Inhalációs, nem virális RNS-hordozó rendszerek
A PULMONÁLIS GÉNTERÁPIA ÚJ IRÁNYAI

Dr. Rónai Zoltán
MyClinic Magánklinika, Pécs

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedben a nukleinsav-alapú terápiák, különösen a hírvivő RNS- (mRNS), az antiszensz-oligonukleotid- (ASO), a kis interferáló RNS- (siRNS) és a mikroRNS- (miRNS) technológiák robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül[1]. Az RNS-terápiák lényege, hogy közvetlenül a sejtek transzkripciós és transzlációs folyamataira hatva képesek betegséget okozó fehérjék expresszióját gátolni, vagy hiányzó fehérjéket pótolni. A molekuláris biológia és a nanotechnológia integrációja lehetővé tette, hogy e terápiák klinikai alkalmazása a korábbi kísérleti szakaszból valós betegellátási szintre lépjen[2].

A hatékony és biztonságos RNS-terápia kulcsa a megfelelő hordozó és beadási útvonal megválasztása. A szisztémás (intravénás) adagolás során a csupasz RNS-molekulák gyorsan degradálódnak a szérum-ribonukleázok hatására, és a retikuloendoteliális rendszer rövid időn belül eliminálja őket[3]. A virális vektorok ugyan magas transzfekciós hatékonyságot kínálnak, de immunogenitásuk, genomi integrációs kockázatuk és gyártástechnológiai komplexitásuk korlátozza klinikai használatukat[4]. A nem virális hordozók – különféle lipidek, polimerek, exoszómák és nanorészecskék – e problémák alternatív megoldását adják.

A tüdő a génterápiák szempontjából kiemelt célszerv. Az alveoláris felszín nagysága (kb. 70–100 m^2), a gazdag kapillárishálózat, valamint a légzési ciklus dinamikája lehetőséget teremt a jó hatóanyag-depozícióra és a gyors felszívódásra[5]. Az inhalációs gyógyszerbevitel nem invazív, elkerüli az ún. first pass effektust, és közvetlenül a kóros elváltozás helyére juttatja a hatóanyagot. Különösen a légúti betegségek (pl. cisztás fibrózis, asztma, COPD, IPF, SARS-CoV-2 fertőzés) esetén kínál új terápiás perspektívát[6-8].

INHALÁCIÓS RENDSZEREK ÉS ESZKÖZÖK

Az inhalációs gyógyszerbevitel hatékonyságát az alkalmazott aeroszolképző eszköz és a képződő részecskék fizikai tulajdonságai határozzák meg[9-11]. Az aeroszolizált részecskék 1–5 µm közötti aerodinamikai átmérő esetén jutnak el optimálisan a bronchiolusok és az alveolusok szintjére. A számtalan inhalációs eszköz (adagolós aeroszol, szárazporbelégző, soft-mist inhaler és a különböző porlasztókészülékek) közül a rezgőmembrános (mesh) porlasztók a legígéretesebbek az RNS-terápiákhoz, mert hőhatás nélkül, egyenletes cseppméretű aeroszolt képeznek, minimalizálva a nukleinsav-denaturáció kockázatát[12,13]. *Kim és mtsai.* és *Bai és mtsai.* állatkísérletekben igazolták, hogy a mesh porlasztóval inhalált mRNS- és siRNS-részecskék magas tüdődepozíciót és nagy transzfekciós hatékonyságot érnek el[14,15]. Az optimális eszközválasztás során figyelembe kell venni a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonságait, a beteg együttműködési készségét, valamint a célzott tüdőterületet (bronchiolus vagy alveolus)[16].

A PULMONÁLIS GYÓGYSZERBEVITEL GÁTJAI

Az inhalált RNS-hordozók útját számos anatómiai és élettani akadály nehezíti[17,18]. A főbb gátak a következők:

– A légúti váladékréteg és a mukociliáris clearance: a részecskék jelentős hányadát mechanikusan eltávolítja[19].
– A légúti sejttípusok heterogenitása: megnehezíti a célsejt-specifikus transzfekciót[20].
– Makrofág-fagocitózis és immunválasz[21]
– Endoszomális lebomlás: ebből az RNS-nek hatékonyan kell kiszabadulnia a citoplazmatikus aktivitáshoz[22].

A terápiás hatékonyság kulcsa az, hogy a nanorészecskék áthatoljanak a nyákrétegen, elérjék a célsejteket, majd endoszomális kiszabadulást követően a citoplazmába juttassák az RNS-t. Ennek optimalizálása magában foglalja a részecskeméret (100 nm–1 µm), a felületi töltés, a hidrofóbicitás és a polietilénglikol (PEG) polimer optimális felületi sűrűségének precíz szabályozását[23,24]. A betegspecifikus tényezők (életkor, légzésritmus, inspirációs volumen, eszközhasználati technika) tovább befolyásolják az aeroszol-depozíciót, ami magyarázza az inhalált RNS-készítmények klinikai vizsgálataiban tapasztalt nagy variabilitást.

