



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**INTERAZIONE TRA NANOPARTICELLE
LIPIDICHE E PROTEINE PLASMATICHE:
CARATTERIZZAZIONE DIMENSIONALE
E TERMODINAMICA MEDIANTE TRPS E
ITC**

Relatore: Prof.ssa Catenacci Laura

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Chiara Zancani

Anno Accademico 2025/2026

Il presente lavoro di tesi è stato svolto nell'ambito di un progetto di ricerca la cui proprietà intellettuale appartiene al gruppo di ricerca coordinato dalla Prof.ssa Maria Cristina Bonferoni, nel quadro di un progetto PNRR finanziato dall'Unione Europea — NextGeneration EU: PNRR_CN3, Centro Nazionale per la Terapia Genica e i Farmaci a Tecnologia a RNA, Spoke 9, CUP: F13C22000700007, M4C2-investimento 1.4 CN00000041.

Le attività sono state condotte utilizzando le strutture e le risorse dell'Università di Pavia; di conseguenza, l'utilizzo di eventuali risultati e prodotti brevettabili derivanti da tale ricerca sarà di proprietà dell'Università stessa e del gruppo di ricerca coordinato dalla Prof.ssa Maria Cristina Bonferoni, responsabile del progetto.

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1. Sistemi di somministrazione dei farmaci	1
1.1.1. Classificazione dei sistemi di drug delivery (DDS).....	5
1.1.2. Nanomedicina e sistemi nanoparticellari.....	6
1.1.3. Limitazioni e problematiche associate alle nanoparticelle.....	8
1.2. Caratteristiche generali delle nanoparticelle lipidiche.....	9
1.2.1. Delivery di acidi nucleici.....	11
1.2.2. Applicazioni terapeutiche e rilevanza clinica.....	12
1.3. Composizione delle nanoparticelle lipidiche.....	13
1.3.1. Lipidi PEGilati.....	14
1.3.2. Lipidi ionizzabili e cationici.....	17
1.3.3. Fosfolipidi.....	20
1.3.4. Colesterolo.....	21
1.3.5. Colesterolo fuorescente.....	22
1.4. Metodi preparativi delle LNPs.....	23
1.4.1. Produzione tramite microfluidica.....	24
1.4.2. Caratteristiche e funzionamento del chip microfluidico.....	26
1.5. Caratterizzazione delle LNPs.....	28
1.5.1. Concentrazione.....	30
1.5.2. Proprietà superficiali.....	30
1.5.3. Efficienza di incapsulamento	31
1.6. Interazione delle nanoparticelle con l'ambiente biologico.....	32

1.7.	Formazione della corona proteica.....	35
2.	Scopo della tesi.....	38
3.	Materiali e metodi.....	41
3.1.	Materiali.....	41
3.1.1.	Formulazioni lipidiche.....	41
3.1.2.	CleanCap® mCherry mRNA (5moU)	46
3.1.3.	Sieroalbumina bovina (BSA).....	47
3.1.4.	Sieroalbumina umana (HSA).....	48
3.1.5.	Soluzioni tampone.....	49
3.2.	Metodi.....	50
3.2.1.	Produzione di nanoparticelle lipidiche mediante tecnologia microfluidica.....	50
3.2.2.	Dialisi.....	53
3.2.3.	Formazione della corona proteica.....	54
3.2.4.	Caratterizzazione LNPs.....	56
3.2.4.1.	Photon correlation spectroscopy (PCS).....	56
3.2.4.2.	Analisi del potenziale zeta tramite Dynamic Light Scattering (DLS).....	57
3.2.4.3.	Spettrofluorimetro.....	58
3.2.4.4.	Determinazione dell'efficienza di incapsulamento (EE%) tramite saggio RiboGreen™.....	59
3.2.4.5.	Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS).....	60
3.2.4.6.	Isothermal Titration Calorimetry (ITC).....	62
4.	Risultati e discussioni.....	64
4.1.	Analisi dimensionale mediante PCS.....	65
4.2.	Analisi dimensionale mediante TRPS.....	66
4.3.	Determinazione del contenuto lipidico.....	68
4.4.	Efficienza di incapsulamento (EE%).....	72

4.5. Proprietà superficiali delle nanoparticelle lipidiche, studio della protein corona.....	75
4.5.1. Potenziale zeta mediante DLS.....	76
4.5.2. TRPS.....	78
4.5.3. Studio delle interazioni di legame tramite Microcalorimetria ITC.....	83
 5. Conclusioni.....	91
 6. Bibliografia.....	94
 7. Ringraziamenti.....	110

1. Introduzione

1.1. Sistemi di somministrazione dei farmaci

Secondo quanto disposto dall'art. 1 del D.Lgs. 219/2006, il farmaco è definito come una sostanza o associazione di sostanze impiegata per la prevenzione, la diagnosi o il trattamento di una patologia, attraverso un'azione farmacologica, immunologica o metabolica. Affinché possa esercitare il proprio effetto terapeutico, il principio attivo deve raggiungere il sito d'azione in una concentrazione adeguata e per un intervallo di tempo sufficiente. L'efficacia di una terapia farmacologica non dipende pertanto esclusivamente dalle caratteristiche intrinseche del principio attivo, ma anche dalla modalità con cui esso viene somministrato e dal suo comportamento nell'organismo (Figura 1).

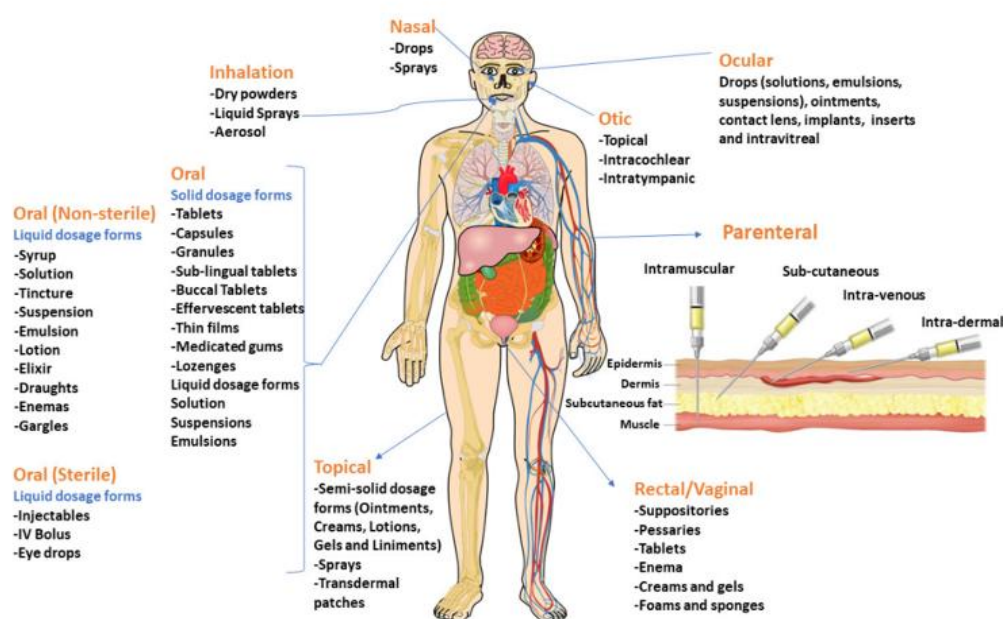


Figura 1. Differenti vie di somministrazione dei farmaci (Adepu S. et al., 2021).

Dopo la somministrazione, il principio attivo è infatti sottoposto a una serie di processi che ne determinano il destino nell'organismo, comunemente descritti attraverso il modello farmacocinetico ADME, che comprende assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione. Questi processi influenzano la quantità di farmaco che raggiunge la circolazione sistemica, la sua distribuzione nei diversi tessuti, il tempo di permanenza nell'organismo e, di conseguenza, l'intensità e la durata dell'effetto terapeutico. Per tutte queste ragioni, i farmaci somministrati tramite una delle vie convenzionali, possono essere eliminati dall'organismo rapidamente e la dose potrebbe non mantenersi entro la finestra terapeutica per un tempo sufficientemente lungo per produrre un effetto terapeutico significativo (Figura 2).

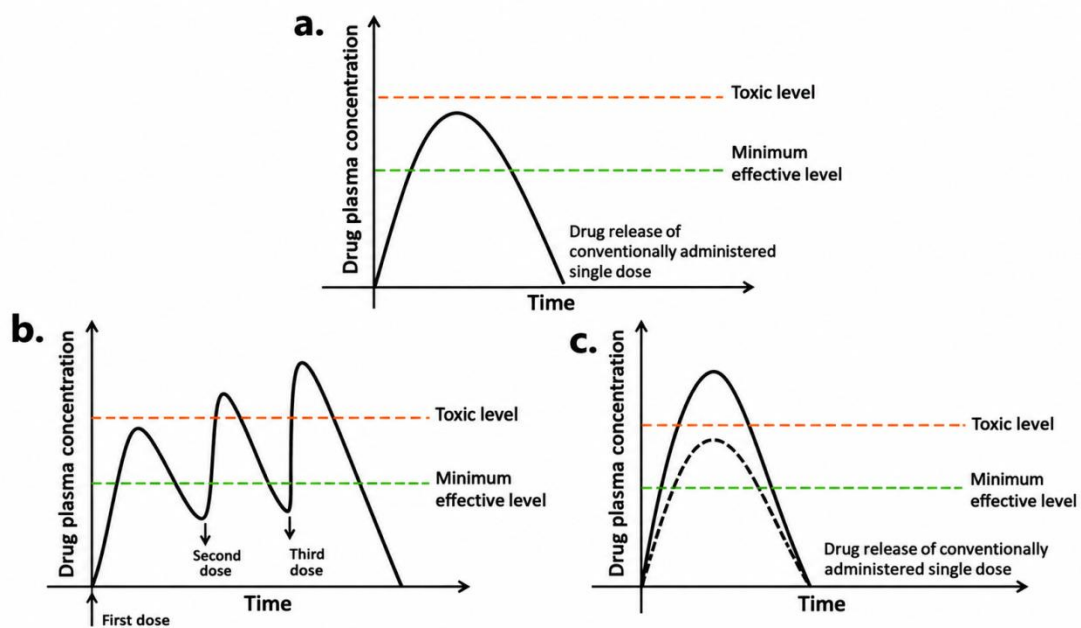


Figura 2. La figura illustra le fluttuazioni della concentrazione plasmatica del farmaco nei sistemi di somministrazione di farmaci convenzionali. (a) Dose singola convenzionale, (b) Dosi multiple, (c) Dose singola aumentata (Adepu S. et al., 2021).

Per mantenere la concentrazione plasmatica del farmaco al di sopra della concentrazione minima efficace (MEC) e al di sotto della concentrazione tossica, sono stati ricercati diversi approcci, in sostituzione all'assunzione della singola dose, tra cui:

- La somministrazione di dosi multiple a intervalli regolari. Provoca fluttuazioni nei livelli plasmatici del farmaco e spesso scende al di sotto dei livelli efficaci e al di sopra dei livelli tossici.

- La somministrazione di una singola dose superiore alla dose richiesta. Porta ad effetti avversi diversi da quelli desiderati dal farmaco.

Pertanto, sono necessari sistemi di somministrazione di farmaci a rilascio controllato per mantenere i livelli plasmatici del farmaco a un ritmo costante all'interno della finestra terapeutica e offrire l'effetto terapeutico desiderato per una durata di tempo più lunga (Figura 3).

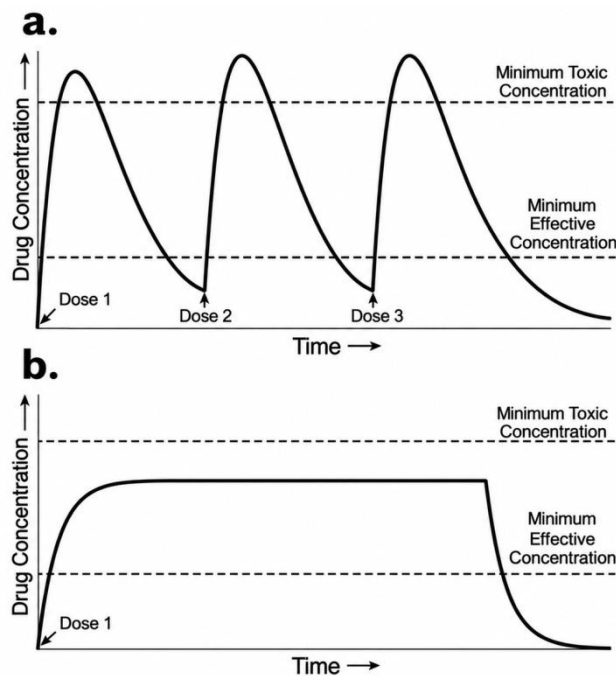


Figura 3. Curve farmacocinetiche (PK) della concentrazione plasmatica di un farmaco in funzione del tempo, per due tipi di sistemi di somministrazione, a) convenzionale e b) controllato (Adepu S. et al., 2021).

La scelta della via di somministrazione rappresenta quindi un elemento fondamentale nella progettazione di una terapia. I sistemi convenzionali di somministrazione dei farmaci che comprendono le principali vie di somministrazione, presentano specifici vantaggi e limitazioni che dipendono dalle caratteristiche del principio attivo e dall'obiettivo terapeutico. Indipendentemente dalla via utilizzata, numerosi principi attivi presentano caratteristiche fisico-chimiche o farmacocinetiche che ne possono limitare l'impiego terapeutico (Figura 4). Queste problematiche hanno portato allo sviluppo di strategie volte a migliorare il profilo farmacocinetico e farmacodinamico dei principi attivi, controllandone il rilascio, la distribuzione e la permanenza nell'organismo. In questo contesto si inseriscono i sistemi di somministrazione controllata, sistemi tecnologici progettati per favorire la somministrazione del principio attivo e modularne il comportamento biologico, con l'obiettivo di aumentarne l'efficacia terapeutica e, al contempo, limitarne gli effetti indesiderati (Afzal O. et al. 2022).

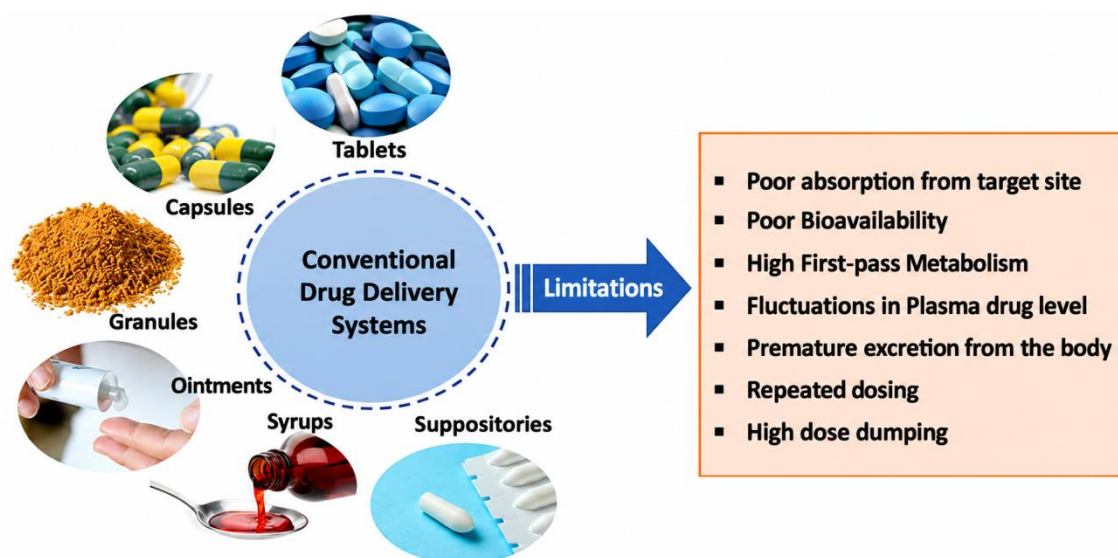


Figura 4. Rappresentazione di alcune limitazioni dei sistemi convenzionali di somministrazione dei farmaci (Adepu S. et al. 2021).

1.1.1. Classificazione dei sistemi di drug delivery (DDS)

I DDS possono essere costituiti da differenti materiali e presentare caratteristiche strutturali e funzionali molto diverse. In base alla loro natura, possono essere distinti in sistemi a rilascio modificato, sistemi a base lipidica, sistemi polimerici e, più recentemente, sistemi di dimensioni nanometriche. La scelta del sistema di delivery dipende dalle caratteristiche del principio attivo, dalla via di somministrazione e dall'obiettivo terapeutico che si intende raggiungere. I sistemi a rilascio controllato (Controlled Drug Delivery Systems) possono essere ulteriormente classificati in funzione del meccanismo responsabile del rilascio del principio attivo. Tra i principali meccanismi si distinguono il rilascio per dissoluzione, diffusione, ingresso dell'acqua nel sistema, processi osmotici, rigonfiamento e trasformazioni chimiche. La progettazione di questi sistemi mira a migliorare le prestazioni delle formulazioni convenzionali, consentendo, ad esempio, di prolungare il rilascio del principio attivo, aumentarne la stabilità e la biodisponibilità, migliorarne la solubilità e favorirne la distribuzione verso specifici tessuti o siti d'azione (Figura 5). Un ulteriore obiettivo di questi sistemi è il targeting, che può essere ottenuto attraverso strategie passive o attive. Nel targeting attivo, la superficie del sistema di delivery viene funzionalizzata con specifici ligandi in grado di riconoscere recettori presenti sulle cellule bersaglio, favorendo una distribuzione maggiormente selettiva. Inoltre, alcuni DDS sono progettati per rispondere a specifici stimoli, quali variazioni di pH o temperatura, ultrasuoni e campi magnetici, permettendo di modulare il rilascio del principio attivo in risposta alle condizioni dell'ambiente biologico (Adepu et al., 2021; Ezike, T. C., 2023; Afzal, O., 2022).

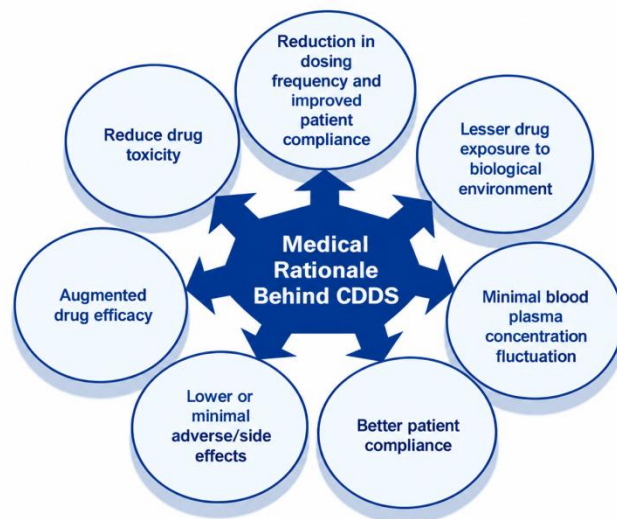


Figura 5. Fondamenti medici alla base dei sistemi di rilascio controllato di farmaci (Adepu et al., 2021).

1.1.2. Nanomedicina e sistemi nano particellari

L'evoluzione dei sistemi di Drug Delivery verso sistemi sempre più sofisticati ha portato allo sviluppo della nanomedicina, inaugurando una nuova era per la veicolazione dei farmaci, nella quale materiali e strutture su scala nanometrica vengono impiegati per la veicolazione di molecole terapeutiche. Le nanoparticelle presentano caratteristiche fisico-chimiche peculiari, determinate dalle loro ridotte dimensioni e dall'elevato rapporto superficie/volume che le caratterizza. Tali proprietà possono essere sfruttate per modificare il comportamento farmacocinetico dei principi attivi, migliorarne la solubilità e la stabilità e favorirne il trasporto verso specifici tessuti o cellule. Inoltre, la loro superficie può essere modificata mediante l'introduzione di specifiche molecole, come ligandi, anticorpi o altre strutture di riconoscimento, con l'obiettivo di favorire l'interazione con determinati bersagli biologici. I sistemi nanoparticellari possono essere costituiti da differenti materiali e, sulla base della loro composizione, possono essere classificati in diverse categorie (Figura 6).

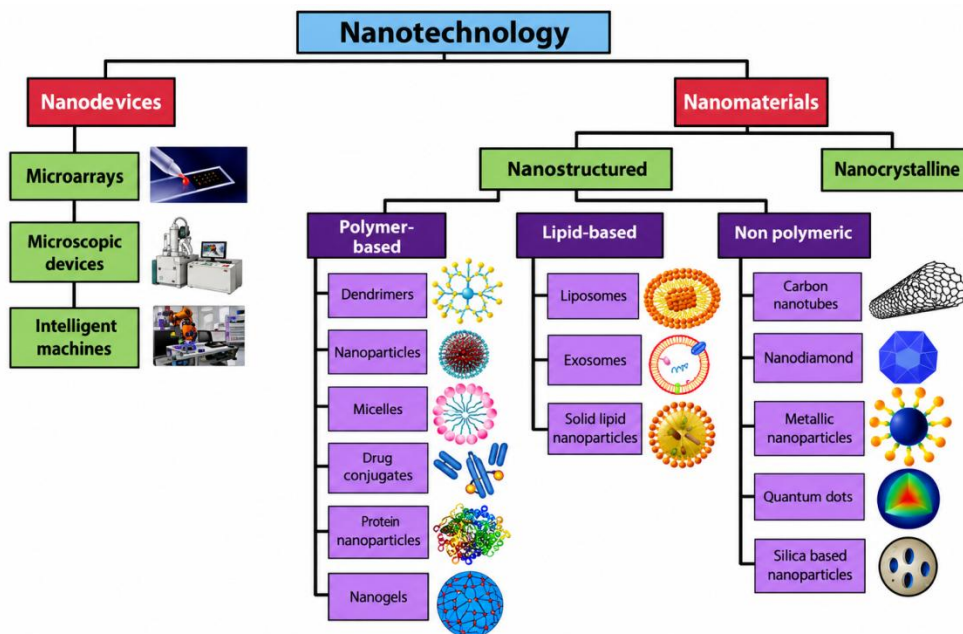


Figura 6. Elementi della nanotecnologia, utilizzati in applicazioni terapeutiche (Yetisgin, A. A. et al. 2020).

La scelta del materiale e delle caratteristiche strutturali del nanocarrier dipende dalla natura della molecola da veicolare e dall'applicazione terapeutica prevista. L'interesse verso la nanomedicina è inoltre legato alla possibilità di utilizzare questi sistemi per la veicolazione di molecole caratterizzate da proprietà che ne rendono difficoltosa la somministrazione mediante approcci convenzionali. Tuttavia, le proprietà delle nanoparticelle non dipendono esclusivamente dalla loro composizione e dalle caratteristiche determinate durante la formulazione. Una volta introdotte nell'organismo, esse entrano infatti in contatto con un ambiente biologico complesso, caratterizzato dalla presenza di proteine, lipidi e altre biomolecole che possono interagire con la loro superficie e modificarne il comportamento. La comprensione di tali interazioni rappresenta pertanto un aspetto fondamentale per valutare il destino biologico e l'efficacia dei sistemi nanoparticellari. In questo contesto si inseriscono le nanoparticelle

lipidiche (Lipid Nanoparticles, LNP), oggi particolarmente rilevanti come sistemi di delivery per molecole di acidi nucleici (Yetisgin, A. A. et al. 2020).

1.1.3. Limitazioni e problematiche associate alle nanoparticelle

Nonostante i numerosi vantaggi associati all'impiego delle nanoparticelle come sistemi di drug delivery, il loro utilizzo presenta alcune importanti criticità che possono limitarne l'efficacia terapeutica e la sicurezza. Una delle principali problematiche è rappresentata dalla stabilità del sistema, sia durante la conservazione sia dopo la somministrazione. Le nanoparticelle possono infatti andare incontro ad aggregazione, degradazione o modificazioni delle proprie caratteristiche fisico-chimiche, compromettendo la stabilità della formulazione e le prestazioni del sistema. Anche la biodistribuzione rappresenta una sfida rilevante, poiché le nanoparticelle possono essere rapidamente riconosciute e rimosse dall'organismo oppure accumularsi in tessuti diversi da quello bersaglio. Ottenere una distribuzione selettiva del principio attivo e limitarne l'esposizione ai tessuti sani rimane uno degli obiettivi principali nello sviluppo di nanocarrier. Un ulteriore aspetto riguarda la biocompatibilità e la sicurezza perché le interazioni con cellule e tessuti, possono determinare risposte immunitarie o infiammatorie indesiderate. Inoltre, la composizione e le proprietà superficiali del nanocarrier possono modificarsi in seguito al contatto con i fluidi biologici, anche attraverso l'adsorbimento di proteine e altre biomolecole sulla superficie, con la conseguente formazione della cosiddetta corona biologica. A queste criticità, si aggiungono le problematiche legate alla riproducibilità e alla scalabilità a livello industriale. La preparazione delle nanoparticelle richiede, infatti, il controllo di numerosi parametri di processo, le cui minime variazioni possono determinare differenze significative nelle caratteristiche finali della formulazione. La standardizzazione dei processi produttivi e la definizione

di adeguati parametri di qualità risultano pertanto fondamentali per garantire la riproducibilità, la sicurezza e l'efficacia dei sistemi nanoparticellari. Nel complesso, lo sviluppo di nanoparticelle per applicazioni terapeutiche richiede quindi un'attenta valutazione delle loro proprietà fisico-chimiche, della stabilità, della biodistribuzione, della biocompatibilità e delle interazioni con l'ambiente biologico. La comprensione di tali aspetti è fondamentale per poter progettare sistemi di drug delivery sicuri ed efficaci (Ezike T. C., 2023).

1.2. Caratteristiche generali delle nanoparticelle lipidiche

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono strutture sopramolecolari multicomponenti, formate dall'autoassemblaggio di diverse componenti lipidiche attraverso interazioni non covalenti. Le formulazioni più comunemente impiegate sono costituite da una combinazione di lipidi cationici o ionizzabili, fosfolipidi, colesterolo e lipidi coniugati con polietilenglicole(PEG) (Figura 7). La natura e la proporzione relativa di questi componenti svolgono un ruolo fondamentale nel determinare le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche delle nanoparticelle. La composizione lipidica può infatti influenzarne numerose proprietà, tra cui dimensione, distribuzione dimensionale, stabilità, efficienza di incapsulamento, interazione con le componenti biologiche e biodistribuzione. Durante il processo di autoassemblaggio, le diverse componenti lipidiche interagiscono tra loro e con il carico terapeutico, favorendone l'associazione e l'incapsulamento all'interno della nanoparticella. In particolare, i lipidi ionizzabili svolgono un ruolo importante nell'interazione con gli acidi nucleici durante la formazione delle LNP, mentre gli altri componenti contribuiscono alla stabilità e all'organizzazione complessiva della struttura.

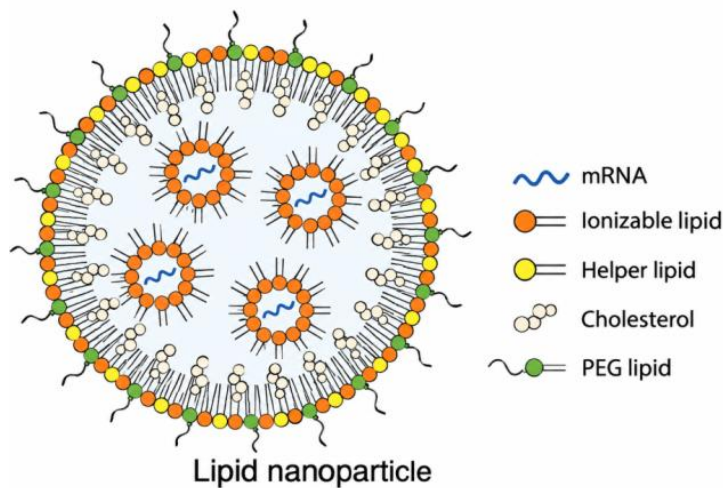


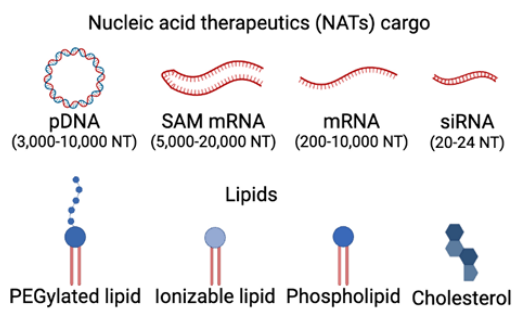
Figura 7. Struttura delle nanoparticelle lipidiche (M. Jeong et al, 2023).

