



Review Article

Lipid Nanoparticles for Genome Editing in Hypercholesterolemia

Setareh Soroudi^{1,2} , Mahmoud Reza Jaafari^{3,4,5} , Leila Arabi^{3,4*}

¹ School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² Student Research Committee, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*Corresponding author: Leila Arabi, Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Email: arabil@mums.ac.ir

DOI: [10.32592/nkums.17.1.25](https://doi.org/10.32592/nkums.17.1.25)

How to Cite this Article:

Soroudi S, Jaafari MR, Arabi L. Lipid Nanoparticles for Genome Editing in Hypercholesterolemia. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;17(1):25-40. DOI: [10.32592/nkums.17.1.25](https://doi.org/10.32592/nkums.17.1.25)

Received: 24 November 2024

Accepted: 09 December 2024

Keywords:

CRISPR-Cas9 technology
Genome Editing
Hyperlipidemia
Lipid Nanoparticles (LNPs)

Abstract

Introduction: Hyperlipidemia is a medical condition that is characterized by elevated blood lipid levels. This condition is often associated with an increased risk of cardiovascular diseases, such as heart attack and stroke. Traditional treatment approaches for hyperlipidemia include lifestyle modifications, dietary changes, and pharmacotherapy. However, some patients cannot achieve the LDL-C treatment goals, necessitating the development of novel lipid-lowering therapies with improved efficacy and safety profiles. Gene editing, which permanently alters gene expression, can revolutionize disease treatment. The CRISPR/Cas9 system has emerged as the preferred technology among various gene editing approaches due to its high efficiency and relative simplicity. Nowadays, CRISPR-Cas9 technology is frequently used in medicine and many other fields for targeted gene screening and gene therapy. However, challenges remain in the clinical application of CRISPR-Cas9, and a safe and efficient delivery system is required.

Method: The search was performed in Scopus, PubMed, and Google Scholar using the following keywords: "Hyperlipidemia," "CRISPR-Cas9", "Genome Editing," "Gene Editing," "Lipid Nanoparticles," and "LNPs." We included all relevant *in vitro*, *in vivo*, and clinical trial studies published until November 2024.

Results: It has been indicated that the use of lipid nanoparticles (LNPs) as delivery vehicles is promising. The LNPs enhance the stability of the CRISPR/Cas9 system and offer advantages, such as ease of production and high versatility, making them an ideal carrier with great potential.

Conclusion: This review provides an overview of the hopeful technology and the latest advances in the development of dyslipidemia treatments.



نانوذرات لیپیدی جهت ویرایش ژن در درمان هایپرکلسترولمی

ستاره سرودی^۱، محمودرضا جعفری^{۲،۳،۴}، لیلا عربی^{۳،۴}^۱ دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران^۲ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران^۳ مرکز تحقیقات فناوری نانو، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران^۴ گروه نانوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران^۵ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

*نویسنده مسئول: لیلا عربی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل:

arabil@mums.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.17.1.25

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

واژگان کلیدی:

هایپرلیپیدمی

فناوری CRISPR-Cas9

ویرایش ژن

نانوذرات لیپیدی

مقدمه: هایپرلیپیدمی یک وضعیت پزشکی است که با سطح بالای چربی خون مشخص می‌شود و اغلب با افزایش خطر بیماری‌های قلبی - عروقی همراه است. رویکردهای درمانی سنتی شامل اصلاح سبک زندگی، تغییر رژیم غذایی و دارودرمانی است. با این حال، برخی از بیماران نمی‌توانند به اهداف درمانی جهت کاهش LDL-C دست یابند. بنابراین، به درمان‌های جدید کاهنده چربی خون با مکانیسم‌های جدید و عوارض جانبی کمتر نیاز است. ویرایش ژن، بیان ژن را تغییر می‌دهد و پتانسیل متحول کردن درمان بسیاری از بیماری‌ها را دارد. علی‌رغم وجود چندین رویکرد ویرایش ژن، سیستم CRISPR/Cas9 به دلیل کارایی بالا و سادگی نسبی به عنوان فناوری انتخابی توسعه یافته است. امروزه از این فناوری در بسیاری از زمینه‌ها برای غربالگری ژن‌های هدف و ژن‌درمانی استفاده می‌شود. با این حال، هنوز موانعی جهت کاربردهای بالینی CRISPR-Cas9 وجود دارد و یک سیستم انتقال ایمن و موثر برای حمل‌ونقل مورد نیاز است.

روش کار: موضوعات مقاله با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed، Scopus، Google scholar و تا نوامبر ۲۰۲۴ جمع‌آوری شده‌اند. عبارات جستجو شامل «Lipid nanoparticle»، «Hypercholesterolemia»، «Dyslipidemia»، «CRISPR/Cas9» و همه اصطلاحات مرتبط که در طول جستجوی اولیه یافته شده است.

یافته‌ها: مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از نانوذره لیپیدی (LNP) به عنوان حامل، یک روش کارا و موثر جهت انتقال است. LNP، پایداری سیستم CRISPR-Cas9 را بهبود می‌بخشد و با توجه به مزایای آن، به یک حامل مطلوب تبدیل شده است. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه چشم‌اندازی از این فناوری امیدوارکننده و مروری بر آخرین پیشرفت‌های حاصل‌شده در جهت توسعه درمان‌های دیسلیپیدمی ارائه می‌دهد.

مقدمه

اختلالات چربی خون دلایل متنوعی دارند. آن‌ها را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: اختلالات چربی خون ارثی، که علل ژنتیکی آن‌ها به خوبی تعریف شده است، و اختلالات چربی خون اکتسابی، که چندعاملی هستند. در مورد دوم، در واقع می‌توان عادات غذایی یا رفتاری ناسالم (غذاهای ناسالم، کم‌تحرکی و سیگار کشیدن) را به عنوان عوامل موثر شناسایی کرد، اما اختلال چربی خون می‌تواند به عنوان یک اثر جانبی دیابت یا پیری نیز ایجاد شود. این بررسی بر روی هایپرکلسترولمی خانوادگی (Familial Hypercholesterolemia - FH) و کوشش‌های

نوین برای درمان آن تمرکز دارد [۱]. هایپرکلسترولمی خانوادگی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ژنتیکی در جهان با شیوع هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزایگوت (HeFH) - Heterozygous Familial Hypercholesterolemia (حدود ۱/۱۱۳ و هموزایگوت (HoFH) - Homozygous Familial Hypercholesterolemia (۱/۳۰۰۰۰-۱۶۰۰۰۰) در جمعیت است [۲،۳]. هایپرکلسترولمی خانوادگی با افزایش قابل توجه کلسترول Low-density lipoprotein - LDL-C کم لیپوپروتئین با چگالی کم

پزشکی مدرن و درمان بیماری‌های بالینی تبدیل شده است. ژن‌درمانی توانایی انجام بهبود ژنتیکی با جایگزین کردن، حذف یا اصلاح یک ژن جهش یافته برای هر درمان هدفمند را در بر می‌گیرد. ظهور فناوری‌های جدید، مانند اسیدریبونوکلیک تداخلی کوچک (Short - siRNA) (interfering RNA)، الیگونوکلیوتیدهای آنتی سنس (ASO-Antisense oligonucleotide)، توالی‌های کوتاه پالیندرمیک خوشه‌ای منظم فاصله‌دار (Clustered Regularly - CRISPR Interspaced Short Palindromic Repeats) و روش‌های جدید انتقال مانند نانومواد و حامل‌های لیپیدی، محبوبیت ژن‌درمانی را بسیار افزایش داده است. افزون بر آن، ژن‌درمانی در درمان بالینی بیماری‌های ژنتیکی مانند تالاسمی، فیبروز کیستیک خانوادگی، بیماری‌های شبکیه مرتبط با ژن RPE65 و هموفیلی استفاده شده است. مزیت ژن‌درمانی در انتقال اطلاعات از طریق مکانیسم‌های ژنتیکی نهفته است که اثرات درمانی ماندگار به همراه دارد [۳،۷].

سیستم CRISPR/Cas9 نسل سوم ابزار ویرایش ژن پس از (Zinc Finger Nuclease - ZFNs) و (Transcription activator like effector nucleases - TALENs) است. ویرایش ژن سلول‌ها و ارگانیسم‌ها با استفاده از CRISPR/Cas9 علاوه بر ساده‌تر و آسان‌تر بودن ساخت، کارآمدتر و دقیق‌تر از فناوری‌های قبلی است. بر این اساس، سیستم CRISPR/Cas9 در حال حاضر ابزار انتخابی ویرایش ژنوم است [۳].

چندین روش برای انتقال مواد ژنتیکی به سلول‌های داخل بدن وجود دارد. این روش‌ها در دو دسته اصلی حامل‌های ویروسی و غیر ویروسی طبقه‌بندی می‌شوند. ناقل‌های ویروسی شامل رتروویروس‌ها، لنتی ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و ویروس‌های مرتبط با آدنو (Adeno-associated virus - AAV) به دلیل قابلیت قدرتمند انتقال ژن، به طور گسترده در کارآزمایی‌های بالینی برای ژن‌درمانی به کار گرفته شده‌اند [۸]. با این حال، استفاده درمانی از ناقل‌های ویروسی به دلیل محدودیت اندازه محموله، تمایل آن‌ها به القای التهاب و پاسخ‌های ایمنی‌زا و پتانسیل جهش‌زایی با محدودیت همراه است. با توجه به محدودیت‌های این ناقل‌ها، ناقل‌های غیر ویروسی پتانسیل زیادی برای کاربردهای بالینی بیشتر نشان داده‌اند [۹]. ناقل‌های غیر ویروسی انتقال ژن عمدتاً شامل لیپید (لیپوزوم‌ها و نانوذرات لیپیدی (Lipid nanoparticles - LNPs) و ناقل‌های مبتنی بر پلیمر (پلی اتیلن ایمین (Polyethyleneimine - PEI) و پلی (آمیدوآمین) (Polyamidoamine - PAMAM) هستند [۱۰]. تا امروز موفق‌ترین نانوحامل‌ها در آزمایش‌های بالینی، نانوذرات با پایه لیپیدی مانند لیپوزوم‌ها و نانوذرات لیپیدی هستند [۱۱،۱۲].

نانوذرات لیپیدی (LNPs) سیستم‌های پیشرو برای انتقال مواد ژنتیکی در مطالعات بالینی در نظر گرفته می‌شوند. در ابتدا، سامانه LNP بر انتقال siRNA متمرکز بود. این سامانه برای انتقال اولین داروی درمانی که سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration - FDA) به نام Patisiran (Onpatro, Alnylam, Inc.) در سال ۲۰۱۸ برای درمان آمیلوئیدوز وراثتی (Transthyretin amyloidosis - ATTR) تایید کرده بود، به کار رفت [۱۳]. بعدها، این فناوری برای انتقال (COVID-19 Messenger RNA - mRNA) در واکسن‌های COVID-19 (Moderna و Pfizer/BioNTech) استفاده شد [۱۴-۱۶]. LNP ها

(cholesterol)، گزانتوم تاندون، و بیماری زودرس قلبی - عروقی مشخص می‌شود. سه ژن اصلی ایجادکننده هایپرکلسترولمی خانوادگی شامل گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL - Low-density lipoprotein receptor)، مسئول ۸۰ تا ۸۵ درصد عوامل منجر به اختلالات متابولیسم (LDL)، آپولیپوپروتئین B-100 (ApoB100 - PCSK9) و (Apolipoprotein B - ۱۰۰) (convertase subtilisin/kexin type 9) (۲٪) است [۳].

هایپرکلسترولمی خانوادگی ده‌ها میلیون نفر را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد و بار اقتصادی سنگینی را برای خانواده‌ها و جامعه به همراه دارد. نکته قابل توجه این است که درک این بیماری در مناطق مختلف جهان بسیار متفاوت است و هنوز بیماران زیادی در برخی مناطق وجود دارند که بیماری آن‌ها به درستی تشخیص داده نمی‌شود و درمان نمی‌شوند.

