, guidandoli verso siti anatomici precisi in base alle loro caratteristiche biofisiche. La molecola SORT può modificare la carica interna e/o esterna delle LNP, consentendo la consegna mirata dell'RNA ai polmoni, alla milza o al fegato. Ad esempio, l'aggiunta di percentuali più elevate di DOTAP a carica permanentemente positiva altera il tropismo tissutale dal fegato ai polmoni.

Limitazioni del targeting passivo

Nonostante il suo potenziale, il targeting passivo presenta diverse limitazioni significative. Ad esempio, l'entità dell'effetto EPR può variare considerevolmente tra diversi tipi di neoplasie: tumori altamente vascolarizzati tendono a mostrare un effetto EPR più pronunciato rispetto a quelli meno vascolarizzati o con stroma denso (come il carcinoma pancreatico). Possono esservi differenze all'interno dello stesso tessuto tumorale con vascolarizzazione e permeabilità variabili, portando ad una distribuzione non ottimale delle LNP. Ci sono differenze tra i pazienti con neoplasie dello stesso tipo istologico che possono mostrare significative variazioni nell'effetto EPR. Diverse barriere fisiologiche possono limitare l'efficacia del targeting passivo: sebbene contribuisca alla ritenzione delle LNP, un'elevata pressione interstiziale nei tumori può anche ostacolare la penetrazione profonda delle nanoparticelle, limitandone l'accumulo principalmente alla periferia del tessuto o alle regioni perivascolari. La densa rete di collagene e altre proteine della matrice extracellulare in alcuni tumori può limitare significativamente la diffusione delle LNP dopo l'extravasazione. Infine, le regioni tumorali ipossiche e acidotiche possono influenzare la stabilità e l'efficacia delle LNP. Oltre alla modulazione delle proprietà delle LNP, alcune strategie possono contribuire a superare le limitazioni del targeting passivo. Interventi che modificano il microambiente tumorale possono migliorare l'accumulo e la penetrazione delle LNP: l'uso di agenti anti-angiogenici a basse dosi può «normalizzare» temporaneamente la vascolarizzazione nel tessuto neoplastico. Enzimi che degradano la matrice extracellulare, come la collagenasi e/o la ialuronidasi, o l'impiego di diuretici osmotici che riducono la pressione interstiziale, possono, anch'essi, migliorare la penetrazione delle LNP. Si

può, infine, ottenere un aumento dell'accumulo delle LNP in un tessuto bersaglio mediante l'utilizzo di metodiche fisiche quali l'ipertermia locale e gli ultrasuoni focalizzati che possono promuovere un incremento della permeabilità vascolare oppure l'applicazione di campi magnetici esterni con i quali è possibile «guidare» le LNP, contenenti materiali magnetici, verso siti specifici.

Targeting attivo

Per ottenere il targeting attivo occorre impiegare ligandi o molecole specifiche che si legano ai recettori o alle strutture di superficie delle cellule bersaglio, migliorando la penetrazione del sistema di rilascio (SalahpourAnarjan F. 2019). Questo approccio mira a migliorare la specificità e l'efficienza della veicolazione. Il targeting attivo sfrutta interazioni specifiche ligando-recettore per promuovere l'accumulo selettivo e l'internalizzazione delle LNP nelle cellule bersaglio. Questo processo coinvolge fattori quali:

- **Affinità e specificità:** il ligando deve legarsi con alta affinità e specificità al recettore bersaglio, minimizzando le interazioni con altri recettori;
- **Densità recettoriale:** l'efficacia del targeting attivo è generalmente proporzionale alla densità dei recettori bersaglio sulla superficie cellulare;
- **Internalizzazione recettoriale:** idealmente, il legame del ligando al recettore dovrebbe innescare l'internalizzazione del complesso LNP-recettore, aumentando l'uptake cellulare.

È importante sottolineare che il targeting attivo non sostituisce, ma complementa il targeting passivo. Necessità, infatti, dell'extravasazione: le LNP devono prima extravasare nei tessuti bersaglio (attraverso meccanismi passivi come l'effetto EPR) prima di poter interagire con i recettori sulle cellule bersaglio. Questo fenomeno determina un miglioramento dell'uptake cellulare poiché non è tanto l'aumento di accumulo totale nel tessuto bersaglio, quanto un miglioramento dell'internalizzazione cellulare e la specificità a livello cellulare. Il targeting attivo, in alcuni casi, può aiutare a superare barriere biologiche specifiche, come la barriera emato-encefalica, attraverso meccanismi di transitosi mediata da recettori.

I ligandi comuni, tra cui proteine, anticorpi, peptidi, carboidrati, aptameri, glicoproteine e vitamine, possono essere incorporati nelle LNP attraverso interazioni non covalenti o legami covalenti, principalmente con i lipidi PEGhilati (Kedmi R. *et al.* 2018) In generale, possono essere impiegate diverse strategie di coniugazione per legare i ligandi di targeting alla superficie delle LNP o dei composti lipidici. Queste strategie includono la coniugazione covalente diretta tramite carbodiimmidi ($R-N=C=N-R'$), maleimmidi ($-C(O)NHC(O)-$) o la click chemistry

(chimica a scatto) e la coniugazione non covalente attraverso interazioni elettrostatiche, idrofobiche o legami a idrogeno. Inoltre, l'inserimento nel bilayer di àncore lipidiche di lipopeptidi o lipidi modificati per siti di targeting può essere effettuato durante la produzione o dopo in LNP preformate. Le strategie ibride combinano più approcci di coniugazione per progettare RNA-LNP con migliori proprietà terapeutiche. La densità dei ligandi sulla superficie delle LNP rappresenta un parametro critico: un'alta densità di ligandi può aumentare l'avidità complessiva attraverso interazioni multivalenti, migliorando potenzialmente il legame alle cellule bersaglio; tuttavia, oltre una certa concentrazione, l'aggiunta di ulteriori ligandi può non migliorare ulteriormente il targeting e potrebbe addirittura ridurre l'efficacia interferendo con la stabilità delle LNP o aumentandone la clearance. I ligandi devono essere adeguatamente esposti oltre lo strato di PEG per interagire efficacemente con i recettori bersaglio. Questo spesso richiede l'uso di «spaziatori» PEG più lunghi per i lipidi coniugati ai ligandi rispetto ai normali lipidi PEGhilati. L'orientamento dei ligandi sulla superficie delle LNP può influenzare significativamente la loro capacità di interagire con i recettori bersaglio: tecniche che permettono di controllare il punto di attacco del ligando possono garantire un orientamento ottimale per l'interazione con il recettore, mentre l'uso di spaziatori flessibili può permettere ai ligandi di adottare l'orientamento ottimale per il legame al recettore. Questi ligandi facilitano le interazioni con le molecole della cellula bersaglio promuovendo la ritenzione nel sito specifico e la captazione delle LNP da parte delle cellule bersaglio (Zhao Z. *et al.* 2020). La modificazione degli zuccheri è emersa come uno strumento prezioso per il targeting verso tipi specifici di cellule. Il galattosio e la galNAc hanno come bersaglio le cellule del parenchima epatico, mentre la modificazione del mannosio ha come bersaglio le cellule non parenchimali e le APCs (Antigen Presenting Cells) (Yamamoto T. *et al.* 2016). Ligandi come la GalNAc e il mannosio sono stati accoppiati ai lipidi PEGhilati per un efficiente targeting delle cellule endoteliali epatiche e sinusoidali (Kim M. *et al.* 2021). Combinazioni come la mannosilazione di lipoplex a bolle con l'irradiazione a ultrasuoni hanno dimostrato una efficace consegna dell'esca NF- κ B ai TAM (macrofagi associati al tumore), migliorando la sopravvivenza in modelli animali (Kono Y. *et al.* 2014). Le LNP funzionalizzate con HA sono promettenti per il targeting attivo di cellule CD44+ in vari tipi di cancro e in alcuni tipi di cellule infiammatorie e immunitarie (Bhattacharya S. *et al.* 2020). La coniugazione di anticorpi, aptameri o peptidi alle LNP migliora la consegna mirata (Lee D. *et al.* 2023, Steffens RC. *et al.* 2023): ad esempio, è stato dimostrato che la modifica della superficie delle LNP con anticorpi mirati alle cellule T consente la consegna di mRNA per il targeting specifico dei fibroblasti cardiaci, un approccio innovativo per il trattamento dell'insufficienza cardiaca (Rurik JG. *et al.* 2022). Le LNP

funzionalizzate con l'mAb CD38 mirano specificamente alle cellule di linfoma (Weinstein S. *et al.* 2016), mentre le LNP modificate con anticorpi CD5 forniscono mRNA alle cellule CART per il trattamento delle malattie cardiache (Rurik JG. *et al.* 2022). Accoppiando le LNP con anticorpi CD31 si ottiene una terapia mirata delle cellule endoteliali polmonari (Parhiz H. *et al.* 2018). I peptidi che penetrano le cellule ricchi di arginina, combinati con ligandi di targeting, migliorano il rilascio dell'RNA (Takeuchi T. *et al.* 2016). Sono state progettate APNs (nanoparticelle che presentano l'antigene) che hanno come bersaglio le cellule T CD8+, facilitando la consegna in vivo dell'mRNA alle cellule T antigene-specifiche (Su F-Y. *et al.* 2022). Ligandi come il peptide RGD (acido arginilglicilaspartico) e il peptide HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) si sono mostrati promettenti per il targeting attivo dei tumori (Peng JQ. *et al.* 2019, Suga T. *et al.* 2017). Le LNP coniugate con ligandi specifici per i marcatori delle cellule T (CD3, CD4, CD5 e CD8) aumentano l'efficienza del targeting. Inoltre, polimeri funzionalizzati o peptidi polimerizzati con ripetizioni GALA, che forniscono fusogenicità alle APC, sono stati studiati come terapeutici per il rilascio di RNA non epatico (Lou B. *et al.* 2018). Inoltre, l'aptamero CH6 consente la somministrazione mirata di AN agli osteoblasti attraverso le LNP (Liang C. *et al.* 2015). Le LNP funzionalizzate con folato sono promettenti per la terapia del cancro al cervello e al seno (Cohen ZR. *et al.* 2015). Le LNP modificate con acido fenilboronico colpiscono le cellule tumorali interagendo con i residui di acido sialico di superficie, consentendo un legame e una captazione selettivi (Tang Q. *et al.* 2019). Le LNP modificate con imidazolo hanno come target i linfociti T splenici per la veicolazione di mRNA, facilitando l'immunoterapia con le cellule T (Zhao X. *et al.* 2020). Le LNP dotate di un lipide derivato dalla piperazina hanno come target le cellule immunitarie del fegato e della milza (Ni H. *et al.* 2022). La modificazione, con anelli eterociclici, a livello delle teste lipidiche dei componenti delle LNP migliorano la veicolazione di mRNA e la secrezione di IFN- γ , attivando successivamente la via di segnalazione IFN di tipo I nota come pathway di cGAS-STING (Miao L. *et al.* 2019, AIRC 2021). Le LNP funzionalizzate con l'alendronato offrono una veicolazione mirata alle cellule del tessuto osseo attraverso la chelazione del calcio (Tang Q. *et al.* 2019). Le LNP coniugate con vitamine veicolano ai macrofagi peptidi antimicrobici e mRNA codificante la catepsina B (Hou X. *et al.* 2020). È stata sviluppata una LNP, mirata ai tessuti linfoidei secondari, con nuovi derivati della fosfatidilserina che ha migliorato la veicolazione dell'mRNA alla milza. Le LNP che contengono fosfatidilserina hanno mostrato una maggiore captazione da parte dei macrofagi nella polpa rossa e nella zona marginale della milza (Gomi M. *et al.* 2023). In un altro studio, il lipidoide legato all'anisamide

(AA-T3A-C12) è stato impiegato per la produzione di siRNA-LNP per attivare le HSC (cellule stellate epatiche) e silenziare HSP47 nella fibrosi epatica (Han X. *et al.* 2023).

Sebbene il targeting attivo offra dei vantaggi per una somministrazione efficiente, è necessario affrontare criticità quali la variabilità della specificità del ligando-recettore tra i pazienti, l'interferenza della corona biomolecolare e la formulazione di un complesso. La ricerca continua di combinazioni efficaci ligando-recettore, unitamente alla combinazione di più ligandi di targeting sulle superfici delle LNP, può migliorare la specificità e l'affinità di legame ottimizzando questa strategia.

Applicazioni cliniche e precliniche

Il targeting attivo è stato studiato per numerose applicazioni:

- **Targeting tumorale:** numerosi studi hanno utilizzato ligandi come anticorpi anti-HER2, peptidi RGD (acido arginilglicilaspartico) o acido folico per direzionare le LNP verso cellule tumorali che sovraesprimono i rispettivi recettori;
- **Targeting epatico cellulo-specifico:** ligandi come GalNAc possono direzionare selettivamente le LNP verso gli epatociti piuttosto che verso le cellule di Kupffer all'interno del fegato;
- **Attraversamento di barriere biologiche:** ligandi come transferrina o peptidi penetranti la barriera emato-encefalica sono stati utilizzati per migliorare la veicolazione al cervello;
- **Targeting di cellule immunitarie:** anticorpi o altri ligandi specifici per recettori espressi su cellule immunitarie possono migliorare l'efficacia di vaccini o immunoterapie basate su LNP.

Limitazioni e Prospettive

Come per il targeting passivo, barriere quali la pressione interstiziale elevata e la matrice extracellulare densa possono limitare l'accesso dei ligandi ai loro recettori bersaglio. L'espressione dei recettori bersaglio può variare significativamente tra pazienti, ad esempio, all'interno dello stesso tumore e durante la progressione della malattia. In alcuni casi, ligandi endogeni possono competere con i ligandi di targeting per il legame ai recettori bersaglio. Alcuni ligandi, particolarmente anticorpi o peptidi di grandi dimensioni, possono indurre risposte immunitarie che ne limitano l'efficacia in somministrazioni ripetute. Infine, l'aggiunta di ligandi di targeting aumenta la complessità della produzione e della caratterizzazione delle LNP, con potenziali implicazioni regolatorie. Per superare queste limitazioni si stanno

sviluppando diverse strategie come l'uso di combinazioni di ligandi che può permettere il targeting simultaneo di diverse popolazioni cellulari o di superare l'eterogeneità dell'espressione recettoriale. Sistemi che espongono diversi ligandi in sequenza, in risposta a stimoli specifici, per migliorare la specificità e l'efficacia del targeting. Combinare il targeting attivo con sistemi di rilascio sensibili a stimoli (pH, enzimi, temperatura) può migliorare ulteriormente la specificità. Per concludere, l'analisi dell'espressione recettoriale in campioni individuali di pazienti può guidare la selezione di ligandi di targeting ottimali per terapie personalizzate.

