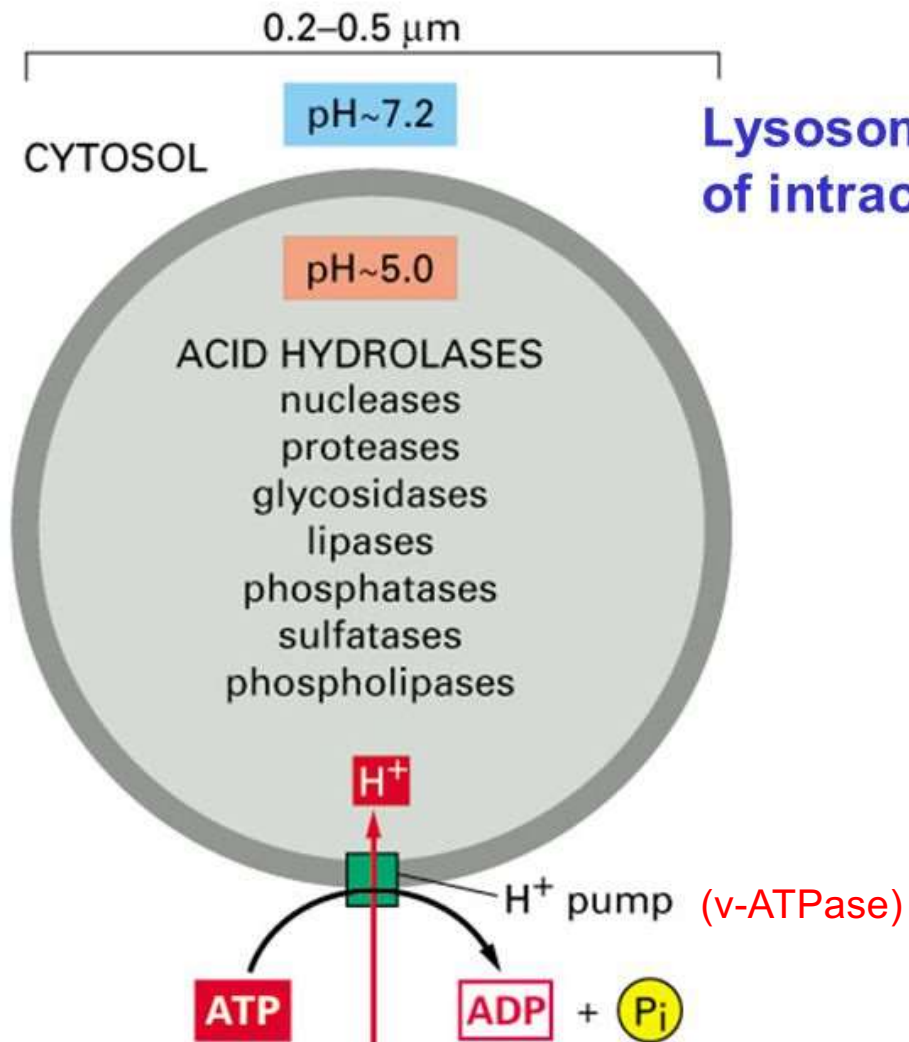


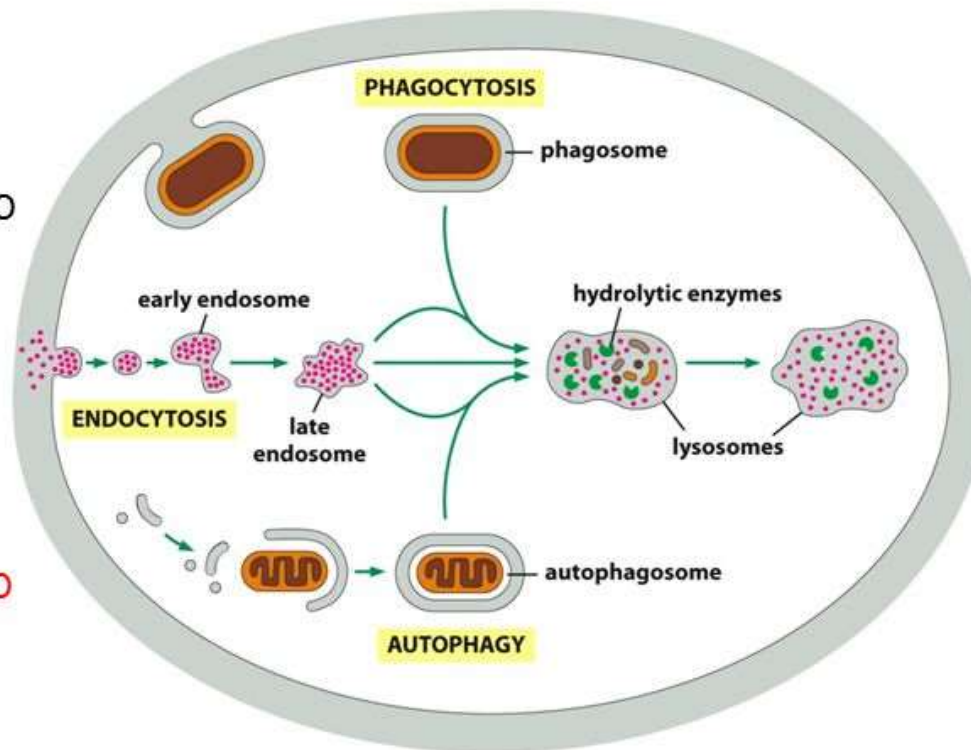


**Lysosome are the principal sites
of intracellular digestion**

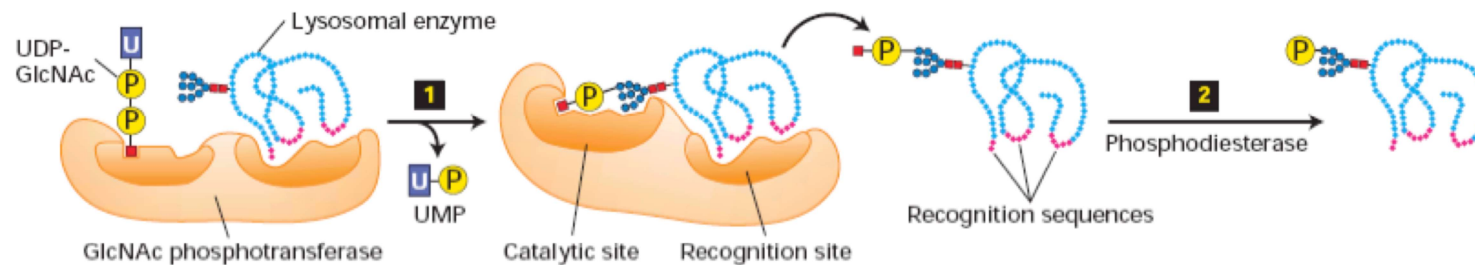
The lysosome - The cell dumping station!

Endocytosed, phagocytosed and autophagosomal material are trafficked to the lysosome for destruction!