درمان اصلی فعلی برای هایپرکلسترولمی خانوادگی آنتی‌بادی مونوکلونال PCSK9 یا استاتین‌ها به تنهایی یا همراه با ازیمایب است. یک مطالعه نشان داده است که درمان ترکیبی با میپومرسن (mipomersen)، یک الیگونوکلیوتید آنتی سنس، منجر به کاهش اضافی ۲۵ درصدی LDL-C در بیماران با هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت می‌شود. میپومرسن مانع از تولید آپولیپوپروتئین B می‌شود و از این طریق می‌تواند موجب کاهش سطوح لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم (Very low-density lipoprotein cholesterol - VLDL) و LDL شود [۴]. داروی جدید دیگر با نام لومیتاپید (lomitapide) یک مهارکننده آنزیم است که برای درمان هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت تایید شده است. تحقیقات بالینی نشان می‌دهد که این دارو می‌تواند سطح LDL-C را تا ۴۰٪ در این بیماران کاهش دهد. با این حال عوارض جانبی گوارشی و احتمال آسیب کبدی استفاده بالینی را از آن محدود کرده است. لومیتاپید مولکولی است که آنزیم MTP (Microsomal triglyceride transfer protein - MTP) را در شبکه آندوپلاسمی سلول‌های کبدی و انتروسیت‌ها مهار می‌کند و نقش مهمی در کاهش سطح پلاسمایی تمام لیپوپروتئین‌های حاوی ApoB از جمله VLDL، LDL و شیلومیکرون‌ها دارد [۵].

آفریزس لیپوپروتئین (Lipoprotein apheresis) روش درمانی دیگری است که به طور فیزیکی لیپوپروتئین‌های آتروژنیک مانند LDL-C و (Lipoprotein (a) - LP(a)) را از خون حذف می‌کند. این دارو در بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی شدید به ویژه بیماران با هایپرکلسترولمی خانوادگی زمانی که اصلاح شیوه زندگی و درمان دارویی کافی نیست، استفاده می‌شود. این روش شامل عبور خون بیمار از طریق دستگاهی است که لیپوپروتئین‌ها را از سایر اجزای خون جدا می‌کند و می‌تواند LDL-C را بیش از ۶۵٪ در بیماران کاهش دهد. لیکن عوارض جانبی بالقوه و پرهزینه بودن، اغلب این درمان را برای بیشتر بیماران غیر قابل تحمل می‌کند. در حال حاضر، پیوند کبد تنها راه برای مدیریت سریع سطوح LDL-C در بیماران هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت برای رسیدن به مقادیر طبیعی است؛ اما به دلیل چالش‌های ایمنی قابل توجه پیوند اعضا و کمبود شدید اهداکنندگان یک درمان رایج نیست. به طور کلی، درمان‌های فعلی اثرات درمانی محدودی در برابر هایپرکلسترولمی خانوادگی دارند [۳،۶].

از قرن بیست و یکم ژن‌درمانی به یک جهت تحقیقاتی مهم در مهندسی

عملکردهای اختصاصی تشکیل شده‌اند: لیپیدهای قابل یونیزاسیون، لیپیدهای کمکی، کلسترول و لیپیدهای پلی اتیلن گلیکول (PEG- Polyethylene glycol - Lipids) [۹،۲۰]. ترکیب این اجزای اولیه ویژگی‌های عملکردی متمایز را برای سیستم‌های LNP فراهم می‌کند، تا با همکاری یکدیگر محصور کردن، حمل و نقل و انتقال عوامل درمانی را تسهیل کنند. گفتنی است که نانوذرات لیپیدی (LNPs) با لیپوزوم‌ها از نظر ساختار و برخی اجزای سازنده تفاوت‌هایی دارند. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های لیپیدی دولایه یا چند لایه‌ای هستند که در آن‌ها بخش آبی به طور کامل توسط غشایی متشکل از فسفولیپیدهای آمفیپاتیک محصور شده است. این مولکول‌ها شامل فسفولیپیدهای خنثی مانند لستین و کلسترول، فسفولیپیدهای با بار مثبت مانند DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane) و DOTAP ((chloride salt) 1,2-dioleoyl-3-(trimethylammonium-propane (chloride salt) و یا فسفولیپیدهایی با بار منفی مانند 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-(3-phosphatidic acid sodium salt) DPPA هستند. این در حالی است که لیپیدهای قابل یونیزاسیون یکی از اجزای نانوذرات لیپیدی هستند که خصوصیات عملکردی منحصر به فردی در حیطه ژن درمانی به این نانوذرات می‌بخشند. شکل (۱) خلاصه‌ای از اجزای اصلی نانوذرات لیپیدی و نقش‌های هر کدام را نمایش می‌دهد.

لیپیدهای قابل یونیزاسیون

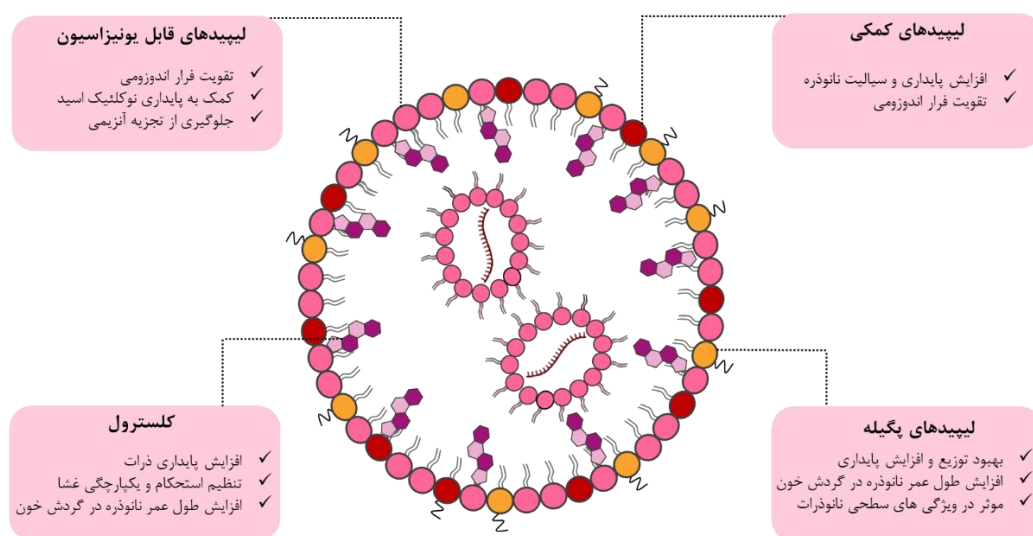
لیپیدهای قابل یونیزاسیون نوعی لیپید هستند که برای استفاده بالقوه در ژن درمانی و تولید واکسن مطالعه شده‌اند [۲۱،۲۲]. در آغاز، لیپیدهای کاتیونی در فرمولاسیون سیستم‌های انتقال اسید نوکلئیک استفاده می‌شدند. بار مثبت این لیپیدها با اسیدهای نوکلئیک با بار منفی برهمکنش می‌کند و در نتیجه بارگذاری آن‌ها را در ذرات تسهیل می‌کند. با این حال، لیپیدهای کاتیونی موجود در بازار، از قبیل لیپوفکتامین، به دلیل بار دائمی برای استفاده در داخل بدن مناسب نیستند. بار دائمی می‌تواند منجر به پاکسازی سریع از جریان خون، فعال شدن سیستم ایمنی و سمیت شود [۲۳،۲۴].

به مثابه یکی از پیشرفته‌ترین فناوری‌های بالینی مزایای متعددی از جمله فرمولاسیون آسان، سازگاری زیستی قابل توجه، قدرت بالا، ظرفیت بار افزایش‌یافته، خودآرایی خود به خودی و قابلیت شخصی‌سازی برای کاربردهای هدفمند را دارند [۱۷].

این مطالعه از نوع مطالعات مروری روایتی تخصصی است (Literature Narrative reviews/reviews) که با هدف بررسی نقش نانوذرات لیپیدی در توسعه درمان‌های جدید هایپرکلسترولمی مبتنی بر ویرایش ژنوم و بررسی شکاف‌های اصلی پژوهش در این حیطه انجام شده است. موضوعات مقاله فعلی با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی Google Scholar، Scopus و PubMed تا دسامبر ۲۰۲۴ جمع‌آوری شده‌اند. عبارات جستجوی مورد استفاده عبارت‌اند از: Lipid nanoparticle، LNP، Hypercholesterolemia، Dyslipidemia، CRISPR/Cas9 و تمام اصطلاحات مربوط به بیماری که در طول جستجوی اولیه یافته شد. با توجه به عنوان مقاله، «نانوذرات لیپیدی جهت ویرایش ژن در درمان هایپرکلسترولمی»، معیارهای ورود به گونه‌ای تنظیم شده است که تمامی مطالعات برون تن، درون تن و نیز مطالعات بالینی (تا دسامبر ۲۰۲۴) در حیطه ویرایش ژن برای درمان هایپرلیپیدمی/دیسلیپیدمی با استفاده از نانوذرات لیپیدی در این مطالعه بررسی شده‌اند. به این منظور کوشش شد مطالعاتی بررسی شوند که پیامدهایی مانند کاهش سطح کلسترول، تری گلیسیرید، مارکرهای مرتبط و نیز کاهش بیان PCSK9 و ANGPTL3 را در پی داشته باشند. گفتنی است که سایر ذرات بر پایه لیپید از جمله لیپوزوم‌ها در این مطالعه لحاظ نشده‌اند و فقط LNPs به عنوان فرمولاسیون نوین بررسی شده‌اند. افزون بر آن، منابع مقالات منتشرشده به منظور اطمینان از هرگونه مطالعه مرتبط بیشتر، به طور کامل غربالگری شده‌اند.

نانوذرات لیپیدی

LNP ها دسته‌ای از وزیکول‌های لیپیدی هستند که به دلیل زیست‌سازگاری، ایمنی زیستی، ظرفیت حمل بالا و ویژگی‌های قابل تنظیم، به عنوان حامل‌های بسیار موثر برای انتقال عوامل درمانی شناخته شده‌اند [۱۸،۱۹]. LNP ها از چهار جزء اصلی لیپیدی با



شکل ۱. خلاصه‌ای از اجزای اصلی نانوذرات لیپیدی و نقش هر کدام از اجزا در ساختار و خصوصیات نانوذرات لیپیدی

نسبت مولار اجزای LNP، به ویژه لیپید قابل یونیزاسیون، نقش مهمی در کارایی انتقال mRNA دارد. لیپیدهایی با چندین دم، پیکربندی مخروطی شکل را ایجاد می‌کنند که فرار اندوزومی را تسهیل کرده و کارایی انتقال mRNA را افزایش می‌دهد. CKK-E12، یک لیپید قابل یونیزاسیون با چهار دم لیپیدی و سری با هسته دیکتوپیرازین، اثربخشی قابل توجهی در انتقال mRNA و sgRNA سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9 نشان داده است [۲۵،۳۳]. LNP های فرموله شده با CKK-E12 کارایی بالایی در انتقال mRNA به کبد، ریه و قلب نشان داده‌اند [۳۴].

اگرچه لیپیدهای قابل یونیزاسیون برای کاربردهای انتقال RNA تایید شده‌اند، اما در سنتز و مقیاس پذیری این لیپیدها چالش‌هایی وجود دارد که برای غلبه بر این موانع و پیشبرد توسعه بالینی آن‌ها نیاز به کوشش‌های تحقیقاتی مداوم است [۳۴].

لیپیدهای کمکی

لیپیدهای کمکی برای افزایش پایداری و سیالیت نانوذرات لیپیدی استفاده می‌شوند. نقش اصلی لیپیدهای کمکی در LNP حمایت از پایداری طی نگهداری و در گردش خون است. اصطلاح «لیپیدهای کمکی» طیف وسیعی از لیپیدها از جمله فسفولیپیدها، گلیسرولیپیدها و استرول‌ها را در برمی‌گیرد. این لیپیدها، به طور کلی غیر کاتیونی هستند، اگرچه این اصطلاح برای سورفکتانت‌ها و PEG-لیپیدها نیز به کار رفته است [۳۵].

متداول ترین فسفولیپیدها (به مثابه لیپیدهای کمکی) در فرمولاسیون LNP عبارت‌اند از: 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) و 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE). DPPC یک لیپید فسفاتیدیل کولین اشباع (Phosphatidylcholine) است که PC با دمای انتقال بالا (T_m) است که زمان گردش خون و ثبات کلی فرمول را افزایش می‌دهد [۳۶]. سیستم‌های تجاری LNP، مانند Onpatro یا واکسن‌های mRNA کووید ۱۹ BioNTech و Moderna به طور عمده از DPPC استفاده می‌کنند؛ این مسئله احتمالاً به دلیل پایداری در لیپوزوم‌ها و توانایی آن‌ها در تسهیل انتقال سلولی است. علاوه بر این، DPPC می‌تواند کارایی محصورسازی اسیدهای نوکلئیک را در LNP ها افزایش دهد [۳۰،۳۵،۳۷].

از سوی دیگر، DOPE، یک لیپید غیر اشباع، دارای ساختار مخروطی شکل کوتاهی است که به دلیل وجود پیوندهای دوگانه در زنجیره‌های آسیلی آن و همچنین گروه سر کوچک‌تر در مقایسه با گروه آمین سوم (تری متیله) در فسفاتیدیل کولین است. این ویژگی‌های ساختاری DOPE تشکیل فاز شش‌ضلعی غیر دولایه (HiI) را تسهیل می‌کند، در نتیجه انتقال درون سلولی اسیدنوکلئیک را بهبود می‌بخشد.