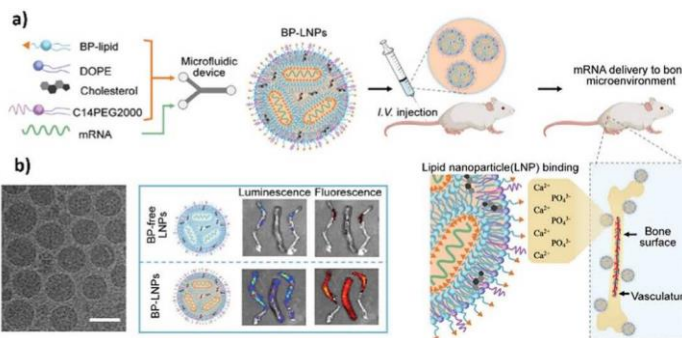
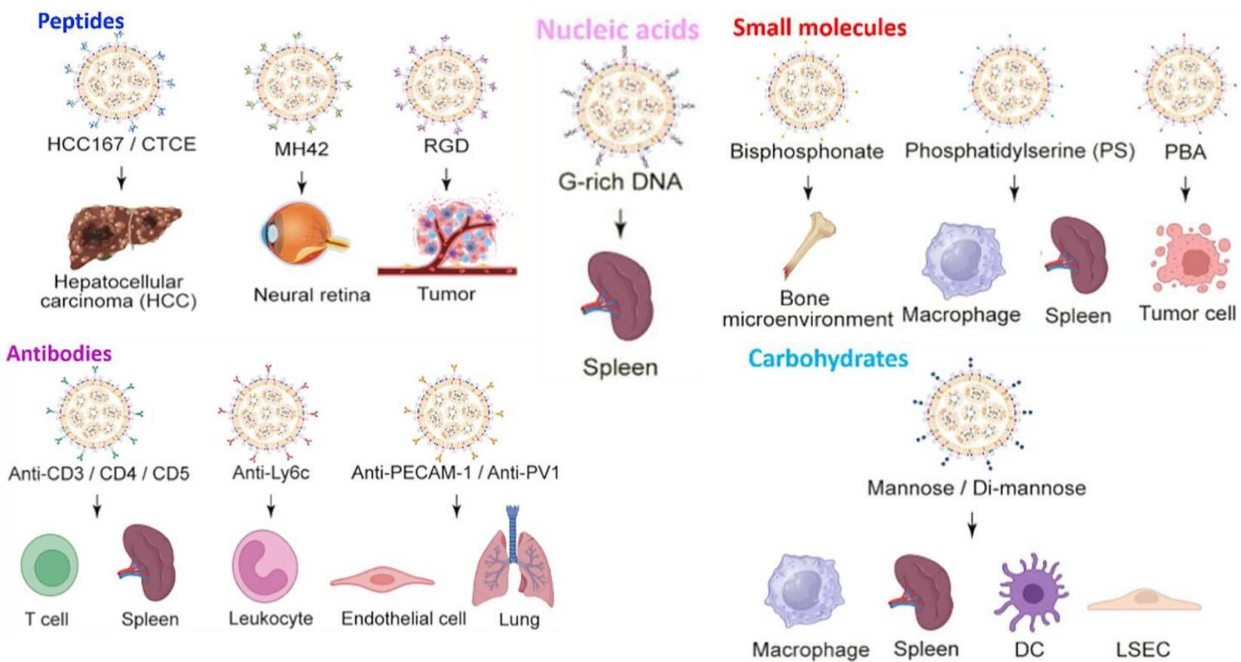
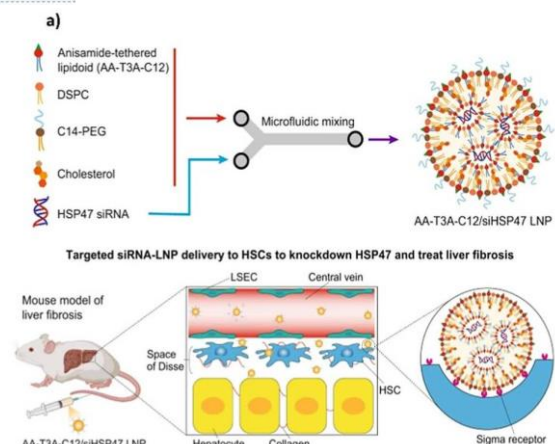
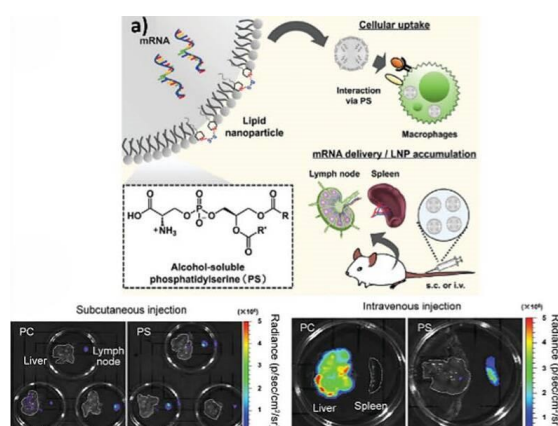


Fig 6: Sopra: comuni ligandi di targeting utilizzati per la veicolazione specifica di LNP-RNA. **A sx e sotto:** esempi di modifiche della superficie delle LNP per il targeting attivo: componente lipidico bisfosfonato (BP) per la veicolazione di mRNA nel microambiente osseo; LNP caricate con fosfatidilserina per la veicolazione dell'mRNA nei tessuti linfoidi secondari; nanoparticelle lipidiche legate ai ligandi per il rilascio di RNA nel trattamento della fibrosi epatica



6. MODALITÀ DI PENETRAZIONE INTRACELLULARE DELLE LNP

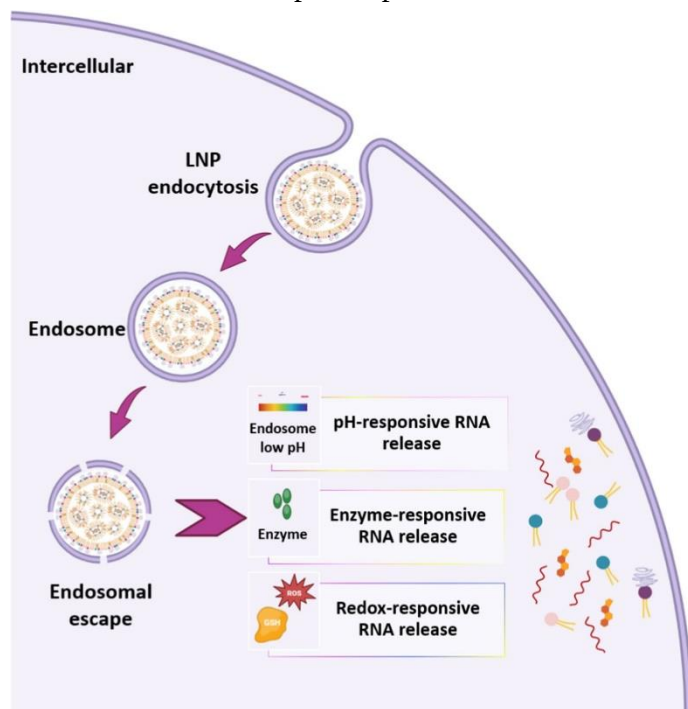
La veicolazione efficace degli RNA terapeutici richiede non solo che le nanoparticelle lipidiche raggiungano i tessuti bersaglio, ma anche che penetrino all'interno delle cellule target e rilascino il loro carico nel citoplasma, dove l'RNA può esercitare la sua funzione. I vettori non virali sono tipicamente internalizzati attraverso l'endocitosi che rappresenta il principale meccanismo attraverso cui le LNP entrano nelle cellule. Questo processo coinvolge l'invaginazione della membrana plasmatica attorno alle LNP, seguita dalla formazione di vescicole intracellulari che contengono le nanoparticelle. Esistono diverse vie endocitiche, ciascuna con caratteristiche e regolazioni distinte, come l'endocitosi mediata da clatrina (CME), quella mediata da caveolina (CvME) e la macropinocitosi (El-Sayed A. *et al.* 2013). L'efficienza dell'endocitosi è influenzata dalle proprietà chimico-fisiche delle LNP, dai tipi e dalla densità recettoriale, con recettori come LDL e ASGPR noti per le loro elevate capacità di captazione e dalla corona proteica (Hu J. *et al.* 2014). Una volta internalizzate, attraverso diverse vie endocitiche, le particelle vengono trasportate agli endosomi, subiscono la degradazione e infine vengono dirette ai lisosomi. Le LNP, dopo internalizzazione, si trovano confinate all'interno di vescicole endosomiali. Per esercitare la loro funzione terapeutica, l'RNA caricato nelle LNP deve essere rilasciato nel citoplasma. Tale fenomeno prende il nome di escape endosomiale. I meccanismi di trasferimento intracellulare, indipendenti dall'endocitosi, includono la fusione delle membrane, come osservato in virus quali il Sendai virus (Kaneda Y. *et al.* 2002). Le vescicole endocitiche subiscono un processo di maturazione caratterizzato da cambiamenti progressivi nella composizione, nel pH e nella funzione. Immediatamente dopo l'internalizzazione, le LNP si trovano in endosomi precoci, caratterizzati da un pH moderatamente acido di circa 6.5-6.0; gli endosomi precoci fungono da stazione di smistamento, da cui il cargo può essere riciclato alla membrana plasmatica, trasportato al Golgi o avviato verso la degradazione. Con la progressione della maturazione, gli endosomi precoci si trasformano in endosomi tardivi dove il pH scende a circa 5.5-5.0 e la membrana si arricchisce in lipidi anionici come fosfatidilserina e LBPA (acido lisobisfosfatidico), che possono interagire con i lipidi ionizzabili delle LNP. Il destino finale della via endocitica degradativa sono i lisosomi con un pH acido di circa 4.5-5.0. Sono caratterizzati dalla presenza di numerosi enzimi idrolitici, capaci di degradare la maggior parte delle macromolecole biologiche, e costituiscono un ambiente ostile per l'RNA terapeutico. Per un'efficace veicolazione dell'RNA, le LNP devono sfuggire dal compartimento endosomiale prima della fusione con i lisosomi, idealmente a livello di endosomi precoci o tardivi. L'efficienza dell'escape endosomiale, pertanto, è fondamentale per il successo della terapia. Solo una piccola parte delle LNP riesce a sfuggire dai compartimenti (Wittrup A. *et*

al. 2015). Sebbene il meccanismo preciso non sia del tutto chiaro, i lipidi con carica positiva possono potenziare le interazioni elettrostatiche e i fenomeni di fusione con le membrane endosomali con carica negativa, rilasciando le molecole di mRNA nel citoplasma (Meng C. *et al.* 2021). Le strategie per migliorare l'escape endosomiale prevedono l'utilizzo di polimeri sensibili al pH, lipidi o peptidi fusogenici e la progettazione di ICL più potenti e sicuri. L'escape endosomiale può essere ottimizzata regolando il pKa dei lipidi ionizzabili (Sabnis S *et al.* 2018). Inoltre, le code lipidiche possono influenzare l'escape endosomiale delle LNP (Lee SM. *et al.* 2021): ad esempio, i lipidi con code ramificate dimostrano una migliore fuoriuscita endosomiale rispetto a quelli con code lineari, grazie ad una maggiore protonazione a pH endosomiale (Hajj KA. *et al.* 2019). Inoltre, il tipo di lipidi helper e il loro rapporto influenzano l'escape endosomiale (Kim J. *et al.* 2020). Tra i lipidi helper, il DOPE dimostra un'elevata efficacia di veicolazione dell'RNA in vitro inducendo la fusione con la membrana endosomiale; tuttavia, in vivo, la fusione avviene con gli eritrociti riducendo l'efficienza (Sakurai F. *et al.* 2001). La PEI (polietilenimina) facilita l'escape endosomiale attraverso l'effetto «spugna protonica» (proton sponge), inducendo la rottura degli endosomi a causa dell'afflusso di ioni cloruro (Akinc A. *et al.* 2005). Nello specifico i gruppi amminici protonabili, sia della PEI che degli ICL, tamponano il pH acido endosomiale promuovendo una entrata di controioni (Cl⁻) che porta ad un aumento della pressione osmotica e rottura della membrana. Inoltre, i peptidi fusogenici come GALA favoriscono il rilascio endosomiale sensibile al pH, mentre i sali inorganici come il fosfato di calcio favoriscono la fuoriuscita endosomiale attraverso l'acidificazione e la dissoluzione (Hu Y. *et al.* 2013). Esistono tecniche grazie alle quali è possibile ottenere un'efficiente penetrazione di RNA, senza richiedere la fuoriuscita dall'endosoma, creando pori temporanei nella membrana cellulare mediante l'uso di forze all'interfaccia esterna. Queste tecniche includono l'elettroporazione, le microbolle, l'applicazione di ultrasuoni e l'idrodinamica che prevede l'iniezione rapida di un grande volume di soluzione contenente RNA (Fumoto S. *et al.* 2012, Hu Y. *et al.* 2013, Chang DC. *et al.* 1990). Il trasporto nucleare di RNA terapeutici è fondamentale per influenzare l'attività genica intranucleare; è stato dimostrato che il chitosano coniugato con un peptide NLS (Nuclear Localization Signal) ha trasportato efficacemente l'acido nucleico a livello nucleare (Tammam SN *et al.* 2015).

Un nanovettore ideale deve caricare strettamente l'mRNA, prima di entrare nel citoplasma per una protezione e una distribuzione ottimali, e poi rilasciarlo rapidamente una volta nel citoplasma. Vari metodi, come la FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), l'elettroforesi, la citometria a flusso, consentono di studiare i meccanismi e le cinetiche di

dissociazione dell'mRNA dalle LNP permettendo di capire la posizione, l'estensione e la velocità di rilascio dell'mRNA dalle LNP e di correggere i livelli di espressione genica.