Anche le proprietà superficiali, tra cui la carica superficiale e il potenziale zeta, possono influenzarne il comportamento biologico, modificando le interazioni con le membrane cellulari, le proteine plasmatiche e le cellule del sistema immunitario. In condizioni fisiologiche ($\text{pH} \sim 7.4$), i lipidi ionizzabili presentano una carica superficiale prossima alla neutralità che è generalmente associata a una riduzione delle interazioni aspecifiche e può favorire una maggiore biocompatibilità. Al contrario, in condizioni di pH acido, viene favorita l'interazione elettrostatica con gli acidi nucleici, contribuendo al loro incapsulamento. L'efficienza di incapsulamento e il successivo rilascio del carico terapeutico dipendono pertanto dall'interazione tra composizione lipidica, proprietà fisico-chimiche, condizioni di preparazione e da parametri quali dimensione delle particelle, indice di polidispersione (PDI) e pK_a dei lipidi ionizzabili. Dal punto di vista strutturale, le LNP presentano un'organizzazione interna complessa e non necessariamente riconducibile a una singola architettura. La comprensione del contributo dei singoli componenti lipidici rappresenta pertanto un aspetto fondamentale per la progettazione e l'ottimizzazione delle formulazioni (Porte, S. et al. 2025).

1.2.1. Delivery di acidi nucleici

Tra i sistemi di delivery non virali, le LNP rappresentano una delle piattaforme maggiormente sviluppate e validate clinicamente per la somministrazione di terapie a base di acidi nucleici (NAT). Queste offrono un potenziale terapeutico più ampio per il trattamento di diverse patologie, rispetto ai trattamenti convenzionali, in quanto, gli acidi nucleici permettono di modulare specifici processi di espressione genica mentre le LNP ne favoriscono la protezione dalla degradazione e la veicolazione intracellulare (Figura 8 A e B).

8 A)



8 B)

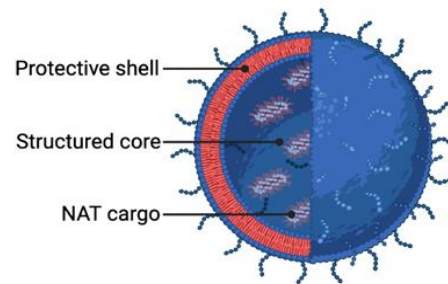


Figura 8. (Udepurkar A. et al. 2025).

A) Diversi componenti che costituiscono una tipica LNP.

B) Rappresentazione tipica di una LNP come particella con un guscio protettivo per incapsulare un carico terapeutico all'interno di un nucleo strutturato.

Il carico terapeutico veicolato può comprendere diverse tipologie di acidi nucleici esogeni. Tra questi rientrano il DNA plasmidico (pDNA), l'RNA messaggero (mRNA), i piccoli RNA interferenti (siRNA) e gli oligonucleotidi antisense (ASO). Una delle principali sfide per le NAT è garantire una somministrazione sicura ed efficace ai siti bersaglio. Le molecole di acido nucleico sono fragili, soggette a degradazione da parte delle nucleasi sieriche nel flusso sanguigno o all'autoidrolisi e possono innescare risposte

immunitarie innate, mentre le loro sfavorevoli proprietà fisico-chimiche, come le cariche negative e le grandi dimensioni, rendono difficile l'attraversamento delle barriere per l'assorbimento cellulare e possono ostacolare il trasporto intracellulare verso il citosol o il nucleo. Sono stati esplorati vettori di rilascio sia virali (ad esempio, retrovirus, virus adeno-associati e lentivirus) che non virali (ad esempio, materiali inorganici, a base di lipidi e a base di polimeri) per superare questa difficoltà. I vettori virali presentano diverse limitazioni, tra cui la bassa capacità di carico (in particolare per acidi nucleici di grandi dimensioni), problemi di sicurezza (come cancerogenicità e immunogenicità), la difficoltà di somministrazioni ripetute e processi di produzione complessi. Rispetto ai vettori virali, i sistemi non virali presentano generalmente una maggiore flessibilità progettuale, una minore immunogenicità e una produzione potenzialmente più semplice e scalabile (Udepurkar A. et al. 2025).

1.2.2. Applicazioni terapeutiche e rilevanza clinica

Le LNP sono state ampiamente studiate in diversi ambiti biomedici, tra cui la terapia genica, le vaccinazioni e il trattamento di patologie oncologiche e genetiche. Un'importante svolta nella ricerca biomedica è stata rappresentata dallo sviluppo dei vaccini a base di nanoparticelle lipidiche cariche di mRNA, contro SARS-CoV-2, come mRNA-1273 (Spikevax, sviluppato da Moderna) e BNT162b2 (Comirnaty, sviluppato da Pfizer-BioNTech), che hanno contribuito a dimostrare il potenziale clinico di questa piattaforma di delivery. Un esempio consolidato di applicazione della tecnologia dei sistemi lipidici in ambito oncologico è rappresentato da Doxil® (doxorubicina liposomiale pegilata), una formulazione in cui la doxorubicina è incapsulata all'interno di liposomi rivestiti con PEG. La formulazione liposomiale consente di modificare la distribuzione farmacocinetica della doxorubicina e di ridurre alcuni effetti tossici rispetto

alla formulazione convenzionale, rappresentando uno dei primi esempi di successo clinico dei sistemi di drug delivery basati su nanostrutture lipidiche. Un'importante conferma del potenziale clinico di questa piattaforma è rappresentata da Onpattro® (patisiran), il primo farmaco a base di siRNA veicolato mediante LNP approvato per il trattamento dell'amiloidosi ereditaria mediata dalla transtiretina. L'impiego delle LNP si è successivamente esteso anche alla somministrazione di sistemi di editing genomico, tra cui CRISPR/Cas9, aprendo nuove prospettive terapeutiche nel trattamento di malattie genetiche rare e precedentemente difficili da trattare (Udepurkar A. et al. 2025; Porte, S. et al. 2025).

1.3. Composizione delle nanoparticelle lipidiche

Le LNP rappresentano una delle principali piattaforme di veicolazione non virale attualmente impiegate per la somministrazione di acidi nucleici e di altre molecole terapeutiche. Negli ultimi anni, il loro sviluppo ha raggiunto un importante traguardo con l'impiego nelle formulazioni vaccinali a base di mRNA contro COVID-19, dimostrando il loro potenziale come sistemi di delivery per applicazioni cliniche. Il successo di questa tecnologia ha inoltre favorito l'interesse verso il loro impiego in ulteriori applicazioni di terapia genica e medicina a base di acidi nucleici. Grazie alle loro dimensioni nanometriche, alla possibilità di modularne la composizione e alla buona biocompatibilità dei componenti impiegati, sono in grado di proteggere gli acidi nucleici dalla degradazione e favorirne il trasporto all'interno delle cellule. Questa capacità risulta particolarmente rilevante per l'utilizzo di molecole di mRNA, la cui efficacia terapeutica dipende dalla possibilità di raggiungere il citoplasma cellulare, dove l'mRNA può essere tradotto in proteina. Le LNP sono composte da un doppio strato lipidico cationico o ionizzabile pH-dipendente, polietilenglicole (PEG), fosfolipidi e colesterolo (Figura 9).

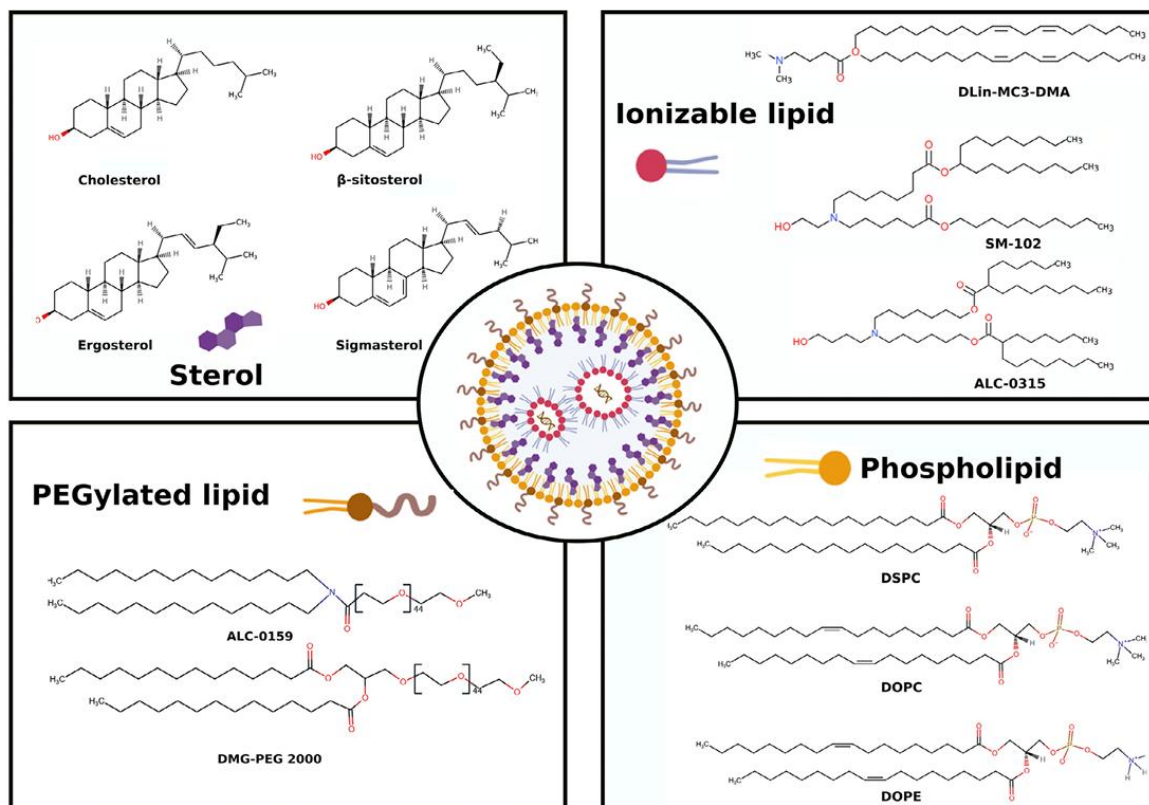


Figura 9. Componenti tipici di una nanoparticella lipidica per la somministrazione di farmaci e/o acidi nucleici (Porte S. et al. 2025).

1.3.1. Lipidi PEGilati

I lipidi PEGilati rappresentano una componente fondamentale delle LNP, sebbene siano generalmente presenti in basse percentuali molari. Sono costituiti da una porzione lipidica idrofobica, che si associa alla struttura della nanoparticella, e da una catena di polietilenglicole (PEG) idrofila, che si estende verso l'ambiente acquoso esterno formando uno strato superficiale (Figura 10).

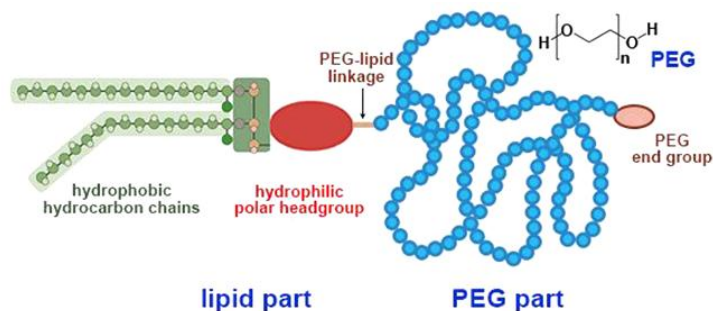


Figura 10. Schema rappresentativo della struttura del PEG-lipide (Tenchov R., et al. 2023).

Grazie all'elevata idrofilia e flessibilità delle catene di PEG, questo rivestimento crea una barriera sterica che limita l'aggregazione delle nanoparticelle e le interazioni aspecifiche con le biomolecole, contribuendo a migliorarne la stabilità e a prolungarne la permanenza in circolo. La quantità, la lunghezza della catena di PEG e la natura dell'ancora lipidica influenzano significativamente le proprietà delle LNP, tra cui dimensione, stabilità, biodistribuzione, efficienza di incapsulamento e rilascio del carico. Inoltre può influenzare anche le interazioni delle nanoparticelle con le proteine plasmatiche. In particolare, la riduzione del contenuto di lipidi PEGilati può favorire l'associazione dell'apolipoproteina E (ApoE) sulla superficie delle LNP. L'ApoE è una proteina plasmatica coinvolta nel trasporto e nel metabolismo delle lipoproteine e può favorire il riconoscimento e l'internalizzazione delle LNP da parte di specifiche cellule, contribuendo alla loro biodistribuzione. Un'eccessiva presenza di PEG può invece ostacolare tali interazioni e ridurre l'uptake cellulare. Pertanto, sebbene il PEG favorisca la stabilità e il cosiddetto effetto “stealth”, una quantità eccessiva può ridurre l'interazione delle LNP con le cellule e ostacolare il rilascio intracellulare dell'acido nucleico. Inoltre, i lipidi PEGilati possono essere associati a risposte immunitarie indesiderate. Tra queste, la clearance ematica accelerata (Accelerated Blood Clearance, ABC) consiste nella più rapida eliminazione delle nanoparticelle in seguito a

somministrazioni ripetute ed è stata associata alla formazione di anticorpi anti-PEG dopo la prima esposizione. Un'altra possibile risposta è la pseudoallergia correlata all'attivazione del complemento (Complement Activation-Related PseudoAllergy, CARPA), una reazione di ipersensibilità associata all'attivazione del sistema del complemento che può manifestarsi anche dopo la prima somministrazione. È quindi necessario bilanciare l'effetto stabilizzante e “stealth” del PEG con la capacità delle LNP di interagire con le cellule e rilasciare efficacemente il proprio carico, dando origine al cosiddetto “PEG dilemma” (Tenchov, R. et al. 2023). Tra i lipidi PEGilati maggiormente impiegati nelle formulazioni di LNP vi sono i PEG-lipidi contenenti PEG2000, caratterizzati da una catena di PEG con peso molecolare di circa 2000 Da (Figura 11). LNP contenenti coniugati PEG2000-lipidi rappresentano la scelta ottimale per un adeguato compromesso tra l'approccio antiopsonizzante, il targeting efficace e la riduzione dell'effetto ABC.

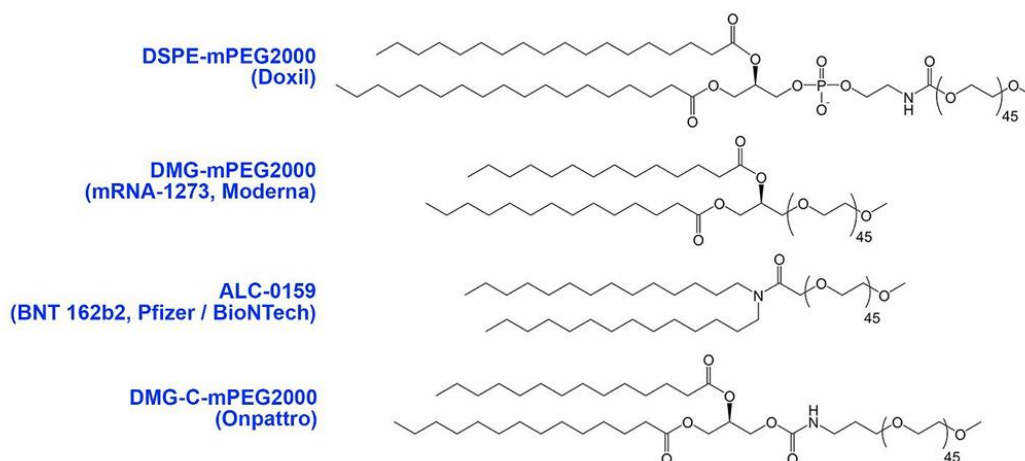


Figura 11. Esempio di struttura PEG-lipide utilizzata in formulazioni commercializzate (Tenchov, R., et al. 2023).

1.3.2. Lipidi ionizzabili e cationici

I lipidi ionizzabili e i lipidi cationici sono in grado di interagire con gli acidi nucleici e svolgono un ruolo centrale nella formazione delle LNP e nel successivo rilascio del carico terapeutico. Sebbene presentino caratteristiche comuni, le due categorie si distinguono principalmente per il loro comportamento rispetto al pH e, di conseguenza, per lo stato di ionizzazione che assumono in differenti condizioni fisiologiche.

I lipidi ionizzabili sono molecole anfifiliche generalmente costituite da tre elementi strutturali principali: una testa polare, una regione idrofobica e un linker che collega le due porzioni (Figura 12).

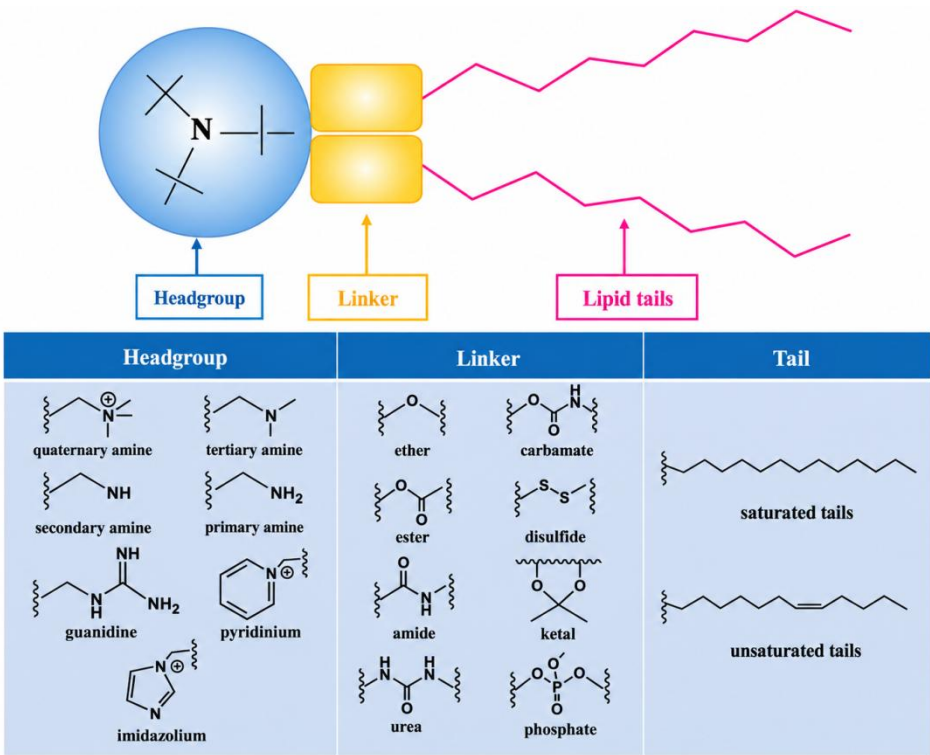


Figura 12. Rappresentazione schematica dei lipidi ionizzabili e dei loro componenti (gruppo di testa, linker e code) (Wang, B. et al. 2024).

Il gruppo di testa contiene generalmente una funzione amminica il cui stato di protonazione dipende dal pH dell'ambiente. A pH fisiologico, i lipidi ionizzabili sono prevalentemente presenti in forma neutra, mentre in condizioni acide vengono protonati e assumono una carica positiva. Questa caratteristica permette di combinare una bassa interazione aspecifica con le componenti biologiche durante la circolazione, con la capacità di interagire efficacemente con gli acidi nucleici durante la formazione delle nanoparticelle. La struttura dei lipidi ionizzabili può essere ulteriormente modulata attraverso la variazione del linker, (può influenzare la stabilità, la biodegradabilità, la citotossicità e l'efficienza di trasfezione delle LNP), e del numero, della lunghezza e del grado di insaturazione delle code idrofobiche (contribuiscono a determinarne le proprietà strutturali e il comportamento biologico). Tra i lipidi ionizzabili maggiormente studiati e impiegati per la somministrazione di acidi nucleici si trovano DLin-MC3-DMA, ALC-0315 e SM-102 (Figura 13).

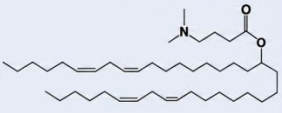
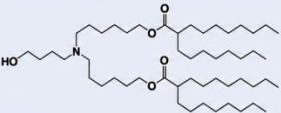
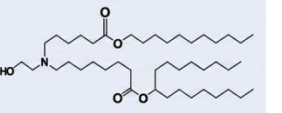
Drug	Onpattro	BNT162b2	mRNA 1273
Company	Alynlam	Pfizer/BioNTech	Moderna
Ionizable lipids	 DLin MC3 DMA	 ALC-0315	 SM102
Molar ratios	Ionizable lipids : Phospholipids : Cholesterol : PEG-lipids		
	50:10:38.5:1.5	46.3:9.4:42.7:1.6	50:10:38.5:1.5

Figura 13. Struttura chimica e rapporto molare dei componenti lipidici di tre tra le principali formulazioni di LNP (Wang, B. et al. 2024).

Durante la formazione delle nanoparticelle, la protonazione dei lipidi ionizzabili favorisce l'interazione elettrostatica con i gruppi fosfato carichi

negativamente, degli acidi nucleici, contribuendo al loro incapsulamento. Dopo la somministrazione, invece, il ritorno verso il pH fisiologico riduce la protonazione dei lipidi, diminuendo le interazioni elettrostatiche aspecifiche con le componenti biologiche e favorendo una maggiore tollerabilità. Una volta internalizzate dalle cellule, le LNP vengono inglobate negli endosomi, caratterizzati da un ambiente progressivamente più acido. In queste condizioni, i lipidi ionizzabili vengono nuovamente protonati e possono interagire con i lipidi anionici presenti nella membrana endosomiale. Tali interazioni possono determinare una riorganizzazione della membrana e favorire la destabilizzazione dell'endosoma, facilitando il rilascio del carico nel citoplasma. Questo processo, definito endosomal escape, rappresenta uno dei principali ostacoli alla consegna intracellulare degli acidi nucleici (Wang, B. et al. 2024).

I lipidi cationici, al contrario, possiedono una carica positiva permanente. Questa caratteristica favorisce una forte interazione elettrostatica con gli acidi nucleici, facilitandone l'associazione durante la formazione delle nanoparticelle, ma può anche promuovere interazioni aspecifiche e il rischio di citotossicità, oltre a favorire fenomeni di destabilizzazione delle membrane ed effetti emolitici (Samaridou, E. et al. 2020). Tra i lipidi cationici maggiormente utilizzati nello sviluppo di sistemi di delivery lipidici si trovano DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane), e DC-Chol (3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol) (Figura 14).

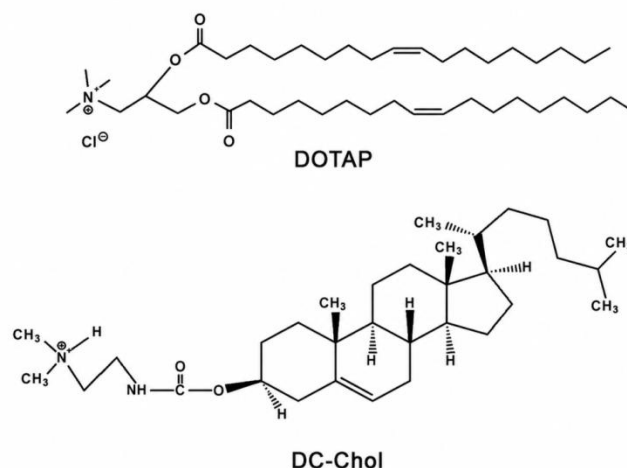


Figura 14. Struttura dei lipidi cationici DOTAP e DC-Chol (L. Ciani et al.).

1.3.3. Fosfolipidi

I fosfolipidi (lipidi helper), costituiscono una componente ausiliaria e contribuiscono alla organizzazione strutturale, alla stabilità e alla funzionalità biologica delle nanoparticelle. Sono molecole anfipatiche, caratterizzate da una testa polare idrofila e da una o più code idrofobiche, e possono interagire con gli altri componenti lipidici favorendo la formazione e la stabilizzazione della nanoparticella. La loro natura e composizione può influenzare proprietà quali la dimensione, la stabilità, l'efficienza di incapsulamento e il comportamento delle LNP a livello delle membrane cellulari ed endosomiali. Tra i fosfolipidi maggiormente impiegati si trovano DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina)(Figura 15 e 16).

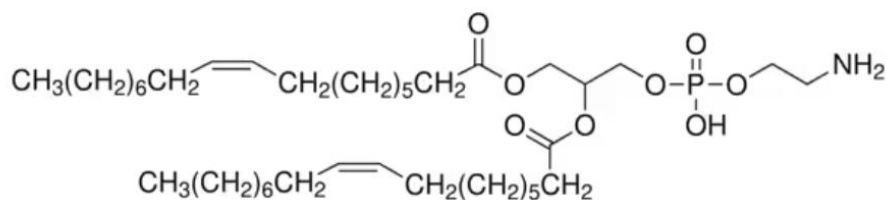


Figura 15. Struttura del lipide cationico DOPE.

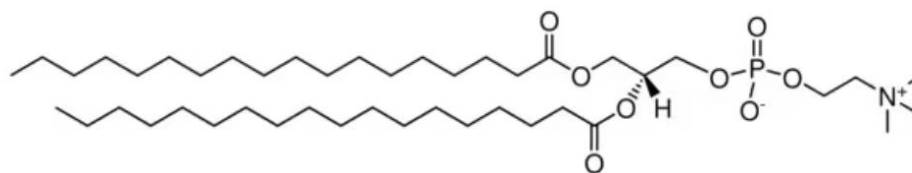


Figura 16. Struttura del lipide cationico DSPC.

Il DSPC presenta una struttura relativamente stabile e contribuisce all'integrità e alla stabilità della nanoparticella, motivo per cui è stato ampiamente impiegato nelle formulazioni cliniche e commerciali.

DOPE, caratterizzato invece da una maggiore fluidità, può favorire la destabilizzazione delle membrane e quindi il rilascio endosomiale del carico. La diversa natura dei fosfolipidi può pertanto influenzare il comportamento delle LNP sia durante la loro formazione sia dopo l'internalizzazione cellulare (Porte, S. et al. 2025).

1.3.4. Colesterolo

Il colesterolo rappresenta uno dei principali componenti delle LNP e svolge un ruolo fondamentale nel determinarne la struttura, la stabilità e il comportamento biologico. Grazie alla sua natura anfipatica, il colesterolo si inserisce tra le componenti lipidiche della nanoparticella, contribuendo a modulare l'organizzazione e la fluidità della fase lipidica. In questo modo, può aumentare la stabilità delle LNP e ridurre la fuoriuscita del carico, favorendo un incapsulamento più stabile del carico terapeutico. Oltre a svolgere una funzione strutturale, il colesterolo contribuisce a modulare il comportamento delle nanoparticelle in seguito alla somministrazione, influenzandone le interazioni con le membrane cellulari e favorendo i processi di fusione e di internalizzazione. Inoltre, può modulare le interazioni con le proteine plasmatiche, influenzandone la distribuzione e la

permanenza in circolo. La struttura del colesterolo può infine essere modificata mediante l'introduzione di specifici gruppi funzionali (Wang, B et al. 2024; Tenchov, R. et al.2023).

1.3.5. Colesterolo fluorescente

Il colesterolo è una componente fondamentale delle membrane biologiche e non è intrinsecamente fluorescente. Il suo comportamento e la sua distribuzione possono essere studiati mediante l'impiego di analoghi fluorescenti, ottenuti attraverso la coniugazione della molecola con specifici fluorofori. Tra questi, il gruppo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ile (NBD) è ampiamente utilizzato per la marcatura del colesterolo, dando origine a derivati quali 22-NBD-colesterolo e 25-NBD-colesterolo (Figura 17). Questi analoghi consentono di studiare la distribuzione, le interazioni e la dinamica del colesterolo all'interno delle membrane biologiche e dei sistemi di delivery.