تحقیقات نشان می‌دهد که فسفاتیدیل اتانول آمین‌ها (PE - Phosphatidylethanolamine) به دلیل توانایی‌شان در کمک به همجوشی بین غشای نانوذره و غشای سلول‌های هدف می‌توانند انتقال mRNA توسط LNP ها را افزایش دهند [۲۵].

مطالعات نتایج متضادی را هنگام جایگزینی DOPE با DPPC در آماده‌سازی mRNA-LNP گزارش کرده‌اند. Kauffman و همکاران بهبود کارایی محصورسازی mRNA را با LNP های حاوی DPPC

به طور کلی لیپیدهای قابل یونیزاسیون دارای خواص آمفی‌فیلیک (دوگانه‌دوست) هستند که از سه بخش تشکیل می‌شوند: گروه‌های سر قابل یونیزاسیون، دم‌های آبگریز و مناطق اتصال‌دهنده. بر اساس ویژگی‌های ساختاری سرهای قابل یونیزاسیون، آن‌ها را می‌توان به چندین نوع از جمله ترکیبات آمینی (آمین‌های سه ظرفیتی، آمین‌های چهار ظرفیتی) و ساختارهای حلقوی (هسته پیریدین، هسته پیرازین، هسته ایمیدازول و هسته سر لیپید بر پایه دیکتوپیرازین) طبقه‌بندی کرد. در شرایط اسیدی، زمانی که pH کمتر از ثابت تفکیک اسیدی (pK_a) لیپید باشد، سر لیپید قابل یونیزاسیون پروتونه و دارای بار مثبت می‌شود و امکان برهمکنش را با mRNA به عنوان یک مولکول با بار منفی فراهم می‌کند. در شرایط خنثی، RNA-LNP به حالت الکتریکی خنثی با می‌گردد. پس از ورود به سلول، RNA-LNP منجر به تشکیل اندوزوم می‌شود [۲۵]. رهایی RNA قبل از بلوغ لیزوزومی، گام مهمی برای انتقال موثر است. با این حال، این فرایند که به فرار اندوزومی معروف است، معمولاً کارایی کافی ندارد و یک عامل محدودکننده برای توسعه درمان‌های مبتنی بر LNP در نظر گرفته می‌شود [۲۶]. هنگامی که محیط اندوزوم به طور فزاینده‌ای اسیدی می‌شود، لیپید قابل یونیزاسیون پروتونه شده و بار مثبت پیدا می‌کند که امکان برهمکنش با فسفولیپیدهای آنیونی در غشای اندوزومی را فراهم و ساختار غشای اندوزومی را مختل می‌کند و موجب رهاسازی RNA به سیتوزول می‌شود. توانایی LNP ها برای تسهیل فرار اندوزومی به تشکیل فاز هگزاگونال (شش ضلعی) معکوس (H_{II}) نسبت داده می‌شود [۲۹-۲۷]. شایان ذکر است که طراحی لیپیدهای قابل یونیزاسیون نقشی اساسی در تقویت فرار اندوزومی ایفا می‌کند. عواملی مانند ترکیب، مقدار و pK_a گروه‌های سر لیپیدهای قابل یونیزاسیون و همچنین ویژگی‌های دم‌های لیپیدی از جمله طول، تعداد، انشعاب و اشباع آن‌ها (برای مثال، میزان اشباع بودن، پیکربندی و محل اتصالات غیر اشباع) تعیین‌کننده سیالیت غشای لیپیدی و توانایی در بر هم زدن پایداری غشای اندوزومی هستند [۲۱،۲۵،۳۰،۳۱].

LNP ها بر اساس ترکیب خود، به طور طبیعی کبد را هدف قرار می‌دهند. قابل ذکر است که 4-methyl-Dilinoleyl dimethylaminobutyrate (DLin-MC3-DMA) که به اختصار MC3 نامیده می‌شود، لیپید یونیزه‌کننده موجود در Onpatro به عنوان اولین فرمولاسیون LNP برای انتقال siRNA است. همچنین، اجزای لیپید قابل یونیزاسیون واکسن‌های کووید ۱۹-Pfizer BioNTech (Comirnaty) و Moderna (Spikevax) به ترتیب ALC-315 و SM-102 هستند.

لیپید قابل یونیزاسیونی با سر آمین نوع سوم که در بیماری هاپرکلسترولمی مفید است، 306-O12B می‌باشد. LNP هایی که حاوی 306-O12B هستند برای انتقال mRNA و (Single guided RNA - sgRNA) سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9 با هدف قرار دادن 3 angiopoietin-like (ANGPTL3) استفاده می‌شدند. برخلاف MC3، 306-O12B در القای سرکوب ANGPTL3 در کبد، درجه بالاتری از اختصاصیت و کارایی را نشان داده است. این امر منجر به کاهش قابل توجه سطح پروتئین ANGPTL3 سرم و همچنین کاهش غلظت کلسترول لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL-C) و تری‌گلیسرید شده است [۳۲].

مشاهده کرده‌اند؛ در حالی که فرمولاسیون‌های مبتنی بر DOPE منجر به بیان پروتئین بالاتری شده‌اند [۳۸].

کلسترول

کلسترول یکی از اجزای حیاتی در LNP ها است و وظایف متعددی دارد. این ماده به محصورسازی بهتر اسید نوکلئیک در LNP ها، تنظیم استحکام و یکپارچگی غشا و افزایش پایداری ذرات کمک می‌کند [۳۰]. همچنین، کلسترول با کاهش پروتئین‌های متصل به سطح، طول عمر نانوذرات را در گردش خون افزایش می‌دهد [۳۹]. LNP ها با کلسترول بالا پس از جذب با آپولیپوپروتئین (Apolipo protein - ApoE) مسیری مشابه لیپوپروتئین‌های کم‌چگالی (LDL) را طی می‌کنند و پردازش می‌شوند.

پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که جایگزین‌های طبیعی استرول می‌توانند جایگزین کلسترول در فرمولاسیون‌های LNP شوند. مشتقات کلسترول، همان‌طور که با جایگزینی با فیتوسترول‌ها و مشتقات بتاستوسترول مشاهده شده است، پتانسیل افزایش کارایی LNP را دارند. این جایگزین‌ها با داشتن زنجیره‌های آلکیل بلندتر مشخص می‌شوند و نشان داده شده است که خواص همجوشی و فرار آندوزومی را تقویت می‌کنند [۴۰-۴۲].

لیپیدهای پگیده

اگرچه لیپیدهای پگیده تنها درصد مولی کمی (حدود ۱/۵٪) از کل اجزای لیپیدی موجود در LNP را تشکیل می‌دهند، اما تاثیر قابل توجهی بر ویژگی‌های کلیدی LNP دارند. این ویژگی‌ها شامل پایداری در طول فرایند تهیه و نگهداری، اندازه، پراکندگی، کارایی انتقال ماده ژنتیکی، نیمه عمر در گردش خون و توزیع درون تن می‌شود [۴۳]. علاوه بر این، افزودن لیپیدهای PEG به فرمولاسیون LNP می‌تواند به طور موثری از تجمع LNP جلوگیری کند و تحمل‌پذیری آن‌ها را با کاهش شناسایی و پاک‌سازی با سیستم ایمنی بدن، بهبود بخشد. فرایند پگیده‌سازی در ابتدا برای کمک به داروهای پروتئینی در فرار از پاسخ‌های ایمنی توسعه یافته است [۳۰، ۴۴، ۴۵].

همچنین، این فرایند از طریق ایجاد مانع فضایی، دسترسی به سطح LNP را مسدود می‌کند و از این طریق اپسونیزاسیون و کلیرانس (پاک‌سازی) را به ترتیب با پروتئین‌های خون و ماکروفاژها کاهش می‌دهد. در نتیجه، پگیده‌سازی منجر به طولانی شدن زمان گردش خون سیستمیک LNP ها می‌شود. PEG ها به عنوان پلیمرهای آب‌دوست و انعطاف‌پذیر می‌توانند برای اتصال لیگاندهای خاص به ذره مورد استفاده قرار گیرند و انتقال هدفمند را ممکن سازند [۴۵].

مطالعات متعددی برای بررسی اهمیت پگیده‌سازی در دستیابی به هدف‌گیری اختصاصی اندام و کارایی بالای انتقال ماده ژنتیکی درون بدن در LNP ها انجام شده است [۴۶]. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که اثربخشی سیستم‌های انتقال LNP تحت تاثیر عوامل مختلف مرتبط با خواص لیپیدهای پگیده، مانند اندازه و ساختار مولکول PEG، طول و نوع زنجیره کربنی، و نسبت مولی PEG-لیپید است [۴۷]. اندازه LNP ها را می‌توان با دستکاری نسبت لیپیدهای PEG درون LNP ها تنظیم کرد؛ به طوری که غلظت بالاتر لیپیدهای PEG منجر به تشکیل LNP

های کوچک‌تر می‌شود [۴۸].

علی‌رغم مزایای کنژوگه‌های PEG، تحقیقات پاسخ‌های ایمنی پیش‌بینی‌نشده‌ای را نسبت به نانوحامل‌های پگیده، از جمله پاک‌سازی سریع از خون (Accelerated blood clearance - ABC) و تولید آنتی‌بادی‌های ضد PEG پس از تزریق اولیه نشان داده‌اند. این آنتی‌بادی‌ها باعث تسریع پاک‌سازی خون در تزریق‌های بعدی و همچنین واکنش‌های مفرط حساسیتی به نام شبه آلرژی وابسته به فعال‌سازی کمپلمان (Complement activation-related pseudoallergy - CARPA) می‌شوند [۴۹-۵۲].

علاوه بر معایب تحریک سیستم ایمنی، پگیده‌سازی نانوذرات می‌تواند پیامدهای نامطلوب دیگری را نیز به دنبال داشته باشد. در زمینه دارورسانی، این فرایند می‌تواند جذب سلولی را کاهش دهد و مانع فرار نانوذرات از آندوزوم‌ها شود و در نتیجه کارایی کلی را پایین آورد. برای تسهیل جذب سلولی، حذف لیپیدهای PEG از سطح LNP ضروری است؛ زیرا برهم‌کنش بین LNP و پروتئین‌های درگیر در فرایندهای جذب پس از جدا شدن لیپیدهای PEG اتفاق می‌افتد. کاهش سرعت جدا شدن ممکن است منجر به کاهش کارایی در هدف‌گیری و انتقال سلولی LNP شود؛ بنابراین، وجود یک پوسته PEG سدی فضایی ایجاد می‌کند که مانع اتصال کارآمد ذره و رهایی آن از آندوزوم‌ها می‌شود. بر این اساس، تنظیم دقیق مقدار و نوع لیپیدهای PEG برای ایجاد تعادل دقیق بین اثرات پنهان‌سازی و پایداری کافی بدون ایجاد اختلال در رهاسازی محموله، امری حیاتی است. این مشکل به طور معمول با عنوان «معضل PEG» شناخته می‌شود [۵۳-۵۰].

تاکنون کوشش‌های زیادی برای یافتن جایگزین‌های بالقوه برای PEG صورت گرفته است. با این حال، تحقیقات بیشتر برای توسعه، سنتز و ارزیابی جایگزین‌های موثر ضروری است [۵۴]. استفاده از پلیمرهای جایگزین، مانند پلی اکسازولین [۵۵]، پلی گلیسرول [۵۶]، پلی ان-وینیل پیرولیدون [۵۷]، پلی وینیل الکل [۵۸]، پلی N - N - دی متیل آکریل آمید، پلی N - آکریلونیل مورفولین [۵۹]، پلی (N - ۲) - هیدروکسی پروپیل متاکریلامید (پلی (HPMA) [۶۰]، پلی آمینو اسیدها [۶۱] و مواد دو قطبی مانند پلی (کربوکسی بتائین آکریل آمید) و پلی (سولفوبتائین متاکریلات) به عنوان نانوحامل‌های بالقوه با ایمنی بالاتر بررسی و ارزیابی شده‌اند. مطالعات اخیر نیز، پتانسیل پلی سارکوزین را در این باره بررسی کرده است [۶۲].