Per ottenere un disimballaggio controllato delle RNA-LNP, e regolare il comportamento in vivo, sono stati sviluppati nanovettori reattivi agli stimoli in grado di rispondere a trigger intracellulari come il pH, il potenziale redox, l'ATP, enzimi e a stimoli esterni come campi



magnetici, luce ed ultrasuoni (Lin M. *et al.* 2023). Questi nanovettori possono incapsulare stabilmente l'RNA in ambienti fisiologici e in siti non bersaglio, ma rilasciano il carico di RNA in seguito a cambiamenti strutturali innescati da stimoli specifici nelle cellule bersaglio (Yan Y. *et al.* 2022, Torchilin VP. 2014) (Fig 7. a sinistra). Le LNP reattive al pH rimangono stabili a pH fisiologico, ma diventano cariche positivamente in ambienti acidi, migliorando il rilascio

del carico e l'escape endosomiale. Questa adattabilità favorisce una somministrazione mirata e riduce la citotossicità (Liu S. *et al.* 2022). Utilizzando una strategia di idrolisi catalizzata dal pH, è stato progettato un lipide ionizzabile auto-degradabile (ssPalmO-Phe) contenente legami disolfuro ed esteri fenilici. Questo espediente promuove la degradazione della LNP e il rilascio di mRNA migliorando l'efficienza di trasfezione (Tanaka H. *et al.* 2020). Inoltre, il DOPDEDA, un nuovo derivato lipidico, esprime cariche diverse a vari valori di pH, garantendo la stabilità a pH fisiologico senza l'uso di lipidi PEGhilati. Le LNP con DOPDEDA sopprimono efficacemente l'espressione dell'mRNA e della proteina PLK1 e migliorano la veicolazione di siRNA con apoE3 (Hirai Y. *et al.* 2020). Sono stati studiati coloranti BODIPY PEGhilati (PBD) come agenti stabilizzanti di superficie per le formulazioni a base di LNP per il rilascio di mRNA sensibile al pH; tali LNP hanno mostrato un migliore rilascio di mRNA a livello epatico (Xiong H. *et al.* 2020). È stata sviluppata una LNP sensibile al pH, chiamata BAMPA-O16B, per migliorare il rilascio di siRNA e l'escape endosomiale nelle cellule di GBM (Glioblastoma Multiforme). Questa LNP ha veicolato efficacemente siRNA contro CD47 e PD-L1, migliorando l'immunità antitumorale dipendente dalle cellule T nei topi (Liu S. *et al.* 2022). Il potenziale redox più elevato nel citoplasma, rispetto all'ambiente extracellulare, può innescare

il rilascio di RNA. La maggiore concentrazione di GSH nel citoplasma facilita la rottura dei legami disolfuro all'interno delle strutture delle LNP consentendo una migliore terapia (Hu Y. *et al.* 2013). Un lipide ionizzabile con un linker degradabile (4A3-SCC-PH) e code ramificate ha migliorato in modo significativo la trasfezione dell'mRNA, mostrando un miglioramento di 15,5 volte nella veicolazione dell'mRNA FLuc (Firefly Luciferase); ciò è dovuto alle catene alchiliche asimmetriche attaccate al tioetere e al legame disolfuro GSH responsivo, creando una forma conica che ha facilitato un'efficiente distribuzione dell'mRNA nelle cellule maligne (Chen Z. *et al.* 2023).

I ROS sono significativamente più elevati nelle cellule tumorali rispetto alle cellule normali, rendendo queste entità chimiche uno stimolo specifico per innescare il rilascio di mRNA (Sies H. *et al.* 2020). A tal proposito è stata creata una formulazione a base di LNP redox-responsive caricata con mRNA codificante TP53 per indurre una maggiore apoptosi in cellule Hep3B dell'epatocarcinoma umano e cellule H1299 del carcinoma polmonare non a piccole cellule con deficit di TP53 in vitro e in vivo (Kamath D. *et al.* 2024). Allo stesso modo, l'estere dell'acido borico (Liu XX. *et al.* 2016, Wang QY. *et al.* 2020, Ruan C. *et al.* 2018) e i legami tiochetali (Zheng N. *et al.* 2021) possono creare LNP sensibili ai ROS per il rilascio controllato di RNA. Infatti è stato sintetizzato un lipide ionizzabile, il BAmP-TK-12, contenente gruppi tiochetali degradabili dai ROS che inducono l'ossidazione e la degradazione dei gruppi TK-12 nelle LNP a base di BAmP-TK-12, facilitando il rilascio di mRNA e la successiva traduzione. Questa strategia ha consentito di veicolare con successo l'mRNA che codifica la proteasi DUF5 per la deplezione del mutante RAS, sopprimendo la crescita tumorale in topi portatori di tumore A549 (linea cellulare di adenocarcinoma polmonare umano usato in ricerca) e dimostrando il potenziale delle LNP reattive ai ROS per la veicolazione di mRNA specifico per il tumore (Cai W. *et al.* 2022, Huang P. *et al.* 2024). I nanocarrier responsivi agli enzimi possono innescare il rilascio dell'RNA, la dissociazione del vettore e un migliore uptake cellulare negli ambienti tumorali. Ad esempio, i polimeri cationici sensibili alle esterasi possono invertire la loro carica per rilasciare RNA terapeutico in presenza di tali enzimi intracellulari (Qiu N. *et al.* 2018). Analogamente, i nanocarriers sensibili alla metalloproteinasi di matrice (MMP) possono rilasciare il loro carico utile specificamente nei tessuti tumorali, migliorando l'efficacia terapeutica (Klassen LMB. *et al.* 2018). Le LNP responsive all'ATP sfruttano gli elevati livelli di questa molecola nelle cellule tumorali per promuovere il rilascio di RNA mirato ed efficiente. Il gruppo dell'acido fenilboronico, in questi nanocarrier, può formare e rompere legami estere con l'ATP, portando alla dissociazione della nanoparticella e al rilascio di RNA (Yoshinaga N. *et al.* 2017). Altri esempi includono polimeri modificati con acido fenilboronico e PEI reticolate

con alginato, che aumentano l'efficienza di trasfezione e il silenziamento genico nelle cellule tumorali (Tang X. *et al.* 2020, Zhou Z. *et al.* 2018). Le LNP reattive agli stimoli per il rilascio di RNA sono progettate per rispondere a più stimoli, migliorando l'accuratezza e la specificità. Ad esempio, è stato sviluppato un poliplesso a doppia risposta pH/redox per la veicolazione di MDR1 (Multi Drug Resistance 1) siRNA e doxorubicina, che rilascia il suo carico utile in ambienti acidi e ad alta concentrazione di GSH, dimostrando una potente efficacia antitumorale (Gao Y. *et al.* 2019). Analogamente è stata progettata una nanoparticella reattiva ai livelli di pH e H₂O₂ nei microambienti tumorali per controllare selettivamente l'editing genico CRISPR/Cas13a (Zhang Z. *et al.* 2019). Anche i sistemi reattivi agli stimoli esterni sono in fase di studio per la veicolazione dell'RNA. Le LNP sensibili ai campi magnetici possono accumularsi nei siti tumorali se guidate da un campo magnetico esterno. Studi condotti con LNP di silice mesoporosa magnetica e con LNP magnetiche di Fe₃O₄ rivestite di polidopamina hanno evidenziato un aumento dell'attecchimento nell'area tumorale e dell'efficacia terapeutica (Wang Z. *et al.* 2018, Wang J. *et al.* 2021). I sistemi reattivi alla luce UV, come i dendrimeri PAMAM ancorati alla cumarina, rilasciano il loro carico utile in seguito ad esposizione ai raggi UV (Wang H. *et al.* 2018). È stata sviluppata una strategia chiamata LASER (Rilascio Endosomiale di siRNA Attivato dalla Luce) utilizzando LNP porfiriniche che generano ROS quando vengono esposte alla luce dell'infrarosso vicino, catalizzando la rottura della membrana e il rilascio endosomiale di siRNA. Questo metodo ha ottimizzato l'escape del siRNA e il raggiungimento del bersaglio nelle cellule di cancro alla prostata. In vivo, le LNP porfiriniche unitamente a quelle d'oro, hanno confermato l'effetto LASER, migliorando il rilascio terapeutico dell'RNA (Mo Y. *et al.* 2023). I nanocarrier attivati dalla luce ultravioletta impiegano fotosensibilizzatori per produrre ROS, promuovendo l'escape endosomiale e il rilascio dell'RNA (Wang J. *et al.* 2018). Un altro esempio è rappresentato dagli acidi nucleici sferici fotolabili che si disassemblano e rilasciano siRNA in seguito alla produzione di ROS innescata dall'infrarosso vicino (Chen L. *et al.* 2021). La veicolazione dell'RNA adiuvata con gli ultrasuoni sfrutta questi ultimi per dirigere il materiale genetico verso i siti target, migliorando la penetrazione cellulare grazie all'aumento della permeabilità delle membrane. I nanocarrier ROS, potenziati dagli ultrasuoni e caratterizzati dalla presenza di sonosensibilizzanti come IR780, facilitano il rilascio di RNA attraverso la generazione di ROS (Zhang C. *et al.* 2022).

La biodegradabilità gioca un ruolo fondamentale nel ridurre la tossicità dei nanovettori e le LNP composte da lipidi ionizzabili che degradano in metaboliti non tossici sono favorite. L'introduzione di legami estere aumenta la biodegradabilità dei lipidi, come dimostrato per

lipidi SM-102 (Hassett KJ. *et al.* 2019) e ALC-0315 i quali sono utilizzati nei vaccini COVID-19 (Kim J. *et al.* 2021). La combinazione di legami esterei e disolfuro accelera ulteriormente la degradazione. È stata sintetizzata un'ampia gamma di lipidoidi degradabili creati tramite l'aggiunta di alchilammine coniugate alle code di alchil-acrilato. I lipidoidi sono stati formulati con colesterolo, DSPC, PEG2000-DMG e siRNA per la preparazione di LNP. È stato scoperto che particolari parametri strutturali e valori di pKa forniscono la possibilità di prevedere oltre il 95% del silenziamento delle proteine in vivo, indicando che questi criteri possono servire come alternativa ai costosi saggi di coltura cellulare e ai test sugli animali (Whitehead KA. *et al.* 2014). Altri progressi includono il distacco del PEG sensibile al pH (Guan X. *et al.* 2017) e l'impiego di materiali come il fosforo nero (Chen L. *et al.* 2018) che si degradano in condizioni specifiche, rilasciando efficacemente il loro carico. L'uso di componenti biodegradabili come l'acido ialuronico (Zhao Y. *et al.* 2018), i polidisolfuri (Zhang X. *et al.* 2021), il PEI reticolato con tiochetale (Wang J. *et al.* 2018), nanobolle modificate con PEI (Shapiro MG. *et al.* 2014) e materiali reattivi come gli esteri dell'acido borico (Liu XX. *et al.* 2016) migliorano l'efficacia e la sicurezza della somministrazione di RNA. Pertanto, le LNP opportunamente progettate possono garantire un controllo preciso della somministrazione mirata di RNA, mantenendo la biocompatibilità e la sicurezza (Wang B. *et al.* 2024).

Destino dell'RNA

Una volta che l'RNA è stato rilasciato nel citoplasma in seguito all'escape endosomiale, deve raggiungere il suo sito d'azione intracellulare e mantenere la sua integrità funzionale. In primis l'RNA deve dissociarsi dai lipidi ionizzabili per essere funzionalmente attivo e ciò può avvenire attraverso diversi meccanismi come la diluizione nel citoplasma che favorisce la dissociazione dei complessi RNA-lipidi, la competizione per il legame con gli ICL tra l'RNA e proteine citosoliche endogene, la neutralizzazione degli ICL a pH citosolico (~7.2) che riduce l'interazione elettrostatica con l'RNA, la degradazione dei lipidi ad opera di lipasi citosoliche specialmente quelli contenenti legami labili come esteri. Una volta libero nel citoplasma, l'RNA terapeutico interagisce con pool enzimatici cellulari specifici a seconda del suo tipo e funzione.

7. MEDICINALI A RNA APPROVATI PER USO UMANO

I progressi nella comprensione della biologia dell'RNA e nello sviluppo di sistemi di veicolazione efficaci, in particolare le nanoparticelle lipidiche (LNP), hanno portato all'approvazione di diversi medicinali a base di RNA per uso clinico. Nel 2017 e nel 2018 il primo prodotto a base di RNA è stato approvato rispettivamente in Usa e in Europa e, sulla scia di questo primo successo, ma soprattutto sulla spinta della pandemia da COVID-19, nel 2021 sono stati approvati i primi vaccini a base di mRNA veicolato mediante nanoparticelle lipidiche. La popolarità dei vaccini a RNA ha quindi spinto tanti gruppi di ricerca, e soprattutto molte aziende, ad investire su vettori lipidici non virali soprattutto grazie alle tecniche di produzione relativamente semplici ed economiche (De Rosa G. 2024 fivs.org).

7.1 Medicinali a base di siRNA

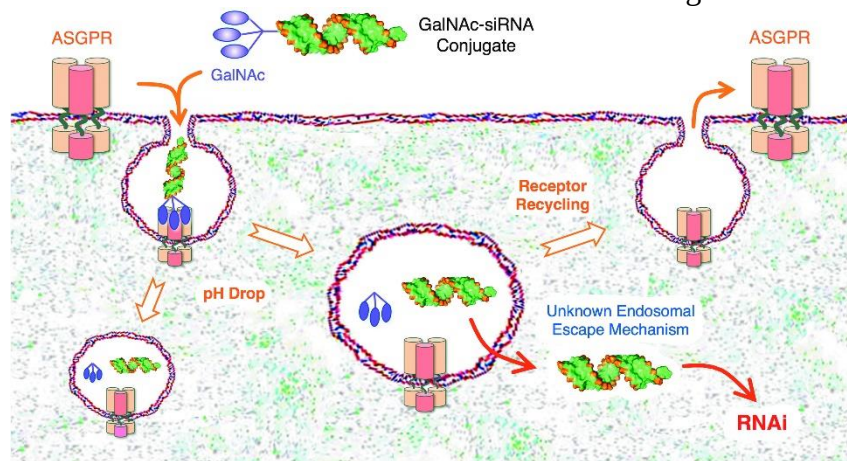
Gli small interfering RNA (siRNA) sono stati tra i primi tipi di RNA terapeutici a raggiungere l'approvazione clinica grazie alla loro capacità di silenziare specificamente geni target attraverso il meccanismo dell'RNA interference (RNAi).

Patisiran (Onpattro®)

Patisiran rappresenta una pietra miliare nella storia dei medicinali a RNA, essendo il primo farmaco basato su siRNA approvato dalla FDA (2018) e dall'EMA (2018) (De Rosa G. 2024 fivs.org). Indicato nel trattamento dell'amiloidosi ereditaria da transtiretina (hATTR) con polineuropatia negli adulti con malattia in stadio 1 o 2 (Adams D. *et al* 2018). Il Patisiran è un siRNA che silenzia specificamente il gene della transtiretina (TTR), una proteina prodotta principalmente dal fegato. Nelle forme mutate, la TTR può accumularsi formando depositi di amiloide in vari tessuti, particolarmente nei nervi periferici e nel cuore. Riducendo la produzione epatica di TTR, Patisiran diminuisce la formazione di nuovi depositi amiloidi (Rizk M. *et al.* 2019). Il siRNA di Patisiran è costituito da 21-23 nucleotidi per filamento, con modifiche 2'-O-metile per aumentare la stabilità e ridurre l'immunogenicità (Garber K. 2018). Patisiran utilizza LNP di prima generazione per veicolare il siRNA agli epatociti. La formulazione include: DLin-MC3-DMA come lipide ionizzabile, PEG2000-C-DMG per la stabilizzazione, DSPC e colesterolo come lipidi strutturali (Akinc A. *et al.* 2019). Le LNP si accumulano principalmente nel fegato attraverso l'effetto di prima filtrazione epatica e l'interazione con recettori delle lipoproteine (principalmente LDLR) mediata da ApoE (Sehgal A. *et al.* 2013).