Autophagy is the destruction of an organelle – envelopes organelle and takes it to the lysosome



The M6P residues that direct soluble proteins to lysosomes are generated in the *cis*-Golgi

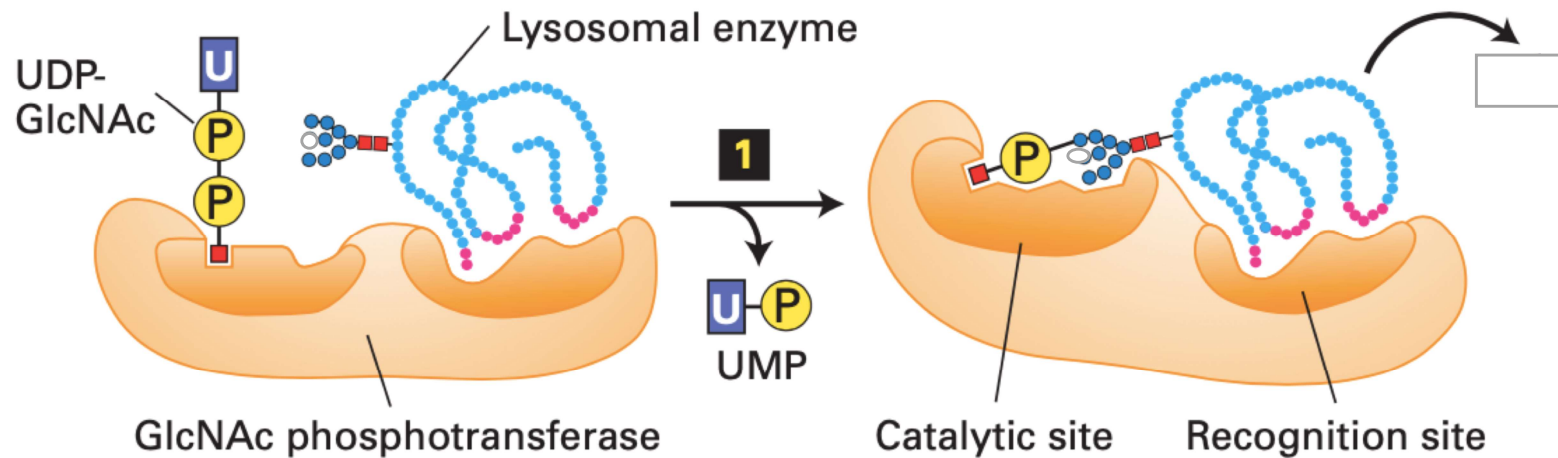


Formation of mannose 6-phosphate (M6P) residues that target soluble enzymes to lysosomes. The M6P residues that direct proteins to lysosomes are generated in the *cis*-Golgi by two Golgi-resident enzymes. Step **1**: An *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) phosphotransferase transfers a phosphorylated GlcNAc group to carbon atom 6 of one or more mannose residues. Because only lysosomal enzymes contain

sequences (red) that are recognized and bound by this enzyme, phosphorylated GlcNAc groups are added specifically to lysosomal enzymes. Step **2**: After release of a modified protein from the phosphotransferase, a phosphodiesterase removes the GlcNAc group, leaving a phosphorylated mannose residue on the lysosomal enzyme. [See A. B. Cantor et al., 1992, *J. Biol. Chem.* **267**:23349, and S. Kornfeld, 1987, *FASEB J.* **1**:462.]

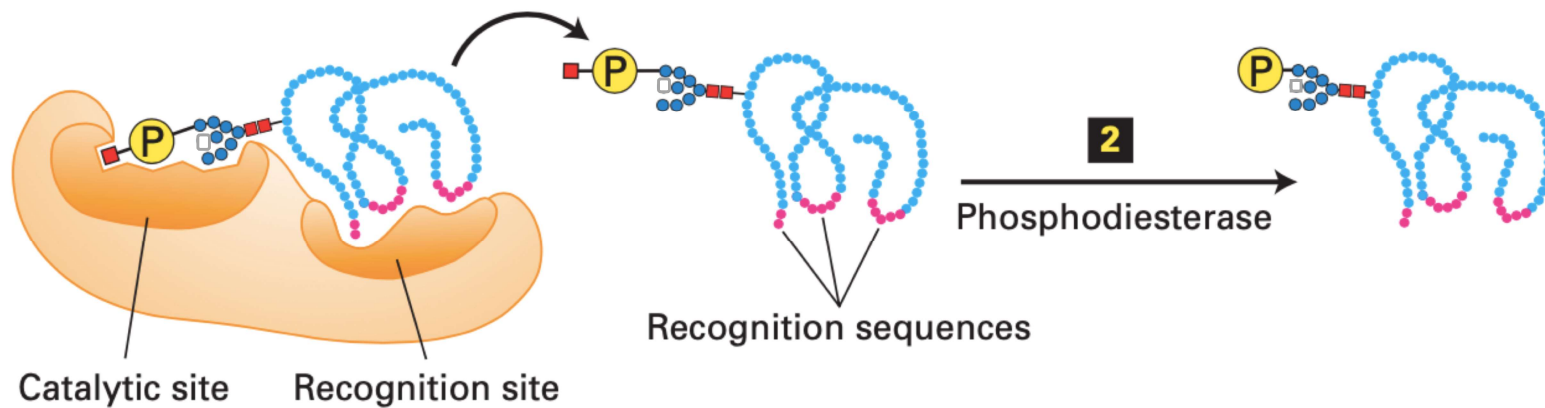
■ N-acetylglucosamine (GlcNAc)

The M6P residues that direct soluble proteins to lysosomes are generated in the *cis*-Golgi



■ N-acetylglucosamine (GlcNAc)

The M6P residues that direct soluble proteins to lysosomes are generated in the *cis*-Golgi