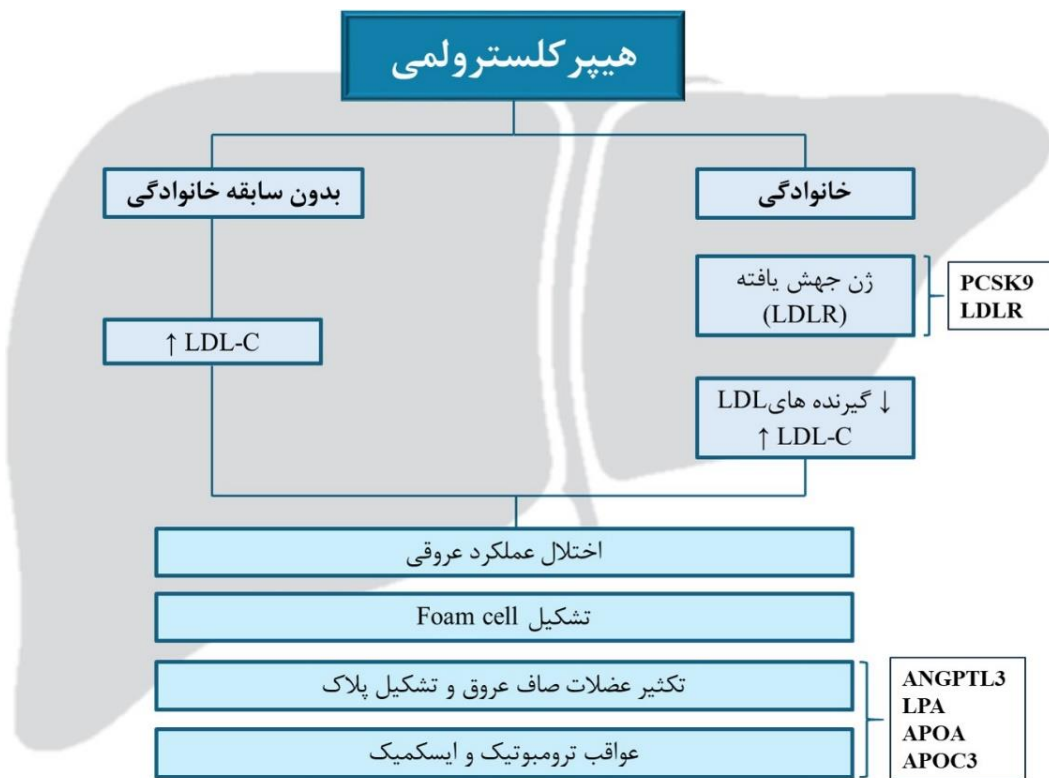
هایپرکلسترولمی

هایپرکلسترولمی یک اختلال در متابولیسم لیپوپروتئین است که علت اصلی بیماری‌های قلبی - عروقی به شمار می‌رود. مشخصه آن سطوح بالای غیر طبیعی کلسترول در پلاسما، به ویژه کلسترول لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL-C) است. LDL-C به عنوان یک حامل مهم کلسترول در جریان خون عمل می‌کند. پاک‌سازی کبدی LDL-C بیشتر با گیرنده‌های LDL (LDL-R) تسهیل می‌شود. با این حال، سطوح بالا LDL-C که در هایپرکلسترولمی مشاهده می‌شود تا حد زیادی به جهش‌های ژنتیکی عملکردی در ژن‌های مسئول تنظیم سطح LDL-C نسبت داده می‌شود. این جهش‌ها می‌توانند منجر به نقص‌های مولکولی مانند اختلال در جذب داخلی LDL متصل شده، کاهش ظرفیت اتصال، کاهش بیان گیرنده‌ها و نرسیدن گیرنده‌های LDL به

هایپرکلسترولمی خانوادگی عمدتاً ناشی از افزایش عملکرد ژن PCSK9 یا کاهش عملکرد گیرنده LDL یا ژن آپولیپوپروتئین B (ApoB) است؛ از این رو، مهار PCSK9 یکی از راهبردهای اصلی برای درمان FH به شمار می‌رود [۶۸]. ژن‌های PCSK9 و ANGPTL3 بیشتر در سلول‌های کبدی بیان می‌شوند و محصولات پروتئینی آن‌ها در جریان خون آزاد می‌شوند. PCSK9 پروتئینی است که بر سطوح LDL-R روی سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) تاثیر می‌گذارد [۶۹]. این گیرنده‌ها مسئول اتصال و تجزیه LDL-C در کبد هستند. هنگامی که PCSK9 به گیرنده‌های LDL متصل می‌شود، این گیرنده‌ها از طریق تجزیه لیزوزومی از کبد حذف می‌شوند. این امر منجر به کاهش متابولیسم LDL-C می‌شود که می‌تواند به سطوح بالای کلسترول خون کمک کند. بنابراین، مهار PCSK9 امکان بازیافت گیرنده‌های LDL را فراهم می‌کند و متابولیسم LDL-C را افزایش می‌دهد [۷۰]. شکل ۲، پاتوفیزیولوژی هایپرکلسترولمی را نشان می‌دهد. بر این اساس، PCSK9 و ANGPTL3 جزو مهم‌ترین اهداف ژنتیکی برای مدیریت هایپرکلسترولمی به شمار می‌روند.

غشای پلاسمایی شوند [۶۳،۶۴]. ژن‌های کدکننده PCSK9 و ANGPTL3 مهم‌ترین اهداف ژنتیکی برای مدیریت کلسترول بالا هستند [۶۵،۶۶].

هایپرکلسترولمی خانوادگی (FH) یک اختلال ارثی است که با سطوح بسیار بالای LDL-C مشخص می‌شود. تظاهرات بالینی FH به نوع آن که می‌تواند به دو شکل هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزیگوت و هموزیگوت باشد، بستگی دارد. از ویژگی‌های هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزیگوت می‌توان به غلظت $LDL-C < 190 \text{ mg/dl}$ ، شروع دیرتر علائم و تظاهرات بالینی معمولاً محدود به گزائتوم‌های تاندون اکستنسور اشاره کرد. در مقابل، در هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت غلظت LDL-C می‌تواند به بیش از 500 mg/dl برسد و اولین علائم در کودکی ظاهر می‌شوند. به دلیل خطر شروع زودرس بیماری (Atherosclerotic cardiovascular disease - ASCVD) تشخیص زودهنگام FH بسیار مهم است. تشخیص بیشتر بر اساس ارزیابی سطح LDL-C، علائم بالینی، سابقه خانوادگی و با استفاده از معیارهای مناسب انجام می‌شود [۶۷].



شکل ۲. پاتوفیزیولوژی هایپرکلسترولمی. PCSK9 و ANGPTL3 جزو مهم‌ترین اهداف ژنتیکی برای مدیریت هایپرکلسترولمی به شمار می‌روند.

خاموش می‌کند، تاییدیه FDA را برای استفاده‌های پزشکی دریافت کرده‌اند. اخیراً، شرکت Merck یکی از اولین کاندیدهای بالینی مشتق شده از mRNA را که یک مهارکننده زیستی در دسترس PCSK9 است، معرفی کرده است [۷۰]. MK-0616 به عنوان یک مهارکننده خوراکی PCSK9 کاهش قابل توجه و وابسته به دوز-LDL-C را در کارآزمایی تصادفی فاز IIb برای درمان هایپرکلسترولمی نشان داده است [۷۱]. همه این تکنیک‌ها به طور قابل توجهی سطح LDL-

رویکردهای نوین درمانی

برای مهار ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط به منظور کاهش موثر LDL-C پلاسما از چندین رویکرد استفاده شده است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند evolocumab (Repatha) و alirocumab (Praluent) برای هدف قرار دادن پروتئین PCSK9، و siRNA دو رشته‌ای (inclisiran) که mRNA کدکننده PCSK9 را هدف قرار می‌دهد و Mipomersen به عنوان ASO که به طور انتخابی mRNA کدکننده ApoB100 را

C را در بیماران مبتلا به کلسترول بالا کاهش می‌دهند. شایان ذکر است، siRNA و ASO های بیشتری برای هایپرکلسترولمی خانوادگی در حال آزمایش‌های بالینی هستند [۳،۷۲].

هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت یک بیماری ژنتیکی است که در آن فرد بدون گیرنده‌های LDL عملکردی است. این امر منجر به افزایش قابل توجه سطح LDL-C می‌شود و خطر حمله قلبی یا سکته مغزی را در سنین جوانی افزایش می‌دهد. درمان‌های کنونی که فقط بر روی PCSK9 تمرکز دارند، اثربخشی محدودی در درمان این بیماران دارند. برای رفع این مشکل، ساختارهای mRNA که LDL-R را رمزگذاری می‌کنند، توسعه یافته‌اند. بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های کبدی منجر به افزایش جذب LDL-C با سلول‌های کبدی می‌شود [۷۳]. علاوه بر این، یکی دیگر از رویکردهای اخیر برای کاهش سطح LDL-C تمرکز بر روی mRNA کدکننده آنتی‌بادی خنثی‌کننده علیه PCSK9 است که بیشتر در کبد سنتز می‌شود. PCSK9 با LDL-R برهمکنش کرده و منجر به تخریب LDL-R و متعاقباً افزایش سطح پلاسمایی LDL-C می‌شود [۷۴،۷۵]. در بخش بعدی، درباره پتانسیل LNP ها در ویرایش ژنوم بحث خواهد شد که بیانگر نقش امیدوارکننده استراتژی درمانی برای هایپرکلسترولمی خانوادگی است [۶۳،۷۶].

انتقال CRISPR/Cas و سیستم ویرایش ژنوم با واسطه LNP

سامانه CRISPR/Cas9 مهندسی و ویرایش ژنوم را متحول کرده است. این سیستم یک سیستم ایمنی تطبیقی است که اولین بار در باکتری‌ها شناسایی شد. اصطلاح CRISPR مخفف «توالی‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای» است که آرایه‌های کوتاهی از توالی‌های تکراری هستند که با توالی‌های فاصله‌گذار خاصی از هم جدا شده‌اند. این توالی‌های CRISPR در کنار پروتئین‌های مرتبط با CRISPR (Cas) نقش مهمی در پاسخ ایمنی باکتری‌ها علیه ویروس‌ها و پلاسمیدها ایفا می‌کنند. خانواده پروتئین Cas گروه متنوعی از پروتئین‌ها هستند که شامل نوکلئازها، هلیکازها و پلیمرازها می‌شوند. سیستم‌های CRISPR/Cas متعددی وجود دارد که بر اساس تعداد محرک‌ها (عوامل موثر)، انواع و زیرگروه‌ها به دسته‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. Cas9 یک سیستم کلاس ۲ است که از یک عامل موثر تک‌واحدی تشکیل و با یک ژن واحد رمزگذاری شده است که استفاده از آن را آسان‌تر می‌کند [۷۷].

در سیستم CRISPR/Cas9، تجویز همزمان دو جزء، RNA راهنمای منفرد (sgRNA) و Cas9 مورد نیاز است [۷۸]. قابل ذکر است، فرموله کردن دو RNA مختلف در یک پلتفرم LNP برای دستیابی به یک سیستم ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR کارآمد حیاتی است [۷۹]. sgRNA از طریق فرایند تطابق جفت باز، قادر است Cas9 را به یک

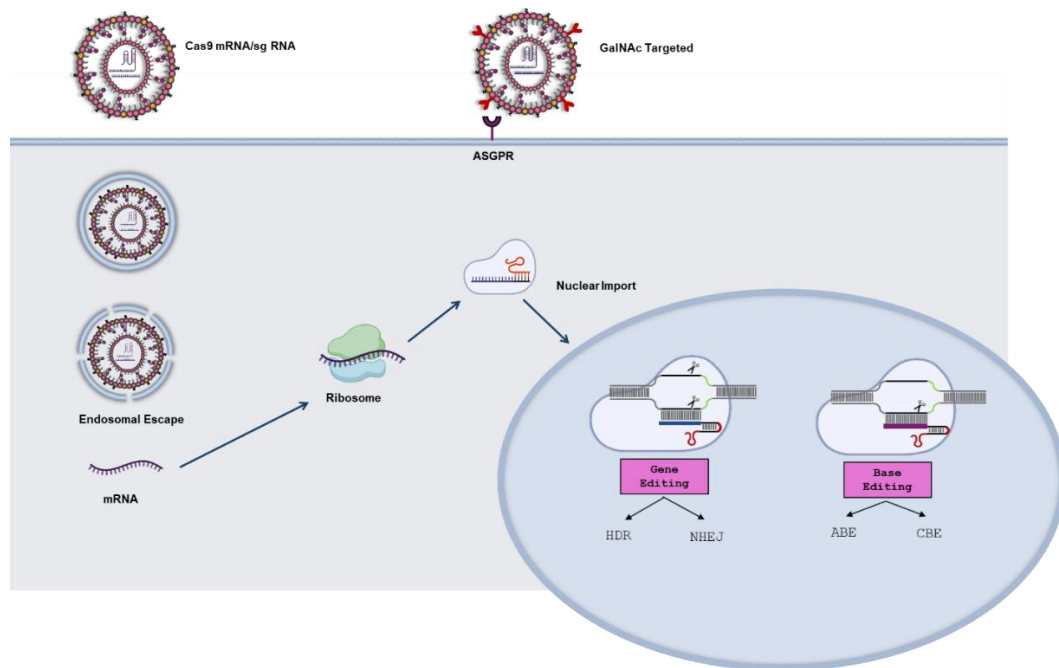
محل هدف خاص در ژنوم هدایت کند. هنگامی که sgRNA در محل هدف قرار می‌گیرد، با فعالیت نوکلئازی Cas9 برخورد می‌کند و منجر به ایجاد دو برش متوالی در DNA می‌شود. این برش‌ها منجر به شکستگی دو رشته‌ای DNA محلی (Double-strand break - DSB) می‌شوند. سپس سلول میزبان از دو مکانیسم اصلی، اتصال انتهای غیرهمسان (Non-Homologous End Joining - NHEJ) و ترمیم هدایت‌شده توسط همسانی (Homology-Directed Repair - HDR) برای ترمیم DSB استفاده می‌کند. هر دوی این مکانیسم‌ها پتانسیل دستکاری یکپارچگی ژنوم سلول میزبان را دارند و آن‌ها را برای اهداف مهندسی ژنتیک بسیار مرتبط می‌سازد. تکنیک‌های CRISPR/Cas9 این پتانسیل را دارند که اختلالات ژنتیکی را از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند حذف ژن، الحاق (درج)، اصلاح یا مهار بیان ژن برطرف کنند. با تغییر توالی در ناحیه قابل طراحی sgRNA می‌توان تغییرات دلخواه را در توالی واقع در نزدیکی موتیف مجاور پروتوسپیسر (Protospacer adjacent motif - PAM)، یک توالی ۳ نوکلئوتیدی خاص برای هر نوع Cas، ایجاد کرد [۸۰].