Givosiran (Givlaari®)

Givosiran è stato il secondo farmaco basato su siRNA approvato dalla FDA (2019) e dall'EMA (2020) (De Rosa G. 2024 fivs.org). Indicato nel trattamento della porfiria epatica acuta (AHP) in adulti e adolescenti di età pari o superiore a 12 anni (Scott LJ. 2020). Il Givosiran silenzia il gene dell'acido aminolevulinico sintasi1 (ALAS1), l'enzima limitante nella biosintesi dell'eme nel fegato. Nelle porfirie epatiche acute, l'upregolazione di ALAS1 porta all'accumulo di intermedi tossici (ALA e PBG) responsabili degli attacchi acuti. Riducendo l'espressione di ALAS1, Givosiran diminuisce la produzione di questi intermedi tossici (Sardh E. *et al.* 2019). È costituito da un siRNA con modifiche GalNAc per il targeting epatico e modifiche chimiche (2'-F, 2'-OMe, legami fosforotioato) per aumentare la stabilità (Zimmermann TS. *et al.* 2017). Il sistema di veicolazione a differenza di Patisiran non utilizza LNP ma un coniugato siRNA-GalNAc. Il GalNAc (N-acetilgalattosamina) si lega specificamente al recettore dell'asialoglicoproteina (ASGPR) espresso sugli epatociti, permettendo un targeting epatico diretto (Springer AD. *et al.* 2018).



Il coniugato siRNA-GalNAc viene rapidamente captato dagli epatociti attraverso l'interazione GalNAc-ASGPR, con minima distribuzione in altri tessuti (Sehgal A. *et al.* 2013).

Altri farmaci approvati a base di siRNA, ma non veicolati da LNP sono:

- **Lumarisan (Oxulmo®)** approvato dalla FDA e dall'EMA nel 2020 per il trattamento dell'iperossaluria primaria di tipo 1 (PH1) in tutte le fasce di età (De Rosa G. 2024 fivs.org, Garrelfs SF. *et al.* 2021).;
- **Inclisiran (Leqvio®)** approvato dall'EMA nel 2020 e dalla FDA nel 2021 per il trattamento dell'ipercolesterolemia (EMA, 2020);
- **Vutrisiran (Amvuttra®)** approvato dalla FDA e dall'EMA nel 2022 come evoluzione di Patisiran. Indicato nel trattamento dell'amiloidosi ereditaria da transtiretina (hATTR) con polineuropatia negli adulti (Alnylam® Pharmaceuticals, 2022).

7.2 Medicinali a base di mRNA

I vaccini verso il COVID-19 rappresentano il primo successo commerciale, su larga scala, per i medicinali a base di mRNA, aprendo la strada a numerose altre applicazioni terapeutiche (De Rosa G. 2024 fivs.org).

Vaccini COVID-19: Tozinameran (Comirnaty®) ed Elasmomeran (Spikevax®)

I vaccini a mRNA di Pfizer/BioNTech (Tozinameran/Comirnaty) e Moderna (Elasomeran/Spikevax) sono stati approvati per uso in emergenza nel 2020 e hanno ricevuto successivamente l'approvazione completa. Possiedono come indicazione terapeutica l'immunizzazione attiva per la prevenzione di COVID-19 causata dal virus SARS-CoV-2 (EMA 2020, EMA 2021). Questi vaccini contengono mRNA, che codifica per la proteina spike del SARS-CoV-2, incapsulato in LNP. Dopo la somministrazione, l'mRNA viene tradotto nelle cellule dell'ospite, producendo la proteina spike che induce una risposta immunitaria protettiva, sia umorale (anticorpi) che cellulare (cellule T). L'mRNA è modificato con N1-metilpseudouridina per aumentare la stabilità e ridurre l'immunogenicità, con cap 5' e coda poli(A) ottimizzati. Entrambi i vaccini utilizzano LNP di nuova generazione composte da:

- Lipidi ionizzabili: ALC-0315 (Comirnaty) o SM-102 (Spikevax);
- Lipidi PEGhilati: ALC-0159 (Comirnaty) o PEG2000-DMG (Spikevax);
- Colesterolo e fosfolipidi (DSPC)

Vengono somministrati mediante iniezione intramuscolare, tipicamente in un regime a due dosi (Comirnaty: 30 µg a distanza di 21 giorni; Spikevax: 100 µg a distanza di 28 giorni) (AIFA 2020, AIFA 2021). Inizialmente richiedevano conservazione a temperature ultra-basse (-70°C per Comirnaty, -20°C per Spikevax), con successive formulazioni più stabili a temperature di refrigerazione (2-8°C). Gli studi pivotal di fase 3 hanno dimostrato un'efficacia del 95% (Comirnaty) e 94,1% (Spikevax) nella prevenzione di COVID-19 sintomatico, con efficacia ancora maggiore contro malattia grave, ospedalizzazione e morte (Polack FP. *et al.* 2020, Baden LR. *et al.* 2021). Questi vaccini hanno rappresentato uno strumento fondamentale nella risposta alla pandemia di COVID-19, con miliardi di dosi somministrate in tutto il mondo.

Altri medicinali a base di mRNA in fase avanzata di sviluppo

Sebbene i vaccini COVID-19 siano attualmente gli unici medicinali a base di mRNA approvati, numerosi altri candidati sono in fase avanzata di sviluppo clinico.

Vaccini profilattici

Tra i vaccini influenzali vi sono candidati a mRNA contro l'influenza stagionale e pandemica in fase 2/3 di sviluppo che stanno mostrando potenziale per un rapido adattamento ai ceppi circolanti e maggiore efficacia rispetto ai vaccini tradizionali.

Vi sono, inoltre, vaccini RSV (virus respiratorio sinciziale) anch'essi a mRNA i cui candidati sono in una fase avanzata di sviluppo con dati preliminari promettenti. Infine, i vaccini combinati, ovvero vaccini a mRNA che codificano per antigeni di multipli patogeni (es. influenza + COVID-19) in fase di sviluppo.

Vaccini terapeutici

Troviamo tra questi i vaccini oncologici personalizzati: farmaci a mRNA personalizzati che codificano per neoantigeni tumorali specifici del paziente, in fase 2 di sviluppo per il trattamento del melanoma e di altri tumori solidi. Poi vi sono vaccini per malattie autoimmuni caratterizzati dall'impegno di mRNA per indurre tolleranza immunitaria in malattie come sclerosi multipla e diabete di tipo 1.

Terapie di sostituzione proteica

Per il trattamento dei deficit enzimatici: terapie a base di mRNA per malattie da accumulo lisosomiale e altri deficit, che prevedono la somministrazione ripetuta di mRNA codificante per l'enzima mancante. Sono in fase di studio anche terapie a base di mRNA per la produzione di proteine terapeutiche secrete, come fattori di crescita o anticorpi.

7.3 Medicinali a base di CRISPR/Cas9

La tecnologia CRISPR/Cas9 rappresenta un approccio rivoluzionario per l'editing genomico, con il potenziale di correggere direttamente mutazioni genetiche. Il primo medicinale basato su CRISPR/Cas9, Exa-cel (Casgevy®), è stato approvato dalla FDA e dall'EMA nel 2023 (EMA, 2023) per il trattamento di pazienti di età $\geq$ ai 12 anni affetti anemia falciforme (SCD) con crisi vaso-occlusive ricorrenti e il trattamento di pazienti di età $\geq$ ai 12 anni con β -talassemia trasfusione-dipendente (TDT) (EMA, 2023).

Diversi altri farmaci, basati su CRISPR/Cas9, sono in fase di sviluppo clinico, tra cui NTLA-2001 che rappresenta la prima terapia CRISPR in vivo somministrata sistemicamente, la quale utilizza LNP per veicolare CRISPR/Cas9 agli epatociti per il trattamento dell'amiloidosi da transtiretina.

7.4 Medicinali a base di ASO (Oligonucleotidi Antisenso)

Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) rappresentano un'altra importante classe di medicinali a RNA, che agiscono legandosi specificamente a RNA messaggeri target attraverso complementarità di sequenza, inducendo la loro degradazione o alterando il loro splicing. Esempi di farmaci approvati sono rappresentati ad esempio da Nusinersen (Spinraza®) per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale (SMA) in pazienti di tutte le età (EMA, 2017), Eteplirsen (Exondys 51®) per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e Inotersen (Tegsedi®) per il trattamento dell'amiloidosi ereditaria da transtiretina (hATTR) con polineuropatia negli adulti in stadio 1 o 2 (EMA, 2018).

I medicinali a RNA hanno compiuto progressi straordinari nell'ultimo decennio, passando da concetto teorico a realtà clinica con diverse approvazioni in differenti aree terapeutiche.

I farmaci a base di siRNA hanno trovato particolare successo per indicazioni epatiche, sfruttando il tropismo naturale delle LNP o dei coniugati GalNAc per il fegato. I vaccini a mRNA hanno rivoluzionato la risposta alla pandemia di COVID-19, mentre gli ASO hanno dimostrato utilità in malattie neurologiche e muscolari. La recente approvazione della prima terapia basata su CRISPR-Cas/9 segna l'inizio di una nuova era per le terapie di editing genomico.

Nonostante questi successi permangono sfide significative, tra cui: veicolazione efficiente verso tessuti non epatici, riduzione dell'immunogenicità, miglioramento della stabilità e della durata d'azione, riduzione dei costi per aumentare l'accessibilità globale.

8. PROSPETTIVE CLINICHE PER NUOVE TERAPIE

Le nanoparticelle lipidiche sono i vettori non virali approvati che incapsulano e trasportano gli RNA terapeutici alle cellule e ai tessuti bersaglio proteggendoli dalla degradazione e dalle reazioni immunitarie. Le modifiche chimiche possono ridurre l'immunogenicità degli RNA terapeutici. Inoltre, la stabilità dell'RNA e la funzione biologica, come l'espressione genica, possono essere migliorate da sequenze di RNA modificate chimicamente. Il successo dei vaccini a mRNA COVID-19 a base di LNP ha stimolato un maggiore interesse e investimenti nelle tecnologie a base di mRNA, favorendo il potenziale commerciale dei sistemi di somministrazione basati sulle LNP (Haghighi E. *et al.* 2024). Le LNP consentono la terapia genica per diverse condizioni mediche, come la somministrazione di siRNA per ridurre i livelli di colesterolo, l'uso del fegato come bioreattore per produrre proteine terapeutiche e lo sviluppo di vaccini a base di mRNA per il cancro e le malattie infettive. Tra questi figurano vaccini innovativi a base di mRNA, immunoterapie personalizzate e la terapia con cellule CAR-T. Attraverso numerose sperimentazioni cliniche si sta valutando la loro capacità di colpire e distruggere le cellule tumorali stimolando le cellule immunitarie (Haghighi E. *et al.* 2024). Questi studi stanno fornendo risultati promettenti in termini di sicurezza ed efficacia (Dhayalan M. *et al.* 2024). Oltre ai vaccini COVID-19, le LNP vengono utilizzate nello sviluppo di vaccini per altre malattie infettive e disturbi genetici. Le innovazioni in questo settore si concentrano sul miglioramento della risposta immunitaria e sulla garanzia di una protezione a lungo termine (Thi TTH. *et al.* 2021). Le tecnologie microfluidiche facilitano la sintesi ad alta precisione, riproducibile e scalabile delle LNP, superando alcune sfide tecniche del settore. Tuttavia, le LNP devono superare criticità come la distribuzione di materiale genetico ai tessuti bersaglio, la specificità tissutale e le reazioni immunitarie. Le LNP si accumulano nel fegato, il che rappresenta un aspetto vantaggioso per il trattamento delle malattie epatiche, ma problematico per la veicolazione extraepatica. Per raggiungere, passivamente o attivamente altri tessuti, le LNP possono essere modificate variando le loro caratteristiche chimico-fisiche o introducendo ligandi di targeting. La corona proteica che si forma sulle LNP dopo la somministrazione influenza il destino in vivo alterando la loro stabilità, l'integrità, il rilascio, la biodistribuzione, l'escrezione e l'accumulo in organi specifici (Haghighi E. *et al.* 2024). La composizione della corona di proteine è inoltre specifica per ogni malattia e individuo, il che richiede un approccio nanomedico personalizzato in grado di prevedere il trattamento ottimale per ogni paziente. La ricerca recente si è concentrata sul miglioramento della sicurezza delle LNP per un uso clinico diffuso e a lungo termine (Liu Y. *et al.* 2024). Si stanno studiando strategie come la modifica della composizione lipidica e l'ottimizzazione delle dimensioni delle particelle per migliorarne

la biocompatibilità (Wang J. *et al.* 2024). La somministrazione ripetuta di RNA terapeutico tramite le LNP è ostacolata dal riconoscimento di queste particelle da parte del sistema immunitario e del complemento. Gli studi futuri mirano ad ottimizzare le formulazioni delle LNP per ridurre la produzione di anticorpi anti-PEG e minimizzare l'attivazione del sistema del complemento innescata dalle LNP. La progettazione delle LNP necessita di un'attenta analisi delle loro proprietà chimico-fisiche, come le dimensioni, la carica e la composizione lipidica. Queste proprietà influenzano la biodistribuzione, la penetrazione cellulare e la sicurezza (Waheed I. *et al.* 2024). Le ricerche, e le sperimentazioni cliniche in corso e il successo clinico delle nanoparticelle lipidiche (LNP) come vettori per RNA terapeutici, culminato con l'approvazione di farmaci come Onpattro e i vaccini a mRNA contro COVID-19, ha aperto la strada ad un'ampia gamma di nuove possibilità terapeutiche. Il panorama dello sviluppo clinico di terapie basate su RNA veicolate mediante LNP è estremamente dinamico, con molteplici candidati in diverse fasi di sperimentazione clinica.

Oltre ai vaccini COVID-19 già approvati, altre terapie a base di mRNA sono in fase avanzata di sviluppo.

Terapie a base di mRNA in fase avanzata

mRNA-1647 (Moderna)

- **Indicazione:** prevenzione dell'infezione da citomegalovirus (CMV) (Moderna, 2025);
- **Meccanismo d'azione:** vaccino a mRNA che codifica per sei antigeni del CMV: cinque proteine che formano il complesso pentamerico (gH, gL, UL128, UL130, UL131A) responsabile dell'infezione delle cellule epiteliali, e la glicoproteina B (gB) coinvolta nell'infezione dei fibroblasti (Moderna, 2022);
- **Sistema di veicolazione:** LNP simili a quelle utilizzate per il vaccino COVID-19 Spikevax.

Potrebbe diventare il primo vaccino efficace contro il CMV.

mRNA-1010/1011/1012 (Moderna)

- **Indicazione:** prevenzione dell'influenza stagionale (Moderna, 2025);
- **Meccanismo d'azione:** vaccini a mRNA quadrivalenti che codificano per l'emoagglutinina (HA) dei ceppi influenzali A/H1N1, A/H3N2, B/Yamagata e B/Victoria, con sequenze aggiornate annualmente in base ai ceppi circolanti (Moderna, 2021);
- **Sistema di veicolazione:** LNP

- **Poteniale vantaggio:** produzione più rapida rispetto ai vaccini tradizionali, potenzialmente maggiore efficacia e possibilità di combinazione con altri vaccini a mRNA (es. COVID-19).

I risultati preliminari mostrano risposte anticorpali non inferiori o superiori ai vaccini influenzali tradizionali.