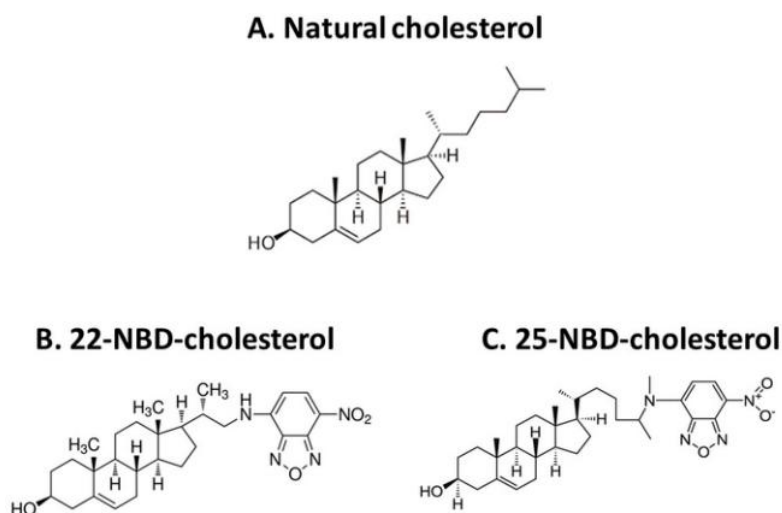


Figura 17. Strutture molecolari del colesterolo naturale (A), del colesterolo 22-NBD (B) e del colesterolo 25-NBD (C) (Pastor-Ibáñez, R. et al. 2019).

Il 25-NBD-colesterolo, rispetto al 22-NBD-colesterolo, può presentare una distribuzione più definita all'interno della componente lipidica, in quanto a basse concentrazioni, si organizza in dimeri transmembrana con disposizione testa-coda, attraversando il doppio strato lipidico (Figura 18). L'impiego di analoghi fluorescenti del colesterolo permette quindi di ottenere informazioni sui processi di riorganizzazione lipidica, sulla stabilità delle LNP, sulle interazioni con le membrane cellulari e sul destino del colesterolo dopo la somministrazione (Pastor-Ibáñez, R. et al. 2019).

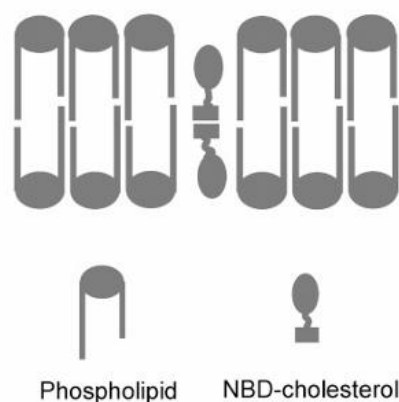


Figura 18. Conformazione che assume il 25-NBD-colesterolo nelle membrane a basse concentrazioni (Pucadyil, T. J. et al. 2007).

1.4. Metodi preparativi delle LNPs

Un processo di produzione adeguatamente controllato è fondamentale per ottenere formulazioni caratterizzate da proprietà fisico-chimiche riproducibili e da un'elevata efficacia nel veicolare il carico terapeutico. I primi approcci utilizzati per l'incapsulamento degli acidi nucleici derivavano principalmente dalle metodiche sviluppate per la preparazione dei liposomi, tra cui l'idratazione del film lipidico e l'evaporazione in fase inversa. Sebbene questi approcci siano semplici e ampiamente utilizzati nella preparazione di sistemi lipidici, presentano limitazioni in termini di

controllo della miscelazione, riproducibilità e scalabilità. La miscelazione relativamente lenta e poco controllata può infatti determinare la formazione di particelle di dimensioni elevate e con distribuzione dimensionale più ampia. Lo sviluppo di sistemi di miscelazione più efficienti ha pertanto permesso di ottenere particelle maggiormente uniformi e di migliorare il controllo del processo produttivo. Tra le strategie maggiormente impiegate per la produzione di LNP, la miscelazione microfluidica rappresenta un approccio particolarmente efficace, in quanto consente di ottenere un controllo accurato delle condizioni di formazione delle nanoparticelle. Un importante vantaggio della microfluidica risiede, infatti, nella possibilità di modulare le caratteristiche delle LNP agendo sui parametri di processo. Tra i principali parametri microfluidici rientrano la portata totale (Total Flow Rate, TFR), definita come la somma delle portate delle fasi acquosa e organica, e il rapporto tra le portate (Flow Rate Ratio, FRR), che esprime il rapporto tra la portata della fase acquosa e quella della fase organica.

1.4.1. Produzione mediante microfluidica

La microfluidica consente di controllare con elevata precisione il flusso e la miscelazione di piccoli volumi di fluidi all'interno di microcanali, favorendo una formazione delle nanoparticelle più controllata e riproducibile. Le due soluzioni, organica e acquosa, vengono introdotte nel dispositivo attraverso ingressi separati, secondo portate e rapporti di flusso prestabiliti. La geometria del dispositivo e le condizioni operative determinano la velocità con cui le due fasi entrano in contatto e si miscelano, influenzando direttamente il processo di formazione delle nanoparticelle (Figura 19 A e B).



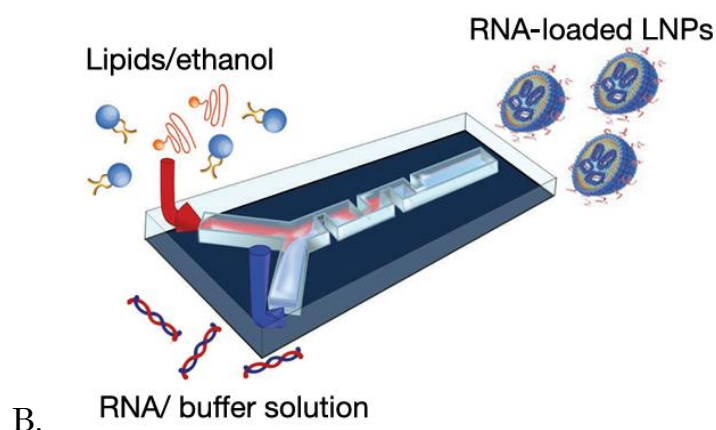


Figura 19 A e B. Rappresentazione schematica del metodo di preparazione delle LNPs, utilizzando un dispositivo microfluidico (A : Streck, S. et al. (2019). B : Maeki, M et al. (2022)).

Il processo si basa sulla rapida miscelazione di una fase organica, contenente i componenti lipidici disciolti in un solvente miscibile con l'acqua, generalmente etanolo, con una fase acquosa che può contenere l'acido nucleico. La rapida miscelazione delle due fasi determina una variazione delle condizioni di solvatazione dei lipidi e il loro progressivo autoassemblaggio, portando alla formazione delle nanoparticelle lipidiche (Figura 20).

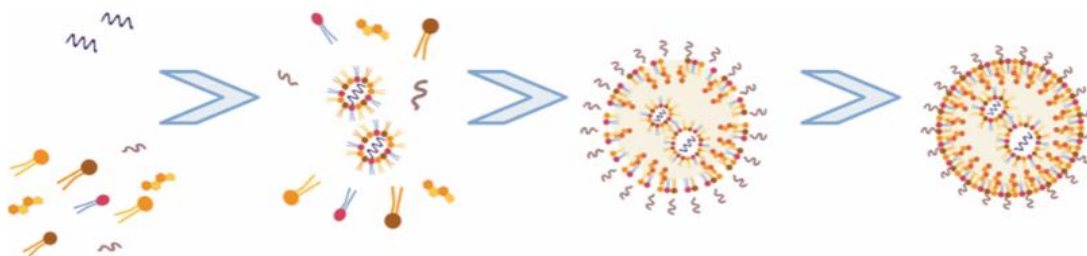


Figura 20. Schema rappresentativo dell'autoassemblaggio delle LNP (Lopes, C. et al. 2022).

In particolare, la velocità di miscelazione e la conseguente diluizione dell'etanolo rappresentano fattori importanti nella determinazione delle dimensioni delle LNP. Una miscelazione più rapida determina una più veloce variazione della composizione del solvente e favorisce una nucleazione e un autoassemblaggio più rapidi, generalmente associati alla formazione di particelle di dimensioni inferiori e con una distribuzione dimensionale più stretta. Al contrario, condizioni di miscelazione più lente possono favorire processi di aggregazione e la formazione di particelle di dimensioni maggiori (Figura 21). Il controllo di questi parametri consente quindi di ottenere LNP con dimensioni, indice di polidispersità ed efficienza di incapsulamento maggiormente riproducibili.

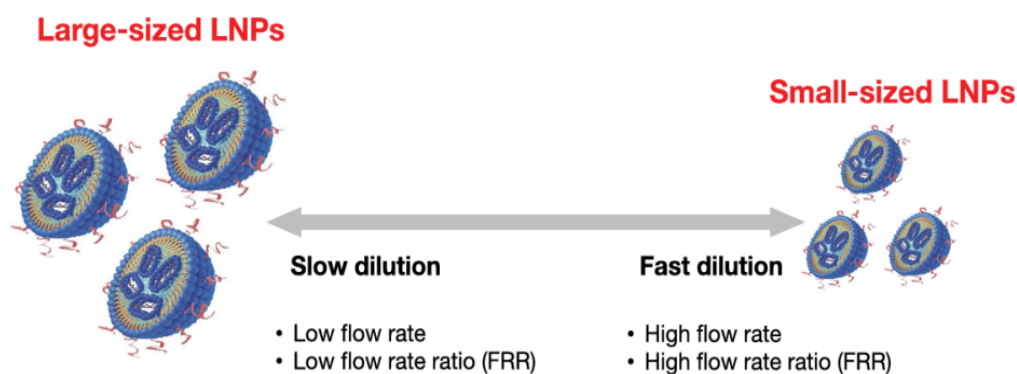


Figura 21. Illustrazione concettuale della relazione tra il comportamento di formazione delle nanoparticelle lipidiche e la fluidodinamica (Maeki, M. et al. 2022).

1.4.2. Caratteristiche e funzionamento del chip microfluidico

I chip microfluidici possono essere realizzati con diversi materiali, tra cui polidimetilsilossano (PDMS), poli(metilmetacrilato) (PMMA), copolimeri di olefine cicliche (COC), polimeri a base di tiolene, vetro e quarzo, la cui scelta dipende dalle caratteristiche chimiche e fisiche dei fluidi utilizzati e dalle condizioni operative. È costituito da una rete di microcanali dotata

generalmente di porte di ingresso, una o più regioni di miscelazione e una porta di uscita. Attraverso le porte di ingresso vengono introdotte le fasi liquide, una fase organica e una fase acquosa. I fluidi vengono quindi convogliati all'interno dei microcanali, dove entrano in contatto e si miscelano, mentre la dispersione contenente le LNP viene successivamente raccolta attraverso la porta di uscita.

L'efficienza di miscelazione nei sistemi microfluidici dipende anche dalla geometria del chip e dalla configurazione del micromiscelatore. A tal fine, sono state sviluppate diverse architetture di micromiscelazione, classificabili, in funzione del meccanismo impiegato per favorire il processo di miscelazione, in sistemi attivi e passivi. I micromiscelatori passivi non richiedono un'energia esterna per promuovere la miscelazione, ma sfruttano la geometria dei microcanali per aumentare l'area di contatto tra i fluidi e favorire la diffusione o l'avvezione caotica. Tra le configurazioni maggiormente utilizzate per la produzione di LNP si trovano l'Hydrodynamic Flow Focusing (HFF), lo Staggered Herringbone Micromixer (SHM) e i miscelatori a T (Figura 22).

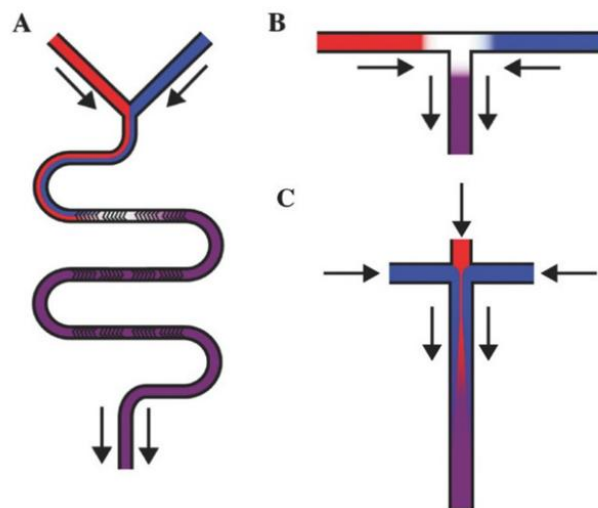


Figura 22. Rappresentazione schematica dei micromiscelatori più utilizzati: (A) SHM, (B) miscelatore a T, (C) HFF. La fase rossa corrisponde alla fase organica e la fase blu corrisponde a quella acquosa (Evers, M. J. W. et al. 2018).

-Hydrodynamic Flow Focusing (HFF).

Nell'HFF, il flusso centrale contenente i lipidi disciolti nel solvente organico viene focalizzato lateralmente da uno o più flussi acquosi, che ne riducono lo spessore fino a formare un sottile strato centrale. Questa configurazione permette di ottenere un'elevata velocità di miscelazione e un buon controllo delle condizioni di formazione delle LNP.

-Staggered Herringbone Micromixer (SHM).

Lo SHM utilizza una geometria caratterizzata dalla presenza di microscanalature disposte secondo un motivo a spina di pesce all'interno del microcanale. Queste strutture modificano continuamente la traiettoria dei fluidi e generano avvezione caotica, aumentando l'interfaccia tra la fase organica e quella acquosa e riducendo il percorso necessario alla diffusione. Rispetto alla semplice diffusione in un canale rettilineo, questo meccanismo consente quindi una miscelazione più rapida ed efficiente.

-Miscelatore a T.

Le due fasi vengono introdotte attraverso canali che si incontrano formando una configurazione a T. Il contatto tra i due flussi determina la formazione di un'interfaccia attraverso la quale avviene la diffusione (Hourdel, L. et al. 2025).

1.5. Caratterizzazione delle LNP

La caratterizzazione delle nanoparticelle lipidiche è fondamentale per definirne le proprietà fisico-chimiche e valutarne l'idoneità come sistemi di drug delivery. Parametri quali dimensione e distribuzione dimensionale, concentrazione, proprietà superficiali ed efficienza di incapsulamento influenzano infatti la stabilità delle formulazioni, le interazioni con l'ambiente biologico, la biodistribuzione e, nel caso delle LNP contenenti mRNA, la capacità di proteggere e veicolare efficacemente il materiale genetico. Tra i principali parametri di caratterizzazione, la dimensione delle

particelle e l'indice di polidispersione (PDI) rivestono particolare importanza. La dimensione delle LNP può influenzare la stabilità colloidale, l'interazione con le membrane cellulari, la biodistribuzione e i processi di internalizzazione ed eliminazione dall'organismo. Sebbene non esista una dimensione ottimale universale, le formulazioni destinate alla somministrazione sistemica sono generalmente progettate nell'ordine delle decine o poche centinaia di nanometri (20-200 nm), in funzione della composizione e dell'applicazione terapeutica (Eygeris et al., 2022). Il PDI fornisce invece un'indicazione dell'ampiezza della distribuzione dimensionale, dove valori più bassi sono generalmente associati a popolazioni particellari più uniformi e, quindi, a formulazioni maggiormente omogenee. Entrambi i parametri dipendono dalla composizione lipidica e dalle condizioni di preparazione, tra cui il rapporto tra i componenti, il contenuto di lipidi PEG e i parametri di miscelazione nei processi microfluidici (Roces et al., 2020; Chen et al., 2014). La diffusione dinamica della luce (DLS) rappresenta una delle tecniche maggiormente utilizzate per la determinazione del diametro idrodinamico (Z-average) e del PDI delle LNP, attraverso l'analisi del moto browniano delle particelle. Tra le tecniche di caratterizzazione impiegate, particolare rilevanza assumono la Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) e la microcalorimetria isoterma (ITC), che costituiscono strumenti centrali per la caratterizzazione delle LNP e per lo studio delle loro proprietà. In particolare, la TRPS consente una caratterizzazione a livello della singola particella, fornendo informazioni sulla distribuzione dimensionale e sulla concentrazione della popolazione nanoparticellare. La ITC, invece, permette di studiare quantitativamente le interazioni tra le LNP e le proteine, fornendo informazioni sui relativi parametri termodinamici. L'integrazione di queste due tecniche consente pertanto di correlare le caratteristiche fisiche delle nanoparticelle con il loro comportamento nelle interazioni con le componenti biologiche (Rozo et al., 2020). L'impiego combinato di tecniche basate su principi differenti

permette quindi di ottenere una descrizione più completa delle caratteristiche delle nanoparticelle.

1.5.1. Concentrazione

La concentrazione permette di definire con maggiore accuratezza la quantità di nanoparticelle presenti nella formulazione e di valutare eventuali fenomeni di aggregazione o frammentazione. La determinazione della concentrazione numerica è inoltre importante per garantire un dosaggio riproducibile nelle successive fasi di caratterizzazione e nelle applicazioni biologiche (Chen et al., 2022; Ribeiro et al., 2018). La TRPS risulta particolarmente utile a questo scopo, poiché consente di determinare la concentrazione delle particelle insieme alla loro distribuzione dimensionale.

1.5.2. Proprietà superficiali

Un'altra importante caratteristica è rappresentata dalle proprietà superficiali, che condizionano la stabilità colloidale e le interazioni con l'ambiente biologico. Tra i parametri di maggiore interesse rientra il potenziale zeta, che fornisce un'indicazione del comportamento elettrocinetico delle particelle e della loro tendenza a interagire e aggregarsi in sospensione. La carica superficiale dipende dalla composizione della formulazione e dalle condizioni del mezzo, quali pH e forza ionica, e può quindi modificarsi durante il passaggio dall'ambiente di formulazione a quello fisiologico. Anche la presenza di lipidi PEG contribuisce a modulare le proprietà superficiali e la stabilità delle LNP, influenzandone al contempo le interazioni con le cellule e le proteine presenti nell'ambiente biologico.

1.5.3. Efficienza di incapsulamento

Per le LNP caricate con mRNA, un parametro particolarmente importante è l'efficienza di incapsulamento (EE%), che esprime la frazione di mRNA totale effettivamente contenuta all'interno delle nanoparticelle. Un'elevata efficienza di incapsulamento consente di proteggere l'mRNA dalla degradazione e di ridurre la quantità di materiale libero nella formulazione. Dipende principalmente dalla composizione lipidica e dalle condizioni di formulazione. In particolare, i lipidi ionizzabili svolgono un ruolo centrale nella complessazione dell'mRNA durante la formazione delle nanoparticelle. Può essere determinata attraverso metodi diretti o indiretti. Uno tra gli approcci maggiormente utilizzati è il saggio Quant-iT™ RiboGreen™ RNA, basato sulla quantificazione fluorimetrica dell'RNA accessibile al colorante, che permette di distinguere la frazione di RNA non incapsulata da quella protetta all'interno delle nanoparticelle (Jones et al., 1998; Schober et al., 2024). La determinazione dell'RNA libero e dell'RNA totale, ottenuto dopo la disgregazione delle LNP mediante detergente, permette di calcolare la frazione di RNA incapsulata secondo l'Equazione 1 (Schultz et al., 2024).

$$EE \% = \frac{RNA_{Totale} - RNA_{Libero}}{RNA_{Totale}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Dove: RNA_{totale} = quantità complessiva di RNA presente nel campione

RNA_{libero} = frazione di RNA non incapsulata

Nel complesso, la valutazione integrata di dimensione, PDI, concentrazione, proprietà superficiali ed efficienza di incapsulamento consente di definire le principali caratteristiche delle LNP e di correlare le proprietà della formulazione con il comportamento atteso in ambiente biologico. La scelta e l'impiego complementare delle diverse tecniche analitiche risultano quindi

essenziali per ottenere una caratterizzazione riproducibile e completa delle nanoparticelle.

1.6. Interazione delle nanoparticelle lipidiche con l'ambiente biologico

Una volta somministrate, le nanoparticelle lipidiche entrano in contatto con un ambiente biologico complesso, caratterizzato dalla presenza di proteine plasmatiche, cellule e componenti del sistema immunitario. Le loro proprietà fisico-chimiche, quali dimensione, composizione lipidica e caratteristiche superficiali, influenzano la stabilità, la biodistribuzione, l'interazione con le cellule e la risposta biologica (Catenacci et al. 2024). Nel caso delle LNP contenenti mRNA, i lipidi ionizzabili svolgono un ruolo fondamentale sia nell'incapsulamento e nella protezione dell'acido nucleico sia nel suo rilascio intracellulare. A pH fisiologico, questi lipidi presentano generalmente una carica prossima alla neutralità, contribuendo a limitare le interazioni elettrostatiche aspecifiche. In seguito all'internalizzazione cellulare, l'ambiente acido dell'endosoma ne determina la protonazione, favorendo l'interazione con le membrane endosomiali e le modificazioni strutturali necessarie per il rilascio dell'mRNA nel citoplasma. Questo processo, definito endosomal escape, è fondamentale per consentire all'mRNA di raggiungere i ribosomi cellulari ed essere tradotto nella proteina di interesse (Figura 23).

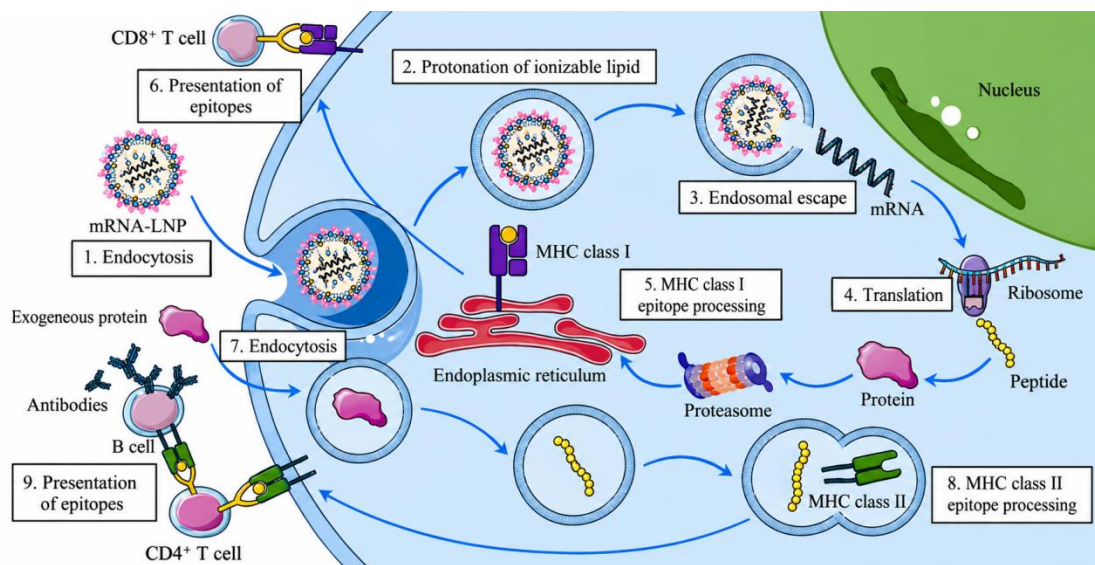


Figura 23. Meccanismo di rilascio degli mRNA-LNP, endosomal escape (Wang et al.).

Tra i modelli recentemente proposti per descrivere questo processo rientra il vesiclebudding and collapse (VBC), secondo il quale i lipidi ionizzabili protonati possono interagire con la membrana endosomiale, favorendo la formazione di domini lipidici e la successiva gemmazione di una piccola vescicola. Il collasso di tale struttura determinerebbe quindi il rilascio del contenuto nel citoplasma (Figura 24) (Pei D. 2025).

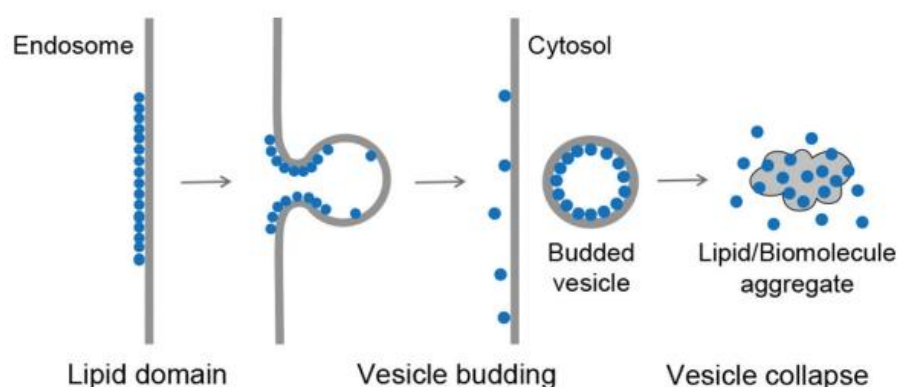


Figura 24. Rappresentazione schematica della traslocazione di biomolecole (sfere blu) attraverso la membrana cellulare (linea grigia) tramite il meccanismo VBC (Pei D. 2025).

Le LNP interagiscono inoltre con il sistema immunitario, e l'entità di tali interazioni dipende sia dalle caratteristiche delle nanoparticelle sia dalla natura del materiale incapsulato. Le nanoparticelle possono modulare l'immunità innata attraverso l'interazione con cellule del sistema fagocitario e con componenti del complemento, contribuendo alla loro clearance e, in alcuni casi, all'attivazione di risposte infiammatorie (Dobrovolskaia, M. A. et al. 2016). Tuttavia, l'attivazione dell'immunità innata non rappresenta necessariamente un effetto indesiderato: nelle applicazioni vaccinali, ad esempio, può contribuire alla presentazione dell'antigene e alla successiva attivazione della risposta immunitaria adattativa, con il coinvolgimento dei linfociti T e B. Anche le loro caratteristiche superficiali rivestono un ruolo importante nel determinarne il comportamento biologico. Il destino biologico delle LNP non dipende esclusivamente dalle loro proprietà originarie, ma è il risultato della loro interazione dinamica con l'ambiente circostante. In particolare, il contatto con i fluidi biologici determina l'adsorbimento di proteine plasmatiche sulla superficie delle nanoparticelle, portando alla formazione della protein corona.

1.7. Formazione della corona proteica

Uno degli obiettivi primari nello sviluppo delle nanoparticelle lipidiche risiede nella progettazione di sistemi avanzati per la veicolazione di materiale genetico, con particolare riferimento agli acidi nucleici destinati alle piattaforme vaccinali a mRNA. In questo ambito terapeutico, l'impiego delle LNP mostra un potenziale estremamente promettente, ma rimane difficoltoso prevedere il loro destino biologico e la loro farmacocinetica, portando a delle discrepanze tra i risultati in vitro e quelli in vivo. Non appena le LNP entrano nel flusso sanguigno, vengono rivestite dalle proteine del siero (es. Apolipoproteina E, albumina), dando origine ad un

rivestimento detto corona biomolecolare, che determina il destino biologico e il target cellulare delle nanoparticelle (Figura 25).

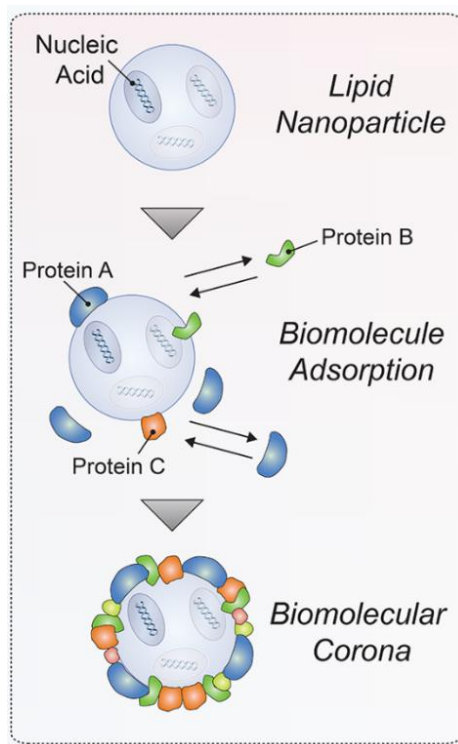


Figura 25. Rappresentazione di come le biomolecole presenti nel sangue si adsorbono sulla superficie delle LNP, formando una corona biomolecolare (Francia V. et al. 2020).

Quando le nanoparticelle lipidiche entrano in contatto con i fluidi biologici, le proteine plasmatiche si adsorbono spontaneamente sulla loro superficie attraverso interazioni non covalenti, formando uno strato proteico definito protein corona. La formazione di una corona proteica non è una proprietà generale di tutte le nanoparticelle. Il processo di formazione della corona proteica è un processo dinamico e la possibile presenza di questo involucro è dato dalla loro differente morfologia. La corona proteica è strutturata in due strati distinti (Figura 26):

La corona dura (hard corona), costituita dalle macromolecole saldamente legate alla superficie delle nanoparticelle.