انتقال مستقیم نوکلئیک‌اسیدهایی مانند DNA پلاسمیدی یا mRNA کدکننده Cas9، برای ویرایش ژن درون بدن با موانع متعددی روبه‌رو است. LNP ها، پلیمرهای کاتیونی، لیپوزوم‌های کاتیونی و غیره می‌توانند CRISPR/Cas9 را انتقال دهند [۷۸،۸۰]. این بخش از مطالعه بر انتقال CRISPR/Cas9 با استفاده از LNP ها در بیماری هایپرکلسترولمی تمرکز دارد.

با استفاده از LNP ها می‌توان شکل‌های مختلفی از اجزای CRISPR را وارد سلول‌ها کرد. این سیستم می‌تواند سه محموله مختلف را انتقال دهد: پروتئین‌ها، پلاسمیدها و mRNA [۷۸]. روش‌های رایج شامل کپسوله کردن DNA پلاسمیدی (pDNA - Plasmid DNA) که هر دو پروتئین Cas9 و gRNA را کدگذاری می‌کند، Cas9 mRNA و gRNA به صورت جداگانه، یا مجموعه‌ای از Cas9/sgRNA (پروتئین/RNA) که به عنوان ریبونوکلوپروتئین (Ribonucleoprotein - RNP) شناخته می‌شود.

بنابراین، LNP ها سیستمی را برای انتقال تمام اجزای مورد نیاز در یک حامل واحد ارائه می‌دهند که امکان ویرایش قابل تنظیم ژنوم را فراهم می‌کند و در عین حال خطر سمیت را کاهش می‌دهد. گنجاندن لیپیدهای قابل یونیزاسیون برای کپسوله کردن موثر همه اشکال اجزای CRISPR/Cas9 ضروری است؛ زیرا فرار نسبت بالاتری از این اجزا از تخریب اندوزومی و انتشار بعدی آن‌ها را در سیتوزول تسهیل می‌کند [۲۰،۸۱].

خلاصه‌ای از تکنیک رایج برای درمان‌های ویرایش ژن و باز همراه با LNP ها در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل ۳. نانوذرات لیپیدی برای انتقال اجزای ویرایش ژن و ویرایش باز

"نانوذرات لیپیدی برای انتقال اجزای ویرایش ژن و ویرایش باز: سیستم Cas9 mRNA و gRNA [۸۵] آمیتوا ند گیرنده خاصی بر روی سطح سلول هدفمند شود. در این روش mRNA حاوی توالی کدکندهی هر دو پروتئین Cas9 و gRNA به سلول وارد میشود. سپس، هسته سلول میزبان، این توالی را رونویسی کرده و پروتئین و RNA مورد نیاز برای ویرایش ژن را تولید میکند. پس از آن، از دو مکانیسم اصلی ترمیم شکستگی دوطرفه (DSB DNA) شامل ترمیم هدایتشده توسط همسانی (HDR) و اتصال انتهایی غیر همسان (NHEJ) استفاده میکند. ویرایشگرهای باز شامل ویرایشگر باز سیتوزین (CBE) و ویرایشگر باز آدنین (ABE) هستند.

جهش‌های ژنتیکی نشان داده‌اند [۸۵].

در سال ۲۰۲۱، محققان از سیستم CRISPR/Cas9 برای ویرایش و کاهش بیان ANGPTL3 در موش‌های C57BL/6 استفاده کرده‌اند. آن‌ها از LNP 306-O12B برای ویرایش ژنوم اختصاصی کبد در داخل بدن استفاده کرده‌اند. این مطالعه نشان داده است که حتی پس از ۱۰۰ روز از یک دوز واحد (۳ میلی گرم بر کیلوگرم)، کاهش وابسته به دوز در سطوح ANGPTL3 (تقریباً ۶۰٪)، تری گلیسرید (حدود ۲۸٪) و LDL-C (تقریباً ۴۸٪) مشاهده شده است [۳۲].

گفتنی است، تعداد کارآزمایی‌های بالینی CRISPR هر ساله در حال افزایش است. بیش از ۸۰ کارآزمایی بالینی مبتنی بر CRISPR برای درمان و تشخیص سرطان، بیماری‌های خونی، سیستم ایمنی و بیماری‌های غدد درون‌ریز ثبت شده است [۸۶]. با این حال، بیشتر کارآزمایی‌های فعلی که از درمان‌های مبتنی بر CRISPR استفاده می‌کنند هنوز در مراحل اولیه هستند.

علاوه بر ویرایش ژن ناقل استاندارد CRISPR/Cas9، ویرایش مبتنی بر CRISPR ابزار دیگری برای ویرایش تک نوکلئوتیدها به روشی دقیق‌تر است. ویرایشگرهای باز پروتئین‌های مصنوعی هستند که از پروتئین‌های Cas9 همراه با یک دامیناز تشکیل شده‌اند، با یک gRNA (با پتانسیل محدود برای ویرایش) به DNA متصل می‌شوند و تنها یک رشته از DNA را می‌شکافند. دو شکل مهم ویرایش باز عبارتند از: (۱) ویرایشگر باز سیتوزین (Cytosine base editors - CBE)، سیتوزین را به تیمین و برعکس گوانین را به آدنین تبدیل می‌کند، (۲) ویرایشگر

سیستم ویرایش ژنوم CRISPR/Cas با واسطه LNP جهت درمان هایپرلیپیدمی

ابتدا سیستم CRISPR/Cas9 ابزاری درمانی برای اختلالات ژنتیکی در نظر گرفته شده است. با این حال، مطالعات اخیر نشان داده است که پتانسیل تبدیل شدن به درمانی برای سایر شرایط از جمله هایپرکلسترولمی را دارد [۸۲، ۸۳]. در این پژوهش، بر روی نمونه‌هایی از هایپرکلسترولمی، به عنوان کاربرد درمانی نوظهور ویرایش ژنوم تمرکز شده است. همان‌طور که پیشتر اشاره شد، درمان سنتی هایپرلیپیدمی شامل اصلاح سبک زندگی، تغییرات رژیم غذایی و استاتین‌ها است [۲]. یکی از محدودیت‌های اصلی داروهای کاهنده چربی خون رایج که به نام استاتین‌ها شناخته می‌شوند، نیاز به مصرف مکرر در طول عمر فرد به منظور دستیابی کامل به اثرات درمانی آن‌ها است. درمان‌های ویرایش ژنی پتانسیل زیادی برای ارائه یک درمان مقرون به صرفه با یک بار استفاده و اثر طولانی‌مدت فعال دارند. قابل ذکر است، استفاده از ویرایش CRISPR در PCSK9 یا ANGPTL3، به عنوان بهترین اهداف ژنتیکی تاییدشده برای درمان هایپرکلسترولمی خانوادگی، این پتانسیل را دارد که با یک رژیم درمانی واحد، همان مزایای درمانی را ارائه دهد و به اثرات درمانی بادوام دست یابد؛ در نتیجه، راه‌حلی دائمی برای این بیماران ارائه دهد [۷۲، ۸۴]. همان‌طور که در بخش قبلی بیان شد، چندین siRNA و ASO برای هایپرکلسترولمی خانوادگی در حال کارآزمایی بالینی هستند. با این حال، فناوری‌های ویرایش ژنوم، کارایی خود را در اصلاح دائمی

باز آدنین (Adenine base editor - ABE): آدنین را به گوانین و برعکس تیمین را به سیتوزین تبدیل می‌کند [۸۷]. با این حال، فعالیت خارج از هدف دغدغهای در استفاده بالقوه از ویرایشگرهای باز برای درمان بیماری‌های ژنتیکی است [۸۸].

با توجه به درمان‌های مبتنی بر CRISPR، شرکت Verve Therapeutics داروی VERVE-101 را برای ویرایش باز به صورت درون‌تنی با CRISPR طراحی کرده است. این برای تغییر یک تک باز DNA در ژن PCSK9 طراحی شده است. هدف از این تغییر، خاموش کردن دائمی تولید پروتئین کبدی است که منجر به کاهش پایدار LDL-C می‌شود. آن‌ها آزمایش‌هایی را بر روی پستانداران غیر انسانی و فرزندان نسل F1 موش برای بررسی کارایی، دوام و پتانسیل ویرایش سلول‌های زایای VERVE-101 انجام داده‌اند. نتایج نشان‌دهنده کاهش ۸۳ درصدی پروتئین PCSK9 خون و کاهش ۶۹ درصدی LDL-C بود. این اثرات تا ۴۷۶ روز پس از مصرف ادامه داشت. بر اساس این نتایج، اولین کارآزمایی بالینی بر روی انسان برای بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزیگوت و بیماری قلبی - عروقی آترواسکلروتیک آغاز شده است [۸۹].

شرکت Verve Therapeutics در سال ۲۰۲۲ برای بررسی کارایی سیستم انتقال LNP (VERVE-101) برای یک زیرگروه خاص از هایپرکلسترولمی خانوادگی، کارآزمایی بالینی فاز ۱b heart-1 (NCT05398029) را آغاز کرده است [۹۰]. این اولین کارآزمایی «ویرایش باز» در انسان برای هایپرکلسترولمی خانوادگی است. در این کارآزمایی، از یک ویرایشگر باز استفاده می‌شود که نوعی ابزار ویرایش مبتنی بر CRISPR است که امکان اصلاحات دقیق در توالی‌های DNA را بدون ایجاد شکستگی‌های دوگانه رشته‌ای فراهم می‌کند. در این کارآزمایی، ویرایشگر باز آدنین با استفاده از LNP ها برای جایگزینی A به G در محل خاصی از ژن PCSK9 انتقال می‌یابد. این کار بیان ژن را برای کاهش سطح PCSK9 در گردش و LDL-C مختل می‌کند. اجتناب از شکستگی‌های دوگانه رشته‌ای قابل توجه است؛ زیرا خطرات بالقوه مرتبط با آسیب سلولی را کاهش می‌دهد. در نتیجه، ویرایش باز خود را به عنوان جایگزینی بالقوه ایمن‌تر برای روش‌های ویرایش سنتی مبتنی بر CRISPR نشان می‌دهد [۸۵]. در این کارآزمایی خاص، ویرایشگر باز برای ایجاد تغییر تک نوکلئوتیدی در ژن PCSK9 طراحی شده است.

علاوه بر این، VERVE-102، یک ژن‌درمانی توسعه‌یافته با Verve Therapeutics، برای هدف قرار دادن ژن PCSK9 به منظور کاهش سطح LDL-C طراحی شده است. این درمان از یک فناوری

انتقال پیشرفته به نام Multi-valent N- GalNAc-LNP - acetylgalactosamine استفاده می‌کند که پیش‌بینی می‌شود منجر به کاهش عوارض جانبی و پاسخ بالینی قوی‌تر شود. این درمان به گونه‌ای طراحی شده است که یک درمان تک‌دوره‌ای باشد که به طور دائمی ژن PCSK9 در کبد را برای کاهش سطح LDL-C خاموش می‌کند و برای افراد مبتلا به هایپرکلسترولمی خانوادگی هتروزیگوت یا بیماری عروق کرونر زودرس در نظر گرفته شده است. Verve Therapeutics قصد داشته است کارآزمایی بالینی فاز 1b برای VERVE-102 را در نیمه اول سال ۲۰۲۴ آغاز کند [۹۱].