BNT122/mRNA-4157 (BioNTech/Moderna/Merck)

- **Indicazione:** trattamento adiuvante del melanoma ad alto rischio e altri tumori solidi (BioNTech, 2025);
- **Meccanismo d'azione:** vaccino a mRNA personalizzato che codifica fino a 34 neoantigeni specifici del tumore di ciascun paziente, identificati mediante sequenziamento del DNA tumorale e algoritmi predittivi di immunogenicità (Sahin U. *et al.* 2020);
- **Sistema di veicolazione:** LNP;
- **Combinazione terapeutica:** Somministrato in combinazione con pembrolizumab (anti-PD-1).

Rappresenta un approccio altamente personalizzato all'immunoterapia del cancro, sfruttando la flessibilità della piattaforma a mRNA.

mRNA-3705 (Moderna)

- **Indicazione:** acidemia metilmalonica (MMA), un errore congenito del metabolismo (Moderna, 2025);
- **Meccanismo d'azione:** mRNA che codifica per l'enzima metilmalonil-CoA mutasi (MUT), carente nei pazienti con MMA (Moderna, 2021);
- **Sistema di veicolazione:** LNP con tropismo epatico.

Esempio di terapia di sostituzione enzimatica basata su mRNA, con potenziale applicazione ad altre malattie metaboliche.

Terapie basate su CRISPR in fase avanzata

Oltre a Exa-cel (Casgevy), recentemente approvato, diverse altre terapie basate su CRISPR sono in fase avanzata di sviluppo.

NTLA-2001 (Intellia/Regeneron)

- **Indicazione:** amiloidosi da transtiretina (ATTR) (Finn JD. *et al.* 2018);

- **Meccanismo d'azione:** sistema CRISPR/Cas9 che silenzia permanentemente il gene della transtiretina (TTR) negli epatociti, riducendo la produzione della proteina che forma depositi amiloidi (Gillmore JD. *et al.*, 2021);
- **Sistema di veicolazione:** le LNP con tropismo epatico, rappresentando il primo tentativo di editing genomico in vivo mediante somministrazione sistemica di CRISPR-Cas9;

Potenziabile approccio «one-and-done» per l'ATTR, in contrasto con le terapie a base di siRNA (Patisiran, Vutrisiran) che richiedono somministrazioni ripetute.

NTLA-2002 (Intellia)

- **Indicazione:** angioedema ereditario (HAE) (Finn JD. *et al.* 2018);
- **Meccanismo d'azione:** sistema CRISPR/Cas9 che silenzia il gene KLKB1 negli epatociti, riducendo la produzione di callicreina plasmatica, un mediatore chiave degli attacchi di angioedema (Intellia Therapeutics, 2022);
- **Sistema di veicolazione:** LNP con tropismo epatico.

8.1 Innovazioni nei sistemi di veicolazione

Nonostante i successi clinici delle LNP attuali, significative limitazioni persistono, particolarmente nella veicolazione in tessuti non epatici. Numerose innovazioni sono in fase di sviluppo per superare queste limitazioni.

LNP di nuova generazione

Le LNP di nuova generazione incorporano modifiche strutturali e funzionali per migliorare le loro proprietà.

- **Lipidi ionizzabili avanzati:** i lipidi ionizzabili rappresentano il componente chiave delle LNP, determinando in larga misura la loro efficienza di transfezione. La presenza di legami labili (esteri, disolfuri, acetali) nella struttura ne migliora il profilo di sicurezza facilitando la degradazione metabolica dopo il rilascio del carico. Modifiche sistematiche della testa polare, del linker e delle code lipidiche hanno portato a lipidi ionizzabili di nuova generazione con efficienza di transfezione significativamente migliorata;
- **Lipidi responsivi a stimoli e lipidi asimmetrici:** i primi sono lipidi che cambiano conformazione o si degradano in risposta a stimoli specifici (pH, enzimi, potenziale redox) per un rilascio più controllato, mentre i secondi sono caratterizzati dalla presenza

di code drofobiche di diversa lunghezza o struttura che conferiscono proprietà di membrana ottimizzate.

Strategie di PEGhilazione avanzate

La PEGilazione è cruciale per la stabilità delle LNP in circolo, ma può ostacolare l'uptake cellulare e l'escape endosomiale. Esistono diverse strategie, tra queste si annoverano:

- **PEG distaccabili:** lipidi PEGhilati con legami sensibili agli stimoli (pH, enzimi, potenziale redox) che permettono il distacco del PEG nel microambiente tumorale o endosomiale;
- **PEG con densità ottimizzata:** caratterizzati da un controllo preciso della densità superficiale di PEG per bilanciare stabilità in circolo e l'efficienza di transfezione.

Esistono alternative al PEG come polimeri quali la polisarcosina e la poliossazolina o polipeptidi che offrono stabilità simile, ma con potenziale minore immunogenicità.

Targeting attivo avanzato

Strategie di targeting attivo più sofisticate per migliorare la specificità tissutale.

- **Targeting multispecifico:** le LNP caratterizzate dalla presenza di combinazioni di ligandi che riconoscono multipli recettori sulle cellule bersaglio, aumentando la specificità;
- **Targeting sequenziale:** sistemi «multi-strato» in cui ligandi di targeting primari sono esposti solo dopo che uno stimolo specifico ha rimosso uno strato esterno, permettendo un targeting più preciso;
- **Aptameri e nanobodies:** utilizzo di aptameri di DNA/RNA o nanobodies (frammenti di anticorpi a dominio singolo) come ligandi di targeting, offrendo alta specificità con dimensioni ridotte.

Sistemi ibridi

L'integrazione di componenti di diversa natura nelle LNP sta portando a sistemi ibridi con proprietà migliorate.

LNP-polimeri

Sono combinazioni di LNP con polimeri sintetici o naturali; nello specifico le LNP vengono rivestite di polimeri quali acido ialuronico, chitosano o polietilenimina per migliorare la stabilità, ridurre l'opsonizzazione e aumentare l'uptake cellulare. Ci sono poi sistemi core-shell

caratterizzati da LNP con un core lipidico circondato da un guscio polimerico che può incorporare funzionalità aggiuntive. Infine, poliplessi stabilizzati da lipidi, ovvero complessi RNA-polimero stabilizzati da un rivestimento lipidico, combinando i vantaggi dei poliplessi (efficiente complessazione) e delle LNP (stabilità).

LNP biomimetiche

Caratterizzate dall'incorporazione di componenti biologici nelle LNP per migliorare biocompatibilità e funzionalità

- **LNP rivestite di membrana cellulare:** LNP rivestite con membrane cellulari naturali (eritrociti, leucociti, piastrine, cellule tumorali) per eludere il sistema immunitario e migliorare il targeting;
- **Lipidi derivati da organismi estremofili:** utilizzo di lipidi da organismi che vivono in condizioni estreme per conferire maggiore stabilità alle LNP;
- **Incorporazione di proteine di fusione virale:** integrazione di proteine o peptidi derivati da virus che facilitano la fusione membranaria e l'escape endosomiale.

8.2 Nuove applicazioni terapeutiche

L'evoluzione dei sistemi di veicolazione sta aprendo la strada a nuove applicazioni terapeutiche per gli RNA veicolati mediante LNP, espandendo significativamente il loro potenziale impatto clinico. Mentre la maggior parte dei medicinali a RNA approvati, o in fase avanzata di sviluppo, si concentra sul fegato, significativi progressi stanno espandendo le applicazioni ad altri tessuti.

Sistema nervoso centrale

Il superamento della barriera emato-encefalica (BEE) rappresenta una sfida cruciale.

Approcci in sviluppo:

- LNP modificate con ligandi che facilitano la transitosi mediata da recettori attraverso la BEE (es. transferrina, insulina, ApoE);
- Somministrazione intratecale o intracerebroventricolare per bypassare la BEE;
- Apertura transitoria della BEE mediante ultrasuoni focalizzati in combinazione con microbolle.

Le applicazioni potenziali sono rappresentate da: malattie neurodegenerative (Alzheimer, Parkinson, SLA), tumori cerebrali, malattie da accumulo lisosomiale con coinvolgimento neurologico, disturbi genetici neurologici (Alnylam Pharmaceuticals, 2023).

Polmone

Il polmone rappresenta un target importante per la somministrazione locale mediante inalazione. Approcci in sviluppo:

- LNP ottimizzate per somministrazione inalatoria, con dimensioni e proprietà superficiali adatte a superare le barriere mucosali;
- Formulazioni in polvere secca o nebulizzate di LNP.

Le applicazioni potenziali sono: fibrosi cistica, asma e BPCO, fibrosi polmonare, tumori polmonari, infezioni respiratorie.

Candidati clinici: ARO-ENaC (Arrowhead, 2020) per fibrosi cistica.

Tessuti muscolari

Il targeting del muscolo scheletrico e cardiaco offre opportunità per diverse patologie.

Approcci in sviluppo:

- LNP recanti peptidi che riconoscono recettori specifici del muscolo;
- Sistemi che sfruttano l'aumentata permeabilità vascolare in condizioni patologiche (es. distrofie muscolari);

Le applicazioni potenziali possono essere: distrofie muscolari (Duchenne, Becker), miopatie metaboliche, cardiomiopatie genetiche, rigenerazione muscolare post-infarto.

Tumori solidi

Il targeting di tumori solidi non epatici rappresenta un'importante frontiera.

Approcci in sviluppo:

- Sfruttamento dell'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention);
- LNP con ligandi che riconoscono antigeni tumore-specifici;
- Sistemi attivabili localmente mediante stimoli esterni (es. luce, ultrasuoni, campo magnetico).

Tra le applicazioni potenziali troviamo: il silenziamento di oncogeni, il ripristino di geni oncosoppressori, l'immunoterapia (es. vaccini a mRNA personalizzati), la modulazione del microambiente tumorale.

Candidati clinici: mRNA-4157 come vaccino personalizzato per melanoma in combinazione con KEYTRUDA[®] (pembrolizumab) (Moderna, 2024).

Oltre alle applicazioni già consolidate (silenziamento genico, sostituzione proteica, vaccini), stanno emergendo nuove modalità terapeutiche come l'editing genomico diretto in vivo che

rappresenta una frontiera molto promettente. Tra le potenziali attuazioni si annoverano la veicolazione di mRNA codificante per nucleasi (Cas9, Cas12a) insieme a gRNA mediante LNP, la veicolazione di ribonucleoproteine (RNP) preformate mediante LNP modificate, sistemi di editing di base o prime editing per modifiche precise senza tagli al doppio filamento. Queste strategie potrebbero condurre a vantaggi quali la correzione permanente di mutazioni genetiche con una singola somministrazione. Un altro esempio è rappresentato dall'utilizzo di RNA terapeutici per modulare la risposta immunitaria; nello specifico mRNA codificanti per citochine o anticorpi, siRNA diretti contro regolatori negativi della risposta immunitaria, mRNA codificanti per neoantigeni tumorali. Tali modalità potrebbero essere applicate per l'immunoterapia del cancro, per malattie autoimmuni, malattie infiammatorie croniche e tolleranza immunitaria per prevenire il rigetto dei trapianti.

8.3 Prospettive a lungo termine

Guardando oltre l'orizzonte attuale, diverse tendenze emergenti potrebbero plasmare il futuro delle terapie a RNA veicolate dalle nanoparticelle lipidiche. La flessibilità dei farmaci a RNA, infatti, offre opportunità uniche per la medicina personalizzata come ad esempio le terapie «N-of-1» che prevedono lo sviluppo di terapie altamente individualizzate per pazienti con malattie ultra-rare; la selezione personalizzata del target con l'impiego di profili genomici, trascritomici e proteomici individuali per selezionare i target migliori per ciascun paziente; formulazioni personalizzate che prevedono l'adattamento delle preparazioni a base di LNP alle caratteristiche individuali del paziente (es. profilo metabolico, comorbidità).

L'espansione verso nuove applicazioni potrebbe trasformare ulteriormente il campo verso ambiti quali:

- **Medicina rigenerativa:** utilizzo di mRNA per riprogrammazione cellulare in vivo o il differenziamento diretto per la rigenerazione tissutale;
- **Longevità e medicina anti-aging:** targeting di vie molecolari associate all'invecchiamento;
- **Modulazione del microbioma:** targeting di specifici componenti del microbioma intestinale o di altri distretti.

9. CONCLUSIONI

Le nanoparticelle lipidiche come vettori per la veicolazione mirata di RNA terapeutici rappresentano l'unica piattaforma tecnologica approvata e in rapida evoluzione con un vasto potenziale clinico. I successi già ottenuti con i medicinali ratificati, particolarmente nel contesto della pandemia COVID-19, hanno dimostrato la validità di questo approccio e catalizzato ulteriori investimenti e innovazioni. Le prospettive cliniche per nuove terapie sono estremamente promettenti, con un vasto ventaglio di candidati in fase avanzata di sviluppo per un'ampia gamma di patologie. Le innovazioni nei sistemi di veicolazione stanno progressivamente superando le limitazioni attuali, espandendo le applicazioni oltre il fegato verso tessuti precedentemente difficili da raggiungere. Nuove modalità terapeutiche, come l'editing genomico in vivo, stanno emergendo e ampliando ulteriormente il potenziale impatto clinico. Tuttavia, significative sfide tecniche, biologiche, regolatorie ed economiche rimangono da affrontare. La veicolazione efficiente verso tessuti non epatici, la gestione dell'immunogenicità e della tossicità, l'ottimizzazione della produzione e la sostenibilità economica rappresentano aree chiave che richiederanno continui sforzi di ricerca e sviluppo. I progressi nelle tecnologie microfluidiche e nelle strategie di formulazione dovrebbero migliorare le prestazioni delle LNP a base di RNA rendendole più efficaci e versatili per le applicazioni cliniche. Inoltre, la continua ricerca sulla biodistribuzione e sulla farmacocinetica delle LNP a RNA fornirà preziose indicazioni sul loro comportamento in vivo e sulle capacità di targeting dei tessuti. Queste conoscenze permetteranno di progettare farmaci più efficienti e mirati. In una prospettiva a lungo termine, l'integrazione con altre tecnologie emergenti e l'espansione verso nuove applicazioni potrebbero trasformare ulteriormente il campo, realizzando pienamente il potenziale delle terapie basate su RNA per affrontare bisogni medici insoddisfatti e migliorare la salute globale. In tale contesto nei prossimi anni assisteremo alla comparsa sul mercato di nuovi medicinali a base di acidi nucleici per il trattamento di patologie finora senza una terapia efficace, tra cui molte patologie genetiche alcune forme di cancro o malattie neurodegenerative (De Rosa G. 2024 fivs.org).

