



LNP PER IL DELIVERY DI FARMACI NUCLEICI

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono i sistemi più impiegati nella veicolazione di farmaci nucleotidici. Il grado di caricamento e rilascio del farmaco dipendono dalla composizione lipidica mentre il coating con PEG, utilizzato per migliorarne la stabilità colloidale e la circolazione sistemica, riduce l'uptake cellulare e conseguentemente l'azione terapeutica, dando origine al cosiddetto "PEG dilemma". Nuovi lipidi funzionali consentono di bilanciare stabilità e funzionalità biologiche di questi sistemi colloidali.

Introduzione

I farmaci a struttura nucleotidica rappresentano la classe più innovativa tra i prodotti terapeutici, offrendo nuove opportunità di trattamento anche di patologie fino a oggi incurabili. A differenza dei farmaci tradizionali di sintesi chimica (piccole molecole), queste macromolecole biologiche agiscono, per lo più, all'origine della patologia, attraverso la modifica altamente selettiva dei processi di trascrizione e traduzione genica, con conseguente silenziamento o attivazione dell'espressione [1] proteica.

Nel corso degli ultimi decenni sono stati sviluppati diversi tipi di farmaci nucleici, sia a basso peso molecolare, come siRNA ed ASO [2], sia ad alto peso molecolare, come mRNA [3], entrati in vari trattamenti clinici. Sebbene la potenzialità terapeutica di questa classe di farmaci sia eccezionale, la loro formulazione, al fine di tradurli in agenti terapeutici efficaci, costituisce uno dei principali aspetti critici per il loro sviluppo e impiego clinico. Nonostante il forte impegno, sia a livello accademico sia industriale, nello sviluppo di formulazioni efficienti, la tecnologia di formulazione di farmaci nucleotidici può considerarsi ancora relativamente giovane, e il suo sviluppo può fornire risposte a necessità terapeutiche ancora aperte.

I limiti dell'impiego di farmaci nucleotidici sono, per lo più, rappresentati dalla bassa stabilità chimica ed enzimatica, dalla rapida eliminazione dall'organismo per ultrafiltrazione renale, dall'elevata immunogenicità, attraverso l'attivazione dei *toll like*

receptors (TLR 7, 8 e 9), e, infine, dall'attività terapeutica in siti diversi da quelli che riguardano la patologia (*off-target*) [4]. Per superare questi limiti e migliorare le caratteristiche biofarmaceutiche e terapeutiche di queste macromolecole, sono state adottate due principali strategie: la modifica chimica della struttura oligo- o poli-nucleotidica e lo sviluppo di adeguati *carrier* che, diversamente dai primi, consentono maggiore flessibilità di *delivery* anche verso *target* specifici.

La modifica chimica degli acidi nucleici, a livello dell'anello di ribosio o desossiribosio, del gruppo fosfato o delle basi, consente la formazione di derivati enzimaticamente più stabili e con una maggiore permanenza nel circolo sanguigno, grazie alle interazioni con proteine circolanti, rispetto ai prodotti nativi. Modifiche chimiche, come la sostituzione di uracile con pseudo-uridina, hanno permesso l'ottenimento di prodotti meno immunoreattivi [5].

Sebbene strategie di modifica chimica siano risultate efficienti nell'ottenimento di acidi nucleici più stabili e meno immunogenici, tali approcci non hanno risolto il problema della veicolazione e del raggiungimento del *target* intracellulare in modo efficiente e selettivo, per lo svolgimento dell'azione terapeutica in distretti dell'organismo, organi, tessuti o cellule diversi dal fegato. Infatti, la maggior parte degli acidi nucleici approvati per l'uso clinico, somministrati in soluzione senza una specifica formulazione e non caratterizzati da un *targeting* specifico, sono prevalentemente impiegati per il



trattamento di patologie correlate al fegato, in virtù della loro spontanea capacità biodistributiva in questo organo.