La corona morbida (soft corona), che forma un guscio periferico fortemente idratato e debolmente associato all'interfaccia colloidale. Trattandosi di un sistema altamente dinamico, i componenti della corona morbida sono soggetti a un continuo processo di scambio ed equilibrio con le biomolecole presenti nell'ambiente biologico circostante, detto turnover.

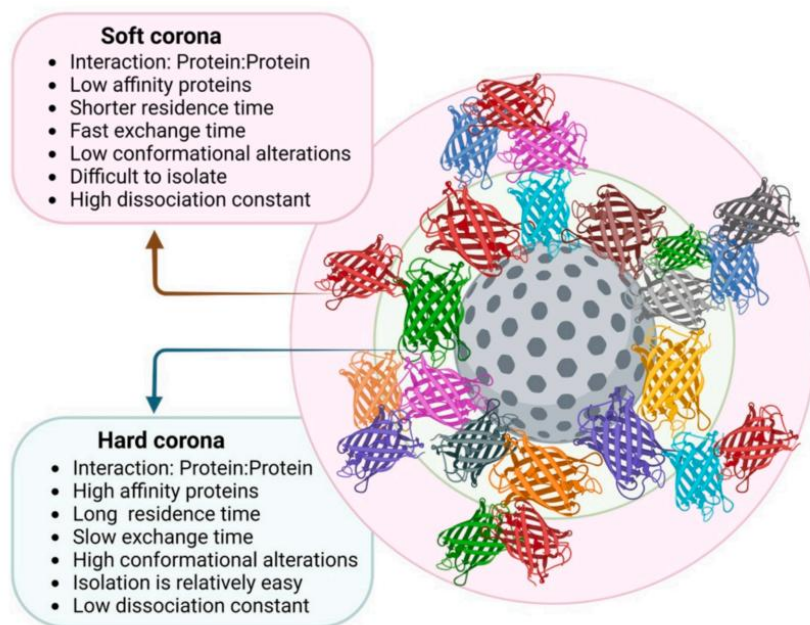


Figura 26. Caratteristiche della soft e hard corona (Kumari, N. U. et al. 2026).

La corona modifica l'interfaccia tra la nanoparticella e l'ambiente biologico, conferendo alle LNP una nuova identità biologica e influenzandone proprietà quali carica superficiale, stabilità, aggregazione, biodistribuzione, internalizzazione ed efficacia biologica. La composizione della protein corona dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche delle LNP e dalle condizioni dell'ambiente biologico. In particolare, la composizione lipidica, la carica superficiale e la presenza di lipidi PEGilati possono influenzare la natura e la quantità delle proteine adsorbite (Figura 27).

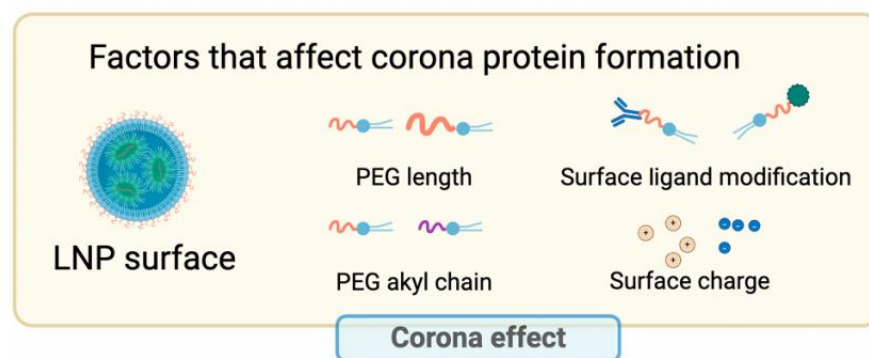


Figura 27. Illustrazione schematica dei fattori che inducono la formazione della corona proteica (Huang et al. 2024).

A loro volta, le proteine della corona possono modulare il destino delle nanoparticelle nell'organismo, favorendone o ostacolandone l'interazione con specifici tessuti e cellule. La composizione della protein corona può influenzare significativamente la biodistribuzione delle LNP, favorendone l'accumulo in specifici organi in funzione delle proteine adsorbite sulla loro superficie. Ad esempio, l'associazione con apolipoproteine come ApoE è stata correlata al targeting epatico, mentre proteine coinvolte nel sistema del complemento possono contribuire alla distribuzione delle LNP a livello della milza (Zwolsman, R. 2025). La formazione della corona può quindi avere effetti sia favorevoli sia sfavorevoli: da un lato può schermare la superficie delle nanoparticelle e ridurre il riconoscimento di ligandi destinati al targeting, dall'altro può favorire una distribuzione selettiva verso determinati tessuti. La composizione della corona può inoltre variare in funzione dell'ambiente biologico e delle caratteristiche individuali, rendendo il fenomeno particolarmente rilevante per la comprensione del comportamento delle LNP in vivo. Lo studio della protein corona rappresenta pertanto un aspetto importante nella progettazione e caratterizzazione delle LNP, poiché permette di mettere in relazione le proprietà della formulazione con le interazioni che si instaurano nell'organismo e con il successivo destino biologico delle nanoparticelle.

2. Scopo della tesi

Lo sviluppo di nanoparticelle lipidiche (Lipid Nanoparticles, LNP) rappresenta oggi una strategia promettente e versatile per la veicolazione di farmaci e acidi nucleici, grazie alla possibilità di modulare le loro proprietà chimico-fisiche in funzione dell'applicazione terapeutica. In particolare, le caratteristiche della componente lipidica e le proprietà superficiali delle nanoparticelle possono influenzarne la stabilità colloidale, le interazioni con l'ambiente biologico e, di conseguenza, il comportamento dopo la somministrazione. Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di preparare e caratterizzare due differenti formulazioni di LNP, accomunate dalla presenza di colesterolo, fosfolipidi e lipidi PEGilati, ma caratterizzate dall'impiego di due differenti lipidi responsabili delle proprietà superficiali delle nanoparticelle: il lipide cationico bromuro di didodecildimetilammonio (DDA) e il lipide ionizzabile ALC-0315 (ALC). Le formulazioni sono state prodotte mediante tecnologia microfluidica, un approccio che consente di ottenere nanosospensioni con caratteristiche riproducibili e un elevato controllo dei parametri di produzione. Per consentire il tracciamento delle nanoparticelle e la valutazione della concentrazione lipidica, nelle formulazioni è stato inoltre incorporato il 25-NBD-colesterolo, un analogo fluorescente del colesterolo caratterizzato dalla presenza del fluoroforo nitrobenzossadiazolo (NBD). Una prima fase del lavoro ha quindi riguardato la caratterizzazione fisico-chimica dei due lotti di LNP prodotti, con particolare attenzione alla determinazione delle dimensioni, dell'indice di polidispersione (PDI), della concentrazione particellare e delle proprietà superficiali. A tale scopo sono state impiegate tecniche analitiche quali la Photon Correlation Spectroscopy (PCS), la Dynamic Light Scattering (DLS) e la Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS), che consentono di ottenere informazioni differenti e complementari sulle caratteristiche dimensionali

delle nanoparticelle. Successivamente per valutare il potenziale delle formulazioni come sistemi di gene delivery, le LNP sono state caricate con un mRNA modello. Tale approccio ha consentito di confrontare le caratteristiche e il comportamento delle formulazioni in assenza e in presenza di mRNA, nonché di approfondire l'interazione tra i diversi sistemi lipidici e l'acido nucleico e la loro capacità di incorporarlo. È stata inoltre determinata l'efficienza di incapsulamento, al fine di quantificare la frazione di mRNA effettivamente associata alle nanoparticelle. Nell'ultima fase del lavoro di tesi, invece, particolare attenzione è stata dedicata allo studio del comportamento delle LNP in condizioni rappresentative dell'ambiente biologico. In seguito alla loro introduzione in fluidi biologici, infatti, le nanoparticelle interagiscono con le numerose biomolecole presenti nel plasma e nel siero, determinando modificazioni delle loro proprietà superficiali. Tali interazioni possono portare alla formazione della cosiddetta protein corona, uno strato di proteine adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle che può modificarne le caratteristiche e influenzarne il destino biologico. Nell'ambito del presente lavoro sono stati pertanto studiati gli effetti conseguenti all'esposizione delle LNP al plasma, valutando eventuali variazioni delle loro caratteristiche dimensionali e superficiali. Successivamente per meglio caratterizzare le interazioni tra le LNP e la protein corona è stato condotto uno studio preliminare mediante microcalorimetria isoterma (Isothermal Titration Calorimetry, ITC). Questa tecnica è stata impiegata per approfondire gli aspetti termodinamici dell'interazione tra la matrice lipidica delle nanoparticelle e alcune proteine modello, contribuendo alla comprensione dei meccanismi alla base delle interazioni LNP-proteina. Nel complesso, il presente lavoro di tesi è stato finalizzato alla caratterizzazione integrata delle LNP, dalla valutazione delle proprietà chimico-fisiche iniziali fino allo studio delle loro interazioni con l'ambiente biologico. Il confronto tra le formulazioni contenenti DDA e ALC ha consentito di approfondire come la natura chimica del lipide influenzi sia le proprietà delle nanoparticelle sia l'interazione con le proteine

plasmatiche. L'insieme di questi risultati fornisce indicazioni utili per comprendere il comportamento *in vivo* delle LNP, in previsione di un'ottimizzazione di questi nanovettori per la veicolazione di acidi nucleici, in particolare per applicazioni basate sull'mRNA.

3. Materiali e metodi

3.1. Materiali

3.1.1. Formulazioni lipidiche

Tutte le formulazioni lipidiche, approvate da FDA, sono costituite da quattro componenti lipidici chiave: un lipide cationico ionizzabile, lipidi helper, il colesterolo e i lipidi coniugati con il glicole polietilenico (PEG-lipidi). Questa specifica composizione favorisce la formazione di nanoparticelle monodisperse, aumentandone la stabilità colloidale e l'efficienza di incapsulamento degli acidi nucleici. Inoltre, tale architettura formulativa ottimizza l'incorporazione cellulare (uptake) e promuove il rilascio endosomiale (endosomal escape), un processo cruciale che permette alle nanoparticelle di liberare il proprio carico terapeutico direttamente nel citoplasma, prevenendo così la degradazione lisosomiale. Ai fini della nostra ricerca, sono state selezionate e ottimizzate due specifiche formulazioni di LNP, descritte nella Tabella 1.

Tabella 1. Composizioni della soluzione lipidica divise per formulazione.

Formulazione	Lipide	Colesterolo	Colesterolo 25-NBD	DSPC	DMG-PEG
ALC-LNP	50% ALC-0315	38,115%	0,385%	10%	1,5%
DDA-LNP	43,5% DDA	44,55%	0,45%	10%	1,5%

Le caratteristiche fisico-chimiche dei materiali utilizzati per la preparazione e caratterizzazione delle LNP in questo lavoro di tesi sono riportate di seguito.

- **((4-idrossibutil)azanediil)bis(esano-6,1-diil)bis(2-esildecanoato)-
ALC-0315**

ALC-0315 un lipide ionizzabile sintetico, ottenuto da BroadPharm (San Diego, USA. Numero di lotto: BP-25498). Si presenta come un liquido oleoso e incolore, edessendo fotosensibile, viene conservato in contenitori di vetro ambrato a una temperatura di -20°C (Figura 28).

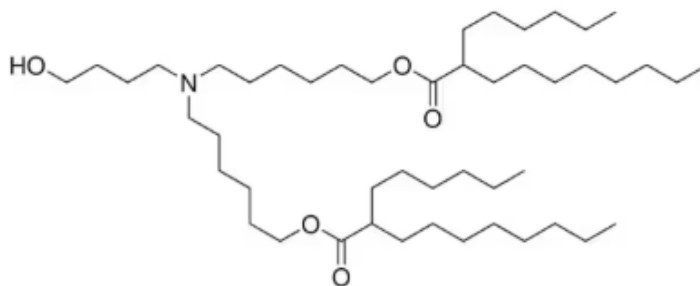


Figura 28. Struttura chimica di ALC-0315.

Le principali caratteristiche chimico-fisiche sono:

Formula bruta: C₄₈H₉₅NO₅

Peso molecolare: 766,3 g/mol

Solubilità in acqua: insolubile

Solubile in solventi organici quali etanolo e cloroformio

Grado di purezza: $\geq 98\%$

- **Dimetildioctadecilammonio Bromuro – DDA**

Il DDA è un lipide cationico sintetico, ottenuto da Sigma Aldrich (Massachusetts, USA. Numero di Lotto: D2779). Si presenta come una polvere bianca stabile a temperatura ambiente (Figura 29).

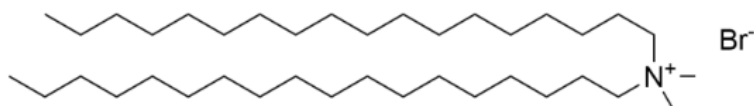


Figura 29. Struttura chimica di DDA

Le caratteristiche chimico- fisiche sono:

Formula bruta: C₃₈H₈₀BrN

Peso molecolare: 630,98 g/mol

Solubilità in acqua: solubile

Grado di purezza: $\geq 98\%$

- **Colesterolo**

Il colesterolo è un lipide presente naturalmente nelle membrane cellulari. È stato ottenuto da Sigma-Aldrich (Massachusetts, USA. Numero di lotto: C-8503) e si presenta come una polvere bianca, stabile a temperatura ambiente (Figura 30).

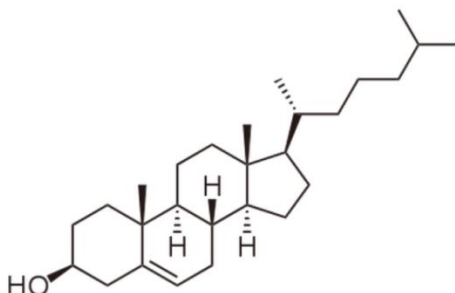


Figura 30. Struttura chimica del colesterolo

Le caratteristiche chimico- fisiche sono:

Formula bruta: $C_{27}H_{46}O$

Peso molecolare: 386,65 g/mol

Solubilità in acqua: praticamente insolubile; 0,00003 g/L a 20 °C

Grado di purezza: $\geq 99\%$

- **25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzossadiazol-4-il)metil]ammino]-27-norcolesterolo– Colesterolo 25-NBD**

Il colesterolo 25-NBD è un analogo strutturale del colesterolo, derivato mediante l'introduzione del gruppo fluorescente nitrobenzossadiazolo (NBD). La fluorescenza è stata misurata mediante spettrofluorimetro Shimadzu RF-6000 (Shimadzu Italia S.r.l., Milano, Italia), utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 490 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 542 nm. Si presenta come una polvere bianca, da conservare a temperatura di -20°C, prodotta da Avanti Polar Lipids™ e distribuito da Merck (Alabama, USA. Cat. Numero di lotto: 810250P). Una volta solubilizzato in etanolo, appare come un liquido giallo, fotosensibile (Figura 31).

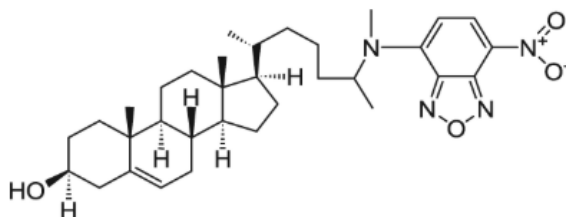


Figura 31. Struttura chimica del colesterolo 25-NBD

Le caratteristiche chimico- fisiche sono:

Formula bruta: $C_{33}H_{48}N_4O_4$

Peso molecolare: 564,76 g/mol

Solubilità in acqua: praticamente insolubile

Grado di purezza: >99% (TLC)

- **1,2-distearoil-*sn*-glicerolo-3-fosfocolina–DSPC**

Il DSPC è un derivato della fosfatidilcolina. Si presenta come una polvere bianca, prodotta da Avanti Polar Lipids™ e distribuito da Merck (Alabama, USA. Numero di lotto: 850725C). Deve essere conservato a temperatura di -20°C (Figura 32).

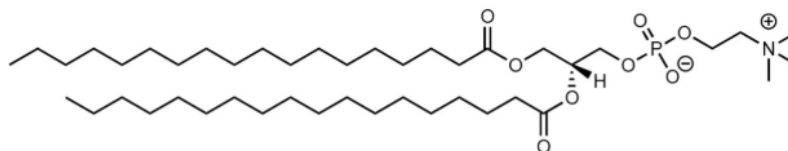


Figura 32. Struttura chimica di DSPC

Le caratteristiche chimico- fisiche sono:

Formula bruta: C₄₄H₈₈NO₈P

Peso molecolare: 790,15 g/mol

Solubilità in acqua : praticamente insolubile

Grado di purezza: ≥ 99%

- **1,2-dimiristoil-rac-glicerolo-3-metossipolietilenglicole-2000-DMG-PEG 2000**

Il DMG-PEG 2000 è un lipide sintetico PEGilato, che si presenta come una polvere bianca da conservare a temperatura di -20°C. È prodotto da Avanti Polar Lipids™ e distribuito da Merck (Alabama, USA. Cat. Numero di lotto: 880151P) (Figura 33).

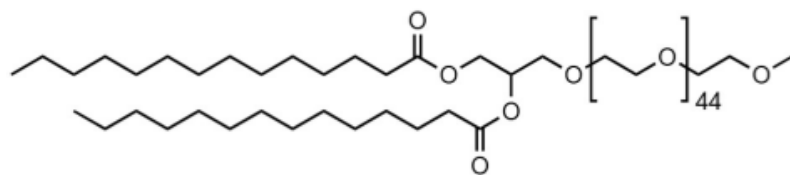


Figura 33. Struttura chimica di DMG-PEG 2000

3.1.2. CleanCap® mCherry mRNA (5moU)

L'acido nucleico impiegato nel presente studio è costituito da mRNA codificante per la proteina fluorescente mCherry, modificato con 5-metiluridina (5moU) e acquistato da TriLink Biotechnologies (San Diego, USA. Numero di lotto. L-7203). È un filamento di RNA messaggero sintetico ingegnerizzato per indurre l'espressione della proteina fluorescente mCherry, all'interno delle cellule bersaglio. Deriva da DsRed, una proteina fluorescente rossa tetrameric (RFP), isolata originariamente dal corallo della specie *Discosoma*. Tale proteina, in seguito a eccitazione, emette una fluorescenza nel range del rosso, con un picco massimo di eccitazione a 558 nm e un picco di emissione a 583 nm. È stabile e resistente al fotobleaching (processo che comporta la diminuzione della fluorescenza di un campione, dovuta alla degradazione fotochimica del fluoroforo). Questo mRNA viene sottoposto a capping (modificazione biologica fondamentale che avviene all'estremità iniziale (estremità 5') della molecola di mRNA) utilizzando CleanCap® Reagent AG, tecnologia di capping co-trascrizionale brevettata da TriLink, che produce la struttura Cap-1 naturale. È poliadenilato (alla sua estremità 3', possiede una lunga catena composta esclusivamente da nucleotidi di adenina (A), nota comunemente come coda Poly(A) e modificato con 5-metossiuridina (5moU). La 5-metossiuridina è un'uridina modificata in grado di ridurre la risposta immunogenica e migliorare l'efficienza traduzionale degli mRNA. Imita un mRNA maturo completamente

processato. Il prodotto deve essere conservato a temperatura di -80°C per garantirne la stabilità (Figura 34).

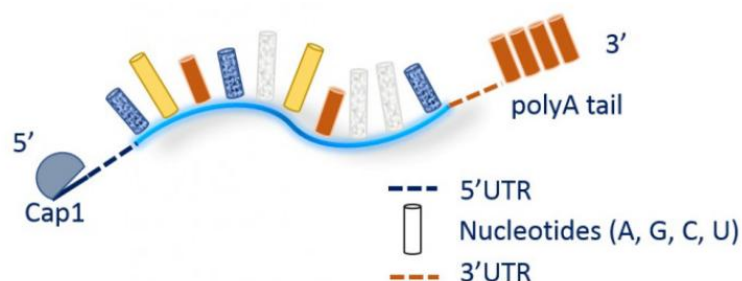


Figura 34. struttura di CleanCap® mCherry mRNA (5moU)

3.1.3. Sieroalbumina bovina (BSA)

La sieroalbumina bovina (BSA), frazione V, è una proteina globulare estratta dal plasma sanguigno dei bovini, che ha il compito di trasportare molecole nel flusso sanguigno, oltre a quello di mantenere la pressione osmotica. È formata da una singola catena di 583 amminoacidi e contiene 17 ponti disolfuro interni che le conferiscono un'elevata stabilità termica e strutturale. La BSA utilizzata in questo lavoro sperimentale è stata acquistata da EuroClone S.p.A (Pero (MI), Italia. Numero di lotto: 2I003311). Ha un peso molecolare di circa 66,5 kDa e presenta un punto isoelettrico (pI) di circa 4,7 che le conferisce una carica netta negativa a pH neutro. Allo stato solido, si presenta sotto forma di una polvere cristallina che tende ad un colore giallo pallido. Deve essere conservata ad una temperatura di $2-8^{\circ}\text{C}$ (Figura 35).

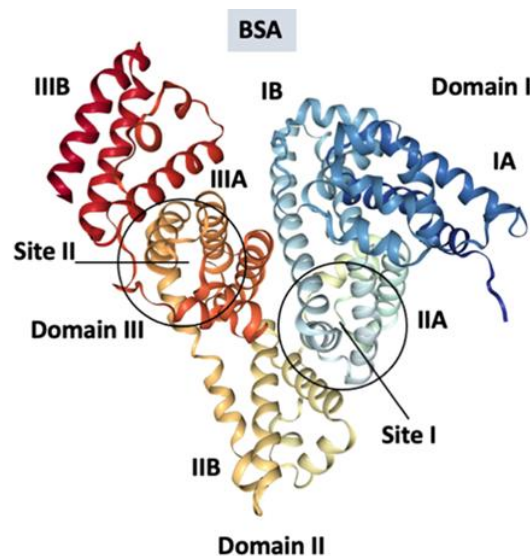


Figura 35. Conformazione biochimica di BSA e dei suoi domini e siti. (Ribeiro, A. G. et al. 2021)

3.1.4. Sieroalbumina umana (HSA)

La siero albumina umana (HSA), è una proteina globulare, formata da una singola catena di 585 amminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 66,5 kDa. La struttura è resa estremamente stabile e resistente grazie a 17 ponti disolfuro. È la proteina più abbondante nel sangue umano, dove costituisce da sola circa il 55-60% di tutte le proteine plasmatiche. Viene sintetizzata nel fegato e viene rilasciata nel flusso sanguigno, contribuisce a regolare la distribuzione dei fluidi tra i vasi sanguigni e i tessuti. L'HSA trasporta anche sostanze come acidi grassi, ormoni e farmaci nel sangue. Può essere facilmente purificata dal plasma umano o prodotta con la tecnologia del DNA ricombinante. Allo stato solido, si presenta sotto forma di una polvere cristallina che tende ad un colore giallo pallido (temperatura di conservazione $T = 2-8^{\circ}\text{C}$). Il lotto utilizzato in questo lavoro sperimentale è stato acquistato da Oryzogen (Wuhan, Cina, Numero di lotto: HYC002M01) (Figura 36).

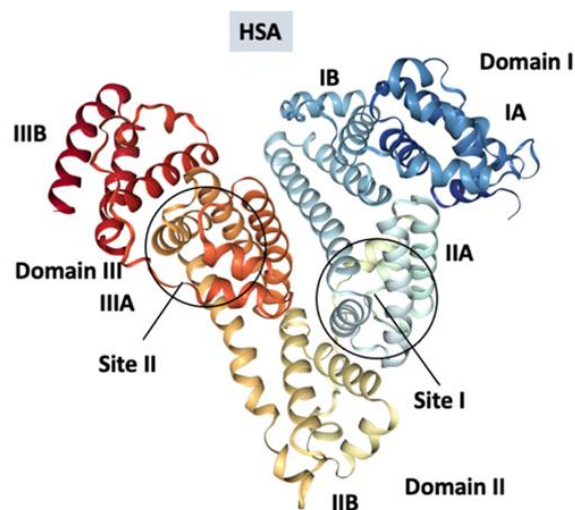


Figura 36. Conformazione biochimica di HSA e dei suoi domini e siti (Ribeiro, A. G. et al. 2021)

3.1.5. Soluzioni tampone

Nella produzione delle LNP sono utilizzati tampone fosfato (pH = 7,4) e tampone acetato (pH = 4,4) entrambi preparati secondo le specifiche riportate in Farmacopea Italiana XII Ed. Tutti i solventi utilizzati sono di grado analitico e acquistati da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

3.2. Metodi

3.2.1. Produzione delle nanoparticelle lipidiche mediante tecnologia microfluidica

Per questo lavoro di tesi sono state allestiti due lotti di LNP, una formulazione contenente il lipide ionizzabile ALC-0315 e una contenente il lipide cationico DDA. La preparazione dei due lotti si basa su un meccanismo di auto-assemblaggio controllato, che prevede inizialmente la preparazione di una soluzione lipidica in etanolo alla concentrazione di 5 mg/mL, sotto agitazione per circa 20 minuti, ottimizzata sulla base di un precedente studio di Design of Experiments (DoE) condotto dal gruppo di ricerca (Dal Pan, G. ,2022), ed una fase acquosa composta da tampone acetato. Una volta preparate le due soluzioni, l'allestimento delle LNP è stato eseguito mediante il sistema microfluidico Dolomite Microfluidics equipaggiato con un sistema di pompaggio MitoS-P (Royston, Regno Unito) e con un chip MicroMixer (MMX) in vetro con rivestimento idrofilo (Figura 37).



Figura 37. Chip MicroMixer (MMX)

Il chip presenta 4 vie. La prima via dall'alto rappresenta l'outlet, ovvero da dove procederemo con la raccolta delle nanoparticelle lipidiche appena formate, la seconda e la quarta via sono dedicate alla soluzione acquosa, mentre la terza via è dedicata alla soluzione lipidica.

Prima dell'avvio del processo produttivo, il chip microfluidico e le tuberie di collegamento vengono sottoposti a un ciclo di lavaggio, mediante flussaggio di acqua ed etanolo precedentemente filtrati, al fine di garantire la pulizia del sistema. Completata la procedura di lavaggio, vengono impostati i parametri di processo mediante il software dello strumento e successivamente avviata la produzione. L'intero processo viene monitorato in tempo reale osservando il chip microfluidico al microscopio ottico per escludere eventuali ostruzioni o la presenza di bolle. Al termine del ciclo di produzione, le tuberie e il chip microfluidico vengono sottoposti ad un ulteriore ciclo di pulizia, che prevede il flussaggio di acqua per rimuovere eventuali sali solubili in acqua e residui di RNA e successivamente di etanolo. Il sistema microfluidico impiegato dispone di due pompe, una che gestisce il flusso della fase acquosa e una che gestisce il flusso della fase organica, entrambe controllate con precisione tramite un software dedicato (Figura 38).

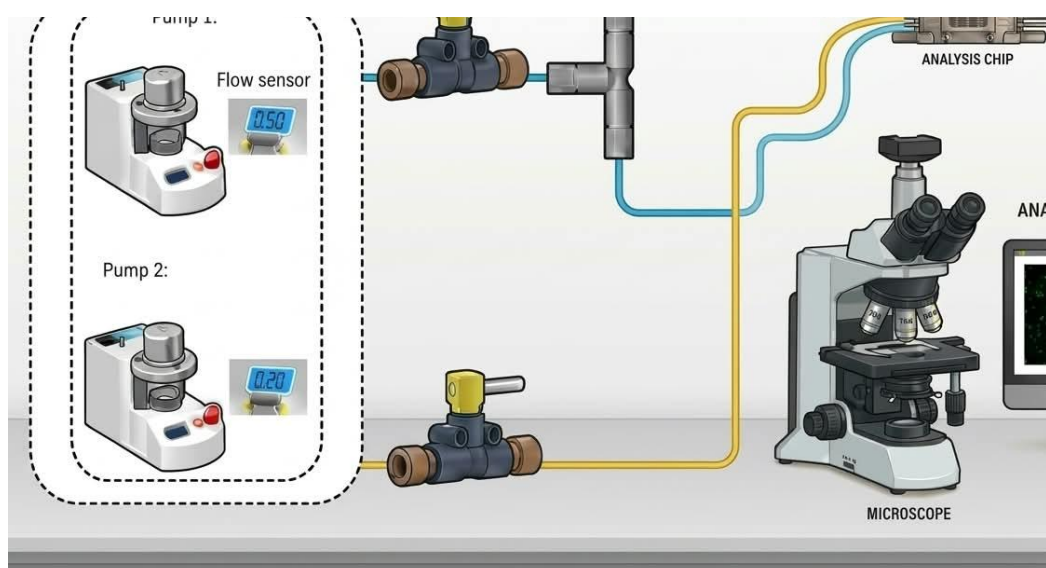


Figura 38. Schema rappresentativo del sistema Dolomite Microfluidics, per la produzione di nanoparticelle lipidiche.