La rapida evoluzione di questo campo sottolinea l'importanza di un approccio multidisciplinare che integri competenze in chimica dei lipidi, biologia molecolare, farmacologia, immunologia, bioingegneria e medicina clinica. Solo attraverso tale collaborazione sarà possibile superare le sfide attuali e realizzare pienamente il ruolo delle nanoparticelle lipidiche come vettori per gli RNA terapeutici.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abstiens K**, et al. Interaction of functionalized nanoparticles with serum proteins and its impact on colloidal stability and cargo leaching. *Soft Matter*. 2019;15:709–20. <https://doi.org/10.1039/C8SM02189A>
- Adams D**. et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379(1):11-21. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1716153>
- Adams D**. et al. Efficacy and safety of vutrisiran for patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis with polyneuropathy: a randomized clinical trial. *Amyloid*. 2022;29(4):235-242 <https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2091985>
- Akinc A**, et al. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*. 2005;7:657–63. <https://doi.org/10.1002/jgm.696>
- Akinc A**, et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol*. 2019;14(12):1084-1087 <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>
- Alp G**, et al. Lipid-based mucus penetrating nanoparticles and their biophysical interactions with pulmonary mucus layer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020;149:45–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.01.017>
- Amreen K**, et al. Review—Miniaturized and microfluidic devices for automated nanoparticle synthesis. *ECS J Solid State Sci Technol*. 2021;10: 017002. <https://doi.org/10.1149/2162-8777/abdb19>
- Anindita J**, et al. The effect of cholesterol content on the adjuvant activity of nucleic-acid-free lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2024;16:181. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020181>
- Attia MF**, et al. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol*. 2019;71:1185–98. <https://doi.org/10.1111/JPHP.13098>
- Baden LR. et al.** Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARSCoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403-416 DOI: [10.1056/NEJMoa2035389](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389)
- Balwani M**. et al. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med*. 2020;382(24):2289-2301. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1913147>
- Bhattacharya S**, et al. Delivery of thymoquinone through hyaluronic acid-decorated mixed Pluronic® nanoparticles to attenuate angiogenesis and metastasis of triple-negative breast cancer. *J Control Release*. 2020;322:35774. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.03.033>
- Boado RJ**. Blood–brain barrier transport of non-viral gene and RNAi therapeutics. *Pharm Res*. 2007;24:1772–87. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9321-5>
- Buck J**, et al. Lipid-based DNA therapeutics: hallmarks of non-viral gene delivery. *ACS Nano*. 2019;13:3754–82. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07858>
- Burrows C**, et al. Modulating RNA with chemical modifications. *Acc Chem Res*. 2024;57:175–6. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00770>
- Busignies V**, et al. Nanostructures for oral delivery of therapeutic nucleic acids. In: *Nanostructures for oral medicine*. Amsterdam: Elsevier; 2017. p. 147–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00007-9>
- Byrne BJ**, et al. Pompe disease gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2011;20:R61–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr174>
- Cai R**, et al. The crown and the scepter: roles of the protein corona in nanomedicine. *Adv Mater*. 2019;31:1805740. <https://doi.org/10.1002/adma.201805740>

- Cai W**, et al. A combinatorial library of biodegradable lipid nanoparticles preferentially deliver mRNA into tumor cells to block mutant RAS signaling. *Adv Funct Mater.* 2022;32:2204947. <https://doi.org/10.1002/adfm.202204947>
- Carvalho BG**, et al. Advanced microfluidic technologies for lipid nano-microsystems from synthesis to biological application. *Pharmaceutics.* 2022;14:141. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010141>
- Chang DC**, et al. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys J.* 1990;58:1-12. [https://doi.org/10.1016/S00063495\(90\)82348-1](https://doi.org/10.1016/S00063495(90)82348-1)
- Chen D**, et al. Role of vitronectin-rich protein corona on tumor-specific siRNA delivery and transfection with lipid nanoparticles. *Nanomedicine.* 2021;16:535–51. <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0428>
- Chen D**, et al. The role of surface chemistry in serum protein corona-mediated cellular delivery and gene silencing with lipid nanoparticles. *Nanoscale.* 2019;11:8760-75. <https://doi.org/10.1039/c8nr09855g>
- Chen D**, et al. The role of apolipoprotein and vitronectin-enriched protein corona on lipid nanoparticles for and vivo targeted delivery and transfection of oligonucleotides in murine tumor models. *Nanoscale.* 2019;11:18806–24. <https://doi.org/10.1039/c9nr05788a>
- Chen L**, et al. Biodegradable black phosphorus nanosheets mediate specific delivery of hTERT siRNA for synergistic cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10:21137–48. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B04807>
- Chen L**, et al. Spherical nucleic acids for nearinfrared light-responsive self-delivery of small-interfering RNA and antisense oligonucleotide. *ACS Nano.* 2021;15:11929–39. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.1C03072>
- Chen S**, et al. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *J Control Release.* 2016;235:23644. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.059>
- Chen Z**, et al. Modular design of biodegradable ionizable lipids for improved mRNA delivery and precise cancer metastasis delineation in vivo. *J AmChem Soc.* 2023;145:24302-14. <https://doi.org/10.1021/JACS.3C09143>
- Cheng Q**, et al. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol* 15,313-320 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0669-6>
- Cheng Q**, et al. Dendrimer-based lipid nanoparticles deliver therapeutic FAH mRNA to normalize liver function and extend survival in a mouse model of hepatorenal tyrosinemia type I. *Adv Mater.* 2018;30(52):e1805308. <https://doi.org/10.1002/adma.201805308>
- Cheng X**, et al. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:129–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>
- Cohen ZR**, et al. Localized RNAi therapeutics of chemoresistant grade IV glioma using hyaluronan-grafted lipid-based nanoparticles. *ACS Nano.* 2015;9:1581-91. <https://doi.org/10.1021/nn506248s>
- Conte G**, Colombo D, Sorrentino R, Miro A, Quaglia F, Brocca P, Ungaro F et al. Hybrid lipid/polymer nanoparticles to tackle the cystic fibrosis mucus barrier in siRNA delivery to the lungs: does PEGylation make the difference? *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14:7565-78. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c14975>
- Crommelin DJA**, et al. Addressing the cold reality of mRNA vaccine stability. *J Pharm Sci.* 2021;110:997–1001. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.006>
- Crooke ST**, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab.* 2018;27:714–39. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.004>

- Damase TR**, et al. The limitless future of RNA therapeutics. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:1–24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628137>
- Danhier F**. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release.* 2016;244:108–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.015>
- Dhayalan M**. et al. Advances in functional lipid nanoparticles: from drug delivery platforms to clinical applications. *3 Biotech.* 2024;14:1-28. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03901-8>
- Di J**, et al. Biodistribution and nonlinear gene expression of mRNA LNPs affected by delivery route and particle size. *Pharm Res.* 2022;39:105–14. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03166-5>
- Ding F**, et al. Boosting ionizable lipid nanoparticle-mediated in vivo mRNA delivery through optimization of lipid amine-head groups. *Biomater Sci.* 2021;9:7534–46. <https://doi.org/10.1039/D1BM00866H>
- Dirin M.**, et al. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13:875–88. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.774366>
- Eckstein F**. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24:374–87. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>
- El-Mayta R**, et al. A nanoparticle platform for accelerated in vivo oral delivery screening of nucleic acids. *Adv Ther.* 2021;4:2000111. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000111>
- El-Sayed A**, et al. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol Ther.* 2013;21:1118–30. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.54>
- Eygeris Y**, et al. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery. *Nano Lett.* 2020;20:4543–9. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386>
- Eygeris Y**, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc Chem Res.* 2022;55:2–12. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>
- Ezzat K**, et al. The viral protein corona directs viral pathogenesis and amyloid aggregation. *Nat Commun.* 2019;10:2331. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10192-2>
- Fang J**, et al. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:136–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- Fang Y**, et al. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Delivery*, 24 (2), 22–32. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1388451>
- Feldman RA**, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine.* 2019;37(25):3326–3334. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.074>
- Feng R**, et al. RNA therapeutics—research and clinical advancements. *Front Mol Biosci.* 2021;8:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.710738>
- Fenton OS.**, et al. Synthesis and biological evaluation of ionizable lipid materials for the in vivo delivery of messenger RNA to B lymphocytes. *Adv Mater.* 2017;29:1606944. <https://doi.org/10.1002/adma.201606944>
- Finn JD. et al.** A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent in vivo genome editing. *Cell Rep.* 2018;22(9):2227–2235. DOI: [10.1016/j.celrep.2018.02.014](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.014)

- Francia V**, et al. Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. *Beilstein J Nanotechnol.* 2020;11:338–53. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25>
- Francia V**, et al. The biomolecular corona of lipid nanoparticles for gene therapy. *Bioconjug Chem.* 2020;31:2046–59. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.0C00366>
- Francia V**, et al. Corona composition can affect the mechanisms cells use to internalize nanoparticles. *ACS Nano.* 2019;13:11107–21. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03824>
- Fumoto S**, et al. Efficient in vivo gene transfer by intraperitoneal injection of plasmid DNA and calcium carbonate microflowers in mice. *Mol Pharm.* 2012;9:196270. <https://doi.org/10.1021/mp2006592>
- Fumoto S**, et al. Understanding in vivo fate of nucleic acid and gene medicines for the rational design of drugs. *Pharmaceutics.* 2021;13:159. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020159>
- Gan Z**, et al. Nanoparticles containing constrained phospholipids deliver mRNA to liver immune cells in vivo without targeting ligands. *Bioeng Transl Med.* 2020;5: e10161. <https://doi.org/10.1002/btm2.10161>
- Garber K**. Alnylam launches era of RNAi drugs. *Nat Biotechnol.* 2018;36(9):777–778. <https://doi.org/10.1038/nbt0918-777>
- Garrelfs SF**, et al. Lumasiran, an RNAi therapeutic for primary hyperoxaluria type 1. *N Engl J Med.* 2021;384(13):1216–1226. DOI: [10.1056/NEJMoa2021712](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021712)
- Gao Y**, et al. pH/Redox dualresponsive polyplex with effective endosomal escape for codelivery of siRNA and doxorubicin against drug-resistant cancer cells. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11:16296–310. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b02016>
- Ge X**, et al. Rationale and application of PEGylated lipid-based system for advanced target delivery of siRNA. *Front Pharmacol.* 2021;11:598175. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.598175>
- Gennemark P**, et al. Abstract 13307: an oral antisense oligonucleotide for PCSK9 inhibition in humans. *Circulation.* 2020;142:A13307. https://doi.org/10.1161/circ.142.suppl_3.13307
- Gillmore JD**, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2021;385(6):493–502. DOI: [10.1056/NEJMoa2107454](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107454)
- Giulimondi F**, et al. Interplay of protein corona and immune cells controls blood residency of liposomes. *Nat Commun.* 2019;10:3686. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11642-7>
- Gomi M**, et al. Delivering mRNA to secondary lymphoid tissues by phosphatidylserine loaded lipid nanoparticles. *AdvHealthc Mater.* 2023;12:2202528. <https://doi.org/10.1002/adhm.202202528>
- Guan X**, et al. A pH-responsive detachable PEG shielding strategy for gene delivery system in cancer therapy. *Biomacromolecules.* 2017;18:1342–9. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00080>
- Hafez I**, et al. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther.* 2001;8:1188–96. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301506>
- Haghighi E**, Abolmaali, SS., Dehshahri, A., Mousavi Shaegh, S., Azarpira, N., Tamaddon, A. Navigating the intricate in-vivo journey of lipid nanoparticles tailored for the targeted delivery of RNA therapeutics: a quality-by-design approach *J Nanobiotechnol* **22**, 710 (2024) <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02972>
- Hajj KA**, et al. Branched-tail lipid nanoparticles potentially deliver mRNA in vivo due to enhanced ionization at endosomal pH. *Small.* 2019;15:1805097. <https://doi.org/10.1002/sml.201805097>
- Hald Albertsen C**, et al. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022;188: 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>

- Hallan S**, et al. Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2021;13:549. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040549>
- Han J**, et al. Lipid nanoparticle-based mRNA delivery systems for cancer immunotherapy. *Nano Converg*. 2023;10:1–13. <https://doi.org/10.1186/s40580-023-00385-3>
- Han X**, et al. Ligand-tethered lipid nanoparticles for targeted RNA delivery to treat liver fibrosis. *Nat Commun*. 2023;14(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35637-z>
- Hanna AR**, et al. Microfluidic generation of diverse lipid nanoparticle libraries. *Nanomedicine*. 2024;19:455-7. <https://doi.org/10.2217/nnm-2023-0345>
- Hassett KJ**, et al. Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;15:1-11. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2019.01.013>
- Hayashi Y**, et al. Differential nanoparticle sequestration by macrophages and scavenger endothelial cells visualized in vivo in real-time and at ultrastructural resolution. *ACS Nano*. 2020;14:1665–81. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b07233>
- Herrera-Barrera M**, et al. Peptide-guided lipid nanoparticles deliver mRNA to the neural retina of rodents and nonhuman primates. *Sci Adv*. 2023;9: eadd4623. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add4623>
- Heyes J**, et al. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release*. 2005;107:276–87. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.014>
- Hirai Y**, et al. Charge-reversible lipid derivative: a novel type of pH-responsive lipid for nanoparticle-mediated siRNA delivery. *Int J Pharm*. 2020;585: 119479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119479>
- Hou X.**, et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* **6**, 1078–1094 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Hou X**, et al. Vitamin lipid nanoparticles enable adoptive macrophage transfer for the treatment of multidrug-resistant bacterial sepsis. *Nat Nanotechnol*. 2020;15:41-6. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0600-1>
- Hu J**, et al. Physiological roles of asialoglycoprotein receptors (ASGPRs) variants and recent advances in hepatic-targeted delivery of therapeutic molecules via ASGPRs. *Protein Pept Lett*. 2014;21:1025–30. <https://doi.org/10.2174/0929866521666140626102429>
- Hu Y**, et al. Membrane perforation and recovery dynamics in microbubble mediated sonoporation. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39:2393-405. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2013.08.003>
- Hu Y**, et al. A highly efficient synthetic vector: nonhydrodynamic delivery of DNA to hepatocyte nuclei in vivo. *ACS Nano*. 2013;7:5376–84. <https://doi.org/10.1021/nn4012384>
- Huang P**, et al. Cellular trafficking of nanotechnology-mediated mRNA delivery. *Adv Mater*. 2024;36:2307822. <https://doi.org/10.1002/adma.202307822>
- Huang X**, et al. Well-defined multivalent ligands for hepatocytes targeting via asialoglycoprotein receptor. *Bioconj Chem*. 2017;28(2):283-295. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.bioconjchem.6b00651>
- Janoria KG**, et al. Novel approaches to retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2007;4:371–88. <https://doi.org/10.1517/17425247.4.4.371>
- Ji Q**, et al. GP60 and SPARC as albumin receptors: key targeted sites for the delivery of antitumor drugs. *Front Pharmacol*. 2024;15:1329636. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2024.1329636/BIBTEX>