A TERÁPIÁS RNS-MOLEKULÁK FŐ TÍPUSAI

A terápiás RNS-ek három funkcionális csoportba sorolhatók[20,25]. Az első a génexpresszió-gátlók csoportja, ide tartozik a kis interferáló RNS, más néven rövid interferáló RNS (siRNS) vagy csendesítő RNS; a mikro-RNS (miRNS), ami egy kis, egyszálú nemkódoló RNS, valamint az antiszensz oligonukleotidok (ASO). A második csoportba a fehérjekódolók (az mRNS és a módosított mRNS) tartoznak, a harmadikba pedig a fehérjecélzó aptamerek (strukturált RNS-motívumok). A siRNS (~13 kDa, kettős szálú) az RNS indukált csendesítő fehérje komplex (RISC) közvetítésével bontja a cél-mRNS-t, ezzel tartós transzláció gátlást okozva. Számos preklinikai modellben, köztük tüdőrákos egerekben, a belélegezhető siRNS-nanorészecskék tumorregressziót idéztek elő[15,26,27]. Az ASO-k (~6–9 kDa, egyszálú oligonukleotidok) RNase H1-mediált hasítással inaktiválják a céltranszkriptumot; több inhalációs ASO-terápia is klinikai fejlesztés alatt áll cisztás fibrózisban[28-30]. A miRNS-ek endogén génszabályozó kis RNS-ek, amelyek belélegezhető formában a karcinogenezis gátlására is vizsgálat alatt állnak[27]. Az mRNS-terápia előnye a transzlációs hatékonyság, az átmeneti expresszió és az immunstimulációs potenciál, ami egyaránt alkalmassá teszi fehérjepótlásra, vakcinációra és immunterápiára[31,32]. A különböző RNS-típusok inhalációs hordozó igénye eltérő: míg a kis oligonukleotidok könnyebben komplexálhatók polikationos vektorokkal, az mRNS stabilitása, másodlagos szerkezete és molekulatömege nagyobb kihívást jelent a formuláció számára[20,25].

NEM VIRÁLIS INHALÁCIÓS HORDOZÓRENDSZEREK

A hatékony pulmonális RNS-transzfekció kulcsa a stabil, biokompatibilis és immunológiailag semleges hordozóplatform. A legígéretesebb rendszerek közé tartoznak az extracelluláris vezikulák (EV, exoszómák), a szintetikus és természetes polimerek, a polikomplexek, a lipid nanorészecskék (LNP) és a kationos liposzómák[33-36].

Extracelluláris vezikulák (exoszómák)

Az exoszómák természetes, 30–150 nm méretű, kettős lipidmembránnal határolt nanorészecskék, amelyek fiziológiás körülmények között is RNS-t, fehérjéket és lipideket szállítanak a sejtek között. Ez az endogén transzportfunkció predesztinálja őket biokompatibilis génhordozónak[33]. Kísérletesen igazolták, hogy mesh porlasztóval történt inhaláció után az EV-k kizárólag a tüdőszövetben detektálhatók, főként alveoláris makrofágokban és hámsejtekben. Az inhalált EV-siRNS készítmények lipopoliszacharid-indukált tüdőkárosodásban hatékonyan csökkentették a gyulladásos markereket[37].

Liu és mtsai. tüdő eredetű exoszómákat alkalmaztak mRNS inhalációs transzferére. Ezek egy hónapig stabilak szobahőmérsékleten, és hatékonyabb fehérje expressziót biztosítottak, mint a hagyományos lipid nanorészecskék[38]. Ezek alapján az exoszómák újgenerációs, autológ RNS-vektorokként jelenhetnek meg, csekély immunogenitással és nagy stabilitással.

Polimer-alapú hordozók

A polimeres vektorok előnye a kémiai módosíthatóság és a szabályozható degradáció. A polikationos polietilénimin (PEI), poli-béta-amino-észter (PBAE), illetve ezek hiperelágazó változatai (hPBAE) bizonyítottan képesek stabil polikomplexek kialakítására RNS-sel[5,39].

Patel és mtsai. hPBAE-mRNS nanoformulációt hoztak létre, amely inhalációt követően ismételt adagolásra is állandó fehérjeexpressziót váltott ki a tüdőben, lokális

vagy szisztémás toxicitás nélkül[5]. *Rotolo és mtsai.* egy poli-béta-amino-tioészter polimert fejlesztettek ki, ami több állatfajban (hörcsög, menyét, majom) is képes hatékony mRNS-szállításra, és SARS-CoV-2 ellen védő Cas13a expressziót biztosított[39].