Per le formulazioni contenenti mRNA, la fase acquosa è costituita da 90 μL contenenti 90 μg di mRNA m-Cherry disciolti in 2160 μL di tampone acetato e viene sterilizzata in autoclave. Tutte le soluzioni prima dell'utilizzo vengono filtrate con filtri da 0.22 μm (filtri di cellulosa per le soluzioni acquose e di polietersulfone per i solventi organici) al fine di evitare l'ingresso nel chip e nella tuberia di particolato o altri contaminanti.

I parametri di processo sono stati ottimizzati in un precedente lavoro di tesi mediante un approccio statistico basato su un DoE (Rossi, R. 2025) e adattati al tipo di formulazione (Tabelle 2 ,3 e 4).

Tabella 2 e 3. Set-up microfluidica basato sulle differenti formulazioni delle nanoparticelle.

2) DDA-LNPs

	Flusso	Pressione
Soluzione organica	172 $\mu\text{L}/\text{min}$ 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ effettivi	1000 mbar
Soluzione acquosa	1050 $\mu\text{L}/\text{min}$	1000 mbar

3) ALC-0315-LNPs

	Flusso	Pressione
Soluzione organica	127 $\mu\text{L}/\text{min}$ 240 $\mu\text{L}/\text{min}$ effettivi	1000 mbar
Soluzione acquosa	720 $\mu\text{L}/\text{min}$	1000 mbar

Tabella 4. Set-up microfluidica basato sulle differenti formulazioni delle LNP. Il TFR rappresenta il flusso totale, mentre il FRR rappresenta il rapporto tra la fase organica e quella acquosa.

Formulazione	Total flow rate (TFR)	Flow rate ratio (FRR)
DDA-LNP	1400 $\mu\text{L}/\text{min}$	1:3
ALC-LNP	960 $\mu\text{L}/\text{min}$	1:3

3.2.2. Dialisi

La dialisi rappresenta una fase cruciale nella preparazione delle LNP, principalmente per la purificazione, la rimozione dei solventi organici e per la stabilizzazione del prodotto finale, perché consente di trasferire le nanoparticelle in un tampone fisiologico o in un mezzo di conservazione ottimale, preservando la stabilità, le dimensioni e la polidispersità delle particelle nel tempo. I campioni di LNP senza mRNA, ottenuti tramite microfluidica, sono stati quindi inseriti in membrane da dialisi (SpectraPor, cut off 14 kDa) di lunghezza di circa 8 cm e pre-idratate con acqua deionizzata. La dialisi è stata condotta in tampone fosfato a $\text{pH} = 7,4$ per circa 5 ore con sostituzione del tampone ogni ora al fine di eliminare completamente i residui di tampone acetato e etanolo.

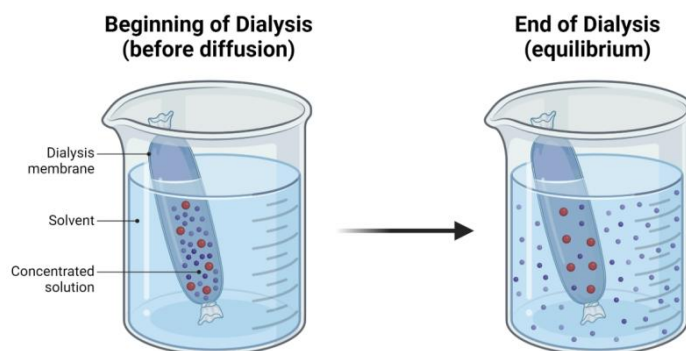


Figura 39. Dialisi effettuata nella membrana SpectraPor, cut off 14 kDa.

Per i lotti di LNP caricati con mRNA la dialisi è stata invece eseguita sotto cappa sterile utilizzando dispositivi per dialisi Slide A-Lyzer™ MINI, MWCO 20K (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) (Figura 40). È stato utilizzato un tampone fosfato a pH = 7.4, precedentemente autoclavato per garantirne la sterilità, con sostituzione del tampone ogni ora per un totale di 5 cambi.

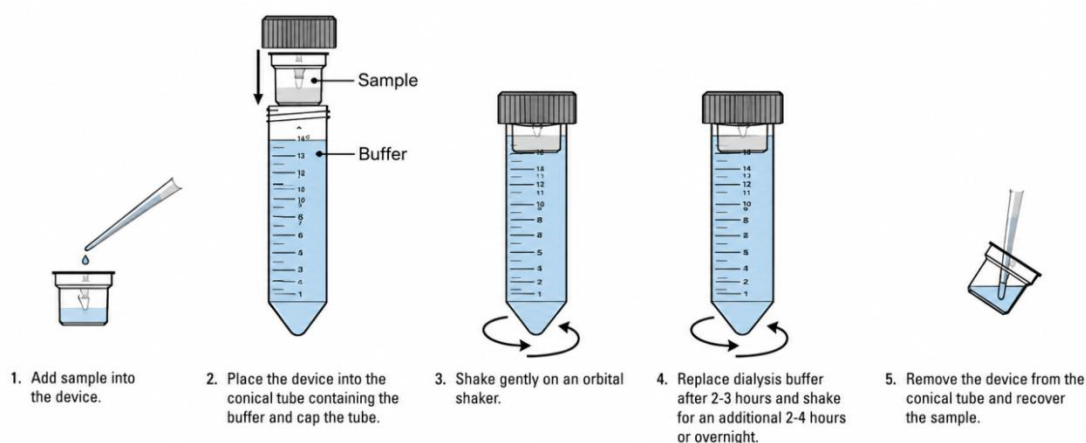


Figura 40. Dispositivo da dialisi Slide A-Lyzer™ MINI.

3.2.3. Formazione della corona proteica

Per lo studio del comportamento delle ALC-LNP e DDA-LNP in condizioni rappresentative dell'ambiente biologico, sono stati investigati due differenti approcci sperimentali, finalizzati a valutare l'interazione delle nanoparticelle lipidiche con le componenti proteiche. In particolare, le LNP sono state incubate rispettivamente con terreno di coltura RPMI 1640 addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) e con plasma umano. La dispersione di LNP è stata miscelata in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione costituita da tampone fosfato e terreno di coltura RPMI 1640 addizionato con FBS (10% (v/v)). Il campione è stato quindi incubato a 37 °C per un'ora sotto costante agitazione, al fine di favorire l'interazione tra la

superficie delle nanoparticelle e le proteine presenti nel mezzo biologico. Al termine dell'incubazione, la dispersione è stata centrifugata a 15.000 RPM per 45 minuti, al fine di separare la frazione solubile contenete le proteine libere (surnatante), dal pellet costituito dalle LNP e dalle proteine adsorbite sulla loro superficie (hard corona). Il surnatante è stato quindi rimosso e il pellet è stato risospeso in un volume di tampone fosfato equivalente al volume iniziale di LNP.

Per lo studio della protein corona in condizioni maggiormente rappresentative dell'ambiente biologico, le LNP sono state incubate in presenza di tampone fosfato e plasma umano in rapporto 1:1 (v/v). La procedura sperimentale ha previsto anche in questo caso l'esposizione delle nanoparticelle al plasma a 37 °C per un'ora, al fine di favorire l'adsorbimento delle proteine sulla superficie delle LNP (Figura 41). In questo approccio sperimentale, al termine dell'incubazione non è stato effettuato il passaggio di centrifugazione.

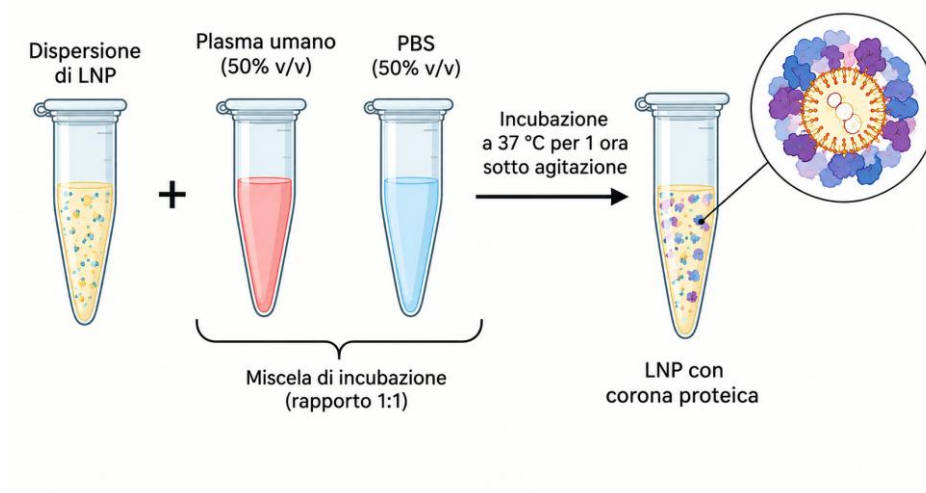


Figura 41. Procedura di formazione della corona proteica utilizzando plasma umano.

3.2.4. Caratterizzazione LNPs

Le LNP allestite sono state successivamente caratterizzate in termini di concentrazione, distribuzione dimensionale, indice di polidispersione (PDI) e potenziale Z. Le tecniche analitiche utilizzate sono: Photon Correlation Spectroscopy (PCS), Dynamic Light Scattering (DLS), Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) e spettrofluorimetro. Per valutare la formazione della protein corona, le nanostrutture sono state successivamente poste a contatto con plasma. Al fine di studiare i parametri termodinamici associati all'interazione tra la matrice lipidica delle LNP e le proteine plasmatiche, sono state effettuate delle analisi mediante microcalorimetria isoterma (ITC). I risultati ottenuti hanno fornito informazioni complementari alla caratterizzazione fisico-chimica delle LNP, permettendo di approfondire i meccanismi alla base dell'interazione nanoparticella-proteina e della conseguente formazione della protein corona.

3.2.4.1. Photon Correlation Spectroscopy (PCS)

La caratterizzazione iniziale dei lotti di LNP è stata eseguita mediante Photon Correlation Spectroscopy (PCS), utilizzando lo strumento N5 Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter, California, USA). Questa tecnica consente di determinare la dimensione media delle particelle e l'indice di polidispersione (PDI). La PCS si basa sul principio della diffusione dinamica della luce da parte di una sospensione di particelle, sottoposta a moto browniano quando illuminata da un raggio laser a una lunghezza d'onda di 632,8 nm. Poiché il movimento delle particelle è casuale e continuo, l'intensità della luce diffusa varia nel tempo, determinando un coefficiente di diffusione che tramite l'equazione di Stokes-Einstein (Equazione 2) permette di determinare il loro raggio idrodinamico.

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{Eq. 2})$$

Per le misurazioni, 100 μL di campione vengono diluiti con 900 μL di acqua ultrapura MilliQ in una cuvetta trasparente di polidimetilsilossano (PDMS). Per ciascun campione sono state effettuate almeno tre repliche ($n = 3$) e i valori riportati come media $\pm$ deviazione standard.

3.2.4.2. Analisi del potenziale zeta tramite Dynamic Light Scattering (DLS)

Il potenziale zeta è stato determinato mediante Dynamic Light Scattering (DLS), con lo strumento Litesizer DLS (Anton Paar GmbH, Torino, Italia). Questo strumento è fondamentale per lo studio delle LNP poiché consente la misurazione simultanea di tre parametri: le dimensioni medie, l'omogeneità del campione tramite il PDI e la carica superficiale attraverso il potenziale zeta. I campioni opportunamente diluiti con acqua ultrapura MilliQ vengono analizzati a 25 °C, utilizzando una cuvetta Omega per potenziale zeta (Figura 42). Ogni analisi è stata effettuata in triplicato e i risultati finali sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard.



Figura 42. Cuvetta Omega utilizzata per determinare il Potenziale Zeta tramite strumento DLS.

3.2.4.3. Spettrofluorimetro

L'analisi spettrofluorimetrica è stata eseguita per l'analisi quantitativa del colesterolo fluorescente incorporato nei lotti di LNP. Questa tecnica si basa sulla misura dell'intensità della luce emessa per fluorescenza da un campione, dopo eccitazione ad una specifica lunghezza d'onda, permettendo un'analisi quantitativa e qualitativa delle sostanze. Le sono state condotte con uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-6000 (Shimadzu Italia S.R.L., Milano, Italia) con lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 490 e 542 nm. Al fine di garantire una quantificazione accurata del tracciante fluorescente, è stata preventivamente costruita una curva di calibrazione allestendo soluzioni standard di colesterolo 25-NBD in tampone fosfato, in un intervallo di concentrazione compreso tra 12,5 e 625 $\mu\text{g/mL}$. I campioni di LNP sono stati analizzati immediatamente dopo la preparazione tramite microfluidica e prima della dialisi, al fine di evitare eventuali perdite di colesterolo fluorescente associate al processo di purificazione e consentire una quantificazione accurata del segnale totale. Ciascun campione dopo opportuna diluizione è stato analizzato in una cuvetta di quarzo, registrando l'intensità della fluorescenza emessa,

direttamente proporzionale alla concentrazione del fluoroforo presente nel campione.

3.2.4.4. Determinazione dell'efficienza di incapsulamento (EE%) tramite saggio RiboGreen™

Per valutare l'efficienza di incapsulamento dell'mRNA all'interno delle LNP, è stato utilizzato il saggio Quant-iT™ RiboGreen (ThermoFisher Scientific, Milano, Italia). Tale saggio utilizza il reattivo RiboGreen™ in grado di legarsi selettivamente agli acidi nucleici, emettendo una fluorescenza proporzionale alla concentrazione di RNA. Per la determinazione dei campioni incogniti è stata prima preparata una curva di taratura partendo dagli standard di RNA forniti nel kit che sono stati opportunamente diluiti in tampone TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) per ottenere concentrazioni finali note di 0, 20, 100, 500 e 1000 ng/mL. Tale curva è stata successivamente utilizzata per quantificare l'RNA nei campioni di LNP. I campioni da sottoporre all'analisi, opportunamente diluiti sempre in tampone TE, per garantire che le relative concentrazioni di RNA rientrassero nel range della curva di calibrazione, sono stati ripartiti in aliquote all'interno di una piastra a 96 pozzetti con fondo nero opaco, per garantire una fluorescenza di fondo minima durante la misurazione. Al fine di identificare il metodo ottimale per garantire il rilascio dell'RNA incapsulato, sono state testate diverse tecniche di rottura delle LNP e applicato un disegno sperimentale di tipo DoE (Bianchi, M. 2024), per definire le condizioni ottimali. Tali processi includono cicli di congelamento e scongelamento, l'utilizzo di SDS, Triton X-100 e Tween 20. Le letture di fluorescenza sono state ottenute utilizzando un lettore di micropiastre, FLUOstar® Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germania), con lunghezze d'onda di eccitazione a 485 nm ed emissione a 528 nm. L'analisi fornisce unità relative di fluorescenza (RFU) che vengono convertite tramite

la curva di calibrazione in concentrazioni di RNA sia libero che incapsulato. L'efficienza di incapsulamento percentuale (EE%) è stata quindi calcolata mediante l' Equazione 3.

$$EE \% = \frac{RNA_{totale} - RNA_{libero}}{RNA_{totale}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Dove: RNA_{totale} = quantità complessiva di RNA presente nel campione

RNA_{libero} = frazione di RNA non incapsulata

3.2.4.5. Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS)

Lo strumento Exoid IZON (Izon Science Ltd, Christchurch, Nuova Zelanda) è stato impiegato per la caratterizzazione delle nanoparticelle in soluzione, utilizzando la tecnologia Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS). Il principio di funzionamento si basa sulla misura di impulsi elettrici generati dal passaggio delle singole particelle attraverso una membrana, detta nanopore, permettendone un accurata misurazione (Figura 43).

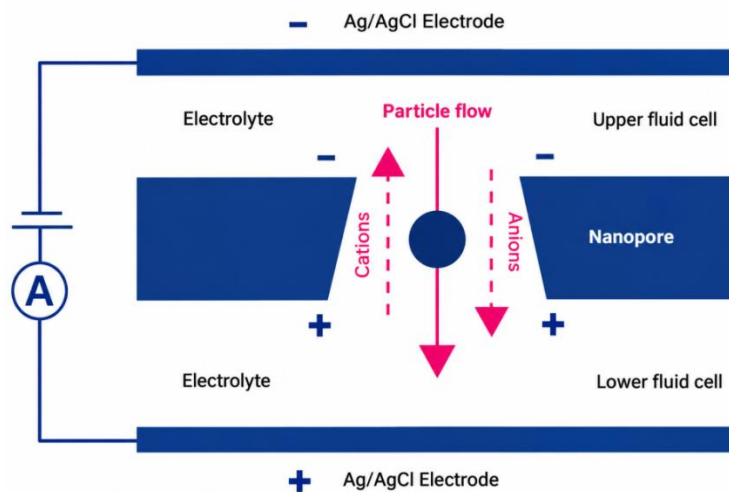


Figura 43. Rappresentazione schematica del Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS), che mostra la posizione relativa del nanoporo, degli elettrodi e delle celle fluidiche, nonché la direzione del flusso di ioni e particelle.

Il sistema utilizza una membrana in poliuretano termoplastico (TPU), un polimero idrofobico all'interno del quale è ricavato un nanoporo deformabile (tunable nanopore). In questo studio sono state selezionate una nanopore NP200 e NP250. La prima fase prevede la preparazione della membrana mediante un processo di soaking con una soluzione umettante seguita dall'aggiunta di una soluzione elettrolitica (tampone fosfato) fino all'ottenimento di una corrente di base stabile. Per garantire una dispersione uniforme e prevenire l'aggregazione, tutti i componenti sono statipreventivamente filtrati mediante filtri PES da 0,22 μm . Una volta stabilizzato il sistema, i campioni preparati vengono introdotti nel sistema Exoid. La camera inferiore viene riempita con 75 μL di PBS, mentre 35 μL della sospensione di nanoparticelle viene iniettata nella cella superiore. Viene quindi eseguito un monitoraggio in tempo reale dei principali indicatori di stabilità (corrente, rumore di fondo (RMS) e dimensione del blockade) per assicurare il mantenimento delle condizioni ottimali durante tutta l'analisi. Il valore di RMS è stato mantenuto al disotto di 12 pA, mentre il conteggio dei blockade per le LNP è stato mantenuto tra 100 e 1000, con una corrente stabilizzata a circa 100 nA. Pressione (0-2000 Pa), tensione (100-500 mV) e allungamento della nanopore (45-49 mm) sono stati regolati per ottimizzare le condizioni di misurazione. La dimensione e la concentrazione delle nanoparticelle è stata determinata tracciando gli eventi di blockade durante il passaggio delle nanoparticelle attraverso la nanopore. I dati acquisiti sono stati normalizzati utilizzando l'IZON Science Control Suite, generando distribuzioni dimensionali e profili di concentrazione. Dopo l'analisi, lo strumento è stato calibrato utilizzando particelle di riferimento (beads) con dimensioni e concentrazioni definite (ottenute da Izon Science

Ltd, Christchurch, Nuova Zelanda) al fine di utilizzare le stesse condizioni sperimentali ottimizzate per le analisi.

3.2.4.6. Isothermal titration calorimetry (ITC)

La calorimetria isoterma di titolazione (Isothermal titration calorimetry, ITC), è una tecnica microcalorimetrica usata per studiare le interazioni molecolari tra due composti, misurando il calore rilasciato o assorbito durante la formazione di un legame (Figura 44).

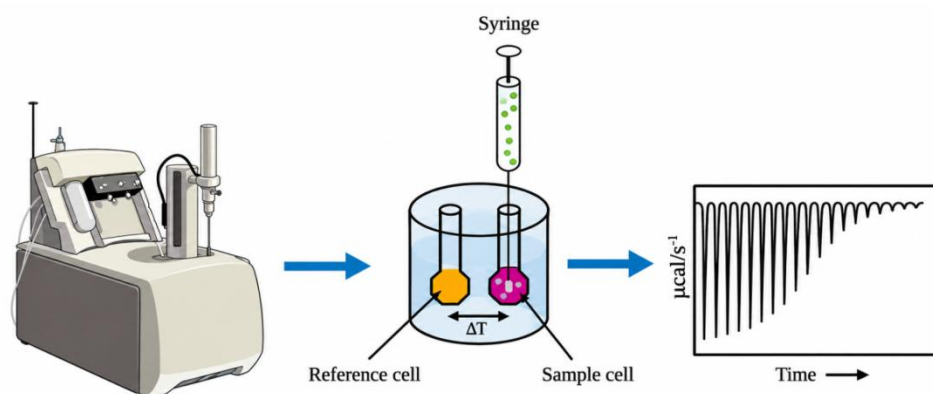


Figura 44. Schema rappresentativo dello strumento (Lima Cavalcanti et al., 2023).

Lo strumento utilizzato per studiare le possibili interazioni tra le LNP e le proteine sieriche è la MicroCal PEAQ-ITC (MalvernPanalytical Ltd, Inghilterra). Lo strumento è formato da una cella di riferimento, contenente 300 μL di acqua MilliQ e una cella per il campione di ugual volume, entrambe inserite in un forno a temperatura controllata. La soluzione di ligando viene gocciolata nella cella del campione mediante una microsiringa da 40 μL , dotata di un sistema di agitazione integrato che permette di mescolare in modo continuo e omogeneo la soluzione (Figura 45).

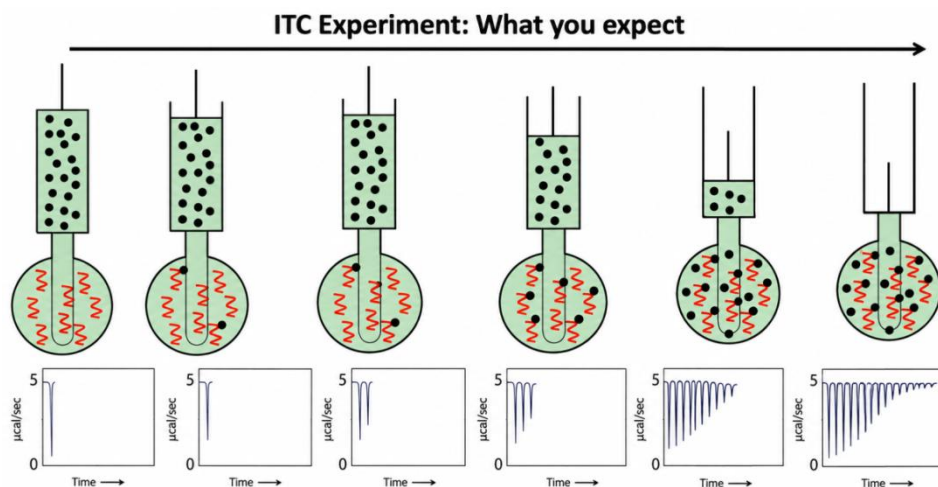


Figura 45. Rappresentazione grafica che illustra l'andamento graduale dei risultati di un esperimento ITC (Srivastava, V. K., & Yadav, R., 2019).

Prima dell'analisi, i campioni vengono sottoposti a degasaggio al fine di evitare la formazione di bolle d'aria, che potrebbero interferire con la misura calorimetrica. È inoltre fondamentale che i campioni presentino condizioni sperimentali comparabili. A tale scopo, il pH della sospensione di LNP e quello della soluzione proteica vengono opportunamente controllati, assicurandosi che la differenza tra i due valori non superi 0,05 unità di pH, per evitare variazioni termiche legate a fenomeni di mismatch. Analogamente, i campioni devono essere portati alla stessa temperatura prima dell'analisi, così da evitare variazioni del segnale calorimetrico non correlate all'interazione in esame. Le analisi sono state condotte inserendo nella cella del campione le LNP, mentre nella siringa vengono inserite le proteine, quali siero albumina bovina (BSA) o siero albumina umana (HSA). Il metodo utilizzato prevede una serie di 18 iniezioni da 2 µL ciascuna, più un'iniezione iniziale di 0,4 µL (per un totale di 19 iniezioni). Per minimizzare l'impatto degli artefatti di equilibrizzazione, che si possono verificare con la prima iniezione, il punto iniziale viene scartato

automaticamente prima dell'analisi dei dati. I risultati vengono visualizzati sotto forma di profili calorimetrici che correlano il flusso di calore ($\mu\text{cal/s}$) in funzione del tempo (min). L'elaborazione dei dati grezzi è stata effettuata mediante il software MicroCal PEAQ-ITC Analysis, attraverso il quale è stato possibile ottenere la curva di titolazione e determinare i principali parametri termodinamici. La curva di titolazione sperimentale è stata interpolata applicando un modello di fitting a sito singolo di legame in modo da determinare la costante di affinità K_a , la variazione di entalpia e la stechiometria di legame. La variazione di energia libera di Gibbs (ΔG) e il contributo entropico (ΔS) sono stati derivati mediante le relazioni fondamentali della termodinamica :

$$\Delta G = -RT\ln K_a \quad \text{e} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

4. Risultati e discussioni

La prima parte del lavoro di tesi ha riguardato la caratterizzazione dimensionale delle formulazioni allestite in assenza e in presenza di materiale genetico (ALC-LNP, ALC-mRNA-LNP, DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP), al fine di valutare come la composizione lipidica delle formulazioni e la presenza dell'mRNA possano influenzare le proprietà fisico-chimiche delle LNP. Successivamente le stesse formulazioni sono state confrontate in termini di proprietà superficiali, efficienza di incapsulamento del materiale genetico e interazione con le proteine plasmatiche, con particolare attenzione alla formazione della protein corona. Tutte le analisi sulle formulazioni lipidiche sono state effettuate dopo dialisi e congelamento e su lotti indipendenti, in modo da garantire la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati.

4.1. Analisi dimensionale mediante PCS

Le formulazioni ALC-LNP, ALC-mRNA-LNP, DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP sono state sottoposte a caratterizzazione dimensionale mediante lo strumento N5 Submicron Particle Size Analyzer (PCS), dopo i passaggi di dialisi e congelamento previsti dal protocollo sperimentale. Le analisi sono state condotte a 25 °C, determinando per ciascuna formulazione il diametro medio e l'indice di polidispersione (PDI). I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 5.

Tabella 5. Valori di diametro medio delle particelle (espresso in numero) e PDI delle formulazioni ALC-LNP, DDA-LNP, ALC-mRNA-LNP e DDA-mRNA-LNP ottenuti mediante analisi PCS.

Formulazioni	Diametro medio (nm)	PDI
ALC-LNP	201,15 ± 29,35	0,102 ± 0,02
DDA-LNP	214,25 ± 20,43	0,257 ± 0,12
ALC-mRNA-LNP	184,20 ± 18,07	0,143 ± 0,07
DDA-mRNA-LNP	199,70 ± 14,69	0,247 ± 0,04

I risultati mostrano valori di diametro medio compresi tra 180 e 230 nm confrontabili tra le quattro formulazioni, non evidenziando differenze statisticamente significative (one-way ANOVA) con valori leggermente inferiori per le LNP a base di ALC. In particolare, il caricamento con mRNA non determina variazioni sostanziali del diametro medio, indicando che la presenza dell'acido nucleico non altera significativamente le dimensioni delle nanoparticelle nelle condizioni sperimentali adottate. Inoltre, tutte le formulazioni mostrano valori di PDI inferiori a 0,25, indicando un sistema monodisperso, con una ridotta propensione all'aggregazione (Lüdtke, F. L. et al. 2025). In particolare, le formulazioni a base di ALC mostrano valori medi di PDI inferiori rispetto alle corrispondenti formulazioni con DDA,

suggerendo una distribuzione dimensionale tendenzialmente più omogenea. Il valore di PDI non è stato comunque influenzato negativamente dal caricamento dell'acido nucleico in entrambe le formulazioni di LNP. Questo aspetto risulta particolarmente rilevante per gli studi successivi, in quanto conferma la corretta formulazione di popolazioni omogenee di LNP, indipendentemente dal lipide utilizzato e dalla presenza o meno del materiale genetico.