- Jin H**, et al. Engineered lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary fibrosis by regulating epithelial–mesenchymal transition in the lungs. *Adv Funct Mater.* 2023;33:2209432. <https://doi.org/10.1002/adfm.202209432>
- Jung O**, et al. Modulating lipid nanoparticles with histidinamideconjugated cholesterol for improved intracellular delivery of mRNA. *Adv Healthc Mater.* 2024;13:2303857. <https://doi.org/10.002/adhm.202303857>
- Kamath D**, et al. Therapeutic potential of combating cancer by restoring wild-type p53 through mRNA nanodelivery. *Nanomedicine.* 2024;56: 102732. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2024.102732>
- Kaneda Y**, et al. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther.* 2002;6:219–26. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0647>
- Kaufmann KB**, et al. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med.* 2013;5:1642–61. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202287>
- Kauffman KJ**, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs. *Nano Lett.* 2015;15(11):7300–7306. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.nanolett.5b02497>
- Kauffman KJ**, et al. Efficacy and immunogenicity of unmodified and pseudouridine-modified mRNA delivered systemically with lipid nanoparticles in vivo. *Biomaterials.* 2016;109:78–87 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.006>
- Kawabata K**, et al. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res.* 1995;12:825–30. <https://doi.org/10.1023/A1016248701505>
- Kawakami S**, et al. Enhanced gene expression in lung by a stabilized lipoplex using sodium chloride for complex formation. *J Gene Med.* 2005;7:1526–33. <https://doi.org/10.1002/jgm.813>
- Kedmi R**, et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics. *Nat Nanotechnol.* 2018;13:214–9. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0043-5>
- Kim J.** et al. Naturally derived membrane lipids impact nanoparticle-based messenger RNA delivery. *Cell Mol Bioeng.* 2020;13:463–74. <https://doi.org/10.1007/s12195020-00619-y>
- Kim J**, et al. Self-assembled mRNA vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;170:83–112. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.12.014>
- Kim M**, et al. Engineered ionizable lipid nanoparticles for targeted delivery of RNA therapeutics into different types of cells in the liver. *SciAdv.* 2021;7: eabf4398. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABF4398>
- Klassen LMB** et al. MMP9 gene expression regulation by intragenic epigenetic modifications in breast cancer. *Gene.* 2018;642:461–6. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.11.054>.
- Kono Y**, et al. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Sci.* 2014;105:1049–55. <https://doi.org/10.1111/cas.12452>
- Kowalski PS**, et al. Ionizable amino-polyesters synthesized via ring opening polymerization of tertiary amino-alcohols for tissue selective mRNA delivery. *Adv Mater.* 2018;30:1801151. <https://doi.org/10.1002/adma.201801151>
- Kranz LM**, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature.* 2016;534:396–401. <https://doi.org/10.1038/nature18300>

- Kreiter S**, et al. Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity. *Cancer Res.* 2010;70:9031–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0699>
- Kulkarni JA**, et al. On the formation and morphology of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids and siRNA. *ACS Nano.* 2018;12(5):4787–4795 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b01516>
- Kulkarni JA**, et al. Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics. *Acc Chem Res.* 2019;52:2435–44. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00368>
- Kulkarni JA**, et al. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale.* 2019;11:21733–9. <https://doi.org/10.1039/C9NR09347H>
- Lee D**, et al. Strategies for targeted gene delivery using lipid nanoparticles and cell-derived nanovesicles. *Nanoscale Adv.* 2023;5:3834–56. <https://doi.org/10.1039/D3NA00198A>
- Lee SM**, et al. A systematic study of unsaturation in lipid nanoparticles leads to improved mRNA transfection in vivo. *Angew Chemie Int Ed.* 2021;60:5848–53. <https://doi.org/10.1002/anie.202013927>
- Leung AKK**, et al. Lipid nanoparticles containing siRNA synthesized by microfluidic mixing exhibit an electron-dense nanostructured core. *J Phys Chem C.* 2012;116:18440–50. <https://doi.org/10.1021/jp303267y>
- Leung AKK**, et al. Microfluidic mixing: a general method for encapsulating macromolecules in lipid nanoparticle systems. *J Phys Chem B.* 2015;119:8698–706. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b02891>
- Li X**, et al. Optimal delivery strategies for nanoparticle-mediated mRNA delivery. *J Mater Chem B.* 2023;11:2063–77. <https://doi.org/10.1039/d2tb02455a>
- Li Y**, et al. Protein and mRNA delivery enabled by cholesteryl-based biodegradable lipidoid nanoparticles. *Angew Chemie.* 2020;132:15067–74. <https://doi.org/10.1002/ANGE.202004994>
- Liang C**, et al. Aptamer-functionalized lipid nanoparticles targeting osteoblasts as a novel RNA interference-based bone anabolic strategy. *Nat Med.* 2015;21:288–94. <https://doi.org/10.1038/nm.3791>
- Lin M**, et al. Advances and challenges of stimuli-responsive nucleic acids delivery system in gene therapy. *Pharmaceutics.* 2023;15:1450. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051450>
- Liu M**, et al. Lymph-targeted high-density lipoprotein-mimetic nanovaccine for multi-antigenic personalized cancer immunotherapy. *Sci Adv.* 2024;10: eadk2444. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADK2444>
- Liu S**, et al. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing. *Nat Mater.* 2021;20:701–10. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00886-0>
- Liu S**, et al. An optimized ionizable cationic lipid for brain tumor-targeted siRNA delivery and glioblastoma immunotherapy. *Biomaterials.* 2022;287: 121645. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2022.121645>
- Liu W**, et al. Targeted pathophysiological treatment of ischemic stroke using nanoparticle-based drug delivery system. *J Nanobiotechnol.* 2024;22(1):499. <https://doi.org/10.1186/S12951-024-02772-2>
- Liu XX**, et al. Fusogenic reactive oxygen species triggered charge-reversal vector for effective gene delivery. *Adv Mater.* 2016;28:1743–52. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201504288>
- Liu Y**, et al. Development of mRNA lipid nanoparticles: targeting and therapeutic aspects. *Int J Mol Sci.* 2024;25:10166. <https://doi.org/10.3390/ijms251810166>
- Logan A**, et al. Targeted delivery of polo-like kinase 1 siRNA nanoparticles using an EGFR-PEG bispecific antibody inhibits proliferation of high-risk neuroblastoma. *J Control Release.* 2024;367:80620. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.02.007>

- Lokugamage MP**, et al. Constrained nanoparticles deliver siRNA and sgRNA to T cells in vivo without targeting ligands. *Adv Mater.* 2019;31:1902251. <https://doi.org/10.1002/adma.201902251>
- Lokugamage MP**, et al. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nat Biomed Eng.* 2021;5:1059-68. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00786-x>
- LoPresti ST**, et al. The replacement of helper lipids with charged alternatives in lipid nanoparticles facilitates targeted mRNA delivery to the spleen and lungs. *J Control Release.* 2022;345:819–31. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.03.046>
- Lorenzer C**, et al. Going beyond the liver: progress and challenges of targeted delivery of siRNA therapeutics. *J Control Release.* 2015;203:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.003>
- Lou B**, et al. mRNA polyplexes with post-conjugated GALA peptides efficiently target, transfect, and activate antigen presenting cells. *Bioconjug Chem.* 2018;30:461-75. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00524>
- Ma Z**, et al. Scalable synthesis of lipid nanoparticles for nucleic acid drug delivery using an isometric channel-size enlarging strategy. *Nano Res.* 2024;17:2899907. <https://doi.org/10.1007/s12274-023-6031-1>
- Maeki M**, et al. Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. *J Control Release.* 2022;344:80-96. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02017>
- Maier MA**, et al. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics. *Mol Ther.* 2013;21:1570–8. <https://doi.org/10.1038/MT.2013.124>
- Melamed JR**, et al. Lipid nanoparticle chemistry determines how nucleoside base modifications alter mRNA delivery. *J Control Release.* 2022;341:206–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.022>
- Melamed JR**, et al. Ionizable lipid nanoparticles deliver mRNA to pancreatic β cells via macrophage-mediated gene transfer. *Sci Adv.* 2023;9: eade1444. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade1444>
- Mendonca MCP**, et al. Design of lipid based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids. *Drug Discov Today.* 2023;28: 103505. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103505>
- Meng C**, et al. Nanoplatfroms for mRNA therapeutics. *Adv Ther.* 2021;4:2000099. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000099>
- Mehta M**, et al. Lipid-based nanoparticles for drug/gene delivery: an overview of the production techniques and difficulties encountered in their industrial development. *ACS Mater Au.* 2023;3:60019. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialsau.3c00032>
- Miao L**, et al. Delivery of mRNA vaccines with heterocyclic lipids increases anti-tumor efficacy by STING-mediated immune cell activation. *Nat Biotechnol.* 2019;37(10):1174-1185 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0247-3>
- Miao L**, et al. Synergistic lipid compositions for albumin receptor mediated delivery of mRNA to the liver. *Nat Commun.* 2020;11:2424. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16248-y>
- Mo Y**, et al. Light-activated siRNA endosomal release (LASER) by porphyrin lipid nanoparticles. *ACS Nano.* 2023;17:4688–703. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.2C10936>
- Nakamura T**, et al. The effect of size and charge of lipid nanoparticles prepared by microfluidic mixing on their lymph node transitivity and distribution. *Mol Pharm.* 2020;17:944–53. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b01182>

- Nakamura T**, et al. Extrahepatic targeting of lipid nanoparticles in vivo with intracellular targeting for future nanomedicines. *Adv Drug Deliv Rev.*2022;188: 114417. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114417>
- Ni H**, et al. Piperazine-derived lipid nanoparticles deliver mRNA to immune cells in vivo. *Nat Commun.* 2022;13:4766. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32281-5>
- Nogueira SS**, et al. Polysarcosine-functionalized lipid nanoparticles for therapeutic mRNA delivery. *ACS Appl Nano Mater.* 2020;3:10634–45. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c01834>
- Pardi N**, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* **17**, pp. 261–279 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Parhiz H**, et al. PECAM-1 directed re-targeting of exogenous mRNA providing two orders of magnitude enhancement of vascular delivery and expression in lungs independent of apolipoprotein E-mediated uptake. *J Control Release.* 2018;291:106-15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.015>
- Patel S**, et al. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye. *J Control Release.* 2019;303:91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.015>
- Pattani BS**, et al. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev.* 2015;115:1093866. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00004>
- Paunovska K**, et al. The extent to which lipid nanoparticles require apolipoprotein e and low-density lipoprotein receptor for delivery changes with ionizable lipid structure. *Nano Lett.* 2022;22:10025–33. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c03741>
- Paunovska K**, et al. Nanoparticles containing oxidized cholesterol deliver mRNA to the liver microenvironment at clinically relevant doses. *Adv Mater.* 2019;31:1807748. <https://doi.org/10.1002/adma.201807748>
- Paunovska K**, et al. Analyzing 2000 in vivo drug delivery data points reveals cholesterol structure impacts nanoparticle delivery. *ACS Nano.* 2018;12(8):8341-8349. doi: [10.1021/acsnano.8b03640](https://doi.org/10.1021/acsnano.8b03640)
- Paunovska K**, et al. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat Rev Genet.* 2022;23:265–80. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00439-4>
- Peng JQ**, et al. Targeted co-delivery of protein and drug to a tumor in vivo by sophisticated RGD-modified lipid-calcium carbonate nanoparticles. *J Control Release.* 2019;302:42–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.021>
- Polack FP. et al.** Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(27):2603-2615 DOI: [10.1056/NEJMoa2034577](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577)
- Ponti F**, et al. Cationic lipids for gene delivery: many players, one goal. *Chem Phys Lipids.* 2021;235: 105032. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105032>
- Poon W**, et al. Elimination pathways of nanoparticles. *ACS Nano.* 2019;13:5785-98. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01383>
- Prakash TP.** An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics. *Chem Biodivers.* 2011;8:1616–41. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100081>
- Qiu M**, et al. Lung-selective mRNA delivery of synthetic lipid nanoparticles for the treatment of pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2022;119: e2116271119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116271119>

- Qiu N**, et al. Enzyme-responsive charge-reversal polymer-mediated effective gene therapy for intraperitoneal tumors. *Biomacromolecules*. 2018;19:2308–19. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00440>
- Rizk M**. et al. Update on the clinical utility of an RNA interference-based treatment: focus on Patisiran. *Pharmgenomics Pers Med*. 2019;12:77-85. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S87945>
- Roces CB**, et al. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. *Pharmaceutics*. 2020;12:1095. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095>
- Roltgen K**, et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell*. 2022;185:1025-1040.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018>
- Ruan C**, et al. Reactive oxygen species-biodegradable gene carrier for the targeting therapy of breast cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:10398–408. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01712>
- Rurik JG**, et al. CAR T cells produced in vivo to treat cardiac injury. *Science* (80-). 2022;375:91-6. <https://doi.org/10.1126/science.abm0594>
- Sabnis S**, et al. A novel amino lipid series for mRNA delivery: improved endosomal escape and sustained pharmacology and safety in non-human primates. *Mol Ther*. 2018;26:1509–19. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2018.03.010>
- Sadauskas E**, et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol*. 2007;4:1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-10>.
- Sago CD**, et al. Nanoparticles that deliver RNA to bone marrow identified by in vivo directed evolution. *J Am Chem Soc*. 2018;140:17095–105. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08976>
- Sago CD**, et al. High-throughput in vivo screen of functional mRNA delivery identifies nanoparticles for endothelial cell gene editing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(42):E9944-E9952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811276115>
- Saha K**, et al. Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. *ACS Nano*. 2016;10:4421–30. [https://doi.org/10.1021/acsnano.6b00053](https://doi.org/10.1021/acs.nano.6b00053)
- Sahin U**, et al. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:759–80. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>
- Sahin U**, et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpointinhibitor- treated melanoma. *Nature*.2020;585:107–12. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2537-9>
- Sakurai F**. et al. Interaction between DNA–cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther*. 2001;8:677–86. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301460>
- SalahpourAnarjan F**. Active targeting drug delivery nanocarriers: ligands. *Nano-Struct Nano-Objects*. 2019;19: 100370. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100370>
- Samaridou E**, et al. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;154–155:37–63. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.06.002>
- Sardh E**. et al. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med*. 2019;380(6):549-558. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1807838>