Assemblaggio del segnale mannosio 6-fosfato

RETICOLO ENDOPLASMATICO

Enzima lisosomiale

- Mannosio
- GlcNAc
- Fosfato

APPARATO DI GOLGI

Golgi cis

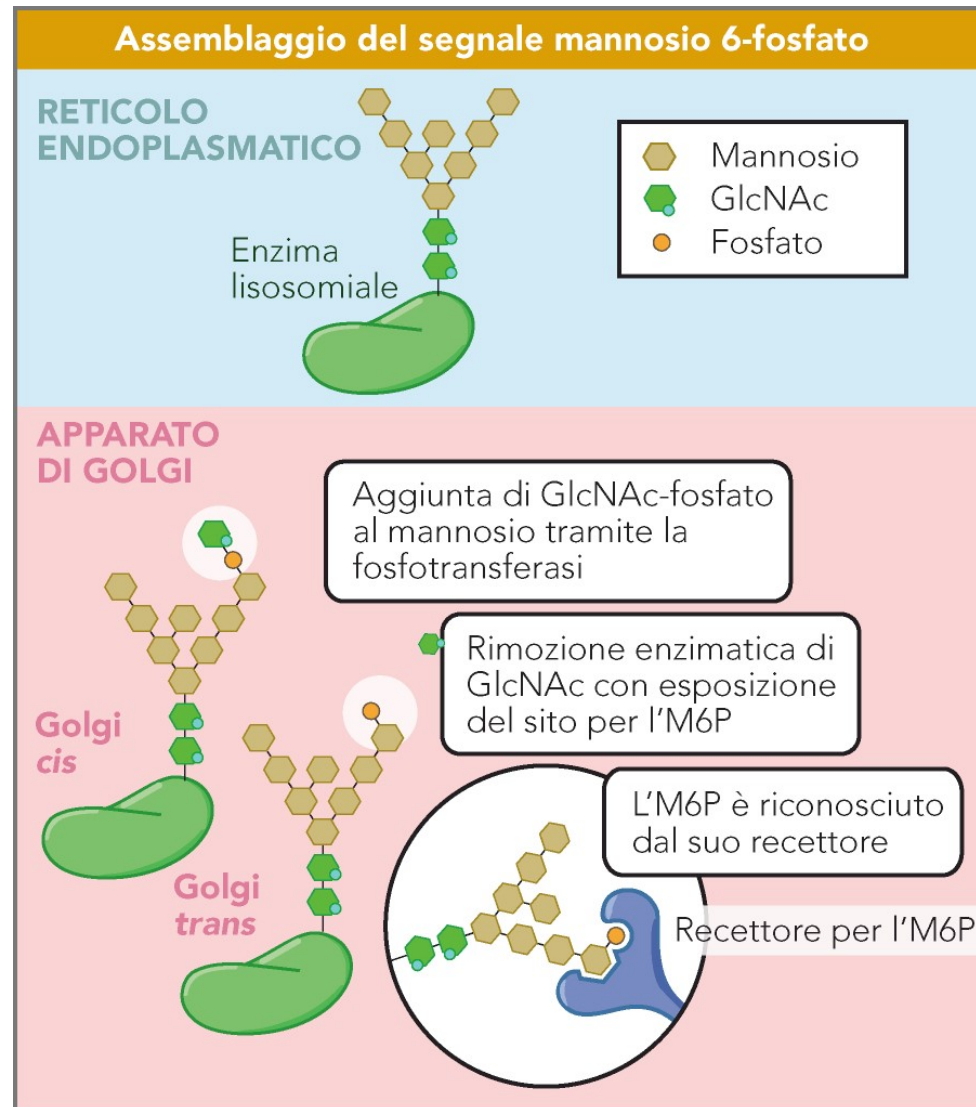
Golgi trans

Aggiunta di GlcNAc-fosfato al mannosio tramite la fosfotransferasi

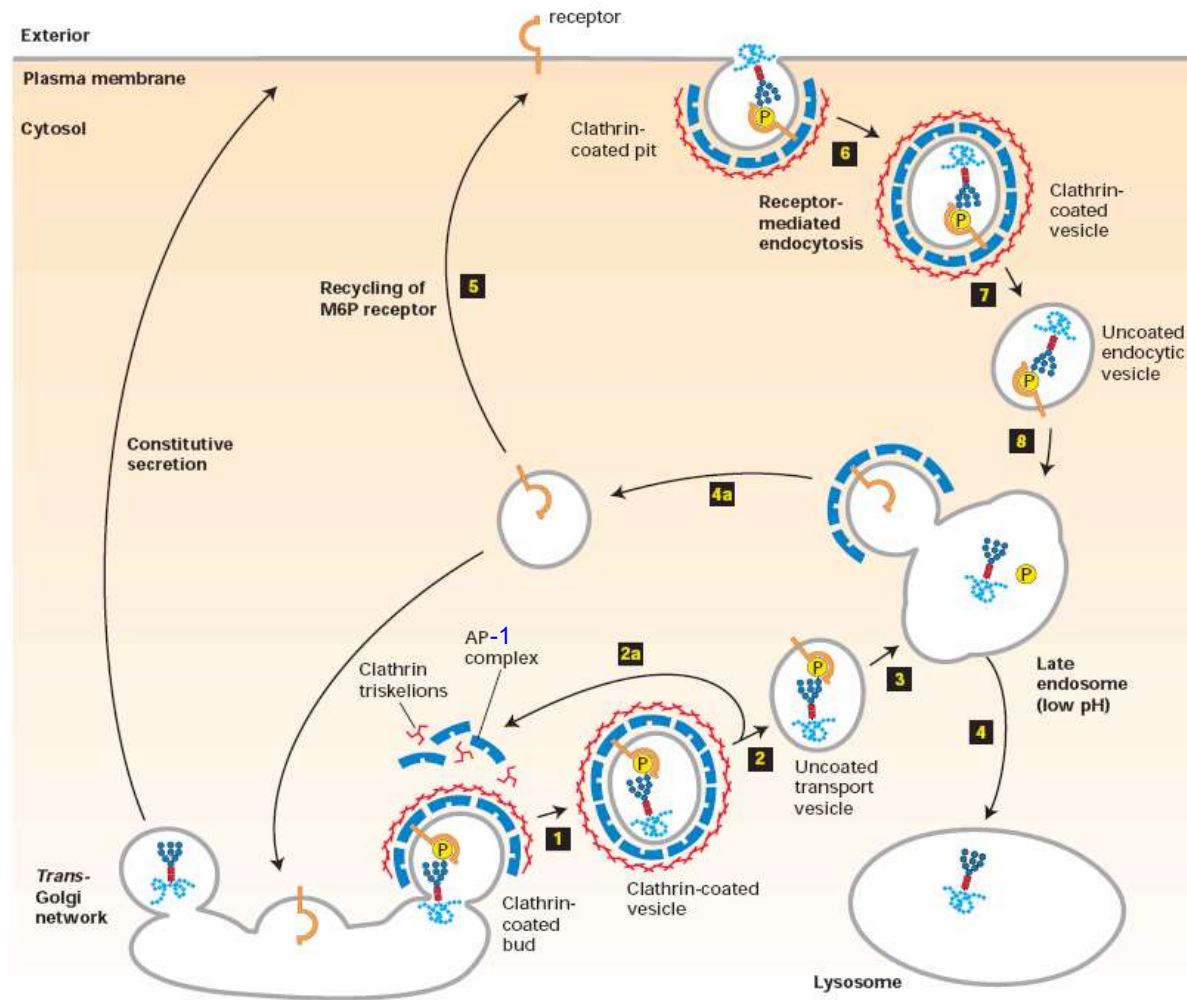
Rimozione enzimatica di GlcNAc con esposizione del sito per l'M6P

L'M6P è riconosciuto dal suo recettore

Recettore per l'M6P



Trafficking of soluble lysosomal enzymes from the TGN and cell surface to the lysosomes



Malattie da accumulo lisosomiali (ca. 50-60 tipi)

Sfingolipidosi

Sindrome di Gaucher (deficit di glucocerebrosidasi)

Sindrome di Tay-Sachs (deficit di esosaminidasi A)

Sindrome di Niemann-Pick (tipi A e B) (deficit di sfingomielinasi)

Mucopolisaccaridosi

Sindrome di Hurler (MPS tipo I) (deficit di α -L-iduronidasi)

Sindrome di Hunter (MPS type II) (deficit di iduronato-2-sulfatasi)

Sindrome di Sanfilippo A (MPS type III) (deficit di eparan N-sulfatasi)

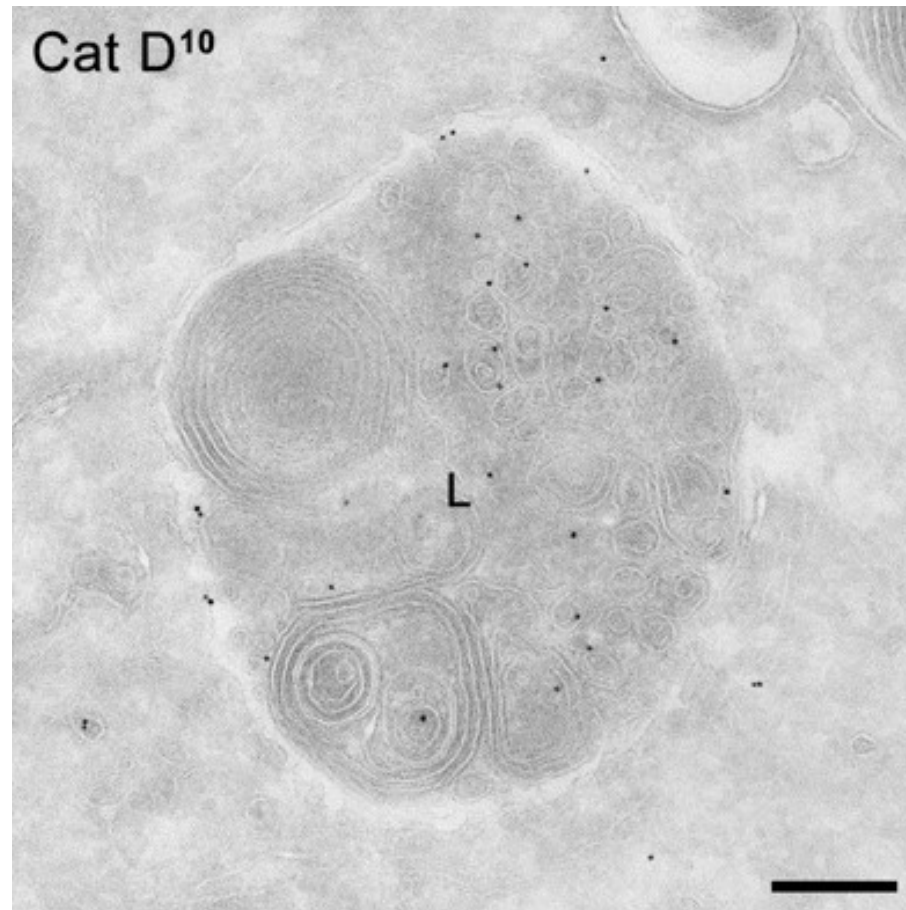
Sindrome di Morquio A (MPS type IV) (deficit di galattosio 6-sulfatasi)