4.2. Analisi dimensionale mediante TRPS

L'analisi mediante Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) è stata impiegata come tecnica complementare alla caratterizzazione dimensionale con PCS, al fine di verificare i risultati precedenti e ottenere una caratterizzazione più accurata. Infatti, a differenza della PCS che stima la dimensione delle particelle sulla base della diffusione della luce da parte dell'intera popolazione delle particelle in sospensione, la TRPS analizza la singola particella nel momento in cui attraversa un nanoporo. Il passaggio di ciascuna particella attraverso il nanoporo genera una variazione del segnale elettrico, da cui si ricavano informazioni relative alle dimensioni e alla concentrazione delle particelle. Tutto ciò consente il calcolo di una dimensione media basata su misurazioni dirette delle singole particelle, e non sull'insieme, fornendo una risoluzione più elevata e dati di distribuzione dimensionale più affidabili. Utilizzando quindi la tecnologia TRPS mediante lo strumento Exoid IZON sono state analizzate le formulazioni ALC-LNP, DDA-LNP, ALC-mRNA-LNP e DDA-mRNA-LNP a una temperatura di 25°C, e i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Valori di diametro medio delle formulazioni ALC-LNP, DDA-LNP, ALC-mRNA-LNP e DDA-mRNA-LNP ottenuti mediante TRPS.

Formulazioni	Diametro medio (nm)
ALC-LNP	175,33 $\pm$ 25,38
DDA-LNP	179,68 $\pm$ 38,64
ALC-mRNA-LNP	148,50 $\pm$ 30,64
DDA-mRNA-LNP	166,67 $\pm$ 36,67

Come per l'analisi PCS, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le quattro formulazioni (one-way ANOVA), a conferma che né il tipo di lipide utilizzato nella formulazione, né la presenza di mRNA determinano una modifica sostanziale della popolazione particellare. La Figura 46 mostra il confronto tra la distribuzione dimensionale delle particelle delle quattro formulazioni, ottenuta tramite questa tecnologia.

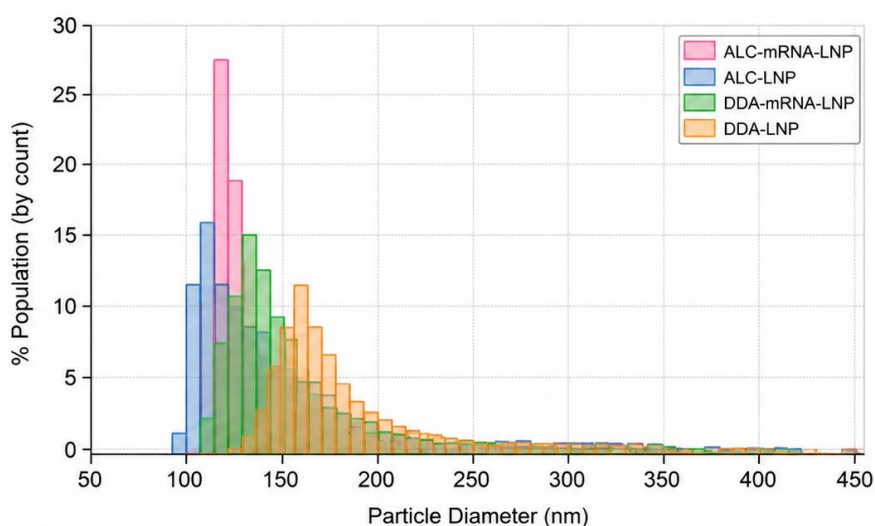


Figura 46. Confronto dimensionale delle formulazioni ALC-LNP, DDA-LNP, ALC-mRNA-LNP e DDA-mRNA-LNP, effettuato tramite lo strumento Exoid IZON.

Come si può osservare tutte le formulazioni mostrano una popolazione principale compresa tra 100 e 200 nm, accompagnata da una coda verso diametri maggiori. Si osserva, inoltre, una differenza anche se non statisticamente significativa nella distribuzione delle particelle in funzione del lipide impiegato. Le formulazioni a base di ALC presentano una distribuzione complessivamente più concentrata e tendenzialmente spostata verso diametri inferiori rispetto alle formulazioni contenenti DDA. Tale osservazione risulta coerente con la tendenza già evidenziata mediante PCS, che aveva mostrato valori dimensionali medi leggermente inferiori e più omogenei per i sistemi a base di ALC. Il confronto tra le formulazioni caricate con mRNA e non, mostra invece che l'incorporazione dell'mRNA non determina variazioni sostanziali della distribuzione dimensionale, sia nei sistemi ALC sia in quelli DDA, per cui le curve relative risultano ampiamente sovrapponibili. I risultati ottenuti mediante TRPS sono quindi in accordo con quanto osservato con la tecnica PCS, confermando la sostanziale comparabilità dimensionale delle formulazioni testate.

4.3. Determinazione del contenuto lipidico

Per quantificare il contenuto lipidico delle LNP è stata eseguita un'analisi spettrofluorimetrica utilizzando il colesterolo fluorescente 25-NBD come tracciante. La tecnica si basa sulla capacità del fluoroforo di assorbire a una specifica lunghezza d'onda di eccitazione e successivamente di emettere a una lunghezza d'onda maggiore, con un'intensità di fluorescenza correlata alla concentrazione del fluoroforo presente nel campione, consentendo così la determinazione del contenuto lipidico totale, espresso in $\mu\text{g/mL}$.

Il 25-NBD è stato inizialmente solubilizzato in etanolo e analizzato impostando lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione rispettivamente di 490 nm e di 542 nm. La curva di calibrazione ottenuta è riportata in Figura 47.

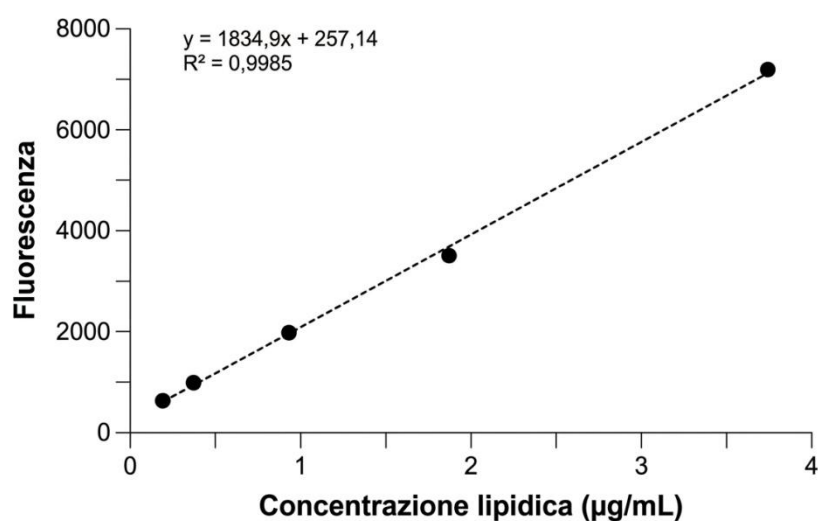


Figura 47. Curva di calibrazione del colesterolo 25-NBD solubilizzato in etanolo.

Per indagare ulteriormente il comportamento della fluorescenza, prima della dialisi sono state create curve di calibrazione utilizzando le formulazioni ALC-LNP, ALC-mRNA-LNP, DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP. Le nanoparticelle sono state diluite in modo da ottenere concentrazioni finali di 25-NBD comparabili a quelle utilizzate per la curva di calibrazione del colesterolo fluorescente libero. Per le formulazioni a base del lipide ALC sia in presenza che in assenza di materiale genetico è stato osservato un incremento dell'intensità di fluorescenza rispetto al 25-NBD solubilizzato in etanolo, indicando che l'ambiente lipidico delle nanoparticelle influenza la risposta del fluoroforo (Figura 48).

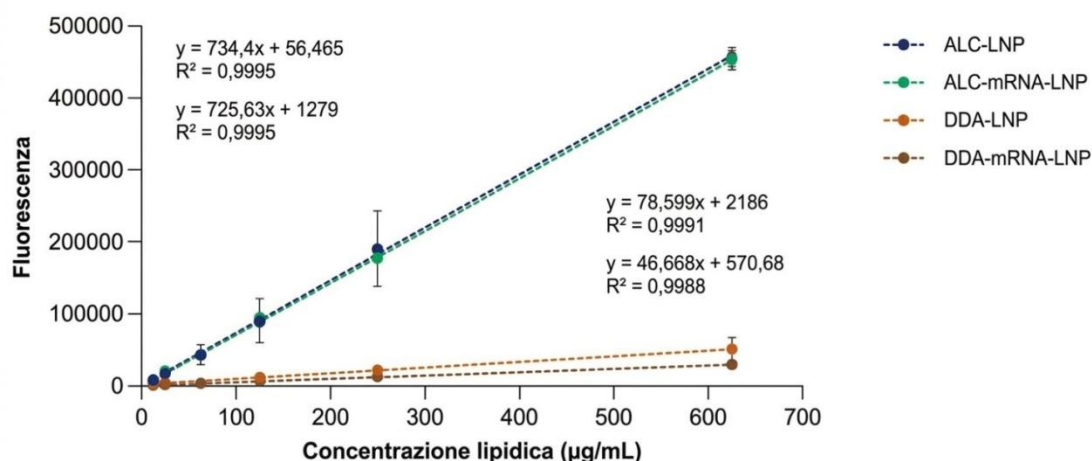


Figura 48. Curve di calibrazione ottenute dall'analisi spettrofluorimetrica delle formulazioni ALC-NBD, ALC mRNA-LNP, DDA-NBD e DDA-mRNA-NBD prima della dialisi.

Questi risultati erano attesi perché la fluorescenza del colesterolo marcato è sensibile all'ambiente e, in particolare, è influenzata dalla composizione lipidica delle LNP in cui è caricato. Il colesterolo, inoltre, può subire un riarrangiamento strutturale all'interno delle LNP, che aumenta l'esposizione del fluoroforo e di conseguenza incrementa il segnale di fluorescenza emesso.

Al contrario, per le formulazioni a base di DDA l'intensità di fluorescenza del colesterolo marcato è rimasta paragonabile a quella osservata nella soluzione etanolica. Questo effetto potrebbe essere dovuto alla carica positiva del DDA, che potrebbe ridurre l'intensità della fluorescenza, riducendo così il segnale complessivo. Un'altra possibile spiegazione è una limitata interazione tra il colesterolo 25-NBD e il lipide cationico, che comporterebbe una minore incorporazione di colesterolo rispetto alle nanoparticelle a base di ALC. Inoltre le curve delle formulazioni ALC-LNP e ALC-mRNA-LNP sono risultate pressoché sovrapponibili, così come quelle delle formulazioni DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP, suggerendo che la

presenza del 25-NBD colesterolo non influisce negativamente l'incapsulamento dell'mRNA. Ciò suggerisce che il colesterolo marcato è ben integrato nella struttura delle nanoparticelle, senza interferire con la capacità delle LNP di incapsulare e trattenere l'mRNA in modo efficiente (Maxfield, F. R. et al. 2012; Ostašov, P. et al. 2013).

A partire dalle curve di calibrazione è stata quindi determinata la concentrazione lipidica totale media delle diverse formulazioni e i risultati ottenuti in $\mu\text{g/mL}$ sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7. Concentrazione lipidica delle formulazioni ALC-LNP, ALC-mRNA-LNP, DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP.

Formulazioni	Concentrazione lipidica ($\mu\text{g/mL}$)
ALC-LNP	$377,36 \pm 105,51$
DDA-LNP	$412,54 \pm 53,42$
ALC-mRNA-LNP	$727,18 \pm 10,22$
DDA-mRNA-LNP	$318,87 \pm 18,14$

I dati ottenuti indicano che le ALC-mRNA-LNP mostrano la concentrazione lipidica più elevata rispetto alla controparte non caricata, suggerendo che l'inclusione dell'mRNA in queste formulazioni può influenzare sia la quantificazione dei lipidi che l'autoassemblaggio delle nanoparticelle, rendendolo più efficiente nel caso del caricamento con mRNA. Al contrario, le DDA-mRNA-LNP mostrano una concentrazione inferiore rispetto alle DDA-LNP, indicando un diversotipo di interazione tra il lipide DDA e l'mRNA. È da sottolineare inoltre come la formulazione ALC-mRNA-LNP presenti una concentrazione lipidica quasi doppia rispetto a quella delle DDA-mRNA-LNP. Le differenze tra le diverse formulazioni possono quindi essere attribuite a differenze nella composizione lipidica, nell'assemblaggio delle particelle o nell'interazione con l'mRNA.

4.4. Efficienza di incapsulamento (EE%)

L'efficienza di incapsulamento (EE%) delle formulazioni ALC-LNP e DDA-LNP caricate con mRNA è stata determinata mediante il test Quant-iT™ RiboGreen™ RNA, un saggio fluorimetrico che legandosi alle molecole di RNA, genera un segnale proporzionale alla sua concentrazione. L'analisi è stata effettuata prima e dopo la lisi delle LNP, utilizzando una curva di calibrazione. In una prima fase è stato condotto uno studio di ottimizzazione per individuare il metodo di lisi più efficace in grado di garantire il completo rilascio dell'mRNA senza compromettere l'accuratezza del saggio. Per tale motivo sono stati saggiati diversi detergenti, Tween 20 e Triton X-100, a differenti concentrazioni, temperature e tempi di incubazione. Sono state individuate come condizioni preliminari più efficaci una temperatura di 37 °C e un tempo di incubazione di 15 minuti, su campioni non diluiti. Successivamente, per valutare in maniera sistematica l'influenza delle diverse variabili sul rilascio dell'mRNA, è stato applicato un approccio DOE (Bianchi, M. 2024), considerando come variabili il tipo di detergente, la sua concentrazione e la diluizione del campione (1:2 e 1:5), mantenendo invece costanti la temperatura (37 °C) e il tempo di incubazione (15 minuti) precedentemente indicati come ottimali. I valori medi di EE% ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali sono riassunti in Tabella 8.

Tabella 8. Confronto dell'EE% media e della relativa deviazione standard per ALC-mRNA-LNP e DDA-mRNA-LNP al variare dei detergenti, delle concentrazioni, dei tempi di incubazione, delle temperature e dei fattori di diluizione impiegati.

	Detergente	C (%v/v)	T (min)	T (°C)	Fattore di diluizione	ALC-mRNA-LNP EE%	DDA-mRNA-LNP EE%
A	Triton X-100	2	15	37	-	38,67 ± 0,07	-
B	Triton X-100	5	15	60	-	45,59 ± 0,01	-
C	Triton X-100	2	15	37	1:2	-	60,90 ± 0,01
D	Triton X-100	2	15	37	1:5	59,74 ± 0,01	81,12 ± 0,01
E	Tween 20	1	15	37	-	55,00 ± 0,04	29,22 ± 0,04
F	Tween 20	1	30	37	-	76,74 ± 0,02	44,00 ± 0,02
G	Tween 20	1	15	37	1:2	81,81 ± 0,03	52,94 ± 0,11
H	Tween 20	1	15	37	1:5	25,05 ± 0,24	74,36 ± 0,01

I risultati evidenziano una diversa risposta delle due formulazioni in base al tipo di detergenti utilizzato. Le ALC-mRNA-LNP hanno mostrato valori di EE% maggiori quando trattate con Tween 20, mentre per le DDA-mRNA-LNP i valori più elevati sono stati ottenuti utilizzando Triton X-100. Inoltre, per entrambe le formulazioni, la diluizione dei campioni ha favorito un rilascio dell'RNA superiore rispetto ai campioni non diluiti. Tali differenze possono essere correlate alla diversa carica dei lipidi, che può influenzare le interazioni con i detergenti e, di conseguenza, l'efficienza di lisi delle LNP. Il confronto dell'EE% tra le due formulazioni per i trattamenti applicati nello studio C-D-G-H è mostrata in Figura 49 e ha permesso di individuare per ciascuna formulazione la condizione sperimentali ottimali.

Per le ALC-mRNA-LNP, il valore massimo, pari all'82%, è stato ottenuto utilizzando il trattamento con Tween 20 all'1%, su campioni diluiti 1:2.

Per le DDA-mRNA-LNP, invece, il valore più elevato, pari all'81%, è stato ottenuto con il trattamento con Triton X-100 al 2%, utilizzando una diluizione dei campioni 1:5.

I valori di EE% ottenuti risultano quindi complessivamente elevati e comparabili tra le due formulazioni indicando che, nelle condizioni sperimentali adottate, la diversa natura del lipide non determina una differenza sostanziale nell'EE%. Tuttavia, al fine di ottimizzare ulteriormente l'EE%, potrebbero essere condotti studi futuri per valutare altre tipologie e concentrazioni del detergente, differenti fattori di diluizione del campione e diverse condizioni di incubazione.

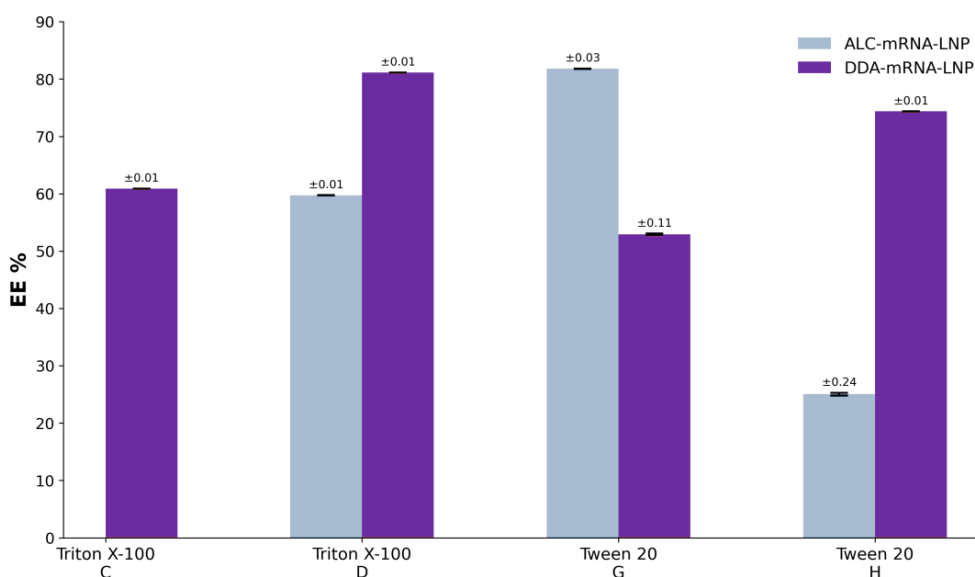


Figura 49. Confronto dell'EE% media e della rispettiva deviazione standard delle due formulazioni caricate con m-RNA in seguito ai diversi trattamenti eseguiti nel DoE.

C: Triton X-100 (2%), 15 min, 37 °C, dil. 1:2;

D: Triton X-100 (2%), 15 min, 37 °C, dil.1:5;

G: Tween20 (1%), 15 min, 37 °C, di. 1:2;

H:Tween20 (1%), 15 min, 37 °C, dil. 1:5

4.5. Proprietà superficiali delle nanoparticelle lipidiche, studio della protein corona

Le proprietà superficiali delle nanoparticelle lipidiche rappresentano un importante fattore che può influenzarne l'interazione con l'ambiente biologico e, di conseguenza, il comportamento *in vivo*. Per tale motivo per ciascuna formulazione è stato per prima cosa determinato il potenziale zeta. Questo parametro fornisce un'indicazione sulla carica superficiale delle particelle e, di conseguenza, sulla loro stabilità colloidale, in grado di ridurre i fenomeni di aggregazione, oltre che sulla loro capacità di interagire con le biomolecole presenti nel mezzo. La carica superficiale dipende dalla composizione delle LNP e dalle caratteristiche dei lipidi impiegati: in particolare, i lipidi cationici conferiscono generalmente una carica positiva, mentre i lipidi ionizzabili sono progettati per mostrare una carica prossima alla neutralità quando sono a pH fisiologico.

Una volta esposte ai fluidi biologici, le nanoparticelle interagiscono rapidamente con le biomolecole presenti nel mezzo, in particolare con le proteine, che possono adsorbirsi sulla loro superficie formando la cosiddetta protein corona. Questo rivestimento dinamico può influenzare in modo critico la stabilità, la biodistribuzione e le interazioni cellulari delle nanoparticelle, determinandone così il destino biologico e la resa farmacologica. La sua composizione dipende da diversi fattori, tra cui la dimensione delle nanoparticelle, la composizione lipidica, la carica superficiale e le condizioni di esposizione al mezzo biologico. La frazione più stabilmente associata alla superficie, definita hard corona, può essere isolata e caratterizzata per identificare le proteine adsorbite e approfondire le caratteristiche dell'interazione tra nanoparticelle e componenti proteiche. Per studiare la protein corona in questo lavoro di tesi è stato per prima cosa valutato il potenziale zeta delle formulazioni (Pederzoli, F. et al 2017; Gao Y. et al. 2024).

4.5.1. Potenziale zeta mediante DLS

Il valore del potenziale zeta è stato determinato per tre differenti condizioni: LNP scariche, LNP caricate con mRNA e LNP scariche dopo incubazione in terreno di coltura addizionato di siero fetale bovino (FBS, 10% v/v). Tali analisi hanno permesso di valutare l'influenza della diversa natura del lipide, del caricamento del materiale genetico e dell'esposizione a un ambiente contenente proteine sulla carica superficiale (Tabella 9).

Tabella 9. Potenziale zeta delle formulazioni ALC-LNP, ALC -mRNA-LNP, ALC-LNP dopo incubazione con terreno di coltura addizionato di siero fetale bovino, DDA-LNP, DDA-mRNA-LNP e DDA-LNP dopo incubazione con terreno di coltura addizionato di siero fetale bovino.

Formulazione	Potenziale Z (mV)
ALC-LNP	$3,53 \pm 0,39$
ALC-mRNA-LNP	$0,13 \pm 0,14$
ALC-LNP post corona	$-0,50 \pm 0,30$
DDA-LNP	$27,48 \pm 0,50$
DDA-mRNA-LNP	$14 \pm 2,22$
DDA-LNP post corona	$-1,33 \pm 0,21$

Per quanto riguarda la composizione del materiale lipidico i valori ottenuti risultano coerenti con le aspettative. Le formulazioni a base di ALC presentano infatti un potenziale zeta prossimo alla neutralità coerentemente con la natura ionizzabile dell'ALC a pH fisiologico; mentre le LNP a base di DDA, mostrano una marcata carica positiva, data la natura cationica del lipide. Questi risultati confermano l'influenza della composizione lipidica sulle proprietà superficiali delle nanoparticelle.

Il confronto tra le formulazioni contenenti e prive di mRNA evidenzia una riduzione del potenziale zeta nelle LNP a base di DDA caricate. Tale variazione potrebbe essere attribuita all'interazione tra il lipide cationico e l'mRNA, caratterizzato da carica negativa, con conseguente parziale schermatura della carica superficiale. Nelle formulazioni a base di ALC, invece, il potenziale zeta si mantiene sostanzialmente prossimo alla neutralità anche in presenza del materiale genetico (Figura 50, A e B).

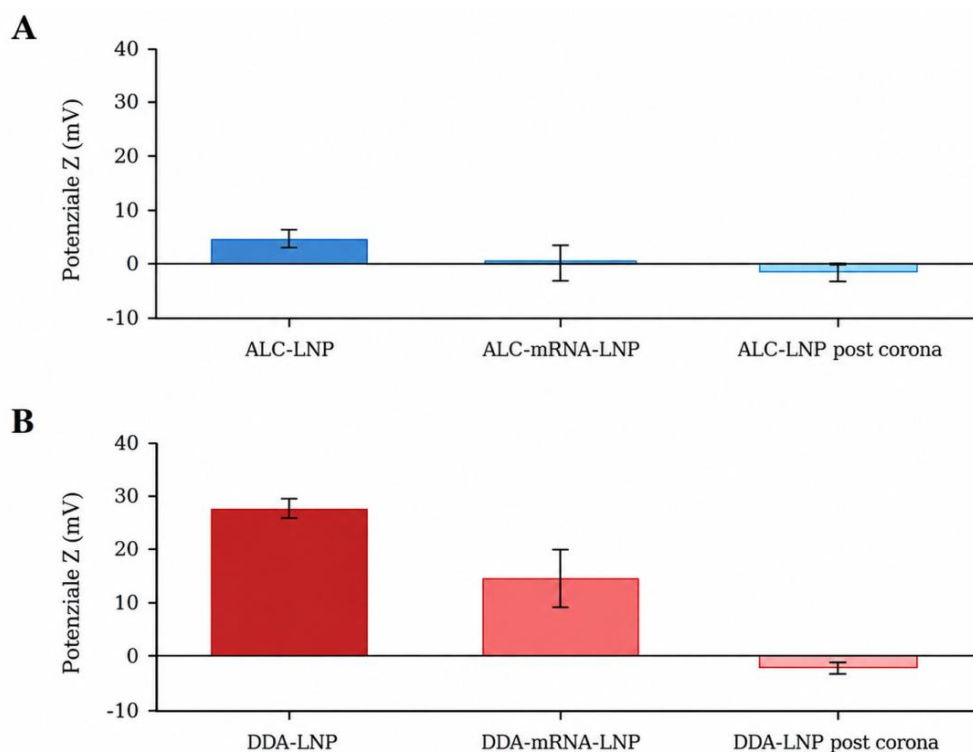


Figura 50 A e B. Rappresentazione grafica dei valori di potenziale zeta per ogni formulazione presa in esame.

Nel caso invece delle LNP non caricate, dopo incubazione con il terreno di coltura contenente FBS, si evidenzia per entrambe le formulazioni una variazione del potenziale zeta verso valori prossimi alla neutralità o leggermente negativi. Ovviamente, tale effetto è più marcato per le DDA-LNP, data la maggior carica superficiale positiva iniziale dovuta alla

presenza del lipide cationico, mentre la variazione è più limitata nelle LNP a base di ALC in accordo con il potenziale zeta iniziale già prossimo alla neutralità. La variazione della carica superficiale osservata dopo incubazione può essere ricondotta all'adsorbimento di proteine sulla superficie delle LNP, con conseguente modificazione e parziale schermatura della carica originaria. Tale comportamento è compatibile con la formazione della protein corona, che determina una modificazione dell'interfaccia tra nanoparticella e ambiente biologico.

Nel complesso, i risultati evidenziano come la natura del lipide determini le caratteristiche di carica superficiale delle LNP e come l'esposizione a un ambiente contenente proteine possa modificarle. In conclusione, il confronto dei valori di carica superficiale delle formulazioni non caricate con materiale genetico prima e dopo incubazione fornisce un'indicazione dell'interazione tra le nanoparticelle e le proteine presenti nel mezzo, a conferma della formazione della protein corona.

4.5.2. TRPS

Per meglio caratterizzare la formazione della protein corona, le formulazioni sono state analizzate anche mediante TRPS. In particolare, questa tecnica è stata utilizzata per valutare una possibile influenza sulla distribuzione dimensionale delle LNPs prima e dopo incubazione con plasma umano (a 37°C per un'ora). Successivamente la medesima tecnica è stata utilizzata anche per valutare una possibile influenza di diverse procedure per il trattamento dei campioni sulle nanoparticelle, quali centrifugazione e filtrazione, in previsione di una loro successiva caratterizzazione qualitativa e quantitativa. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 51 separatamente per le formulazioni a base di ALC (A) e DDA (B). Per entrambe le formulazioni sono evidenti cambiamenti nelle distribuzioni dimensionali a seguito dell'incubazione in plasma a conferma della formazione della protein

corona. Per quanto riguarda le LNP a base di ALC (Figura 51, A) si osserva un evidente spostamento della distribuzione dimensionale verso diametri maggiori, da circa 80–100 nm a circa 140–160 nm. La popolazione post-corona presenta inoltre una distribuzione più ampia e una coda verso diametri maggiori, indicando un incremento delle dimensioni particellari e dell'eterogeneità del campione.

Nel caso delle DDA-LNP (Figura 51, B), già prima dell'incubazione le particelle mostrano una distribuzione spostata verso diametri maggiori rispetto alle ALC-LNP. La formazione della protein corona determina un ulteriore spostamento della distribuzione verso dimensioni maggiori, accompagnato da un marcato ampliamento della distribuzione e da una lunga coda verso diametri elevati. L'effetto della corona sulle DDA-LNP sembra quindi tradursi non soltanto in un incremento delle dimensioni particellari, ma soprattutto in una maggiore eterogeneità della popolazione. Nel complesso, l'effetto della formazione della protein corona sulla distribuzione dimensionale appare più marcato per le DDA-LNP, che mostrano una maggiore dispersione delle dimensioni particellari rispetto alle ALC-LNP.