Da un punto di vista formulativo, sono stati sviluppati diversi vettori colloidali con l'obiettivo di migliorare la stabilità dei farmaci a struttura nucleotidica, proteggendoli da enzimi degradanti, consentendo la permanenza prolungata nell'organismo dopo somministrazione parenterale, riducendone l'eliminazione renale e l'uptake epatico, e favorendo la localizzazione selettiva negli organi bersaglio. In questo senso sono stati sviluppati sistemi a diversa composizione, tra cui sistemi inorganici, come ad esempio nanoparticelle di silice mesoporosa, sistemi a base polimerica, come le nanoparticelle biodegradabili di PLGA e poliplessi, e sistemi di tipo lipidico, come le *lipid nanoparticles* [6].

Risultati e discussione

Le *lipid nanoparticles* (LNP) sono i sistemi più studiati e impiegati a livello clinico per il rilascio di farmaci nucleotidici. Nelle versioni più convenzionalmente impiegate, sono ottenute per combinazione, in rapporti definiti, del farmaco nucleotidico con quattro tipi di lipidi: lipidi *helper*, colesterolo, lipidi ionizzabili e lipidi-PEG. I lipidi *helper* e il colesterolo rappresentano gli eccipienti strutturali; i lipidi ionizzabili consentono la condensazione con l'acido nucleico durante le fasi di formulazione e provvedono all'*endosomal escape* (passaggio indispensabile per il rilascio del nucleotide nel citosol, dove, nella maggior parte dei casi, svolge la sua funzione), mentre il lipide-PEG conferisce stabilità colloidale al sistema e previene l'adesione superficiale di proteine che, in genere, riduce la loro permanenza nel sangue dopo somministrazione. Le LNP hanno dimostrato una buona efficienza nel rilascio di acidi nucleici di prodotti vaccinali utilizzati

nella profilassi antivirale durante la pandemia Covid-19, poiché svolgono la loro azione dapprima a livello locale e, quindi, ai linfonodi, stimolando la memoria immunologica. Comunque, numerosi studi sono stati recentemente condotti per ottimizzare la formulazione di LNP attraverso lo sviluppo di nuovi eccipienti funzionali, per lo più lipidi ionizzabili, in grado di migliorare il grado di caricamento del farmaco, l'uptake cellulare e l'*endosomal escape*, la biocompatibilità e la stabilità del sistema colloidale. Nell'ambito del programma di ricerca CN3 (Centro Nazionale per la Terapia Genica e lo Sviluppo di Farmaci con Tecnologia a RNA del PNRR), è stato condotto uno studio sullo sviluppo di nuovi componenti lipidici per l'ottenimento di formulazioni ad alta efficienza di trasfezione, biocompatibilità e stabilità colloidale. In questo studio sono stati sviluppati e studiati due componenti lipidici chiave: un lipide oligocationico, per aumentare la capacità di caricamento e favorire l'uptake cellulare e il rilascio del farmaco nel citosol, e un lipide-PEG pH-sensibile, in grado di controllare in modo sito-specifico il passaggio delle LNP attraverso le barriere cellulari. In particolare, il lipide-PEG sensibile al microambiente intracellulare consente di superare le limitate caratteristiche di stabilità dei lipidi-PEG usati nei prodotti commerciali, che dissociano molto rapidamente e non consentono di