A polimeralapú siRNS-terápiák között kiemelkedő *McCarroll és mtsai.* munkája, akik csillag (star)-siRNS nanokomplexet fejlesztettek; inhaláció után a komplex a tüdő tumoros régióiban halmozódott fel, és szignifikánsan csökkentette a PLK1 és a béta-III-tubulin expresszióját[26]. A polimerek hátránya lehet a reziduális pozitív töltés miatti citotoxicitás, ezért PEG-szegmentekkel, mannózzal vagy biológiai ligandumokkal módosított formákat alkalmaznak a célsejt-szelektivitás növelésére és a váladék-penetráció elősegítésére[40].

Polikomplexek és hibrid rendszerek

A polikomplexek többkomponensű rendszerek, amelyek egy polimer, egy peptid és egy nukleinsav önszerveződésén alapulnak. *Qiu és mtsai.* a PEG-KL4 peptidet alkalmazták kationos komponensként, amely mRNS-sel 10 : 1 arányban nanoszintű komplexeket képzett, és BALB/c egerekben szignifikánsan javította a tüdőtranszfekciót a hagyományos lipidkomplexekhez képest[41]. *Guan és mtsai.* poloxamin-peptid–nukleinsav hibrid komplexet fejlesztettek, amely cisztás fibrózis modellben helyreállította az ioncsatorna-funkciót és magas transzfekciós hatékonyságot biztosított[42]. Egy másik, riboszomális fehérje-alapú nanoformuláció idiopátiás pulmonális fibrózisban (IPF) elősegítette az epitélium helyreállítását, az extracelluláris mátrix lebontását és az alveoláris architektúra regenerációját[43].

Lipid nanorészecskék (LNP)

Az LNP-platform az mRNS-vakcinák sikerével újra a figyelem középpontjába került. Az LNP-k ionizálható lipidekből, kiegészítő foszfolipidekből, koleszterinből és PEG-lipidből állnak. Az inhalációs alkalmazásban az LNP-k fő kihívása az aeroszolizálás alatti aggregáció és az mRNS integritásának megőrzése[44,45]. *Friis és mtsai.* spray-drying eljárással szárazpor formájú LNP-mRNS rendszert készítettek, amely 4 °C-on két hétig stabil maradt, és belélegezve hatékonyabb mRNS-expressziót adott, mint a folyékony forma[46]. *Lokugamage és mtsai.* a 7C1 lipidkomponens arányának finomhangolásával egy olyan rendszert hoztak létre, amely 28-szoros különbséget mutatott a legjobb és leggyengébb formuláció között mRNS-depozícióban[44]. A formuláció tekintetében kiderült, hogy a PEG-lipidek nélkülözhetetlenek a részecskék stabilizálásához, a kationos-aszszisztált lipidek és a magas PEG-moláris arány fokozzák az inhalációs hatékonyságot, továbbá a semleges foszfolipidek kisebb PEG-mennyiséget igényelnek[45]. Az LNP stabilitását tovább növeli a töltésszabályozás, amely elektrosztatikus taszítással gátolja az aggregációt, illetve a béta-szitoszterol beépítése, ami javítja az endoszomális kiszabadulást és a mRNS-citoplazmatikus felszabadulását[14,47].

Jelenleg több LNP-inhalációs mRNS készítmény klinikai fejlesztése zajlik, többek között cisztás fibrózis[29] és primer ciliáris diszkinézia[48] kezelésére. Mindegyik aeroszolizált LNP-forma a preklinikai fázisban kiváló expressziós hatékonyságot mutatott, de emberben eddig még csekély a klinikai siker, elsősorban az aeroszol-stabilitási problémák és az immunreaktivitás miatt.

Kationos liposzómák és nanorészecskék

A kationos lipidek az első generációs nem virális vektorok közé tartoznak. Előnyük az olcsó szintézis és a magas RNS-komplexálási képesség, hátrányuk viszont a potenciális citotoxicitás és a gyulladásos válasz[49]. A kombinált ionizálható lipid + PEG rendszerek ezeket a limitációkat részben kiküszöbölik. A nanorészecske alapú rendszerek közül *Tang és mtsai.* kettős célpontú mRNS nanorészecskéket fejlesztettek ki, amelyek a tüdő tumoros sejtjeit és a gyulladásos makrofágokat egyaránt elérték, hatékony fehérje expressziót biztosítva[50]. *Zhao és mtsai.* siRNS-nanorészecskékkel sikeresen gátolták az IL-11 és a KRAS gének expresszióját IPF és NSCLC modellekben[15,51]. Az ilyen típusú, 100–200 nm átmérőjű, pozitív töltésű részecskék a váladék penetráció, az endoszomális kiszabadulás és a sejtszelektivitás optimalizálásával képesek hatékony lokális géncsendesítést elérni, mindezt szisztémás toxicitás nélkül.