با توجه به اینکه گیرنده (ASGPR) asialoglycoprotein به طور گسترده در کبد بیان می‌شود، می‌توان از لیگاند‌هایی مانند N-استیل گالاکتوزامین چندظرفیتی (GalNAc) برای تزیین LNP ها و تسهیل جذب از طریق این گیرنده استفاده کرد. جالب اینجاست که از این روش برای درمان ویرایش باز CRISPR برای هدف قرار دادن ژن ANGPTL3 استفاده شده است.

شرکت Verve Therapeutics داروی VERVE-201 را به عنوان یک داروی ویرایش‌کننده باز آدنین برای هدف قرار دادن ANGPTL3 برای ویرایش کبد مستقل از LDLR توسعه داده است. انتظار می‌رود لیگاند هدفمند GalNAc در LNP VERVE-201 امکان انتقال مستقل از LDLR را فراهم کند. VERVE-201 برای درمان هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت، که یک اختلال ژنتیکی نادر است، ساخته شده است. این اختلال می‌تواند باعث کمبود شدید یا کامل LDLR شود که منجر به سطوح بالای LDL-C و بیماری عروق کرونر آترواسکلروتیک زودرس (ASCVD) شود. VERVE-201 همچنین ANGPTL3 را در کبد غیرفعال می‌کند که غلظت LDL-C را کاهش می‌دهد و به درمان ASCVD کمک می‌کند. علاوه بر این، درمان با GalNAc-LNP ها در شش پستاندار غیر انسانی با کمبود LDL-R منجر به ویرایش ۶۱ درصدی ANGPTL3 و کاهش ۸۹ درصدی پروتئین ANGPTL3 خون شده است. در نتیجه، کلسترول LDL در گردش خون نیز ۳۵ درصد کاهش یافته است. همه این داده‌های پیش‌بالینی نشان‌دهنده اثربخشی بالقوه VERVE-201 در سلول‌های اولیه انسانی، موش‌ها و پستانداران غیر انسانی هستند [۹۲-۹۴].

جدول‌های (۱) و (۲) به ترتیب مروری بر استفاده از LNP برای ویرایش ژن و ویرایش باز در درمان هایپرکلسترولمی با هدف ژن ANGPTL3 و PCSK9 و در مدل‌های پیش‌بالینی را نشان می‌دهد. همچنین جدول (۳) مروری بر استفاده از LNP برای ویرایش ژن و ویرایش باز در درمان هایپرکلسترولمی در مطالعات بالینی را نمایش می‌دهند.

جدول ۱. استفاده از LNP برای ویرایش ژن و ویرایش باز در درمان هایپرکلسترولمی با هدف ژن ANGPTL3 در مدل‌های پیش‌بالینی

منبع	توضیحات/ نتیجه	مدل	راه تجویز	روش ویرایش	LNP اجزای
[۳۲]	تفاوتی در (Triglyceride - TG) (aspartate aminotransferase - AST) / (alanine aminotransferase - ALT) وجود ندارد.	C57BL/6 موش	وریدی	CRISPR	lipidoid زیست تجزیه‌پذیر (DOPC, 306-O12B). کلیسترول و DMG-PEG

[۹۲]	↑ متوسط در سیتوکاین‌های سرم ویرایش ANGPTL3 کبدی پاسخگو به دز ↓ پروتئین ANGPTL3 خون غلظت‌های پایین‌تر (LDL-C) برای درمان بیماری‌های قلبی-عروقی آترواسکلروتیک (ASCVD)	موش (وحشی، -/+ LDLR، و -/- LDLR)	وریدی	ویرایشگر باز	VERVE-201 Gal-Nac LNP
[۹۴]	↓ ANGPTL3 سرمی، TG و LDL-C ↑ ALT و AST که تا روز ۱۴ در پستانداران غیر انسانی به طور کامل برطرف شد	موش (مدل بیماری هایپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت، و -/- LDLR) میمون‌های سینومولگوس	وریدی	ویرایشگر باز	VERVE-201 Gal-Nac LNP
[۹۳]	↓ پروتئین ANGPTL3 تا ۸۹٪ پس از تزریق ↓ ANGPTL3 سرمی	میمون سینومولگوس نر	وریدی	ویرایشگر باز	Gal-Nac LNP
[۹۵]	↓ < ۹۰٪ در PHHs ↓ پروتئین ANGPTL3 ↓ سطح تری‌گلسیرید	هیپاتوسیت‌های اولیه انسانی (Primary human hepatocytes - PHHs) درون‌تنی: موش C57BL/6J (وحشی، LDL-/-) و میمون‌های سینومولگوس	وریدی		CTX310

جدول ۲. استفاده از LNP برای ویرایش ژن و ویرایش باز در درمان هایپرکلسترولمی با هدف ژن PCSK9 در مدل‌های پیش‌بالینی

منبع	توضیحات / نتیجه	مدل	راه تجویز	روش ویرایش	LNP اجزای
[۹۶]	انتظار می‌رود SORT اصلاح ژن و درمان‌های جایگزین پروتئین را در بافت‌های خاص تسهیل کند.	C57BL/6 موش	وریدی	CRISPR	نانوذرات جهت هدف‌گیری انتخابی اندام (Selective Organ Targeting - SORT) (برای هدف قرار دادن بافت‌های خارج کبدی)
					نانوذرات شبه لیپیدی (Lipid like nanoparticle - LLN) (DOPE, TT3). کلسترول و DMG-PEG2000 Cas9 mRNA/sgRNA
[۹۷]	↓ بیان PCSK9 مهار بیان در سلول‌های HEK293T بیان‌کننده (enhanced green fluorescent protein - eGFP)	C57BL/6 موش	وریدی	CRISPR	LNP (DOPE, cKK-E12). کلسترول و C14-PEG2000 (Cas mRNA/ 2sgRNA)
					نانو ذرات لیپیدی زیست تجزیه‌پذیر BAMEA-O16B :LNP یکپارچه با پیوندهای دی سولفیدی) Cas9 mRNA/ sgRNA
[۹۸]	↓ بیان PCSK9 ↓ سطوح کلسترول (۳۵-۴۰٪)	موش	وریدی	CRISPR	نانوذرات لیپیدی (Dendrimer lipid nanoparticles - DLNPs) 5A2-DOT-5 های LNP دربرگیرنده PCSK9/sgRNA RNPs
					DSPC، کلسترول، PEG2000. لیپید قابل یونیزاسیون
[۹۹]	↓ بیان GFP در سلول‌های HEK ↓ سطح PCSK9 خون	C57BL/6 موش	وریدی	CRISPR	نانوذرات لیپیدی (Dendrimer lipid nanoparticles - DLNPs) 5A2-DOT-5 های LNP دربرگیرنده PCSK9/sgRNA RNPs
					DSPC، کلسترول، PEG2000. لیپید قابل یونیزاسیون
[۱۰۰]	بازگرداندن بیان دیستروفین در موش (Duchenne muscular dystrophy - DMD) ↓ سطح PCSK9 خون	C57BL/6 موش	وریدی	CRISPR	نانوذرات لیپیدی (Dendrimer lipid nanoparticles - DLNPs) 5A2-DOT-5 های LNP دربرگیرنده PCSK9/sgRNA RNPs
					DSPC، کلسترول، PEG2000. لیپید قابل یونیزاسیون
[۱۰۱]	↓ سطح PCSK9 خون ↓ سطح LDL-C خون ویرایش PCSK9 تمام کبد	میمون سینومولگوس نر	وریدی	ویرایشگر باز	VERVE-101
[۱۰۲]	↓ سطح LDL-C خون ↓ سطح PCSK9 خون	میمون سینومولگوس نر (Macaca) (fascicularis)	وریدی	ویرایشگر باز	VERVE-101
[۸۹]	↓ سطح LDL-C خون ↓ سطح PCSK9 خون	میمون سینومولگوس	وریدی	ویرایشگر باز	VERVE-101

جدول ۳. استفاده از LNP برای ویرایش ژن و ویرایش باز در درمان هایپرکلسترولمی در مطالعات بالینی

منبع	توضیحات / نتیجه	مدل	راه تجویز	روش ویرایش	هدف	LNP جزای
[۹۰]	در بیماران مبتلا به ASCVD، HeFH، سطوح LDL-C کنترل نشده در مجموع ۱۳ بیمار با دوزهای مختلف mg/kg ۰/۱، mg/kg ۰/۳، mg/kg ۰/۴۵ و mg/kg ۰/۶ کاهش LDL-C از ۲۱٪ تا ۷۳٪ در شرکت کنندگان در دوز mg/kg ۰/۴۵ عوارض جانبی گذرا (ترومبوسیتوپنی و ALT) در ۱ شرکت کننده	مطالعه بالینی: فاز 1b-Heart-1 (NCT05398029)	وریدی	ویرایشگر باز	PCSK9	VERVE-101 آمینولپید قابل یونیزاسیون (Acuitas)
[۹۱]	در بیماران مبتلا به HeFH یا بیماری عروق کرونر زودرس پیش‌بینی می‌شود کارایی درمان از طریق هدف‌گیری سلول‌های کبدی با LDLR یا گیرنده‌های آسialogلیکوپروتئین (ASGPR) بهبود یابد.	مطالعه بالینی: فاز 1b-Heart-2 (NCT06164730)	وریدی	ویرایشگر باز	PCSK9	VERVE-102 آمینولپید قابل یونیزاسیون (Novartis) لیگاند هدف‌گیری کبد GalNAc
CRISPR Therapeutics Company	در بیماران مبتلا به هایپرکلسترولمی (HoFH/HeFH) یا هایپرتریگلیسریدمی کاهش غلظت لیپوپروتئین آتروژنیک	مطالعه بالینی: فاز ۱	وریدی	CRISPR	ANGPTL3	CTX310

پیشرفت‌های آتی در تکنیک‌های ویرایش ژن نویدبخش منافع دائمی «تک‌درمانی» برای بسیاری از بیماری‌هاست.

نتیجه‌گیری

موفقیت واکسن‌های مبتنی بر mRNA علیه COVID-19، پتانسیل فرموله کردن اسیدهای نوکلئیک در نانوذرات لیپیدی را بیش از پیش نشان داده است. این مطالعه مروری به بررسی انتقال سیستم‌های CRISPR/Cas جهت درمان بیماری هایپرکلسترولمی با واسطه LNP می‌پردازد. قابل ذکر است ویرایش ژنی PCSK9 با استفاده از LNP-mRNA در حال انجام کارآزمایی‌های بالینی (NCT05398029، NCT06164730) است و ANGPTL3 نتایج پیش‌بالینی امیدوارکننده‌ای را در پیش بالین نشان داده است. براین اساس، درمان‌های مبتنی بر ویرایش ژن در آینده توانایی جایگزینی با برخی از داروهای بیولوژیک و دارودرمانی‌های فعلی را جهت درمان هایپرکلسترولمی خانوادگی که قبلاً غیر قابل درمان بوده‌اند، دارند. به احتمال زیاد این امر استفاده از LNP ها را جهت ویرایش ژن در سایر بیماری‌ها نیز تسریع خواهد کرد.

سپاس‌گزاری

از حمایت مرکز تحقیقات فناوری نانو دانشگاه مشهد علوم پزشکی قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

تعارض منافی وجود ندارد.