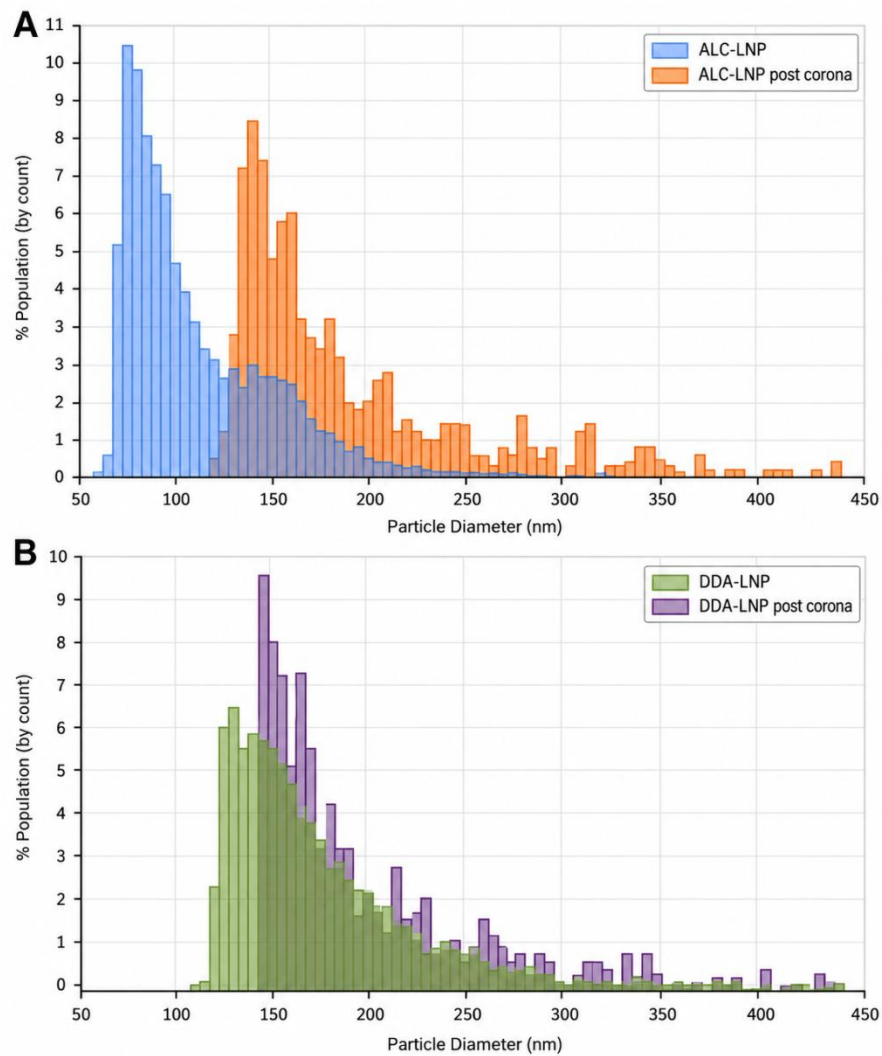


Figura 51. Distribuzioni dimensionali medie di (A) ALC-LNP e (B) DDA-LNP prima e dopo incubazione con plasma umano.

In Figura 52 sono invece confrontate le curve di distribuzione dimensionale delle formulazioni dopo incubazione con plasma prima e dopo trattamento con centrifugazione 15 000 RPM per 45 min.

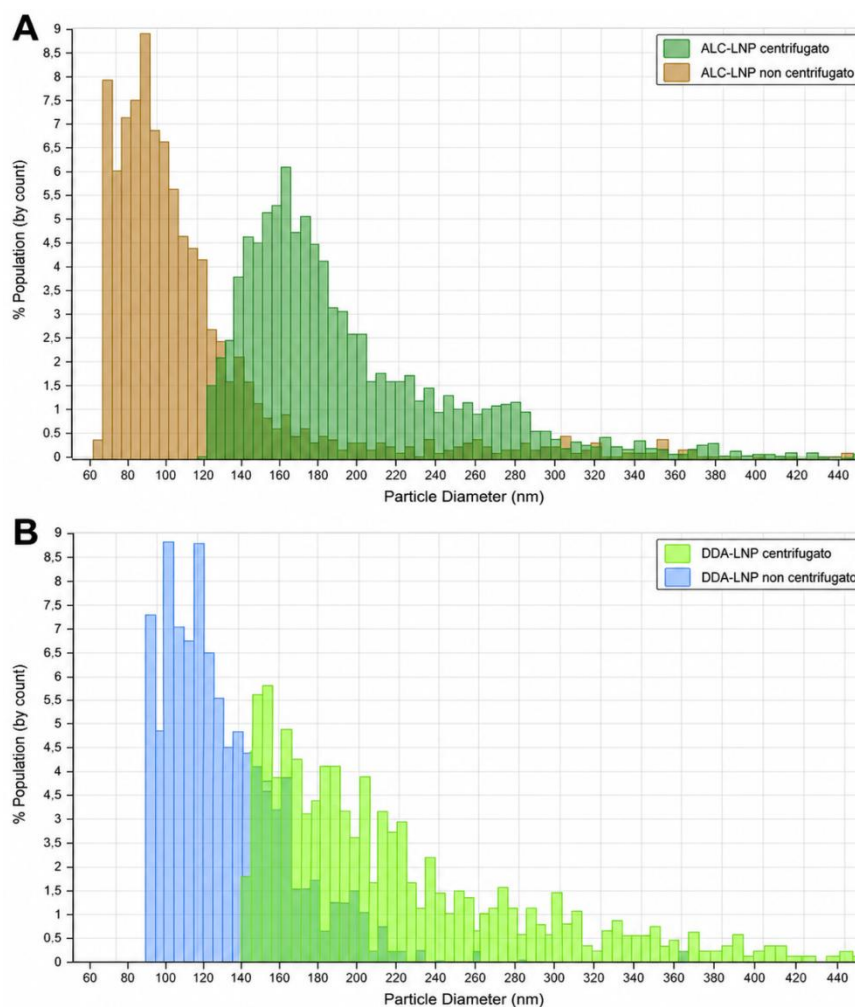


Figura 52. Distribuzioni dimensionali medie di (A) ALC-LNP e (B) DDA-LNP prima e dopo centrifugazione.

Dai risultati ottenuti si può osservare come sia per le formulazioni a base di ALC (Figura 52, A) sia per quelle a base di DDA (Figura 52, B), i campioni non sottoposti a centrifugazione presentano popolazioni particellari caratterizzate da dimensioni inferiori e da una distribuzione più ristretta e omogenea. Al contrario, nei campioni centrifugati si osserva un incremento del diametro medio e un allargamento della distribuzione dimensionale. Tale comportamento suggerisce che la centrifugazione possa favorire il recupero o la concentrazione di popolazioni di LNP di dimensioni maggiori,

inclusi eventuali aggregati. La formazione della protein corona potrebbe infatti favorire interazioni tra le particelle, contribuendo alla formazione di associazioni particellari. Al contrario, i campioni non centrifugati mantengono una popolazione più omogenea e prevalentemente monodispersa a dimensioni inferiori. Nel complesso, i risultati suggeriscono che la centrifugazione possa influenzare la distribuzione dimensionale, promuovendo la presenza di popolazioni particellari più grandi ed eterogenee, indipendentemente dalla natura ionizzabile o cationica del lipide impiegato.

La Figura 53 mostra le distribuzioni granulometriche dei campioni prima e dopo filtrazione su membrana in PES da 0,45 μm . Tale processo permette di ottenere un campione più omogeneo grazie alla rimozione degli aggregati di maggiori dimensioni. Il processo di filtrazione non ha pertanto alterato in modo significativo la distribuzione dimensionale complessiva (curve praticamente sovrapponibili), indipendente dalla composizione lipidica delle LNP.

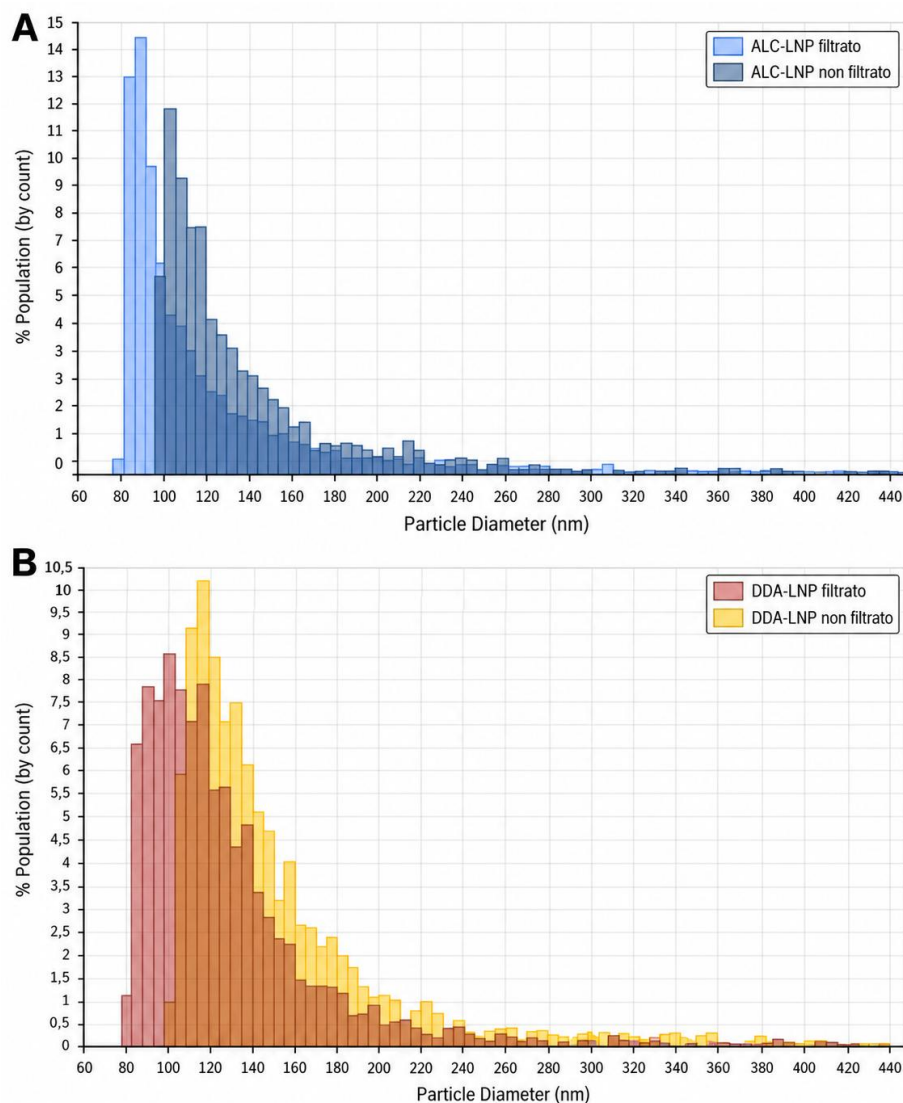


Figura 53. Distribuzioni dimensionali medie di (A) ALC-LNP e (B) DDA-LNP prima e dopo filtrazione.

4.5.3. Studio delle interazioni di legame tramite Microcalorimetria ITC

L'ultima parte del lavoro di tesi ha riguardato una caratterizzazione preliminare dal un punto di vista termodinamico delle interazioni tra le LNP e le proteine sieriche, mediante tecnica ITC. Questa tecnica consente di determinare direttamente parametri quali la costante di associazione o

dissociazione (K_a o K_d), la stechiometria del legame (N), la variazione di entalpia (ΔH), l'energia libera di Gibbs (ΔG) e il contributo entropico ($-T\Delta S$). Come proteine modello sono state utilizzate sia l'albumina sierica bovina (BSA) che successivamente l'albumina sierica umana (HSA), in quanto presenti in elevata concentrazione nei fluidi biologici e quindi attivamente coinvolte nella formazione della protein corona (Fleischer C. C. et al. 2014; Colombi C. et al. 2024). Le analisi ITC hanno richiesto una preliminare ottimizzazione della procedura sperimentale in modo da garantire la riproducibilità del segnale calorimetrico registrato.

Per prima cosa è stato necessario aggiustare il pH delle LNP (pH $\sim 4,7$) per renderlo equiparabile a quello delle soluzioni proteiche in PBS (pH $\sim 7,3$), mediante aggiunte di NaOH 0,2 N, che hanno portato all'ottenimento di una concentrazione finale di LNP di circa 0,2 mg/mL. Prima di ciascuna analisi è stata eseguita un'adeguata procedura di pulizia della cella calorimetrica e per ogni concentrazione proteica testata sono stati eseguiti dei bianchi, titolando la proteina nel solo tampone PBS, al fine di sottrarre il calore di diluizione dal segnale complessivo.

Il protocollo sperimentale prevede, per ciascuna analisi, 19 iniezioni sequenziali della soluzione proteica, contenuta nella siringa, all'interno della cella calorimetrica contenente le LNP. La prima iniezione, successivamente esclusa dall'analisi dal sistema, ha un volume di 0,4 μL , mentre le 18 iniezioni successive hanno un volume di 2 μL ciascuna e vengono effettuate a intervalli di 150 secondi.

Le prime prove effettuate con BSA non hanno rilevato un segnale calorimetrico sufficientemente definito e riproducibile da consentire una determinazione affidabile dei parametri di interazione. Tale risultato non esclude un'interazione tra BSA e LNP, ma suggerisce che la variazione di entalpia associata al processo sia troppo limitata o sovrapponibile al rumore di fondo.

Sulla base di tali risultati, lo studio è proseguito sostituendo la BSA con HSA e mantenendo la stessa configurazione sperimentale. I termogrammi

così ottenuti sono stati elaborati mediante il modello di fitting One Set of Sites, permettendo di ricavare i parametri termodinamici e stechiometrici dell'interazione. Le analisi condotte con HSA alla concentrazione di 2 mg/mL e ALC-LNP alla concentrazione di 0,164 mg/mL (Figura 54), hanno mostrato un termogramma caratterizzato da picchi prevalentemente endotermici, un segnale calorimetrico di bassa intensità e un elevato rumore di fondo, e pertanto privo del caratteristico andamento sigmoidale, indicativo della progressiva saturazione dei siti di legame. Pertanto, anche il successivo fitting dei dati non ha permesso di ottenere parametri termodinamici affidabili, non consentendo una valutazione dell'affinità tra HSA e LNP nelle condizioni sperimentali considerate. Il risultato suggerisce che, alla concentrazione di HSA e LNP testate, il calore di interazione risulta inferiore al limite di sensibilità dello strumento da non poter essere caratterizzato mediante ITC.

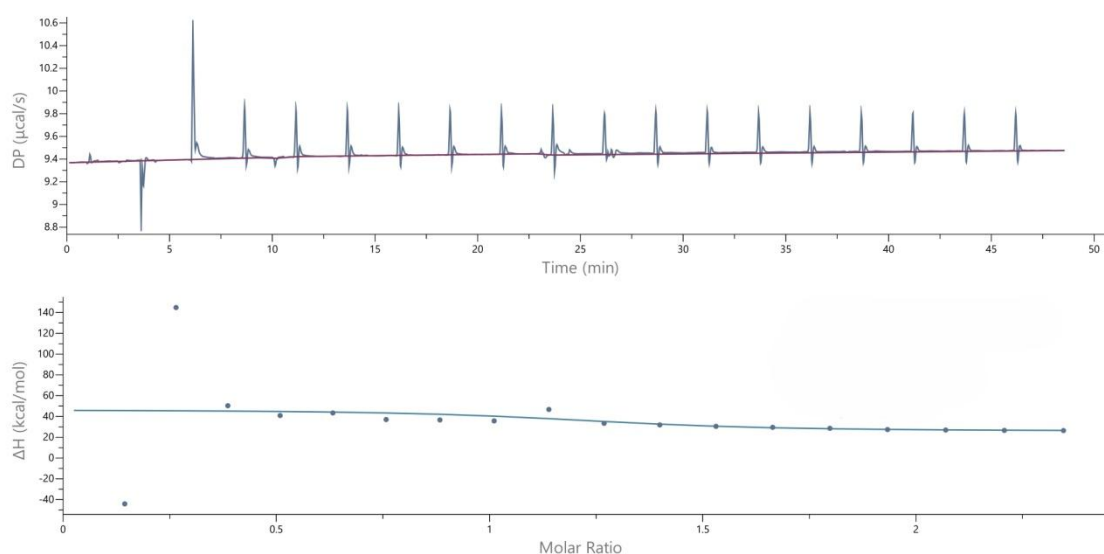


Figura 54. Analisi ITC di ALC-LNP (0.164 mg/mL) titolate con HSA (2 mg/mL).

Si è quindi proseguito lo studio riducendo la concentrazione di ALC-LNP a 0,157 mg/mL e mantenendo fissa la concentrazione di HSA. Il termogramma

ottenuto e riportato in Figura 55 ha mostrato picchi di tipo esotermico nettamente meglio definiti. L'integrazione del calore libero sviluppato per ogni singola iniezione evidenzia l'inizio di un profilo sigmoidale, sebbene la variazione entalpica complessiva sia ancora modesta e con un'elevata dispersione dei dati sperimentali. Nonostante l'elaborazione dei dati mediante fitting abbia fornito valori apparenti di K_d e N accettabili (Tabella 10), l'elevato margine di errore associato alla costante di dissociazione indica la necessità di ottimizzare la curvatura dell'isoterma. Tali risultati suggeriscono una modifica delle condizioni operative atta ad incrementare le concentrazioni dei reagenti in cella e in siringa per ottimizzare il parametro “c” di Wiseman e ottenere così un'isoterma di titolazione completa e analiticamente affidabile.

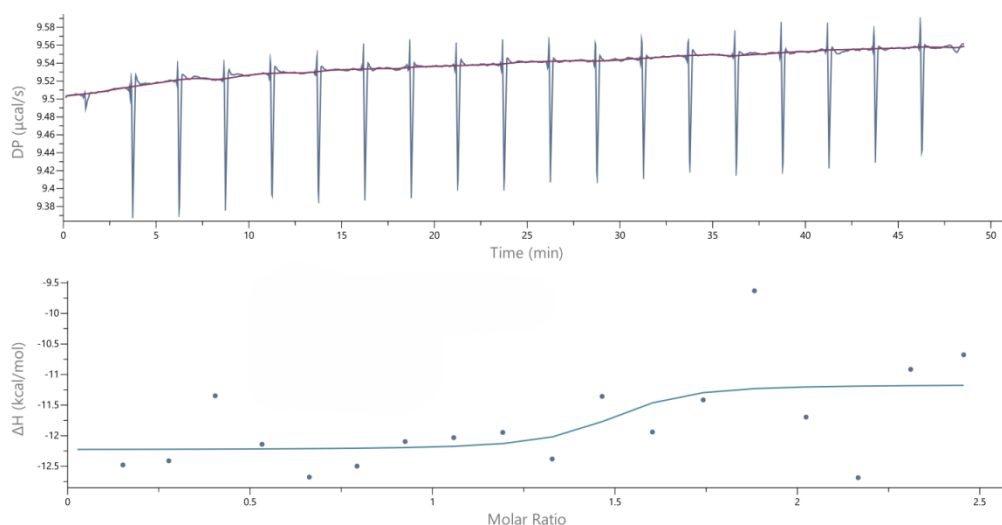


Figura 55. Analisi ITC di ALC-LNP (0.157 mg/mL) titolate con HSA (2 mg/mL).

Tabella 10. Valori delle costanti di dissociazione (K_d) e dei parametri termodinamici delle interazioni tra ALC-LNP e HSA 2 mg/mL.

ALC-LNP (mg/mL)	HSA (mg/mL)	K_d (M)	N (sites)	ΔH (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	-T ΔS (Kcal/mol)
0,164	2	$109 \text{ e}^{-9} \pm 1,34 \text{ e}^{-6}$	$1,21 \pm 1,41$	$20,8 \pm 49,2$	-9,5	-30,3
0,157	2	$16,1 \text{ e}^{-9} \pm 78,3 \text{ e}^{-9}$	$1,44 \pm 0,264$	$-1,06 \pm 0,541$	-10,6	-9,57

Il conseguente aumento sia della concentrazione di HSA (7 mg/mL) che di LNP (0,361 mg/mL) ha determinato un netto miglioramento della qualità del segnale calorimetrico (Figura 56). Il termogramma mostra picchi esotermici ben definiti e riproducibili, associati a un'ampia variazione entalpica, che ha permesso di ottenere un profilo sigmoidale di saturazione. L'elaborazione dei dati mediante fitting ha consentito una determinazione della costante K_d , del valore di N e dei parametri termodinamici riportati in Tabella 11. L'interazione risulta entalpicamente guidata, come indicato dal valore negativo di ΔH ($\Delta H = -13,3$ kcal/mol), che evidenzia la natura esotermica del processo, a fronte di un contributo entropico sfavorevole, comportamento tipico di interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno specifici.

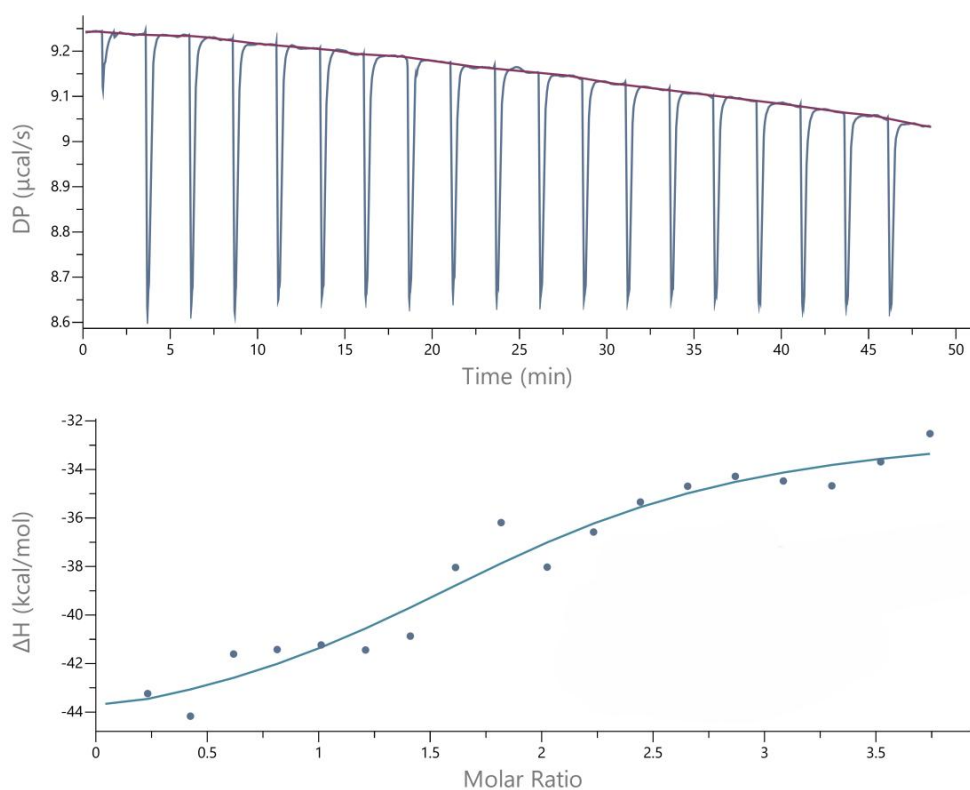


Figura 56. Analisi ITC di ALC-LNP (0.361 mg/mL) titolate con HSA (7 mg/mL).

La titolazione, infine, della formulazione ALC-LNP (0,242 mg/mL) in presenza della più elevata concentrazione di HSA testata (7 mg/mL) ha fornito il profilo calorimetrico qualitativamente e quantitativamente migliore (Figura 57).

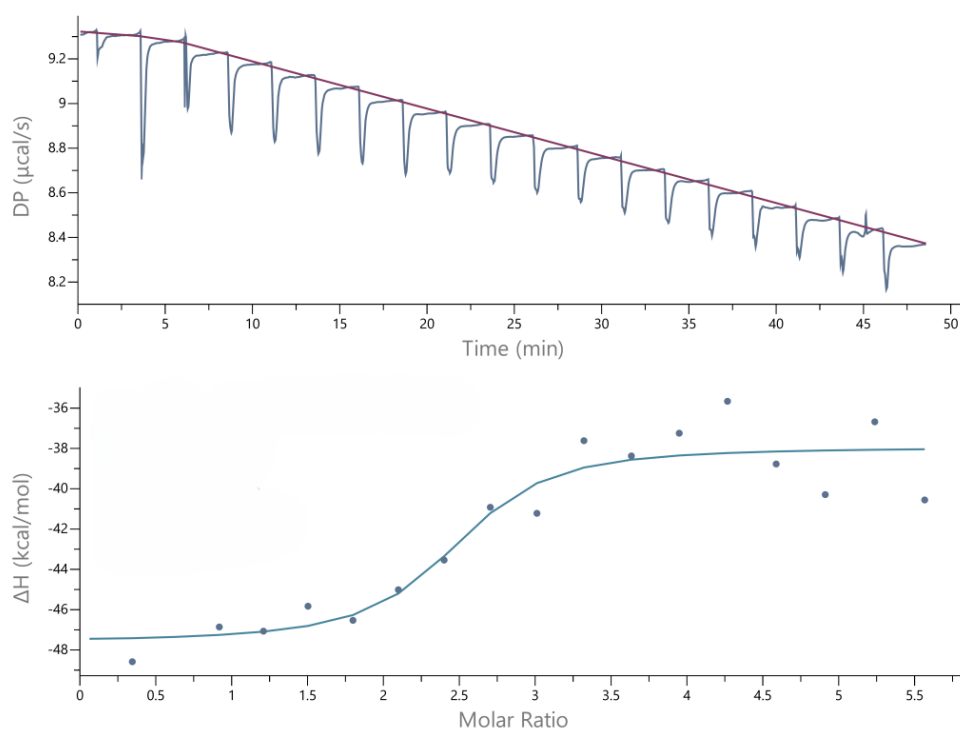


Figura 57. Analisi ITC di ALC-LNP (0.242 mg/mL) titolate con HSA (7 mg/mL).

L'isoterma di legame mostra un andamento sigmoidale con un punto di flesso ben definito, compatibile con un processo di associazione saturabile. Il valore di K_d , colloca l'interazione nell'ordine di affinità nanomolare, con una variazione entalpica verso le esoterme e una variazione di energia libera estremamente favorevole. A differenza dell'analisi precedente, il contributo entropico risulta lievemente sfavorevole (Tabella 11).

Tabella 11. Valori delle costanti di dissociazione (K_d) e dei parametri termodinamici delle interazioni tra ALC-LNP e HSA 7 mg/mL.