KLINIKAI ÉS PREKLINIKAI ALKALMAZÁSOK

SARS-CoV-2 és egyéb légúti vírusok

A SARS-CoV-2-pandémia új lendületet adott az inhalált RNS-terápiák fejlesztésének. A vírus a légúti nyálkahártya ACE2-receptoraihoz kötődve fertőzi a csillószőrös hámsejteket. A mukozális immunitás aktiválása – a szek-

retoros IgA (sIgA) és a lokális T-sejt válasz – hatékonyabb védelmet nyújthat, mint az injekciós vakcinák által kiváltott szisztémás IgG-válasz[52]. Az Ad5-nCoV vakcina volt az első, amely inhalatív úton váltott ki humorális, celluláris és mukozális immunitást, súlyos mellékhatás nélkül[53]. Az antitestválasz mind IgG-, mind IgA-szinten szignifikáns volt, és a T-sejt-aktivációt is igazolták.

Alternatív megközelítést képviselnek az exoszómális RNS-vakcinák. *Wang és mtsai.* olyan tüskefehérje mRNS hordozó rendszert dolgoztak ki, amely porinhalációval adagolható, szobahőmérsékleten stabil, és a humán adenovírus-vakcinánál magasabb mukozális IgA-választ eredményezett[54]. Kísérletes egérmodellekben és főemlősökben az exoszómák egy hónapig megőrizték bioaktivitásukat, ami döntő előny a hidegláncot igénylő LNP-vakcinákkal szemben. *Cheng és mtsai.* olyan rendszert terveztek, amely a SARS-CoV-2 receptorkötő-fehérjét egy exoszómához konjugálta. Az inhalációs immunizálás a bronchoalveoláris lavage folyadékban magas szekretoros IgA-szintet, a légúti hámban pedig fokozott neutralizáló antitest-termelést eredményezett, egyidejűleg csökkentve a vírus detektálhatóságát hörcsögmodellben[54].

Influenza és egyéb fertőzések

Lokugamage és mtsai. a korábban már említett LNP mRNS rendszert influenza elleni vakcinációra is alkalmazták; az mRNS a hemagglutinin fehérjét kódolta, és a bronchioláris hámsejtekben tartós expressziót biztosított[44]. A mukozális immunválasz dominánsan IgA-mediált volt, amely az intramuszkuláris kontrollcsoporthoz képest nagyobb vírusneutralizáló kapacitást mutatott.

Cisztás fibrózis, tüdőfibrózis, COPD és asztma

A cisztás fibrózis az egyik fő célterülete az inhalált mRNS-terápiának, mivel a CFTR-gén funkciója a légúti hámsejtekben helyreállítható lokális génexpresszióval. Több LNP-mRNS rendszerrel klinikai I–II. fázisban vizsgálják a CFTR-fehérje expresszióját, eddig kedvező biztonságossági profillal, de változó hatékonysággal[29,55].

Idiopátiás pulmonális fibrózisban *Bai és mtsai.* si-IL-11 nanorészecskékkel csökkentették a kollagén-depozíciót és a gyulladásos citokin-szintet egerekben[15]. A riboszomális fehérje-kondenzált mRNS-nanokomplexek elősegítették az alveoláris regenerációt és az epitélium helyreállítását[43].

Asztmában és COPD-ben több – az IL-4, IL-5 és TSLP citokin útvonalakat gátló – inhalációs antiszensz oligonukleotid terápia is eljutott a klinikai II. fázisig[56-59].

Tüdőrák és onkológiai indikációk

A tüdőrák lokális kezelése inhalált RNS-sel ígéretes alternatíva a szisztémás kemoterápiával szemben. *Tang és mtsai.* kettős célpontú mRNS-nanopartikulum rendszerekkel sikeresen expresszálták a tumor-szuppresszor p53 fehérjét[50]. *Zhao és mtsai.* KRAS-mutáns nem kissejtes tüdőrák modellekben tumorvolumen-csökkenést idéztek elő[51]. *Zhang és mtsai.* karcinogenezis prevenciót biztosítottak benzpirén-indukált tüdőadenomákban, mellékhatások nélkül[27]. Ezen adatok szerint a kis RNS-molekulák lokális adagolása nemcsak terápiás, hanem preventív onkológiai stratégiák alapja is lehet.