Sindrome di Maroteaux-Lamy (MPS type VI) (deficit di arilsulfatasi B)

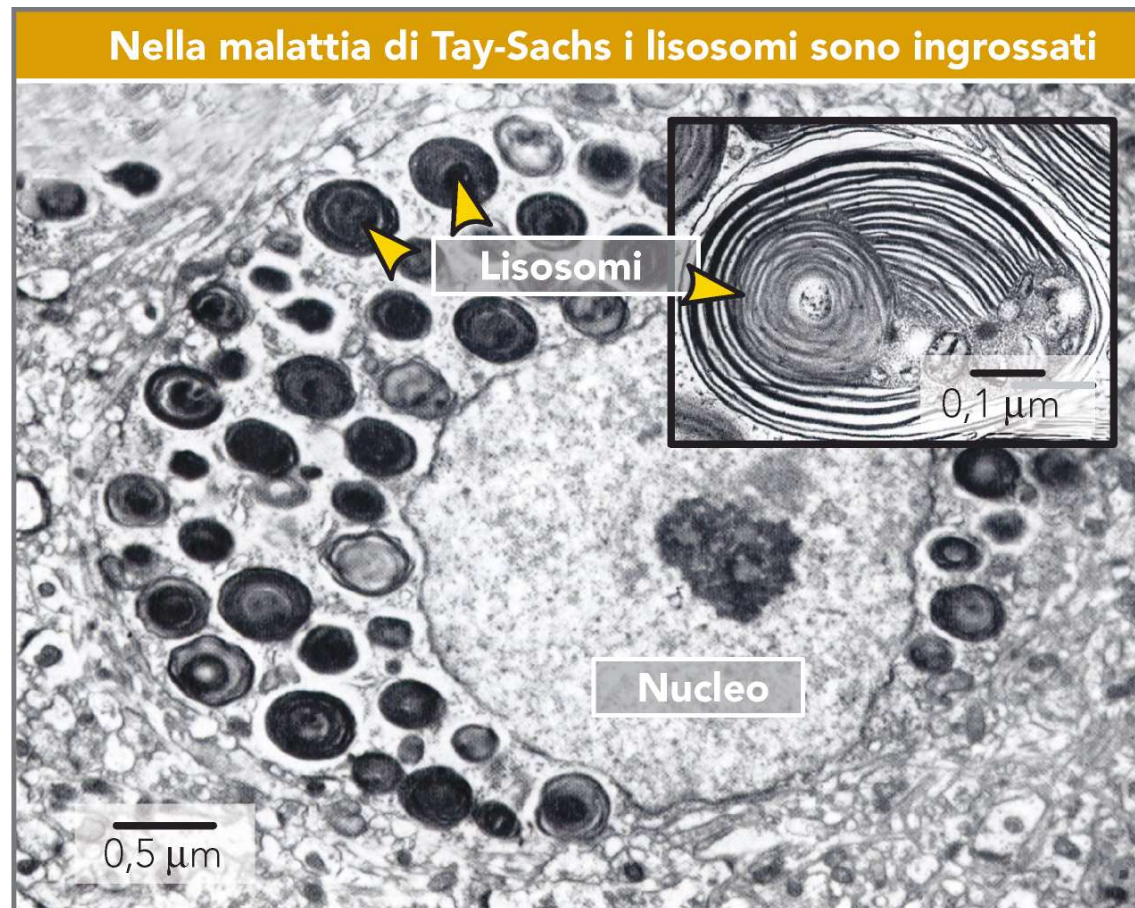
Sindrome di Sly (MPS type VII) (deficit di β -glucuronidasi)

I-cell disease (mucopolipidosis type II) deficit di GlcNAc-phosphotransferase

(There are high plasma levels of lysosomal enzymes, it is often fatal in childhood)