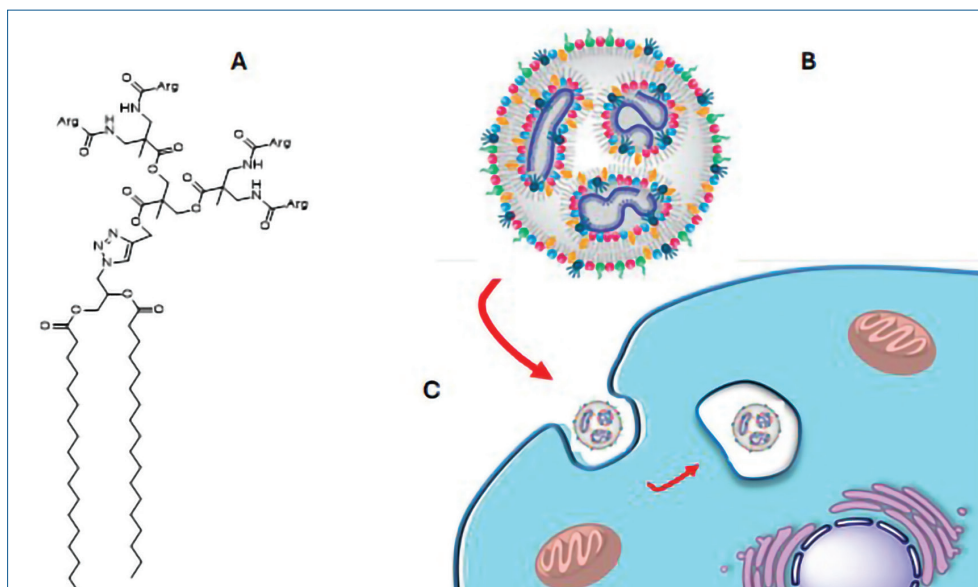


Fig. 1 - A. Lipide oligocationico (OCE). B. rappresentazione di LNP ottenuta con lipidi helper (rossi), colesterolo (arancione), lipidi fusogenici o ionizzabili (azzurro), lipide-PEG (verde) OCE (blue). C. rappresentazione del processo di uptake cellulare

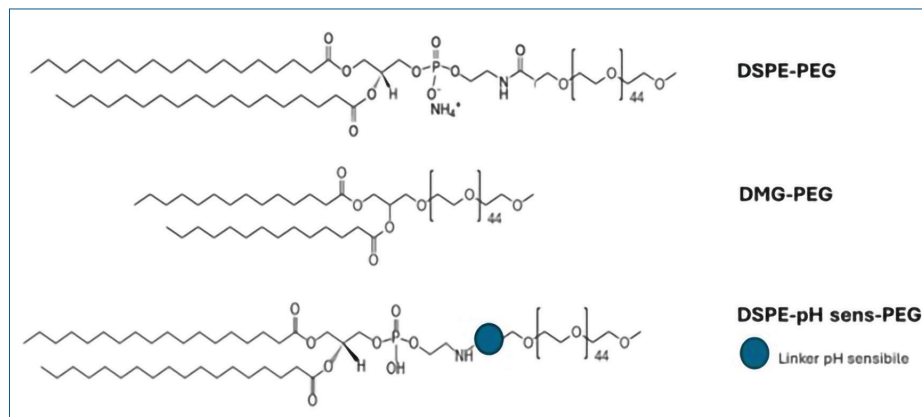


Fig. 2 - Struttura chimica di lipidi-PEG utilizzati nel coating di LNP

ottenere LNP decorate sulla superficie con agenti direzionanti per il *targeting* attivo.

Per questo studio è stata preparata una *library* di LNP ottenute mediante tecniche di microfluidica, combinando, in proporzioni selezionate da studi precedenti, diversi componenti lipidici: HSPC come lipide *helper*, colesterolo, DOPE come lipide fusogenico, lipidi ionizzabili come DODAP, D-Lin-MC3-DMA (MC3), ALC-0315 o SM-102, oppure lipidi non ionizzabili come EPC. Le LNP sono state ottenute includendo il 4 mol% di un lipide oligocationico (OCE), per valutare l'effetto di *cluster* di cariche cationiche, presenti sulla superficie delle LNP, sulle caratteristiche biofarmaceutiche e biologiche di queste formulazioni. L'OCE (Fig. 1) è stato ottenuto attraverso un processo di sintesi *multi-step* ed è costituito da quattro funzioni guanidiniche legate a un gruppo di-acilico, che fornisce ancoraggio alla matrice lipidica del *carrier* [7].