ALC-LNP (mg/mL)	HSA (mg/mL)	K_d (M)	N (sites)	ΔH (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	$-T\Delta S$ (Kcal/mol)
0,361	7	$1,56 \text{ e}^{-6} \pm 1,22 \text{ e}^{-6}$	$1,84 \pm 0,234$	$-13,3 \pm 3,35$	-7,92	5,41
0,242	7	$145 \text{ e}^{-9} \pm 155 \text{ e}^{-9}$	$2,37 \pm 0,163$	$-9,67 \pm 1,40$	-9,33	0,334

In conclusione, le analisi preliminari con la tecnica ITC hanno evidenziato un progressivo miglioramento della qualità del segnale calorimetrico e del rapporto segnale/rumore al variare delle condizioni sperimentali, in particolare in seguito all'aumento della concentrazione di HSA e delle LNP. L'impiego delle concentrazioni più elevate ha permesso di ottenere isoterme definite con profili di saturazione completi, consentendo una prima caratterizzazione termodinamica dell'interazione tra LNP e la protein corona. I risultati ottenuti suggeriscono la presenza di un'interazione di legame guidata da un contributo entalpico favorevole. Ovviamente saranno necessarie ulteriori repliche sperimentali analizzando anche le LNP a base del lipide cationico per confermare la riproducibilità dei dati e ottimizzare il protocollo sperimentale della titolazione ITC.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha approfondito lo sviluppo e la caratterizzazione fisico-chimica di nanoparticelle lipidiche (LNP) come sistemi di veicolazione di acidi nucleici, ponendo particolare attenzione alla relazione tra composizione lipidica, caricamento con materiale genetico, carica superficiale e formazione della protein corona. Sono state confrontate quattro formulazioni, ottenute combinando un lipide ionizzabile, ALC-0315, e un lipide cationico, DDA, in presenza o assenza di mRNA: ALC-LNP, ALC-mRNA-LNP, DDA-LNP e DDA-mRNA-LNP. La produzione mediante tecnologia microfluidica ha consentito di ottenere nanoparticelle riproducibili con caratteristiche dimensionali complessivamente adeguate. La caratterizzazione dimensionale mediante PCS e TRPS ha confermato la formazione di popolazioni particellari monodisperse con dimensioni medie comprese prevalentemente nell'intervallo nanometrico ($<200\text{nm}$), considerato per applicazioni di drug delivery. In particolare, le analisi PCS hanno evidenziato diametri compresi tra 180 e 230 nm con valori di PDI <0.25 , mentre l'analisi TRPS ha mostrato diametri medi compresi tra 148 e 180 nm. Per entrambi i lotti, l'incorporazione successiva dell'mRNA non ha alterato in modo significativo la dimensione media e l'omogeneità delle LNP. Tuttavia, le formulazioni a base di ALC hanno mostrato una distribuzione dimensionale più stretta e monodispersa rispetto a quelle formulate con DDA. L'inclusione del colesterolo fluorescente 25-NBD ha permesso di definire quantitativamente il contenuto lipidico delle formulazioni. I risultati hanno evidenziato differenze nella risposta fluorescente tra le diverse formulazioni, sottolineando l'influenza dell'ambiente lipidico sulla quantificazione del contenuto lipidico. La valutazione dell'efficienza del caricamento con mRNA, condotta mediante saggio fluorimetrico RiboGreen, previa ottimizzazione dei metodi di lisi, ha consentito di ottenere valori

elevati prossimi all'80% per entrambe le formulazioni contenenti mRNA. Tali risultati indicano che le condizioni di formulazione adottate hanno consentito un efficace caricamento dell'acido nucleico senza determinare variazioni sostanziali delle principali caratteristiche dimensionali delle nanoparticelle. Un'ulteriore differenza tra le formulazioni è emersa dall'analisi delle proprietà superficiali tramite potenziale zeta. Le ALC-LNP hanno mostrato valori prossimi alla neutralità, coerentemente con la natura del lipide ionizzabile, mentre le DDA-LNP hanno evidenziato una maggiore carica positiva, in accordo con la natura cationica del lipide DDA. La presenza dell'mRNA ha determinato una riduzione della carica superficiale, particolarmente evidente nelle formulazioni contenenti DDA, compatibile con l'avvenuta interazione tra il lipide cationico DDA e le cariche negative dell'mRNA. Da ultimo è stata valutata l'interazione delle LNP con un ambiente biologico che ha confermato la formazione della protein corona. In seguito all'incubazione in terreno addizionato con FBS al 10%, entrambe le tipologie di LNP hanno mostrato uno spostamento del potenziale zeta verso valori prossimi alla neutralità o leggermente negativi, a causa dell'adsorbimento delle proteine plasmatiche. Analogamente, le analisi TRPS condotte dopo incubazione con plasma umano hanno registrato uno spostamento delle dimensioni particellari verso diametri maggiori e un allargamento della distribuzione dimensionale. Inoltre, il confronto mediante TRPS tra campioni sottoposti o meno a centrifugazione ha dimostrato che la centrifugazione altera la distribuzione dimensionale originaria favorendo l'aggregazione o la selezione di popolazioni a maggiore diametro, mentre la filtrazione su membrane in PES da 0.45 μm ha preservato l'integrità del profilo dimensionale, risultando una tecnica migliore per il recupero del pellet per una sua successiva caratterizzazione quanti e qualitativa. A completamento dello studio della protein corona, la microcalorimetria a titolazione isoterma (ITC) è stata utilizzata come approccio preliminare per approfondire l'interazione tra le LNP e l'albumina sierica. Le prime analisi con BSA e, successivamente, con HSA hanno

evidenziato come la qualità del segnale calorimetrico dipenda fortemente dalle condizioni sperimentali adottate. L'ottimizzazione delle condizioni sperimentali, in particolare il controllo del pH (mismatch <0.05) e l'incremento delle concentrazioni della proteina (fino a 7 mg/mL) e delle LNP (fino a 0.361 mg/mL), ha consentito di registrare termogrammi con andamento sigmoidale completo. L'elaborazione dei dati mediante un modello di fitting a singolo sito di legame ha fornito una prima stima quantitativa dei parametri di legame tra ALC-LNP e HSA, evidenziando un'affinità nell'ordine nanomolare e un processo di interazione termodinamicamente favorito. I risultati ottenuti mediante ITC devono tuttavia essere considerati preliminari, poiché la variabilità osservata tra le diverse analisi e l'incertezza associata ad alcuni parametri rendono necessaria un'ulteriore ottimizzazione delle condizioni sperimentali e una verifica della riproducibilità. In conclusione, i dati raccolti ottenuti in questo elaborato di tesi forniscono una caratterizzazione fisico-chimica integrata delle LNP, che correla la loro composizione lipidica con le loro proprietà superficiali e la reattività nei confronti delle proteine plasmatiche. Tali risultati rappresentano una base fondamentale per un'ulteriore ottimizzazione dei nanocarrier, volta alla progettazione futura di vettori lipidici destinati al delivery di acidi nucleici, caratterizzati da una maggiore efficienza terapeutica, una biodistribuzione controllata e un miglior profilo di sicurezza.

6. BIBLIOGRAFIA

Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>

Afzal, O., Altamimi, A. S. A., Nadeem, M. S., Alzarea, S. I., Almalki, W. H., Tariq, A., Mubeen, B., Murtaza, B. N., Iftikhar, S., Riaz, N., & Kazmi, I. (2022). Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. In *Nanomaterials* (Vol. 12, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nano12244494>

Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issue 6, pp. 428–437). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>

Archer, W. R., & Schulz, M. D. (2020). Isothermal titration calorimetry: practical approaches and current applications in soft matter. In *Soft Matter* (Vol. 16, Issue 38, pp. 8760–8774). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0sm01345e>

Bailey-Hytholt, C. M., Ghosh, P., Dugas, J., Zarraga, I. E., & Bandekar, A. (2021). Formulating and characterizing lipid nanoparticles for gene delivery using a microfluidic mixing platform. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(168). <https://doi.org/10.3791/62226>

Bastos, M., & Velazquez-Campoy, A. (2021). Isothermal titration calorimetry (ITC): a standard operating procedure (SOP). *European*

Biophysics Journal, 50(3–4), 363–371. <https://doi.org/10.1007/s00249-021-01509-5>

Bezelya, A., Küçüktürkmen, B., & Bozkır, A. (2023). Microfluidic Devices for Precision Nanoparticle Production. In *Micro* (Vol. 3, Issue 4, pp. 822–866). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/micro3040058>

Bianchi, M. (2024). Microfluidic production of lipid nanoparticles loaded with a model mRNA and preliminary in vitro characterization. Tesi di laurea magistrale in Medical and Pharmaceutical Biotechnologies; Univeristà di Pavia.

Bouchemal, K. (2008). New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. In *Drug Discovery Today* (Vol. 13, Issues 21–22, pp. 960–972). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.004>

Catenacci, L., Rossi, R., Sechi, F., Buonocore, D., Sorrenti, M., Perteghella, S., Peviani, M., & Bonferoni, M. C. (2024). Effect of Lipid Nanoparticle Physico-Chemical Properties and Composition on Their Interaction with the Immune System. In *Pharmaceutics* (Vol. 16, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16121521>

Cheng, Z., Fobian, S. F., Gurrieri, E., Amin, M., D'Agostino, V. G., Falahati, M., Zalba, S., Debets, R., Garrido, M. J., Saeed, M., Seynhave, A. L. B., Balcioglu, H. E., & ten Hagen, T. L. M. (2024). Lipid-based nanosystems: the next generation of cancer immune therapy. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01574-1>

Ciani, L., Casini, A., Gabbiani, C., Ristori, S., Messori, L., & Martini, G. (2007). DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery studied by circular dichroism and other biophysical techniques. *Biophysical Chemistry*, 127(3), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.02.003>

Colombi, C., Dacarro, G., Diaz Fernandez, Y. A., Taglietti, A., Pallavicini, P., & Doveri, L. (2024a). Human Serum Albumin Protein Corona in Prussian Blue Nanoparticles. *Nanomaterials*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/nano14161336>

Colombi, C., Dacarro, G., Diaz Fernandez, Y. A., Taglietti, A., Pallavicini, P., & Doveri, L. (2024b). Human Serum Albumin Protein Corona in Prussian Blue Nanoparticles. *Nanomaterials*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/nano14161336>

Cullis, P. R., & Hope, M. J. (2017). Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. In *Molecular Therapy* (Vol. 25, Issue 7, pp. 1467–1475). American Society of Gene and Cell Therapy. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>

Dal Pan, G. (2022). Parametri di processo per la produzione di Lipid Nanoparticles in microfluidica. Tesi di laurea magistrale in Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, presso l'università di Pavia.

Dobrovolskaia, M. A., Shurin, M., & Shvedova, A. A. (2016). Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.022>

Duff, M. R., Grubbs, J., & Howell, E. E. (2011). Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity. *Journal of Visualized Experiments*, (55). <https://doi.org/10.3791/2796>

Evers, M. J. W., Kulkarni, J. A., van der Meel, R., Cullis, P. R., Vader, P., & Schiffelers, R. M. (2018). State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. In *Small Methods* (Vol. 2, Issue 9). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/SMTD.201700375>

Eygeris, Y., Gupta, M., Kim, J., & Sahay, G. (2022). Chemistry of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery. *Accounts of Chemical Research*, 55(1), 2–12. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00544>

Ezike, T. C., Okpala, U. S., Onoja, U. L., Nwike, C. P., Ezeako, E. C., Okpara, O. J., Okoroafor, C. C., Eze, S. C., Kalu, O. L., Odoh, E. C., Nwadike, U. G., Ogbodo, J. O., Umeh, B. U., Ossai, E. C., & Nwanguma, B. C. (2023). Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. In *Heliyon* (Vol. 9, Issue 6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488>

Fleischer, C. C., & Payne, C. K. (2014). Nanoparticle-cell interactions: Molecular structure of the protein corona and cellular outcomes. *Accounts of Chemical Research*, 47(8), 2651–2659. <https://doi.org/10.1021/ar500190q>

Francia, V., Schiffelers, R. M., Cullis, P. R., & Witzigmann, D. (2020). The Biomolecular Corona of Lipid Nanoparticles for Gene Therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 31(9), 2046–2059. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00366>

Gal, N., Schroffenegger, M., & Reimhult, E. (2018). Stealth Nanoparticles Grafted with Dense Polymer Brushes Display Adsorption of Serum Protein Investigated by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(22), 5820–5834. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b02338>

Gao, Y., Huang, Y., Ren, C., Chou, P., Wu, C., Pan, X., Quan, G., & Huang, Z. (2024). Looking back, moving forward: protein corona of lipid nanoparticles. In *Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 12, Issue 23, pp. 5573–5588). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d4tb00186a>

Geng, C., Zhou, K., Yan, Y., Li, C., Ni, B., Liu, J., Wang, Y., Zhang, X., Wang, D., Lv, L., Zhou, Y., Feng, A., Wang, Y., & Li, C. (2023). A preparation method for mRNA-LNPs with improved properties. *Journal of Controlled Release*, 364, 632–643. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.11.017>

Greco, A., & Corbo, C. (2025). Therapeutic Implications of Biomolecular Corona on Lipid Nanoparticle-Based Gene Delivery Systems. *Small Science*, 5(9). <https://doi.org/10.1002/ssmsc.202500206>

Grodzicka, M., Michlewska, S., Buczkowski, A., Sekowski, S., Pena-Gonzalez, C. E., Ortega, P., de la Mata, F. J., Blasiak, J., Bryszewska, M., & Ionov, M. (2024). A new class of polyphenolic carbosilane dendrimers binds human serum albumin in a structure-dependent fashion. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56509-0>

Guo, W., Tang, L., Zhou, B., & Fung, Y. (2021). Fundamental studies of rapidly fabricated on-chip passive micromixer for modular microfluidics. *Micromachines*, 12(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/mi12020153>

Hald Albertsen, C., Kulkarni, J. A., Witzigmann, D., Lind, M., Petersson, K., & Simonsen, J. B. (2022). The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 188). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>

Hipólito-Nájera, A. R., del Rosario Moya-Hernández, M., Rojas-Hernández, A., & Gómez-Balderas, R. (2019). Interaction of indomethacin–cyclodextrins in water by UV–Vis and ITC. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 95(1–2), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00915-9>

Hou, X., Zaks, T., Langer, R., & Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 6, Issue 12, pp. 1078–1094). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>

Hourdel, L., Lebaz, N., Peral, F., Ripoll, M., Briançon, S., Bensaid, F., Luthra, S., & Cogné, C. (2025). Overview on LNP-mRNA encapsulation unit operation: Mixing technologies, scalability, and influence of formulation & process parameters on physico-chemical characteristics. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 672). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125297>

Huang, R., & Lau, B. L. T. (2016). Biomolecule-nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(5), 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.027>

Huang, X., Ma, Y., Ma, G., & Xia, Y. (2024a). Unlocking the Therapeutic Applicability of LNP-mRNA: Chemistry, Formulation, and Clinical Strategies. *Research*, 7. <https://doi.org/10.34133/research.0370>

Huang, X., Ma, Y., Ma, G., & Xia, Y. (2024b). Unlocking the Therapeutic Applicability of LNP-mRNA: Chemistry, Formulation, and Clinical Strategies. *Research*, 7. <https://doi.org/10.34133/research.0370>

Jeong, M., Lee, Y., Park, J., Jung, H., & Lee, H. (2023). Lipid nanoparticles (LNPs) for in vivo RNA delivery and their breakthrough technology for future applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 200). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114990>

Kumari, N. U., Chigurupati, S. P. D., Rajana, N., Vasave, R., Bahadure, S., & Mehra, N. K. (2026). Pre-programming the protein corona: From avoidance to endogenous targeting. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 389). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.114447>

Lima Cavalcanti, I. D., Xavier Junior, F. H., Santos Magalhães, N. S., & Lira Nogueira, M. C. de B. (2023). Isothermal titration calorimetry (ITC) as a promising tool in pharmaceutical nanotechnology. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 641). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123063>

Lopes, C., Cristóvão, J., Silvério, V., Lino, P. R., & Fonte, P. (2022). Microfluidic production of mRNA-loaded lipid nanoparticles for vaccine applications. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 19, Issue 10, pp. 1381–1395). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2022.2135502>

Lüdtke, F. L., Silva, T. J., da Silva, M. G., Hashimoto, J. C., & Ribeiro, A. P. B. (2025). Lipid Nanoparticles: Formulation, Production Methods and Characterization Protocols. In *Foods* (Vol. 14, Issue 6). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods14060973>

Ma, Y., Li, S., Lin, X., & Chen, Y. (2024). A perspective of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Exploration*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/EXP.20230147>

Maeki, M., Uno, S., Niwa, A., Okada, Y., & Tokeshi, M. (2022). Microfluidic technologies and devices for lipid nanoparticle-based RNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 344, 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.017>

Markova, N., Cairns, S., Jankevics-Jones, H., Kaszuba, M., Caputo, F., & Parot, J. (2022). Biophysical Characterization of Viral and Lipid-Based Vectors for Vaccines and Therapeutics with Light Scattering and Calorimetric Techniques. *Vaccines*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/vaccines10010049>

Maxfield, F. R., & Wüstner, D. (2012). Analysis of Cholesterol Trafficking with Fluorescent Probes. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 108, pp. 367–393). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386487-1.00017-1>

Miao, Y., Li, L., Wang, Y., Wang, J., Zhou, Y., Guo, L., Zhao, Y., Nie, D., Zhang, Y., Zhang, X., & Gan, Y. (2024). Regulating protein corona on nanovesicles by glycosylated polyhydroxy polymer modification for efficient drug delivery. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45254-7>

Migliore, R., Zavalishin, M. N., Gamov, G. A., Usacheva, T. R., Sharnin, V. A., Grasso, G. I., & Sgarlata, C. (2022). Isothermal titration calorimetry investigation of the interactions between vitamin B6-derived hydrazones and bovine and human serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(9), 5483–5490. <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11200-2>

Omanovic-Miklicanin, E., Manfield, I., & Wilkins, T. (2017). Application of isothermal titration calorimetry in evaluation of protein–nanoparticle interactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 127(1), 605–613. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5764-4>

Ostašov, P., Sýkora, J., Brejchová, J., Olzyńska, A., Hof, M., & Svoboda, P. (2013). FLIM studies of 22- and 25-NBD-cholesterol in living HEK293 cells: Plasma membrane change induced by cholesterol depletion. *Chemistry and Physics of Lipids*, 167–168, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.02.006>

Parhiz, H., Shuvaev, V. v., Pardi, N., Khoshnejad, M., Kiseleva, R. Y., Brenner, J. S., Uhler, T., Tuyishime, S., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., Hope, M. J., Weissman, D., & Muzykantov, V. R. (2018). 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. *Journal of Controlled Release*, 291, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.015>

Parot, J., Mehn, D., Jankevics, H., Markova, N., Carboni, M., Olaisen, C., Hoel, A. D., Sigfúsdóttir, M. S., Meier, F., Drexel, R., Vella, G., McDonagh, B., Hansen, T., Bui, H., Klinkenberg, G., Visnes, T., Gioria, S., Urban-Lopez, P., Prina-Mello, A., Calzolari, L. (2024). Quality assessment of LNP-RNA therapeutics with orthogonal analytical techniques. *Journal of Controlled Release*, 367, 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.01.037>

Pastor-Ibáñez, R., Arnedo, M., & Tort, O. (2019a). High-throughput nitrobenzoxadiazole-labeled cholesterol efflux assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(143). <https://doi.org/10.3791/58891>

Pastor-Ibáñez, R., Arnedo, M., & Tort, O. (2019b). High-throughput nitrobenzoxadiazole-labeled cholesterol efflux assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(143). <https://doi.org/10.3791/58891>

Patel, P., Ibrahim, N. M., & Cheng, K. (2021). The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 42, Issue 6, pp. 448–460). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>

Pederzoli, F., Tosi, G., Vandelli, M. A., Belletti, D., Forni, F., & Ruozi, B. (2017). Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (Vol. 9, Issue 6). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/wnan.1467>

Pei, D. (2025). *Endosomal Escape of Lipid Nanoparticles: A New Perspective on the Literature Data*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2025-t8115>

Porte, S., Vadhana, V., & Sengupta, D. (2025). A Molecular View of Lipid Nanoparticles: Insights into their Morphology and Structural Plasticity. In *Small* (Vol. 21, Issue 43). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/sml.202505404>

Prozeller, D., Morsbach, S., & Landfester, K. (2019). Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle-protein interactions. In *Nanoscale* (Vol. 11, Issue 41, pp. 19265–19273). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9nr05790k>

Pucadyil, T. J., Mukherjee, S., & Chattopadhyay, A. (2007). Organization and dynamics of NBD-labeled lipids in membranes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(8), 1975–1983. <https://doi.org/10.1021/jp066092h>

Puccetti, M., Schoubben, A., Giovagnoli, S., & Ricci, M. (2023). Biodrug Delivery Systems: Do mRNA Lipid Nanoparticles Come of Age? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24032218>

Rathee, J., & Kishore, N. (2025). Interaction of solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin: physicochemical mechanistic insights. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 27(11), 5876–5888. <https://doi.org/10.1039/d4cp04737k>

Ribeiro, A. G., Alves, J. E. F., Soares, J. C. S., dos Santos, K. L., Jacob, Í. T. T., da Silva Ferreira, C. J., dos Santos, J. C., de Azevedo, R. D. S., de Almeida, S. M. V., & de Lima, M. do C. A. (2021). Albumin roles in developing anticancer compounds. In *Medicinal Chemistry Research* (Vol. 30, Issue 8, pp. 1469–1495). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02748-z>

Rossi, R. (2025). Microfluidic production of lipid nanoparticles loaded with a model mRNA and preliminary in vitro characterization; Tesi di laurea magistrale in Medical and Pharmaceutical Biotechnologies; Univeristà di Pavia.

Sadatmousavi, P., Kovalenko, E., & Chen, P. (2014). Thermodynamic characterization of the interaction between a peptide-drug complex and serum proteins. *Langmuir*, 30(37), 11122–11130. <https://doi.org/10.1021/la502422u>

Sahni, A., Qian, Z., & Pei, D. (2020). Cell-Penetrating Peptides Escape the Endosome by Inducing Vesicle Budding and Collapse. *ACS Chemical Biology*, 15(9), 2485–2492. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00478>

Sakamoto, T., Ennifar, E., & Nakamura, Y. (2018). Thermodynamic study of aptamers binding to their target proteins. In *Biochimie* (Vol. 145, pp. 91–97). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.010>

Samaridou, E., Heyes, J., & Lutwyche, P. (2020). Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vols. 154–155, pp. 37–63). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002>

Seo, Y., Lim, H., Park, H., Yu, J., An, J., Yoo, H. Y., & Lee, T. (2023). Recent Progress of Lipid Nanoparticles-Based Lipophilic Drug Delivery: Focus on Surface Modifications. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030772>

Shaghaghi, M., Rashtbari, S., Vejdani, S., Dehghan, G., Jouyban, A., & Yekta, R. (2020). Exploring the interactions of a Tb(III)–quercetin complex with serum albumins (HSA and BSA): spectroscopic and molecular docking studies. *Luminescence*, 35(4), 512–524. <https://doi.org/10.1002/bio.3757>

Shalaby, K. S., Ismail, M. I., & Lamprecht, A. (2021). Cyclodextrin Complex Formation with Water-Soluble Drugs: Conclusions from Isothermal Titration Calorimetry and Molecular Modeling. *AAPS PharmSciTech*, 22(7). <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02040-8>

Shang, J., & Gao, X. (2014). Nanoparticle counting: Towards accurate determination of the molar concentration. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 43, Issue 21, pp. 7267–7278). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00128a>

Skvarnavičius, G., Dvareckas, D., Matulis, D., & Petrauskas, V. (2019). Thermodynamics of Interactions between Charged Surfactants and Ionic Poly(amino acids) by Isothermal Titration Calorimetry. *ACS Omega*, 4(17), 17527–17535. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02425>

Srivastava, V. K., & Yadav, R. (2019). Isothermal titration calorimetry. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources* (pp. 125–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5>

Streck, S., Hong, L., Boyd, B. J., & McDowell, A. (2019). Microfluidics for the Production of Nanomedicines: Considerations for Polymer and Lipid-based Systems. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(6), 423–443. <https://doi.org/10.2174/2211738507666191019154815>

Sun, Y., Zhou, Y., Rehman, M., Wang, Y. F., & Guo, S. (2024). Protein Corona of Nanoparticles: Isolation and Analysis. In *Chem and Bio Engineering* (Vol. 1, Issue 9, pp. 757–772). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cbe.4c00105>

Tenchov, R., Bird, R., Curtze, A. E., & Zhou, Q. (2021). Lipid Nanoparticles from Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. In *ACS Nano* (Vol. 15, Issue 11, pp. 16982–17015). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>

Tenchov, R., Sasso, J. M., & Zhou, Q. A. (2023). PEGylated Lipid Nanoparticle Formulations: Immunological Safety and Efficiency Perspective. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 34, Issue 6, pp. 941–960). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.3c00174>

Thi, T. T. H., Suys, E. J. A., Lee, J. S., Nguyen, D. H., Park, K. D., & Truong, N. P. (2021). Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical

trials: From cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines. In *Vaccines* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040359>

Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.96920>

Tóth, E., Turiák, L., Visnovitz, T., Cserép, C., Mázló, A., Sódar, B. W., Försönits, A. I., Petővári, G., Sebestyén, A., Komlósi, Z., Drahos, L., Kittel, Á., Nagy, G., Bácsi, A., Dénes, Á., Gho, Y. S., Szabó-Taylor, K., & Buzás, E. I. (2021). Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(11). <https://doi.org/10.1002/jev2.12140>

Udepurkar, A., Devos, C., Sagmeister, P., Destro, F., Inguva, P., Ahmadi, S., Boulais, E., Quan, Y., Braatz, R. D., & Myerson, A. S. (2025). Structure and Morphology of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Drug Delivery: A Review. In *ACS Nano* (Vol. 19, Issue 23, pp. 21206–21242). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c18274>

Velazquez-Campoy, A., & Freire, E. (2006). Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nature Protocols*, 1(1), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.28>

Vogel, R., Savage, J., Muzard, J., Camera, G. della, Vella, G., Law, A., Marchioni, M., Mehn, D., Geiss, O., Peacock, B., Aubert, D., Calzolari, L., Caputo, F., & Prina-Mello, A. (2021). Measuring particle concentration of multimodal synthetic reference materials and extracellular vesicles with orthogonal techniques: Who is up to the challenge? *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(3). <https://doi.org/10.1002/jev2.12052>

Voke, E., Arral, M. L., Squire, H. J., Lin, T. J., Zheng, L., Coreas, R., Lui, A., Iavarone, A. T., Pinals, R. L., Whitehead, K. A., & Landry, M. P. (2025a). Protein corona formed on lipid nanoparticles compromises delivery efficiency of mRNA cargo. *Nature Communications* , 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63726-2>

Voke, E., Arral, M. L., Squire, H. J., Lin, T. J., Zheng, L., Coreas, R., Lui, A., Iavarone, A. T., Pinals, R. L., Whitehead, K. A., & Landry, M. P. (2025b). Protein corona formed on lipid nanoparticles compromises delivery efficiency of mRNA cargo. *Nature Communications* , 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63726-2>

Voke, E., Arral, M., Squire, H. J., Lin, T.-J., Coreas, R., Lui, A., Iavarone, A. T., Pinals, R. L., Whitehead, K. A., & Landry, M. (2025). *Protein corona formed on lipid nanoparticles compromises delivery efficiency of mRNA cargo*. <https://doi.org/10.1101/2025.01.20.633942>

Wang, B., Shen, B., Xiang, W., & Shen, H. (2024a). Advances in the study of LNPs for mRNA delivery and clinical applications. In *Virus Genes* (Vol. 60, Issue 6, pp. 577–591). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11262-024-02102-6>

Wang, B., Shen, B., Xiang, W., & Shen, H. (2024b). Advances in the study of LNPs for mRNA delivery and clinical applications. In *Virus Genes* (Vol. 60, Issue 6, pp. 577–591). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11262-024-02102-6>

Wang, T. Y., & Krylov, S. N. (2025). Deterministic error propagation in ITC: Revealing multi-fold errors in K_d values under standard conditions. *Biophysical Chemistry*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2025.107455>

Wszelaka-Rylik, M., & Gierycz, P. (2015). Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with tropane alkaloids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 121(3), 1359–1364. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4658-1>

Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020a). Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>

Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020b). Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25092193>

Zhang, W., Jiang, Y., He, Y., Boucetta, H., Wu, J., Chen, Z., & He, W. (2023). Lipid carriers for mRNA delivery. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 13, Issue 10, pp. 4105–4126). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.11.026>

Zwolsman, R., Darwish, Y. B., Kluza, E., & van der Meel, R. (2025). Engineering Lipid Nanoparticles for mRNA Immunotherapy. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* (Vol. 17, Issue 2). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wnan.70007>

7. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti i colleghi e le colleghe che, nel corso di questi anni e, in particolare, negli ultimi mesi, mi hanno accompagnato lungo questo percorso. A tutti voi, grazie di cuore.

Ringrazio sentitamente tutti i membri del laboratorio “PDPN” del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell’Università di Pavia, in particolare le Prof.sse Maria Cristina Bonferoni, Milena Sorrenti, Sara Perteghella e, soprattutto, la Prof.ssa Laura Catenacci.

Un ringraziamento speciale va anche alla Dott.ssa Rachele Rossi, al Dott. Fahad Khan Tareen, alla Dott.ssa Giada Ghiozzi e al Dott. Luca Randi, il cui supporto e contributo sono stati fondamentali per la riuscita di questo percorso.

Questo lavoro di tesi rientra nel progetto PNRR finanziato dall’Unione Europea — NextGenerationEU: PNRR_CN3, Centro Nazionale per la Terapia Genica e i Farmaci basati sulla Tecnologia a RNA, Spoke 9, CUP: F13C22000700007, M4C2-Investimento 1.4, CN00000041.