FEJLESZTÉSI KIHÍVÁSOK ÉS JÖVŐBELI IRÁNYOK

Bár az inhalált, nem virális RNS-hordozó rendszerek az elmúlt években óriási fejlődést mutattak, a klinikai alkalmazás továbbra is számos akadályba ütközik. A legfontosabb fejlesztési kihívások a következők.

Fizikai-kémiai stabilitás

A nukleinsavak rendkívül érzékenyek a mechanikai nyíróerőre, a hőre és a nedvességre. Az aeroszolizáció során az RNS-szálak fragmentálódhatnak, ami akár 70–90%-os aktivitásvesztést okozhat[60]. A stabilitás többféleképpen javítható. Az ionizálható lipidstruktúrák és a pH-érzékeny amfifil komponensek aeroszolizálás közben is megőrzik a zárt részecske-architektúrát[14]. Fagyasztva szárítást és mikroenkapszulációs technológiákat alkalmaznak a szárazpor formájú RNS-készítmények előállításához[46]. Trehalózt, mannitolt és más diszacharid-stabilizátorokat építenek be, melyek megőrzik a membrán fluiditását és az mRNS-szerkezetét[45]. A hosszú távú tárolhatóság szintén kritikus kérdés: az LNP-mRNS rendszerek jellemzően –20 °C hőmérsékletet igényelnek, míg az exoszomális platformok akár szobahőmérsékleten is hetekig stabilak maradnak[61].

Aeroszolizálás és eszköz-integráció

A porlasztók és a szárazporbelégzők fejlesztése párhuzamosan zajlik az új RNS-formulációkkal. Mivel az ultrahangos porlasztók hőhatása RNS-denaturációt

okozhat, ezért a legtöbb vizsgálatban rezgőmembrános (mesh) rendszereket alkalmaznak[12,13,15]. A porinhalációs RNS készítmények alacsonyabb belégzési áramlás mellett is jó dóziskontrollt kínálnak, ami különösen idős vagy gyenge belégzésű betegek esetén fontos[62]. A jövő kulcsa az eszköz és a formuláció integrált fejlesztése lesz, ahol a részecskeméretet, a töltést, a higroszkóposságot és az áramlási sebességet együtt optimalizálják, hogy maximalizálják az alveoláris depozíciót és a biológiai hozzáférhetőséget.

A biológiai gátak leküzdése

A légúti váladék és a mukociliáris clearance továbbra is a leghatékonyabb fizikai védőmechanizmus, amely megakadályozza a részecskék mélyebb penetrációját. A váladék-penetráló nanorészecskék – neutrális PEG-borítással vagy alacsony felületi töltéssel – jelentős áttörést hoztak. Ezek az 50–200 nm-es mérettartományban és enyhén negatív zéta-potenciál mellett képesek a legjobban áthatolni a nyákon[19,20]. Az endoszómákból való kiszabadulás továbbra is kritikus tényező. A „protonszivacs" hatású polimerek részben képesek kihasználni a pH-csökkenést az endoszomális membrán destabilizálására, de ez sokszor citotoxicitással jár együtt. A jövőben várhatóan biodegradábilis, redox-érzékeny polimerek és lipid–peptid hibridek kerülnek előtérbe[63].

Immunogenitás és biztonság

Az RNS-terápiák természetes immunstimulánsként is működhetnek (pl. a vakcinákban), de a fokozott veleszületett immunválasz csökkentheti a terápiás hatékonyságot. A nemkívánatos immunogenitás mérséklésére nukleozid-módosításokat alkalmaznak (pl. N1-metil-pszeudouridin, 5-metil-citozin), amelyek stabilizálják az mRNS-t és csökkentik a TLR-aktivációt[64]. A lokális adagolás a szisztémás expozíció minimalizálása révén biztonságosabb, különösen krónikus légúti betegségek esetén. Az eddigi humán klinikai vizsgálatok során nem figyeltek meg tüdőgyulladást vagy szignifikáns immunkomplex-mediált toxicitást[29,48,55].

ÖSSZEFOGLALÁS

Az inhalációs, nem virális RNS-terápiák új távlatokat nyitnak a pulmonális kórképek kezelésében. Lehetővé teszik, hogy a génexpresszió közvetlenül a tüdőben, lokálisan és reverzibilisen módosuljon, ezáltal minimalizálva a szisztémás mellékhatásokat. Az elmúlt évek kutatásai alapján az alábbi tendenciák rajzolódnak ki.