Le LNP sono quindi state rivestite in superficie con diversi tipi di lipidi-PEG, in grado di migliorarne la stabilità colloidale. Sono stati studiati tre tipi di lipidi-PEG (Fig. 2): DSPE-PEG, in cui la catena di PEG è coniugata a distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) attraverso un legame stabile; DMG-PEG, in cui il PEG è legato a dimiristoilglicerolo attraverso un legame stabile; e DSPE-pH-sens-PEG, in cui il PEG è legato

a DSPE attraverso un legame pH-sensibile. Le LNP ottenute sono state comparativamente caratterizzate per valutare il grado di caricamento di farmaci nucleotidici, utilizzando eGFP-siRNA come modello, la stabilità del farmaco, la stabilità colloidale della formulazione in diverse condizioni simulanti situazioni fisiopatologiche, nonché l'interazione, l'*uptake* cellulare e l'efficienza di trasfezione in un modello

cellulare esprimente eGFP.

Rispetto alle LNP prive di OCE, la presenza del lipide oligocationico nella formulazione lipidica ha sempre aumentato l'efficacia di condensazione degli acidi nucleici (siRNA utilizzato come modello), che è risultata più del doppio rispetto a quella ottenuta con le classiche formulazioni prive di questo componente. Inoltre, l'introduzione del lipide oligocationico nelle formulazioni ha portato a un significativo aumento dell'interazione delle LNP con le cellule e del loro *uptake* (Fig. 3).

Tuttavia, tutte le LNP, sia quelle contenenti OCE sia quelle prive di OCE, sono risultate colloidalmente poco stabili in ambiente fisiologico, in presenza delle proteine del siero, rendendole quindi non adeguate per l'impiego terapeutico.

Per ovviare a questo problema, le LNP sono state rivestite con lipidi-PEG. In questa parte dello

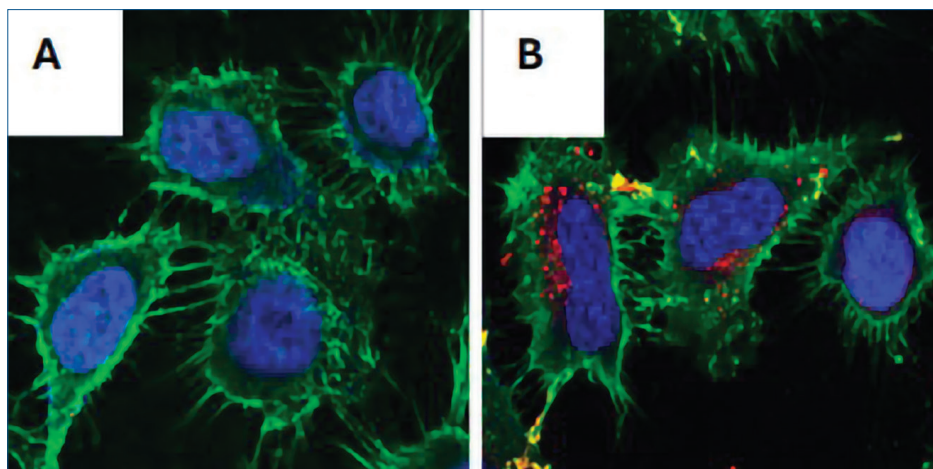


Fig. 3 - Immagine confocale di *uptake* cellulare di LNP senza OCE (A) e LNP contenenti 4% di OCE (B). Verde, membrana cellulare; blue, nucleo; rosso LNP marcate con Cy-5



studio sono stati esaminati lipidi-PEG con diversa struttura chimica, in grado di formare *coating* stabili (DSPE-PEG), *coating* fisicamente instabili con rapida autodissociazione (DMG-PEG) e *coating* degradabili in specifiche condizioni fisiopatologiche (DSPE-pHsens-PEG).