- Sato Y**, et al. Hydrophobic scaffolds of pH-sensitive cationic lipids contribute to miscibility with phospholipids and improve the efficiency of delivering short interfering RNA by small-sized lipid nanoparticles. *Acta Biomater.*2020;102:341–50. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.022>
- Schoenmaker L**, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability. *Int J Pharm.* 2021;601: 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
- Scott LJ**. Givosiran:First Approval.*Drugs.*2020;80(3):335-339. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01269-0>
- Sehgal A**. et al. Liver as a target for oligonucleotide therapeutics. *J Hepatol.* 2013;59(6):1354-1359. DOI:10.1016/j.jhep.2013.05.045
- Semple SC**, et al. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry.* 1996;35:2521-5. <https://doi.org/10.1021/BI950414I>
- Seo H**, et al. High-precision synthesis of RNA-loaded lipid nanoparticles for biomedical applications. *Adv Healthc Mater.*2023;12:2203033. <https://doi.org/10.1002/adhm.202203033>
- Setten RL**, et al. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18:421–46. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0017-4>
- Shapiro MG**, et al. Biogenic gas nanostructures as ultrasonic molecular reporters. *Nat Nanotechnol.* 2014;9(4):311–6. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.32>
- Sieber S**, et al. Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo. *J Control Release.* 2017;264:180-91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.023>
- Sies H**, et al. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21:363–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Simonsen JB**. Lipid nanoparticle-based strategies for extrahepatic delivery of nucleic acid therapies—challenges and opportunities. *J Control Release.* 2024;370:763–72. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.04.022>
- Song K-H**, et al. Microbubble gas volume: a unifying dose parameter in blood–brain barrier opening by focused ultrasound. *Theranostics.* 2017;7:144–52. <https://doi.org/10.7150/thno.15987>
- Springer AD**. et al. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):109-118. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- Steffens RC**, et al. Directing the way—receptor and chemical targeting strategies for nucleic acid delivery. *Pharm Res.* 2023;40:47–76. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03385w>
- Su F-Y**, et al. In vivo mRNA delivery to virus-specific T cells by light-induced ligand exchange of MHC class I antigen-presenting nanoparticles. *Sci Adv.*2022;8:7950. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm7950>
- Suga T**, et al. Ligand peptide-grafted PEGylated liposomes using HER2 targeted peptide-lipid derivatives for targeted delivery in breast cancer cells: the effect of serine-glycine repeated peptides as a spacer. *Int J Pharm.* 2017;521:361-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.041>
- Takeuchi T**, et al. Current understanding of direct translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides and its internalization mechanisms. *Chem Pharm Bull.* 2016;64:1431-7. <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00505>
- Tanaka H**, et al. Self-degradable lipid-like materials based on “hydrolysis accelerated by the intraparticle enrichment of reactant (HyPER)” for messenger RNA delivery. *Adv Funct Mater.* 2020;30:1910575. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201910575>

- Tang Q**, et al. Cell-selective messenger RNA delivery and CRISPR/Cas9 genome editing by modulating the interface of phenylboronic acid-derived lipid nanoparticles and cellular surface sialic acid. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11:46585–90. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17749>
- Tang X**, et al. Triton X-100-modified adenosine triphosphate-responsive siRNA delivery agent for antitumor therapy. *Mol Pharm*. 2020;17:3696–708. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C00291>
- Tammam SN**, et al. Chitosan nanoparticles for nuclear targeting: the effect of nanoparticle size and nuclear localization sequence density. *Mol Pharm*. 2015;12:4277–89. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00478>
- Tenchov BG**, et al. Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: cholesterol as membrane “fusogen”. *Biophys J*. 2006;91:2508–16. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.083766>
- Thi TTH**, et al. Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: from cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines. *Vaccines*. 2021;9:359. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9040359>
- Torchilin VP**. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:813–27. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Un K**, et al. Suppression of melanoma growth and metastasis by DNA vaccination using an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier. *Mol Pharm*. 2011;8:543–54. <https://doi.org/10.1021/mp100369n>
- Verbeke R**, et al. The dawn of mRNA vaccines: the COVID-19 case. *J Control Release*. 2021;333:51120. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.043>
- Waheed I. et al.** Lipid-based nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Front Oncol*. 2024;14:1296091. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1296091>
- Wang B**, et al. Advances in the study of LNPs for mRNA delivery and clinical applications. *Virus Genes*. 2024. <https://doi.org/10.1007/s11262-024-02102-6>
- Wang H** et al. A self-assembled coumarinanchored dendrimer for efficient gene delivery and light-responsive drug delivery. *Biomacromolecules*. 2018;19:2194–201. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00246>
- Wang J**. Far-red light-mediated programmable anti-cancer gene delivery in cooperation with photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2018;171:72–82. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.04.020>
- Wang J**, et al. Designer exosomes enabling tumor targeted efficient chemo/gene/photothermal therapy. *Biomaterials*. 2021;276: 121056. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.121056>
- Wang J**, et al. Recent advances in lipid nanoparticles and their safety concerns for mRNA delivery. *Vaccines*. 2024;2024(12):1148. <https://doi.org/10.3390/VACCINES12101148>
- Wang QY**, et al. Phenylboronic ester-modified anionic micelles for ROS-stimuli response in HeLa cell. *Drug Deliv*. 2020;27:681–90. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748761>
- Wang S**, et al. The role of protein corona on nanodrugs for organ-targeting and its prospects of application. *J Control Release*. 2023;360:15–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.06.014>
- Wang Z**, et al. Shape-controlled magnetic mesoporous silica nanoparticles for magnetically-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*. 2018;154:147–57. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2017.10.047>
- Warminski M**, et al. Chemical modifications of mRNA ends for therapeutic applications. *Acc Chem Res*. 2023;56:2814–26. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00442>

- Weinstein S**, et al. Harnessing RNAi-based nanomedicines for therapeutic gene silencing in B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E16-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519273113>
- Whitehead KA**, et al. Degradable lipid nanoparticles with predictable in vivo siRNA delivery activity. *Nat Commun*. 2014;5:1-10. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS5277>
- Wilhelm S**, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater*. 2016;1:16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
- Wisse E**, et al. The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocytedirected gene transfer. *Gene Ther*. 2008;15:1193-9. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.60>
- Wittrup A**, et al. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. *Nat Biotechnol*. 2015;33:870-6. <https://doi.org/10.1038/nbt.3298>
- Witzigmann D**, et al. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:34463. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.026>
- Xiong H**, et al. Theranostic dendrimerbased lipid nanoparticles containing PEGylated BODIPY dyes for tumor imaging and systemic mRNA delivery in vivo. *J Control Release*. 2020;325:198-205. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.06.030>
- Xu J**, et al. Advancements in NSCLC: from pathophysiological insights to targeted treatments. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2024;47:291-303. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000001088>
- Xu X**, et al. Recent advances in site-specific lipid nanoparticles for mRNA delivery. *ACS Nanosci Au*. 2023;3:192-203. <https://doi.org/10.1021/acsnanoscienceau.2c00062>
- Xue L**, et al. Combinatorial design of siloxane incorporated lipid nanoparticles augments intracellular processing or tissue-specific mRNA therapeutic delivery. *Nat Nanotechnol*. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41565-024-01747-6>
- Yamamoto T**, et al. Serial incorporation of a monovalent GalNAc phosphoramidite unit into hepatocyte-targeting antisense oligonucleotides. *Bioorg Med Chem*. 2016;24:26-32. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.036>
- Yan Y**, et al. Non-viral vectors for RNA delivery. *J Control Release*. 2022;342:241-79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008>
- Yang J**. Intratumoral injection of naked DNA. In: *Gene therapy for cancer*. New Jersey: Humana Press; 2000. p. 313-21. <https://doi.org/10.1385/1-59259-086-1:313>
- Yang T**, et al. Rolling microneedle electrode array (RoMEA) empowered nucleic acid delivery and cancer immunotherapy. *Nano Today*. 2021;36: 101017. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101017>
- Yoshikawa N**, et al. Interaction of lipoplex with albumin enhances gene expression in hepatitis mice. *Pharmaceutics*. 2020;12:341. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040341>
- Yoshinaga N** et al. Polyplex micelles with phenylboronate/gluconamide cross-linking in the core exerting promoted gene transfection through spatiotemporal responsivity to intracellular pH and ATP concentration. *JAm Chem Soc*. 2017;139:18567-75. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b08816>
- Zeng Y**, et al. Lipid nanoparticlebased mRNA candidates elicit potent T cell responses. *Biomater Sci*. 2022;11:964-74. <https://doi.org/10.1039/d2bm01581a>

- Zhang C**, et al. Ultrasound-enhanced reactive oxygen species responsive charge-reversal polymeric nanocarriers for efficient pancreatic cancer gene delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022;14:2587–96. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c20030>
- Zhang C**, et al. RNA therapeutics: updates and future potential. *Sci China Life Sci*. 2023;66:12–30. <https://doi.org/10.1007/S11427-022-2171-2>
- Zhang R**, et al. Helper lipid structure influences protein adsorption and delivery of lipid nanoparticles to spleen and liver. *Biomater Sci*. 2021;9:1449–63. <https://doi.org/10.1039/D0BM01609H>
- Zhang X**, et al. Bio-reducible, arginine-rich polydisulfide-based siRNA nanocomplexes with excellent tumor penetration for efficient gene silencing. *Biomater Sci*. 2021;9:5275–92. <https://doi.org/10.1039/D1BM00643F>
- Zhang Y**, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. *Chem Rev*. 2021;121:12181–277. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00244>
- Zhang Y**, et al. An analysis of the binding function and structural organization of the protein corona. *J Am Chem Soc*. 2020;142:8827–36. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01853>
- Zhang Z**, et al. Dual-locking nanoparticles disrupt the PD-1/PD-L1 pathway for efficient cancer immunotherapy. *Adv Mater*. 2019;31:1905751. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201905751>
- Zhao P**, et al. Long-term storage of lipid-like nanoparticles for mRNA delivery. *Bioact Mater*. 2020;5:358–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.001>
- Zhao X**, et al. Imidazole-based synthetic lipidoids for in vivo mRNA delivery into primary T lymphocytes. *Angew Chem Int Ed*. 2020;59:20083–9. <https://doi.org/10.1002/anie.202008082>
- Zhao X**, et al. mRNA delivery using bio-reducible lipidoid nanoparticles facilitates neural differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Healthc Mater*. 2021;10:2000938. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202000938>
- Zhao Y**, et al. Fine tuning of core-shell structure of hyaluronic acid/cell-penetrating peptides/siRNA nanoparticles for enhanced gene delivery to macrophages in anti-atherosclerotic therapy. *Biomacromolecules*. 2018;19:2944–56. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b005011>
- Zhao Z**, et al. Targeting strategies for tissue-specific drug delivery. *Cell*. 2020;181:151–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.001>
- Zheng N**, et al. Cationic polyporphyrins as siRNA delivery vectors for photodynamic and gene synergistic anticancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021;13:27513–21. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c07662>
- Zhou Z**, et al. ATP-activated decrosslinking and charge-reversal vectors for siRNA delivery and cancer therapy. *Theranostics*. 2018;8:4604–19. <https://doi.org/10.7150/HNO.26889>
- Zhu X**, et al. Surface de-PEGylation controls nanoparticle-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. *Theranostics*. 2017;7:1990–2002. <https://doi.org/10.7150/thno.18136>
- Zimmermann TS**, et al. Clinical proof of concept for a novel hepatocyte-targeting GalNAc-siRNA conjugate. *Mol Ther*. 2017;25(1):71–78. DOI: [10.1016/j.ymthe.2016.10.019](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.019)

11. SITOGRAFIA

AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) (2019) <https://www.aifa.gov.it/en/farmaci-innovativi>

AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) (2020) <https://www.aifa.gov.it/comirnaty>

AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) (2021) <https://www.aifa.gov.it/moderna>

AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) (2021)

<https://www.airc.it/arestampa/scoperta-lazione-di-composti-chimici-che-possono-stimolare-il-sistema-immunitario-contro-le-cellule-tumoriali>

AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) (2023). "Sistema CRISPR/Cas9". <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/ricerca-di-base/sistema-crisprcas9>

Alnylam Pharmaceuticals. Amvuttra (vutrisiran): Highlights of prescribing information. (2022). <https://www.alnylam.com/sites/default/files/pdfs/AMVUTTRAPrescribing-Information.pdf>

Alnylam Pharmaceuticals. Alnylam announces positive phase 2 results for cemdisiran in IgA nephropathy. Press release. <https://investors.alnylam.com/press-release?id=26921> (2022)

Alnylam Pharmaceuticals. Alnylam and Regeneron announce positive initial results from ongoing phase 1 study of ALN-APP, an investigational RNAi therapeutic targeting amyloid precursor protein (APP) for the treatment of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. (2023). <https://investors.alnylam.com/press-release?id=27441>

Arrowhead Pharmaceuticals (2020). <https://arrowheadpharma.com/news-press/arrowhead-pharmaceuticals-initiates-dosing-phase-1-2-study-of-aro-enac-for-treatment-of-cystic-fibrosis/>

BioNTech. Pipeline. <https://www.biontech.com/int/en/science/pipeline.html> (2025)

Chimica-online.it <https://www.chimica-online.it/biologia/endosoma.htm>

De Rosa G. (2024) Terapia genica e medicinali a base di DNA e RNA: come funzionano, cosa aspettarsi in futuro. Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV) 2024. <https://www.fisv.org/2024/10/07/terapia-genica-medicinali-dna-rna-come-funzionano-cosa-aspettarsi-in-futuro/>

EMA European Medicines Agency. Casgevy: EPAR - Product Information. (2023) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/casgevy>

EMA European Medicines Agency. Comirnaty: EPAR - Product Information. (2020) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>

EMA European Medicines Agency. Leqvio: EPAR - Product Information. (2020) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/leqvio>

EMA European Medicines Agency. Spikevax: EPAR - Product Information. (2021) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax>

EMA European Medicines Agency. Spinraza: EPAR - Product Information. (2017) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza>

EMA European Medicines Agency. Tegsedi: EPAR - Product Information. (2018) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tegsedi>

EMA European Medicines Agency. Casgevy: EPAR - Product Information. (2023) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/casgevy>

FDA Food and Drug Administration. Exondys51

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/2064881b1.pdf

Fondazione Mutagenics (2022) “Terapia genica”
<https://www.mutagens.it/informati/terapiagenica/#:~:text=La%20terapia%20genicaTrattamento%20basato,di%20alcuni%20tipi%20di%20cancro>

Intellia Therapeutics. Intellia announces positive interim clinical data for its second in vivo CRISPR candidate, NTLA-2002 for the treatment of hereditary angioedema (2022). <https://ir.intelliatx.com/news-releases/news-release-details/intellia-therapeutics-announces-positive-interim-clinical-data>

Moderna Moderna. Pipeline. <https://www.modernatx.com/pipeline> (2025)

Moderna. Moderna announces positive interim phase 1/2 data for mRNA-3705, its investigational mRNA therapeutic for methylmalonic acidemia (MMA). Press release. (2021). <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2021/Moderna-Announces-First-Patient-Dosed-in-Phase-12-Study-of-mRNA-3705-for-Methylmalonic-Acidemia/default.aspx>

Moderna. Moderna announces positive phase 2 interim results for its cytomegalovirus (CMV) vaccine. Press release. (2022) <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2022/Moderna-Announces-Clinical-and-Program-Updates-at-3rd-Annual-Vaccines-Day/default.aspx>

Moderna. Moderna announces positive interim phase 1/2 data for its seasonal influenza vaccine candidates. Press release. (2021) <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2021/Moderna-Announces-Positive-Interim-Phase-1-Data-for-mRNA-Flu-Vaccine-and-Provides-Program-Update/default.aspx>

Molecular Devices (2023). "Editing genetico (CRISPR/Cas9)" <https://it.moleculardevices.com/applications/gene-editing-with-crispr-engineering>

Moderna (2024). <https://trials.modernatx.com/study/?id=mRNA-4157-P201>

Osservatorio Terapie Avanzate (2024) “Editing genomico - CRISPR: i primi studi sulle somministrazioni multiple” <https://www.osservatorioterapieavanzate.it/terapieavanzate/editing-genomico/crispr-i-primi-studi-sulle-somministrazioni-multiple>