References

- Canepari C, Cantore A. Gene transfer and genome editing for familial hypercholesterolemia. Front Mol Med. 2023;3:1140997. [DOI: 10.3389/fmmed.2023.1140997] [PMID: 39086674]
- Hu P, Dharmayat KI, Stevens CA, Sharabiani MTA, Jones RS, Watts GF, et al. Prevalence of familial

- hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2020;**141**(22):1742–1759. [DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044795] [PMID: 32468833]
3. Fu Q, Hu L, Shen T, Yang R, Jiang L. Recent advances in gene therapy for familial hypercholesterolemia: an update review. *J Clin Med*. 2022;**11**(22):6773. [DOI: 10.3390/jcm11226773] [PMID: 36431249]
4. Parham JS, Goldberg AC. Mipomersen and its use in familial hypercholesterolemia. *Expert Opin Pharmac*. 2019;**20**(2):127–131. [DOI: 10.1080/14656566.2018.1550071] [PMID: 30526168]
5. Alonso R, Cuevas A, Mata P. Lomitapide: a review of its clinical use, efficacy, and tolerability. *Core Evid*. 2019;**14**:19–30. [DOI: 10.2147/CE.S174169] [PMID: 31308834]
6. Julius U. Lipoprotein apheresis in the management of severe hypercholesterolemia and of elevation of lipoprotein(a): current perspectives and patient selection. *Med Devices (Auckl)*. 2016;**9**:349–360. [DOI: 10.2147/MDER.S98889] [PMID: 27785114]
7. Sayed N, Allawadhi P, Khurana A, Singh V, Navik U, Pasumarthi SK, et al. Gene therapy: comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sci*. 2022;**294**:120375. [DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120375] [PMID: 35123997]
8. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PW, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target Ther*. 2021;**6**(1):53. [DOI: 10.1038/s41392-021-00487-6] [PMID: 33558455]
9. Kazemian P, Yu SY, Thomson SB, Birkenshaw A, Leavitt BR, Ross CJ. Lipid-nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 genome-editing components. *Mol Pharm*. 2022;**19**(6):1669–1686. [DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00916] [PMID: 35594500]
10. Wang C, Pan C, Yong H, Wang F, Bo T, Zhao Y, et al. Emerging non-viral vectors for gene delivery. *J Nanobiotechnology*. 2023;**21**(1):272. [DOI: 10.1186/s12951-023-02044-5] [PMID: 37592351]
11. Mehrabian A, Mashreghi M, Dadpour S, Badiie A, Arabi L, Hoda Alavizadeh S, et al. Nanocarriers call the last shot in the treatment of brain cancers. *Technol Cancer Res Treat*. 2022;**21**. [DOI: 10.1177/15330338221080974] [PMID: 35253549]
12. Ho JQ, Arabi L, Basu M, Khaled F, Gonzalez Y, Ghgelieu D, et al. Chapter 2 - Nanotechnology and nanomedicine. In: Mahmoudi M, editor. *Nanomedicine for Ischemic Cardiomyopathy*. 2020:9–21. [DOI:10.1016/B978-0-12-817434-0.00002-7]
13. Witzigmann D, Kulkarni JA, Leung J, Chen S, Cullis PR, van der Meel R. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;**159**:344–363. [DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.026] [PMID: 32622021]
14. Kulkarni JA, Witzigmann D, Thomson SB, Chen S, Leavitt BR, Cullis PR, et al. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nat Nanotechnol*. 2021;**16**(6):630–643. [DOI: 10.1038/s41565-021-00898-0] [PMID: 34059811]
15. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;**383**(27):2603–2615. [DOI: 10.1056/NEJMoa2034577] [PMID: 33301246]
16. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;**384**(5):403–416. [DOI: 10.1056/NEJMoa2035389] [PMID: 33378609]
17. Kulkarni JA, Cullis PR, Van Der Meel R. Lipid nanoparticles enabling gene therapies: from concepts to clinical utility. *Nucleic Acid Ther*. 2018;**28**(3):146–157. [DOI: 10.1089/nat.2018.0721] [PMID: 29683383]
18. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid nanoparticles— from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*. 2021;**15**(11):16982–7015. [DOI: 10.1021/acsnano.1c04996] [PMID: 34181394]
19. Xu L, Wang X, Liu Y, Yang G, Falconer RJ, Zhao CX. Lipid nanoparticles for drug delivery. *Adv NanoBiomed Res*. 2022;**2**(2):2100109. [DOI:10.1002/anbr.202100109]
20. Soroudi S, Jaafari MR, Arabi L. Lipid nanoparticle (LNP) mediated mRNA delivery in cardiovascular diseases: Advances in genome editing and CAR T cell therapy. *J Control. Release*. 2024;**372**:113–140. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.06.023] [PMID: 38876358]
21. Terada T, Kulkarni JA, Huynh A, Chen S, van der Meel R, Tam YYC, et al. Characterization of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids using design-of-experiments approach. *Langmuir*. 2021;**37**(3):1120–1128. [DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c03039] [PMID: 33439022]
22. Li Z, Zhang XQ, Ho W, Li F, Gao M, Bai X, et al. Enzyme-Catalyzed One-Step Synthesis of Ionizable Cationic Lipids for Lipid Nanoparticle-Based mRNA COVID-19 Vaccines. *ACS Nano*. 2022;**16**(11):18936–18950. [DOI: 10.1021/acsnano.2c07822] [PMID: 36269150]
23. Ebrahimi Z, Badiie A, Mansourian M, Alipour Talesh G, Attar H, Arabi L, et al. Poly (I: C)-DOTAP cationic nanoliposome containing multi-epitope HER2-derived peptide promotes vaccine-elicited anti-tumor immunity in a murine model. *Immunol. Lett*. 2016;**176**:57–64. [DOI: 10.1016/j.imlet.2016.05.016]
24. Askarizadeh A, Mashreghi M, Mirhadi E, Mirzavi F, Shargh VH, Badiie A, et al. Doxorubicin-loaded liposomes surface engineered with the matrix metalloproteinase-2 cleavable polyethylene glycol conjugate for cancer therapy. *Cancer Nanotechnol*. 2023;**14**(1):18. [DOI: 10.1186/s12645-023-00169-8] [PMID: 36910721]
25. Tang X, Zhang Y, Han X. Ionizable Lipid Nanoparticles for mRNA Delivery. *Adv NanoBiomed Res*. 2023;**3**(8):2300006. [DOI:10.1002/anbr.202300006]
26. Chatterjee S, Kon E, Sharma P, Peer D. Endosomal escape: a bottleneck for LNP-mediated therapeutics. *Proc Natl Acad Sci*. 2024;**121**(11):e2307800120. [DOI: 10.1073/pnas.2307800120] [PMID: 38437552]
27. Hafez IM, Maurer N, Cullis PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther*. 2001;**8**(15):1188–1196. [DOI: 10.1038/sj.gt.3301506] [PMID: 11509950]
28. Hafez IM, Cullis PR. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001;**47**(2–3):139–148. [DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00103-X] [PMID: 11311989]
29. Álvarez-Benedicto E, Farbiak L, Ramírez M M, Wang X, Johnson LT, Mian O, et al. Optimization of phospholipid chemistry for improved lipid nanoparticle (LNP) delivery of messenger RNA (mRNA). *Biomater. Sci*. 2022;**10**(2):549–559. [DOI:10.1039/d1bm01454d] [PMID: 34904974]
30. Albertsen CH, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;**188**:114416. [DOI: 10.1016/j.addr.2022.114416] [PMID: 35787388]
31. Sun D, Lu ZR. Structure and function of cationic and ionizable lipids for nucleic acid delivery. *Pharm. Res*. 2023;**40**(1):27–46. [DOI: 10.1007/s11095-022-03460-2] [PMID: 36600047]
32. Qiu M, Glass Z, Chen J, Haas M, Jin X, Zhao X, et al. Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific in vivo genome editing of Angptl3. *Proc Natl Acad Sci*. 2021;**118**(10):e2020401118. [DOI: 10.1073/pnas.2020401118] [PMID: 33649229]
33. Fenton O, Kauffman K, McClellan R, Kaczmarek JC, Zeng

- MD, Andresen JL, et al. Customizable lipid nanoparticle materials for the delivery of siRNAs and mRNAs. *Angew. Chem Int Ed Eng.* 2018;**57**(41):13582–13586. [DOI: 10.1002/anie.201809056] [PMID: 30112821]
34. Han X, Zhang H, Butowska K, Swingle KL, Alameh MG, Weissman D, et al. An ionizable lipid toolbox for RNA delivery. *Nat Commun.* 2021;**12**(1):7233. [DOI: 10.1038/s41467-021-27493-0] [PMID: 34903741]
 35. Cheng X, Lee RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;**99**:129–137. [DOI: 10.1016/j.addr.2016.01.022] [PMID: 26900977]
 36. Yazdani M, Jalali S, Badiee A, Shariat S, Mansourian M, Arabi L, et al. Stimulation of tumor-specific immunity by p5 HER-2/neu generated peptide encapsulated in nano-liposomes with high phase transition temperature phospholipids. *Curr Drug Deliv.* 2017;**14**(4):492–502. [DOI: 10.2174/1567201813666160712164149] [PMID: 27411392]
 37. Kulkarni JA, Witzigmann D, Leung J, Tam YYC, Cullis PR. On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale.* 2019;**11**(45):21733–21739. [DOI:10.1039/c9nr09347h] [PMID: 31713568]
 38. Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs. *Nano lett.* 2015;**15**(11):7300–7306. [DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b02497] [PMID: 26469188]
 39. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry.* 1996;**35**(8):2521–2525. [DOI: 10.1021/bi950414i] [PMID: 8611555]
 40. Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat Commun.* 2020;**11**(1):983. [DOI: 10.1038/s41467-020-14527-2] [PMID: 32080183]
 41. Eygeris Y, Patel S, Jozic A, Sahay G. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery. *Nano lett.* 2020;**20**(6):4543–4549. [DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c01386] [PMID: 32375002]
 42. Pilkington EH, Suys EJ, Trevaskis NL, et al. From influenza to COVID-19: lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. *Acta biomater.* 2021;**131**:16–40. [DOI: 10.1016/j.actbio.2021.06.023] [PMID: 34153512]
 43. Mui BL, Tam YK, Jayaraman M, Ansell SM, Du X, Tam YY, et al. Influence of polyethylene glycol desorption rates on pharmacokinetics and pharmacodynamics of siRNA lipid nanoparticles. *Mol Ther-Nucleic Acids.* 2013; **2**(12): e139. [DOI: 10.1038/mtna.2013.66] [PMID: 24345865]
 44. Suzuki T, Suzuki Y, Hihara T, et al. PEG shedding-rate-dependent blood clearance of PEGylated lipid nanoparticles in mice: faster PEG shedding attenuates anti-PEG IgM production. *Int. J. Pharm.* 2020;**588**:119792. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119792] [PMID: 32827675]
 45. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013;**65**(1):36–48. [DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.037] [PMID: 23036225]
 46. Zukancic D, Suys EJ, Pilkington EH, Algarni A, Al-Wassiti H, Truong NP. The importance of poly (Ethylene glycol) and lipid structure in targeted gene delivery to lymph nodes by lipid nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2020;**12**(11):1068. [DOI: 10.3390/pharmaceutics12111068] [PMID: 33182382]
 47. Sarode A, Fan Y, Byrnes AE, Hammel M, Hura GL, Fu Y, Kou P, et al. Predictive high-throughput screening of PEGylated lipids in oligonucleotide-loaded lipid nanoparticles for neuronal gene silencing. *Nanoscale adv.* 2022;**4**(9):2107–2123. [DOI: 10.1039/d1na00712b] [PMID: 36133441]
 48. Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, Wallin S, Wu X, Kvist AJ, et al. Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018;**115**(15):E3351–E3360. [DOI: 10.1073/pnas.1720542115] [PMID: 29588418]
 49. Lila ASA, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. *J. Control. Release.* 2013;**172**(1):38–47.
 50. Tenchov R, Sasso JM, Zhou QA. PEGylated lipid nanoparticle formulations: immunological safety and efficiency perspective. *Bioconjug. Chem.* 2023; **34**(6):941–960. [DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.3c00174] [PMID: 37162501]
 51. Wang X, Ishida T, Kiwada H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J Control Release.* 2007;**119**(2):236–244. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.026]
 52. Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology.* 2005;**216**(2–3):106–21. [DOI: 10.1016/j.tox.2005.07.023] [PMID: 16140450]
 53. Fang Y, Xue J, Gao S, Lu A, Yang D, Jiang H, et al. Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the “PEG dilemma” in efficient drug delivery. *Drug Deliv.* 2017;**24**(2):22–32. [DOI: 10.1080/10717544.2017.1388451] [PMID: 29069920]
 54. Hoang Thi TT, Pilkington EH, Nguyen DH, Lee JS, Park KD, Truong NP. The importance of poly (ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation. *Polymers.* 2020;**12**(2):298. [DOI: 10.3390/polym12020298] [PMID: 32024289]
 55. Simon L, Taddeo MD, Coeurvolan A, Colpaert M, Richard J, Devoisselle JM, et al. Various lipid anchors on amphiphilic polyoxazolines to reach efficient intracellular delivery. *Int J Pharm.* 2023; **642**:123103. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123103] [PMID: 37277088]
 56. Lila ASA, Nawata K, Shimizu T, Ishida T, Kiwada H. Use of polyglycerol (PG), instead of polyethylene glycol (PEG), prevents induction of the accelerated blood clearance phenomenon against long-circulating liposomes upon repeated administration. *Int J Pharm.* 2013;**456**(1):235–42. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.059] [PMID: 23928149]
 57. Berger M, Toussaint F, Djemaa SB, Laloy J, Pendeveille H, Evrard B, et al. Poly(vinyl pyrrolidone) derivatives as PEG alternatives for stealth, non-toxic and less immunogenic siRNA-containing lipoplex delivery. *J Control Release.* 2023;**361**:87–101. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.07.031] [PMID: 37482343]
 58. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; **99**:28–51. [DOI: 10.1016/j.addr.2015.09.012] [PMID: 26456916]
 59. Kierstead PH, Okochi H, Venditto VJ, Chuong TC, Kivimae S, Fréchet JM, et al. The effect of polymer backbone chemistry on the induction of the accelerated blood clearance in polymer modified liposomes. *J Control Release.* 2015; **213**:1–9. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.06.023] [PMID: 26093095]
 60. Whiteman KR, Subr V, Ulbrich K, Torchilin VP. Poly (HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice. *J Liposome Res.* 2001;**11**(2–3):153–164. [DOI: 10.1081/LPR-100108459] [PMID: 19530930]
 61. Romberg B, Metselaar JM, Baranyi L, Snel CJ, Büniger R, Hennink WE, et al. Poly (amino acid) s: promising enzymatically degradable stealth coatings for liposomes. *Int J Pharm.* 2007;**331**(2):186–189.