Grazie alle lunghe catene alchiliche, DSPE-PEG è stabilmente legato alla superficie delle LNP, conferendo stabilità colloidale, senza variazioni della dimensione e della polidispersività nanoparticellare, e l'incubazione con siero ha dimostrato una ridotta opsonizzazione. Tuttavia, studi condotti con cellule eGFP-H1229 hanno rivelato un ridotto *uptake* cellulare e bassa trasfezione.

DMG-PEG, utilizzato in formulazioni approvate per uso clinico, come Onpattro, è ancorato alla superficie delle LNP attraverso catene alchiliche corte che non consentono un rivestimento stabile. Infatti, DMG-PEG viene lentamente rilasciato nel tempo, soprattutto in presenza di proteine e per scambio con componenti biologici quali le membrane cellulari. Sebbene la dissociazione del rivestimento in siero favorisca l'interazione e l'*uptake* cellulare delle LNP, la stabilità colloidale del sistema è bassa, compromettendone l'efficacia terapeutica. Inoltre, la rapida dissociazione del *coating* non consente di implementare il sistema con *targeting* specifico attraverso l'inserimento di ligandi per il bioriconoscimento.

Il *coating* di LNP con il derivato pH-sensibile (DSPE-pHsens-PEG) è stabile a pH 7,4 del circolo sanguigno, garantendo stabilità colloidale alle LNP nel sangue. Il *linker* idrolizza a pH 6,5, caratteristico dell'ambiente intracellulare endosomiale, rilasciando il PEG e ristabilendo un'efficace fusione delle LNP con le membrane endosomiali e il rilascio nel citosol degli acidi nucleici. Ne è risultato un aumento della trasfezione rispetto alle LNP decorate con PEG-DSPE, che non viene rilasciato nel microambiente cellulare.

Conclusioni

L'ottenimento di LNP ad elevata efficienza terapeutica richiede un'attenta progettazione formulativa, con l'impiego di materiali lipidici appositamente progettati. Spesso i materiali impiegati migliorano alcune caratteristiche biofarmaceutiche peggiorandone altre, come nel caso del "PEG dilemma".

Pertanto, la combinazione dei componenti delle LNP risulta essere la chiave del successo di questi vettori.

Nel caso riportato in questo studio, l'impiego di lipidi con cariche cationiche puntiformi ad alta densità migliora la condensazione e il caricamento del farmaco e l'*uptake* cellulare, mentre il *coating* con lipidi-PEG idrolizzabili consente un miglioramento delle caratteristiche colloidali, il controllo dell'interazione con le cellule, dell'*uptake* e, infine, della trasfezione. I lipidi-PEG possono essere impiegati con successo in combinazione con ligandi specifici per il *targeting* attivo delle LNP. In questo caso, la permanenza del PEG sulla superficie garantisce che le LNP possano giungere integre al sito bersaglio per il bioriconoscimento e, solo successivamente, dopo l'*uptake*, la dissociazione del *coating* consente alle LNP il rilascio del cargo nel citosol.

BIBLIOGRAFIA

- [1] X. Sun *et al.*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, **9**, 316.
- [2] Y. Miao *et al.*, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2024, **14**(9), 3802.
- [3] Yi. Shi *et al.*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, **9**, 322.
- [4] K.A. Lennox *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 2025, **2965**, 57.
- [5] S. Naeem *et al.*, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2025, **36**(1), 102440.
- [6] R. van der Meel *et al.*, *Nature Reviews Materials*, 2025, **10**, 490.
- [7] A. Malfanti *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 2023, **363**, 101.

LNPs for Nucleic Acid Delivery

Lipid nanoparticles (LNPs) are suitable systems for the delivery of nucleic acids. However, their performance strongly depends on lipid composition while the surface PEGylation commonly used to enhance the colloidal stability and systemic circulation, reduces cellular interaction and transfection, giving rise to the so-called "PEG dilemma". Therefore, it is necessary to develop new lipids that balance stability and biological functionality.