(1) Platform diverzifikáció – A lipid, a polimer, a hibrid és az exoszomális rendszerek egymással párhuzamosan fejlődnek; mindegyiknek megvan a saját előnye (stabilitás, célzott szállítás, biokompatibilitás), de még nem alakult ki egyértelmű „arany standard".

(2) Transzlációs validálás – A legtöbb ígéretes eredmény preklinikai szinten született. A klinikai alkalmazhatóság kulcsa a formuláció és az aeroszol stabilitása, valamint a gyártástechnológiai reprodukálhatóság biztosítása.

(3) Betegségspecifikus stratégiák – A cisztás fibrózis, az idiopátiás tüdőfibrózis és a SARS-CoV-2 fertőzés elleni terápiák már a legérettebb fejlesztési fázisban vannak. A tüdőrák és a COPD vonatkozásában azonban inkább még a kísérleti stádium dominál.

Az exoszomális rendszerek előretörése – Az exoszómák természetes eredetük és immunológiai semlegességük miatt hosszú távon felválthatják az LNP-alapú platformokat. Stabilitásuk és célsejt-affinitásuk előnyt jelenthet a klinikai alkalmazás során[38,54,61].

Multifunkcionális és kombinációs terápiák – A jövőben várhatóan multi-RNS vagy RNS + fehérje kombinációkat fognak inhalációval bejuttatni, pl. CRISPR-komplexek, immunmodulánsok vagy onkológiai checkpoint inhibitorok társításával[64].

Klinikai kihívások – Az inhalációs adagolás heterogenitása, a dóziskontroll, valamint a beteg-együttműködés kulcsfontosságú limitáló tényezők maradnak. A jövő „okosinhalátorai" várhatóan szenzoros visszajelzéssel, légzésszinkronizált vezérléssel és digitális követéssel fognak működni.

A jelenlegi adatok alapján az inhalált, nem virális RNS-hordozó rendszerek biztonságos, célzott és ígéretes alternatívát jelentenek a hagyományos intravénás vagy virális génterápiákkal szemben. A pulmonális célzás révén a terápiás RNS-molekulák a kóros folyamat helyén, közvetlenül a légúti hámsejtekben fejtik ki hatásukat. A technológia klinikai validálása, ipari méretű gyártása és hosszú távú biztonsági vizsgálata azonban még előttünk áll. A következő évtized döntő lesz annak tisztázásában, hogy az inhalációs RNS-terápiák eljuthatnak-e a rutinszerű klinikai alkalmazásig. ■

IRODALOM

1. High KA. Turning genes into medicines – what have we learned from gene therapy drug development in the past decade? *Nat Commun* 2020; 11: 5821.

2. Nikam RR, Gore KR. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther* 2018; 28: 209e24.

3. Ding L, Tang S, Wyatt TA, et al. Pulmonary siRNA delivery for lung disease: review of recent progress and challenges. *J Control Release* 2021; 330: 977e91.

4. Wang Y, Bruggeman KF, Franks S, et al. Is viral vector gene delivery more effective using biomaterials? *Adv Health Mater* 2021; 10: e2001238.

5. Patel AK, Kaczmarek JC, Bose S, et al. Inhaled nanoformulated mRNA polyplexes for protein production in lung epithelium. *Adv Mater* 2019; 31: e1805116.

6. Yue L, Zhang X, Zhao C, et al. Inhaled drug delivery: past, present, and future. *Nano Today* 2023; 52: 101942.

7. Meng QF, Tai W, Tian M, et al. Inhalation delivery of dexamethasone with iSEND nanoparticles attenuates the COVID-19 cytokine storm in mice and nonhuman primates. *Sci Adv* 2023; 9: eadg3277.

8. Shang Z, Tan S, Ma D. Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies. *Int J Biol Sci* 2021; 17: 4073e91.

9. Lavorini F, Corrigan CJ, Barnes PJ, et al. Retail sales of inhalation devices in European countries: so much for a global policy. *Respir Med* 2011; 105: 1099e103.

10. Leach CL, Davidson PJ, Hasselquist BE, et al. Influence of particle size and patient dosing technique on lung deposition of HF beclomethasone from a metered dose inhaler. *J Aerosol Med* 2005; 18: 379e85.

11. Lam JK, Liang W, Chan HK. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 1e15.2428

12. Galindo-Filho VC, Alcoforado L, Rattes C, et al. A mesh nebulizer is more effective than jet nebulizer to nebulize bronchodilators during non-invasive ventilation of subjects with COPD: a randomized controlled trial with radiolabeled aerosols. *Respir Med* 2019; 153: 60e7.

13. Nickerson C, Hollen D, Garbin S, et al. Pilot study to investigate the benefits of the innospire go mesh nebulizer compared to jet nebulizers in the treatment of stable COPD. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2022; 35: 186e95.