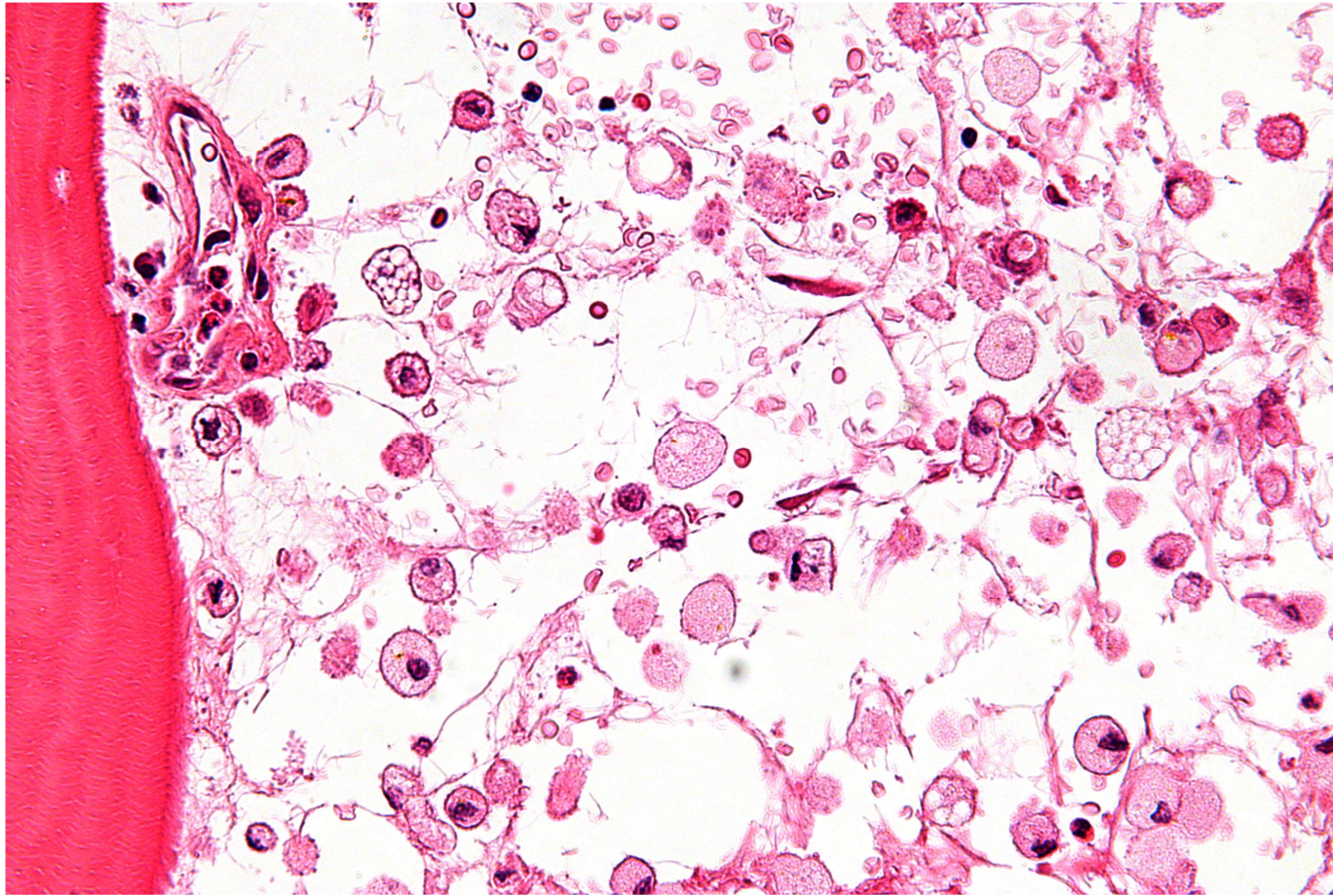


GM2 gangliosidosi, deficit di esosaminidasi A (Tay-Sachs) (accumulation of GM2)



Epileptic seizures, hearing loss, and inability to move, with death usually occurring by the age of 4

Gaucher disease (sphingolipidosis): deficit of β -glucocerebrosidase (cells that have the characteristic crumpled tissue paper-like cytoplasm)



Biopharmaceuticals (biologics)

The first such substance approved for therapeutic use was biosynthetic "human" insulin made via recombinant DNA. Sometimes referred to as rHI, under the trade name Humulin, was developed by Genentech, but licensed to Eli Lilly and Company, who manufactured and marketed it starting in 1982.

Biologics are much more expensive due to their complex manufacturing process.

Totaling US\$ 448 billion in global sales in 2023 (ca. 40% Mabs), biopharmaceutical medicines represent a growing share of the global pharmaceutical market.

Enzyme replacement therapy (ERT)

ERT is a medical treatment which replaces an enzyme that is deficient or absent in the body. Usually, this is done by giving the patient an intravenous (IV) infusion of a solution containing the enzyme.

ERT is currently available for some lysosomal storage diseases: Gaucher disease, Fabry disease, MPS I, MPS II (Hunter syndrome), MPS VI and Pompe disease. ERT does not correct the underlying genetic defect, but it increases the concentration of the enzyme that the patient is lacking.

Genzyme Corporation

Genzyme Corporation is a fully owned subsidiary of [Sanofi-Aventis](#).

Before its acquisition in 2011 ([\\$20.1 billion](#)), Genzyme was an American biotechnology company based in Cambridge, Massachusetts. In 2010, Genzyme was the world's third-largest biotechnology company, [employing more than 11,000 people around the world](#).

As a subsidiary of Sanofi-Aventis, Genzyme has a presence in approximately 65 countries, including 17 manufacturing facilities and 9 genetic-testing laboratories, its products are sold in 90 countries. [In 2010, Genzyme generated \\$4.05 billion](#) in revenues with more than 25 products in the market.

Genzyme Corporation

The company was started by Sheridan Snyder (venture capitalist), George M. Whitesides (MIT professor) and scientist Henry Blair (a technician at the New England Enzyme Center at Tufts Medical School) in 1981 and is primarily devoted to finding drugs that would cure enzyme deficiency conditions that were essential to human survival and which usually afflict a very small percentage of the world's population.

Drugs used to treat such conditions are considered to be “orphan drugs”. In 1986, the company went public, raising \$27 million: Sanofi Genzyme is now the specialty care global business unit of Sanofi, focused on rare diseases, multiple sclerosis, immunology, and oncology.

Sanofi Genzyme: plant in Allston, Massachusetts



In June 2009, Genzyme's Allston, Massachusetts plant was shut down for production of Cerezyme, Fabrazyme and Myozyme after an infection of Chinese hamster ovary cells with Vesivirus 2117. By April 2010, it had restarted operation at diminished capacity.

Malattie da accumulo lisosomiali (ca. 50-60 tipi)

Sfingolipidosi

Sindrome di Gaucher (deficit di glucocerebrosidasi)

Sindrome di Tay-Sachs (deficit di esosaminidasi A)

Sindrome di Niemann-Pick (tipi A e B) (deficit di sfingomielinasi)

Mucopolisaccaridosi

Sindrome di Hurler (MPS tipo I) (deficit di α -L-iduronidasi)

Sindrome di Hunter (MPS type II) (deficit di iduronato-2-sulfatasi)

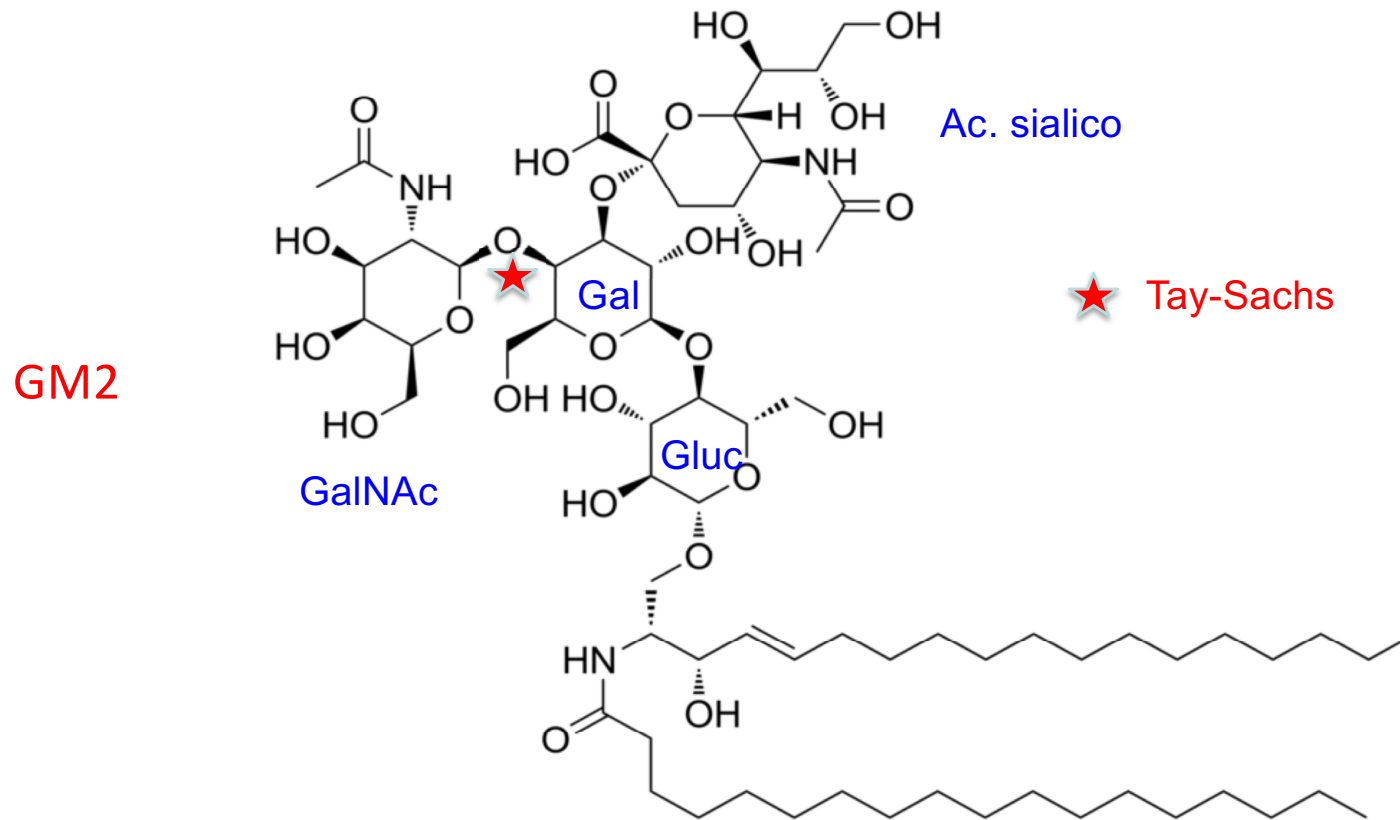
Sindrome di Sanfilippo A (MPS type III) (deficit di eparan N-sulfatasi)