- [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.018] [PMID: 17145145]
62. López-Estévez AM, Lapuhs P, Pineiro-Alonso L, Alonso MJ. Personalized cancer nanomedicine: overcoming biological barriers for intracellular delivery of biopharmaceuticals. *Adv Mater*. 2023;**36**(14):2309355. [DOI:10.1002/adma.202309355]
 63. Yang Z, Ji P, Li Z, et al. Improved extracellular vesicle-based mRNA delivery for familial hypercholesterolemia treatment. *Theranostics*. 2023;**13**(10):3467-3479. [DOI: 10.7150/thno.82873] [PMID: 37351166]
 64. Gupta N, Sharma N, Mathur SK, Chandra R, Nimesh S. Advancement in nanotechnology-based approaches for the treatment and diagnosis of hypercholesterolemia. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;**46**(sup1):188-197. [DOI: 10.1080/21691401.2017.1417863] [PMID: 29265888]
 65. Ruscica M, Zimetti F, Adorni MP, Sirtori CR, Lupo MG, Ferri N. Pharmacological aspects of ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibitors: new therapeutic approaches for the treatment of atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Res*. 2020; **153**:104653. [DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104653] [PMID: 31931117]
 66. Momtazi-Borojeni AA, Jaafari MR, Badiie A, Sahebkar A. Long-term generation of antiPCSK9 antibody using a nanoliposome-based vaccine delivery system. *Atherosclerosis*. 2019; **283**:69-78. [DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.02.001] [PMID: 30797988]
 67. Krzemińska J, Młynarska E, Radzioch E, Wronka M, Rysz J, Franczyk B. Management of familial hypercholesterolemia with special emphasis on evinacumab. *Biomedicines*. 2022 ;**10**(12):3273. [DOI: 10.3390/biomedicines10123273] [PMID: 36552028]
 68. Di Taranto MD, Fortunato G. Genetic heterogeneity of familial hypercholesterolemia: repercussions for molecular diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2023;**24**(4):3224. [DOI: 10.3390/ijms24043224] [PMID: 36834635]
 69. Wan C, Allen TM, Cullis PR. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv Transl Res*. 2014; **4**:74-83. [DOI: 10.1007/s13346-013-0161-z] [PMID: 25786618]
 70. Iskandar SE, Bowers AA. mRNA display reaches for the clinic with new PCSK9 inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2022;**13**(9):1379-83. [DOI: 10.1021/acsmchemlett.2c00319] [PMID: 36105330]
 71. Ballantyne CM, Banka P, Mendez G, et al. Phase 2b randomized trial of the oral PCSK9 inhibitor MK-0616. *J Am Coll Cardiol*. 2023;**81**(16):1553-1564. [DOI: 10.1016/j.jacc.2023.02.018] [PMID: 36889610]
 72. Blom DJ, Marais AD, Moodley R, van der Merwe N, van Tonder A, Raal FJ. RNA-based therapy in the management of lipid disorders: a review. *Lipids Health Dis*. 2022;**21**(1):41. [DOI: 10.1186/s12944-022-01649-3] [PMID: 35459248]
 73. Cooke JP, Youker KA. Future impact of mRNA therapy on cardiovascular diseases. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2022;**18**(5):64. [DOI:10.14797/mdcvj.1169] [PMID: 36561087]
 74. Boada C, Sukhovshin R, Pettigrew R, Cooke JP. RNA therapeutics for cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2021;**36**(3):256-263. [DOI: 10.1097/HCO.0000000000000850] [PMID: 33709981]
 75. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, Mezzetti A, Pacia S, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*. 2012;**220**(2):381-386. [DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.026] [PMID: 22176652]
 76. Li Z, Zhao P, Zhang Y, Wang J, Wang C, Liu Y, et al. Exosome-based Ldlr gene therapy for familial hypercholesterolemia in a mouse model. *Theranostics*. 2021;**11**(6):2953. [DOI: 10.7150/thno.49874] [PMID: 33456582]
 77. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med*. 2019;**25**(2):249-254. [DOI: 10.1038/s41591-018-0326-x] [PMID: 30692695]
 78. Duan L, Ouyang K, Xu X, Xu L, Wen C, Zhou X, et al. Nanoparticle delivery of CRISPR/Cas9 for genome editing. *Front Genet*. 2021; **12**:673286. [DOI: 10.3389/fgene.2021.673286] [PMID: 34054927]
 79. Sofias AM, Lammers T. Multidrug nanomedicine. *Nat Nanotechnol*. 2023;**18**(2):104-106. [DOI: 10.1038/s41565-022-01265-3] [PMID: 36805554]
 80. Rahimi H, Salehiabar M, Charimi J, Barsbay M, Ghaffarlou M, Roohi Razlighi M, et al. Harnessing nanoparticles for the efficient delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Nano Today*. 2020; **34**:100895. [DOI: 10.1016/j.nantod.2020.100895]
 81. Yip BH. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules*. 2020;**10**(6):839. [DOI: 10.3390/biom10060839] [PMID: 32486234]
 82. Vermersch E, Jouve C, Hulot JS. CRISPR/Cas9 gene-editing strategies in cardiovascular cells. *Cardiovasc Res*. 2020;**116**(5):894-907. [DOI: 10.1093/cvr/cvz250] [PMID: 31584620]
 83. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;**5**(1):1. [DOI: 10.1038/s41392-019-0089-y] [PMID: 32296011]
 84. Chadwick AC, Evitt NH, Lv W, Musunuru K. Reduced blood lipid levels with in vivo CRISPR-Cas9 base editing of ANGPTL3. *Circulation*. 2018;**137**(9):975-977. [DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031335] [PMID: 29483174]
 85. Musunuru K. CRISPR and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2023;**119**(1):79-93. [DOI: 10.1093/cvr/cvac048] [PMID: 35388882]
 86. Zhang S, Wang Y, Mao D, Wang Y, Zhang H, Pan Y, et al. Current trends of clinical trials involving CRISPR/Cas systems. *Front Med*. 2023; **10**:1292452. [DOI: 10.3389/fmed.2023.1292452] [PMID: 38020120]
 87. Hurley A, Lagor WR. Treating cardiovascular disease with liver genome engineering. *Curr Atheroscler Rep*. 2022;**24**(2):75-84. [DOI: 10.1007/s11883-022-00986-z] [PMID: 35230602]
 88. Villiger L, Rothgangl T, Witzigmann D, Oka R, Lin PJC, Qi W, et al. In vivo cytidine base editing of hepatocytes without detectable off-target mutations in RNA and DNA. *Nat Biomed Eng*. 2021;**5**(2):179-189. [DOI: 10.1038/s41551-020-00671-z] [PMID: 33495639]
 89. Lee RG, Mazzola AM, Braun MC, Platt C, Vafai SB, Kathiresan S, et al. Efficacy and safety of an investigational single-course CRISPR base-editing therapy targeting PCSK9 in nonhuman primate and mouse models. *Circulation*. 2023;**147**(3):242-253. [DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062132] [PMID: 36314243]
 90. Verve Therapeutics, Inc. A study of VERVE-101 in patients with familial hypercholesterolemia and cardiovascular disease. 2020. [Link]
 91. Verve Therapeutics, Inc. Open-label, phase 1b, single ascending dose study to evaluate the safety of VERVE-102 administered to patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or premature coronary artery disease who require additional lowering of low-density lipoprotein cholesterol. 2023. [Link]
 92. Lee R, Denizio J, Mizoguchi T, Dutta C, Clendaniel V, Garrity R, et al. An investigational in vivo base editing medicine targeting ANGPTL3, VERVE-201, achieves potent and LDLR-independent liver editing in mouse

- models. *Eur Heart J*. 2023;**44**(Supplement_2): ehad655. 2521. [DOI:10.1093/eurheartj/ehad655.2521]
93. Kasiewicz LN, Biswas S, Beach A, Ren H, Dutta C, Mazzola AM, et al. GalNAc-lipid nanoparticles enable non-LDLR dependent hepatic delivery of a CRISPR base editing therapy. *Nat Commun*. 2023;**14**(1):2776. [DOI: 10.1038/s41467-023-37465-1] [PMID: 37188660]
 94. Lee R, Denizio J, Dutta C, Hsu HT, Garrity R, Pacheco A, et al. Preclinical data supporting potential efficacy of VERVE-201-an investigational CRISPR base editing medicine targeting ANGPTL3-in primary human cells, mice, and non-human primates. *J Am Coll Cardiol*. 2023;**81**(8,Supplement):1115-1115. [DOI:10.1016/S0735-1097(23)01559-0]
 95. Morrow PK, Chen YS, Serwer L, Detwiller Z, Flanagan N, Koch E, et al. Abstract 16908: CTX310: An investigational in vivo CRISPR-based therapy efficiently and durably reduces ANGPTL3 protein and triglyceride levels in non-human primates after a single dose. *Circulation*. 2023;**148**(Suppl_1). [DOI:10.1161/circ.148.suppl_1.16908]
 96. Cheng Q, Wei T, Farbiak L, Johnson LT, Dilliard SA, Siegwart DJ. Selective organ targeting (SORT) nanoparticles for tissue-specific mRNA delivery and CRISPR-Cas gene editing. *Nat Nanotechnol*. 2020;**15**(4):313-320. [DOI: 10.1038/s41565-020-0669-6]
 97. Jiang C, Mei M, Li B, Zhu X, Zu W, Tian Y, et al. A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *Cell Res*. 2017;**27**(3):440-443. [DOI: 10.1038/cr.2017.16] [PMID: 28117345]
 98. Yin H, Song CQ, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym LH, et al. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. *Nat Biotechnol*. 2017;**35**(12):1179-1187. [DOI: 10.1038/nbt.4005] [PMID: 29131148]
 99. Liu J, Chang J, Jiang Y, Meng X, Sun T, Mao L, et al. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing in vivo enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv Mater*. 2019;**31**(33):1902575. [DOI: 10.1002/adma.201902575] [PMID: 31215123]
 100. Wei T, Cheng Q, Min YL, Olson EN, Siegwart DJ. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat Commun*. 2020;**11**(1):3232. [DOI: 10.1038/s41467-020-17029-3] [PMID: 32591530]
 101. Rothgangl T, Dennis MK, Lin PJ, Oka R, Witzigmann D, Villiger L, et al. In vivo adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol*. 2021;**39**(8):949-957. [DOI: 10.1038/s41587-021-00933-4] [PMID: 34012094]
 102. Musunuru K, Chadwick AC, Mizoguchi T, Garcia SP, DeNizio JE, Reiss CW, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates. *Nature*. 2021;**593**(7859):429-434. [DOI: 10.1038/s41586-021-03534-y] [PMID: 34012082]
 103. Onuma H, Sato Y, Harashima H. Lipid nanoparticle-based ribonucleoprotein delivery for in vivo genome editing. *J Control Release*. 2023; **355**:406-416. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.02.008] [PMID: 36773957]
 104. Sinclair F, Begum AA, Dai CC, Toth I, Moyle PM. Recent advances in the delivery and applications of nonviral CRISPR/Cas9 gene editing. *Drug Deliv Transl Res*. 2023;**13**(5):1500-1519. [DOI: 10.1007/s13346-023-01320-z] [PMID: 36988873]
 105. Mak MCE, Gurung R, Foo RSY. Applications of genome editing technologies in CAD research and therapy with a focus on atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2023 ;**24**(18):14057. [DOI: 10.3390/ijms241814057] [PMID: 37762360]
 106. Breier D, Peer D. Genome editing in cancer: challenges and potential opportunities. *Bioact Mater*. 2023; **21**:394-402. [DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.08.013] [PMID: 36185740]