14. Kim J, Jozic A, Lin Y, et al. Engineering lipid nanoparticles for enhanced intracellular delivery of mRNA through inhalation. *ACS Nano* 2022; 16: 14792. e806.

15. Bai X, Zhao G, Chen Q, et al. Inhaled siRNA nanoparticles targeting IL11 inhibit lung fibrosis and improve pulmonary function post-bleomycin challenge. *Sci Adv* 2022; 8: eabn7162.

16. Biddiscombe MF, Usmani OS. Delivery and adherence with inhaled the-rapy in asthma. *Minerva Med* 2021; 112: 564e72.

17. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 7e20.

18. El-Sherbiny IM, Villanueva DG, Herrera D, et al. Overcoming lung clea-rance mechanisms for controlled release drug delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, editors. Con Pulmo drug Deliv; 2011.

19. Patton JS, Brain JD, Davies LA, et al. The particle has landed: characterizing the fate of inhaled pharmaceuticals. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010; 23(Suppl 2): S71e87.

20. Chow MYT, Qiu Y, Lam JKW. Inhaled RNA therapy: from promise to reality. *Trends Pharmacol Sci* 2020; 41: 715e29.

21. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 599e608.

22. Lin L, Cho SF, Xing L, et al. Preclinical evaluation of CD8þ anti-BCMA mRNA CAR T cells for treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2021; 35: 752e63.

23. Paranjpe M, Muller-Goymann CC. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 5852e73.

24. Resnier P, Mottais A, Sibiril Y, et al. Challenges and successes using nanomedicines for aerosol delivery to the airways. *Curr Gene Ther* 2016; 16: 34e46.

25. Paunovska K, Loughrey D, Dahlman JE. Drug delivery systems for RNA therapeutics. *Nat Rev Genet* 2022; 23: 265e80.

26. Ma Z, Wong SW, Forgham H, et al. Aerosol delivery of star polymer-siRNA nanoparticles as a therapeutic strategy to inhibit lung tumor growth. *Biomaterials* 2022; 285: 121539.

27. Zhang Q, Pan J, Xiong D, et al. Pulmonary aerosol delivery of Let-7b microRNA confers a striking inhibitory effect on lung carcinogenesis through targeting the tumor immune microenvironment. *Adv Sci* 2021; 8: e2100629.

28. Friedman L, Avitzur OB, Galai EO, et al. The safety and toxicity profile of SPL84, an inhaled antisense oligonucleotide for treatment of cystic fibrosis patients with the 3849 þ10kb C->T mutation, supports a Phase 1/2 clinical study. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2023; 19: 709e20.

29. Cagnina RE, Sawicki GS. Tribulations and (clinical) trials in cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2021; 20: 188e90.

30. Crooke ST, Liang XH, Baker BF, et al. Antisense technology: a review. *J Biol Chem* 2021; 296: 100416.

31. Echaide M, Chocarro de Erauso L, Bocanegra A, et al. mRNA vaccines against SARS-CoV-2: advantages and caveats. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 5944.

32. Shah SM, Alsaab HO, Rawas-Qalaji MM, et al A review on current covid-19 vaccines and evaluation of particulate vaccine delivery systems. *Vaccines* 2021; 9: 1086.

33. Gupta D, Zickler AM, El Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev* 2021; 178: 113961.

34. Yang Z, Shi J, Xie J, et al. Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. *Nat Biomed Eng* 2020; 4: 69e83.

35. Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin* B 2016; 6: 287e96.

36. Popowski KD, George A, Silkstone D, et al. Inhalable exosomes outperform liposomes as mRNA and protein drug carriers to the lung. *Extracell Vesicle* 2022; 1: 100002.

37. Han Y, Zhu Y, Youngblood HA, et al. Nebulization of extracellular vesicles: a promising small RNA delivery approach for lung diseases. *J Control Release* 2022; 352: 556e69.

38. Liu M, Hu S, Yan N, et al. Inhalable extracellular vesicle delivery of IL-12 mRNA to treat lung cancer and promote systemic immunity. *Nat Nanotechnol* 2024;19:565e75.

39. Rotolo L, Vanover D, Bruno NC, et al. Species-agnostic polymeric formulations for inhalable messenger RNA delivery to the lung. *Nat Mater* 2023; 22: 369e79.

40. Friedman AD, Claypool SE, Liu R. The smart targeting of nanoparticles. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 6315e29.

41. Qiu Y, Man RCH, Liao Q, et al. Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide. *J Control Release* 2019; 314: 102e15.

42. Guan S, Munder A, Hedtfeld S, et al. Self-assembled peptide-poloxamine nanoparticles enable in vitro and in vivo genome restoration for cystic fibrosis. *Nat Nanotechnol* 2019; 14: 287e97.