Sindrome di Morquio A (MPS type IV) (deficit di galattosio 6-sulfatasi)

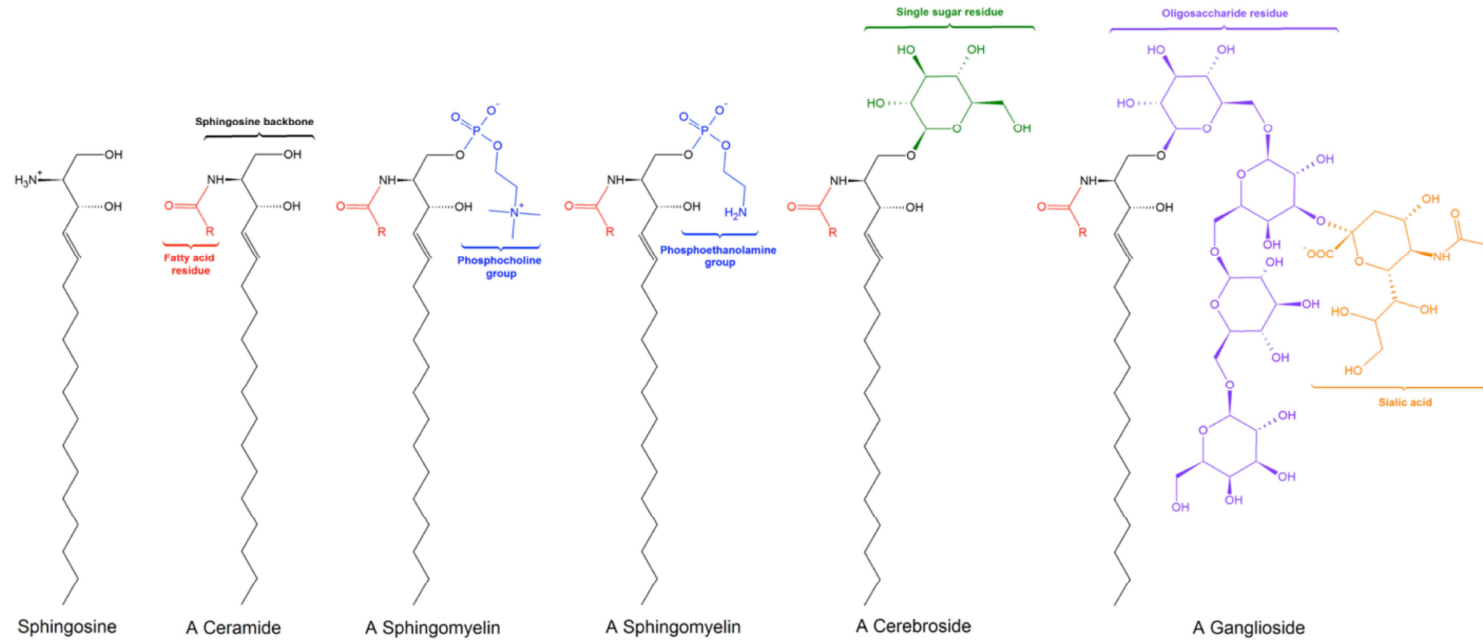
Sindrome di Maroteaux-Lamy (MPS type VI) (deficit di arilsulfatasi B)

Sindrome di Sly (MPS type VII) (deficit di β -glucuronidasi)

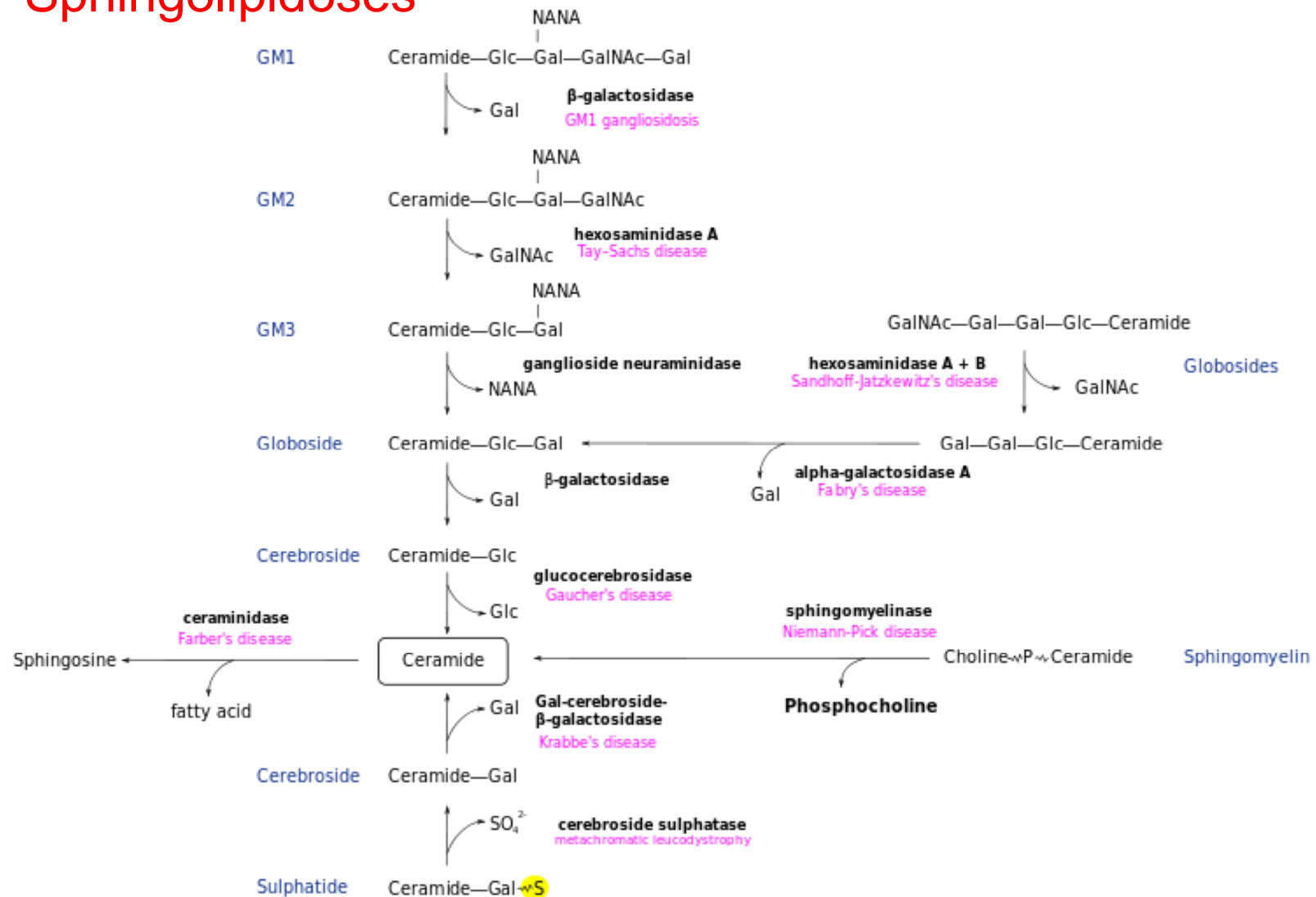
GM2 gangliosidosi (Sindrome di Tay-Sachs), deficit di
esosaminidasi A (accumulo di GM2 nel cervello)



Cerebrosidi e gangliosidi



Sphingolipidoses

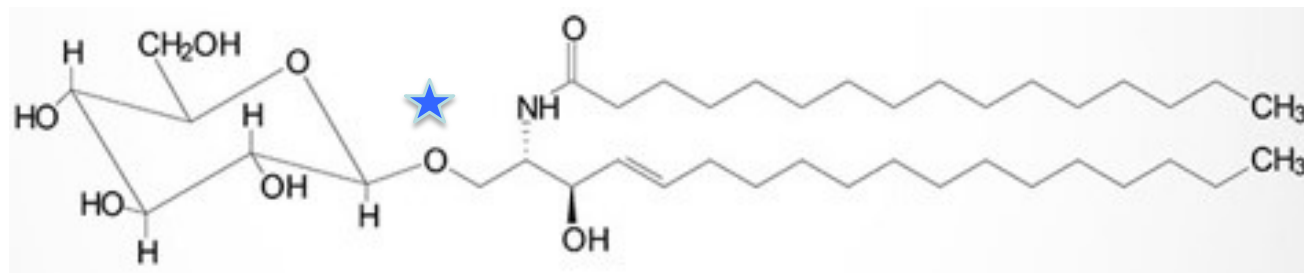


Malattia di Gaucher

E' la più comune malattia da accumulo lisosomiale (3 tipi con frequenza 1/50.000 – 1/200.000; type 1: no CNS involvement, types 2 and 3: CNS involvement).

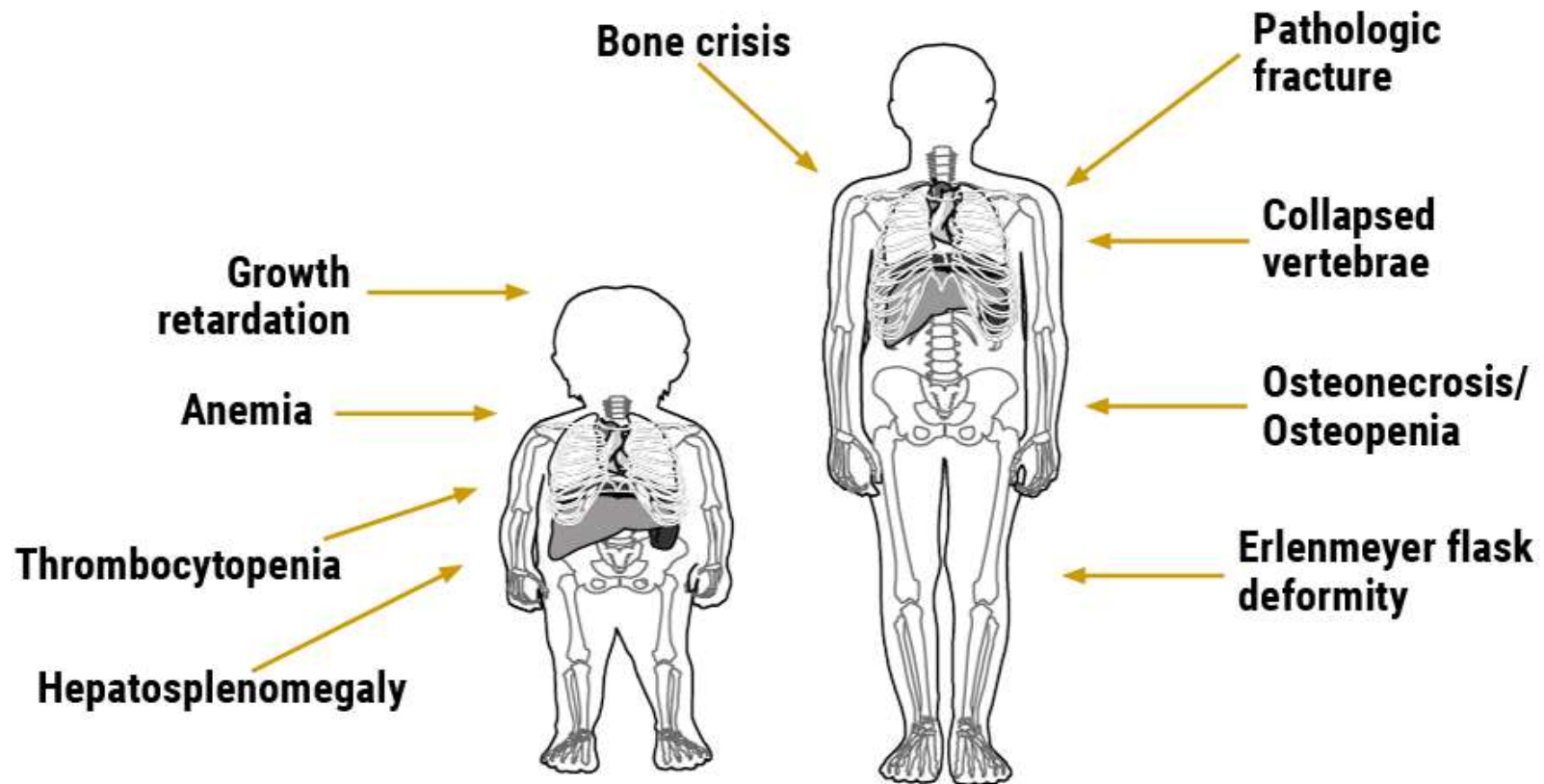
E' causata dalla carenza dell'enzima **glucocerebrosidasi (β -glucosidasi)**. La funzione della glucocerebrosidasi è quella di trasformare i glucocerebrosidi in zuccheri e grassi (ceramide).

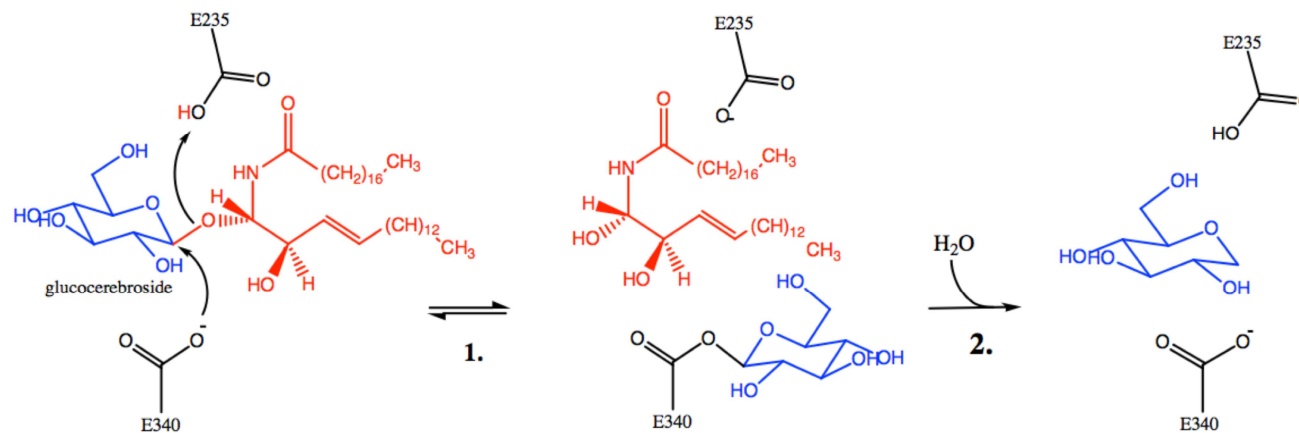
I sintomi e i segni clinici sono frequenti emorragie, atrofia muscolare, splenomegalia, astenia, diarrea, osteopenia, strabismo, nelle forme più gravi (tipo III) vi sono anche casi di convulsioni, demenza e atassia.