Ez a közlemény az alábbi angol nyelvű review – Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) alapján készült – rövidített és átdolgozott fordítása:
Huang C, Li H, Duan X, et al. Inhaled non-viral delivery systems for RNA therapeutics
Acta Pharmaceutica Sinica B 2025; 15(5): 2402e2430

(Irodalom folytatása a 24. oldalon)

IRODALOM

(folytatás a 20. oldalról)

43. Zhang R, Jing W, Chen C, et al. Inhaled mRNA nanoformulation with biogenic ribosomal protein reverses established pulmonary fibrosis in a bleomycin-induced murine model. *Adv Mater* 2022; 34: e2107506.

44. Lokugamage MP, Vanover D, Beyersdorf J, et al. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nat Biomed Eng* 2021; 5: 1059e68.

45. Jiang AY, Witten J, Raji IO, et al. Combinatorial development of nebulized mRNA delivery formulations for the lungs. *Nat Nanotechnol* 2024; 19: 364e75.

46. Friis KP, Gracin S, Oag S, et al. Spray dried lipid nanoparticle formulations enable intratracheal delivery of mRNA. *J Control Release* 2023; 363: 389e401.

47. Liu S, Shan X, Ma X, et al. Charge assisted stabilization of lipid nanoparticles enables inhaled mRNA delivery for mucosal vaccination. *Nat Commun* 2024; 15: 9471.

48. Zhang T, Yin H, Li Y, et al. Optimized lipid nanoparticles (LNPs) for organ-selective nucleic acids delivery in vivo. *iScience* 2024; 27: 109804.

49. Pei Y, BaoY, Sacchetti C, et al. Synthesis and bioactivity of readily hydro-lysable novel cationic lipids for potential lung delivery application of mRNAs. *Chem Phys Lipids* 2022; 243: 105178.

50. Tang Z, You X, Xiao Y, et al. Inhaled mRNA nanoparticles dual-targeting cancer cells and macrophages in the lung for effective transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2023; 120: e2304966120.

51. Zhao G, Ho W, Chu J, et al. Inhalable siRNA nanoparticles for enhanced tumor-targeting treatment of KRAS-mutant non-small-cell lung cancer. *ACS Appl Mater Inter* 2023; 15: 31273e84.

52. Mudgal R, Nehul S, Tomar S. Prospects for mucosal vaccine: shutting the door on SARS-CoV-2. *Hum Vaccin Immunother* 2020; 16: 2921e31.

53. Feng L, WangQ, ShanC, et al.Anadenovirus vectored COVID-19 vaccine confers protection from SARS-COV-2 challenge in rhesus macaques. *Nat Commun* 2020; 11: 4207.

54. Wang Z, Popowski KD, Zhu D, et al. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine. *Nat Biomed Eng* 2022; 6: 791e805.

55. Jackson JJ, Mao Y, White Jr TR, et al. Features of CFTR mRNA and implications for therapeutics development. *Front Genet* 2023; 14: 1166529.

56. Gao J, Xia Z, Vohidova D, et al. Progress in non-viral localized delivery of siRNA therapeutics for pulmonary diseases. *Acta Pharm Sin B* 2023; 13: 1400e28.

57. Liao W, Dong J, Peh HY, et al. Oligonucleotide therapy for obstructive and restrictive respiratory diseases. *Molecules* 2017; 22: 139.

58. Xu Y, Thakur A, Zhang Y, et al. Inhaled RNA therapeutics for obstructive airway diseases: recent advances and future prospects. *Pharmaceutics* 2021; 13: 177.

59. Jessamine V, Mehndiratta S, De Rubis G, et al. The application of nano-particles as advanced drug delivery systems in attenuating COPD. *Heliyon* 2024; 10: e25393.

60. Wei HH, Zheng L, Wang Z. mRNA therapeutics: new vaccination and beyond. *Fundam Res* 2023; 3: 749e59.

61. Popowski KD, Moatti A, Scull G, et al. Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter* 2022; 5: 2960e74.

62. Rogliani P, Calzetta L, Coppola A, et al. Optimizing drug delivery in COPD: the role of inhaler devices. *Respir Med* 2017; 124: 6e14.

63. Zhao D, Li D, Cheng X, et al. Mucoadhesive, antibacterial, and reductive nanogels as a mucolytic agent for efficient nebulized therapy to combat allergic asthma. *ACS Nano* 2022; 16: 11161e73.

64. Zhang M, Lu H, Xie L, et al. Inhaled RNA drugs to treat lung diseases: disease-related cells and nano-bio interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 2023; 203: 115144.