Glucocerebroside

Malattia di Gaucher





Attività della glucocerebrosidasi

Cerezyme®

Cerezyme® (imiglucerasa per iniezione) è indicato nella terapia sostitutiva di lungo termine per pazienti pediatrici e adulti con diagnosi di **malattia di Gaucher tipo 1** che presenta una o più delle seguenti condizioni:

anemia (conta bassa dei globuli rossi)

trombocitopenia (conta bassa delle piastrine)

dolori alle ossa e alle articolazioni

senso di affaticamento

epatomegalia o splenomegalia (fegato o milza ingrossati)

Costo: 200.000 \$ / anno

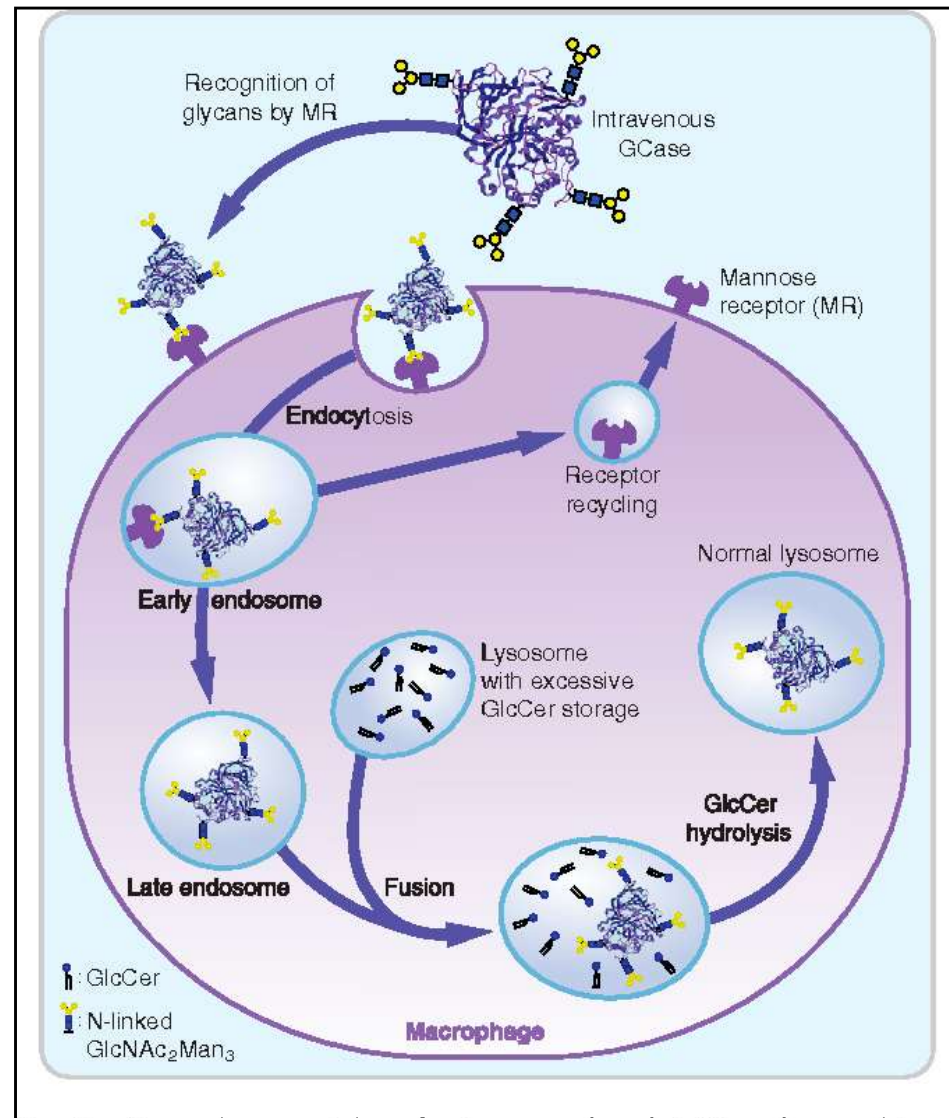
Gaucher's Disease

- Enzyme replacement therapy
 - Cerezyme
 - Administered IV usually q 2 weeks
 - Allergic reactions
 - Reduction in symptoms
 - 13.8% adverse events
 - 1% < anaphylaxis

Cerezyme[®]

Replacement Therapy

Modified glucocerebrosidase:
N-linked glycans contain
terminal mannose residues
thus conferring high affinity
for the mannose receptor
(MR) resident on the
macrophages



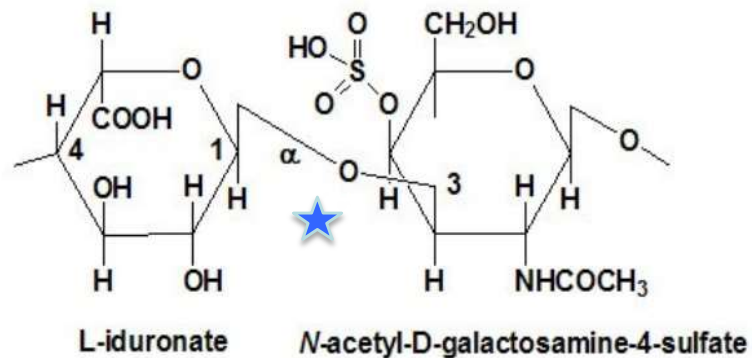
Mucopolisaccaridosi di Tipo I (MPS I)

La causa della Mucopolisaccaridosi di Tipo I (**Sindrome di Hurler**) è la mancanza o la carenza dell'enzima **alfa-L-iduronidasi**, responsabile della decomposizione dei glicosaminoglicani (GAG) presenti in tutti i tessuti connettivi.

In questa sindrome **possono essere danneggiati in modo particolare l'apparato muscolo-scheletrico, quello visivo, quello gastrointestinale e quello cardiaco**. Nelle forme più severe si riscontra anche un danneggiamento del sistema nervoso centrale, con conseguente ritardo mentale.



Structure of dermatan sulphate



ALDURAZYME (Iduronidasi) per MPS I

Aldurazyme è indicato per pazienti con le forme di Hurler e Hurler-Scheie di **Mucopolisaccaridosi I (MPS I)** e con pazienti con la forma di Scheie che presentano sintomi da moderati a severi.

Aldurazyme è il nome della variante commerciale dell'enzima **Iduronidasi**, che idrolizza i residui di acido alfa-L-iduronico del dermatan-solfato e dell'eparan-solfato. **L'enzima ricombinante è lungo 628 aminoacidi con 6 oligosaccaridi N-linked e 2 catene oligosaccaridiche modificate che terminano con mannosì**

Prodotto per via ricombinante in cellule di **Chinese hamster ovary**, Aldurazyme è prodotto dalla BioMarin Pharmaceutical Inc. e distribuito dalla Genzyme Corporation.

Aldurazyme viene somministrato lentamente per infusione intravenosa.

Malattia di Fabry (X-linked)

E' un raro disordine genetico provocato dalla carenza dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A. Porta all'accumulo progressivo di glicosfingolipidi.

Questo enzima è una glicoproteina omodimerica che idrolizza i residui terminali di alfa-galattosio da glicolipidi e glicoproteine.

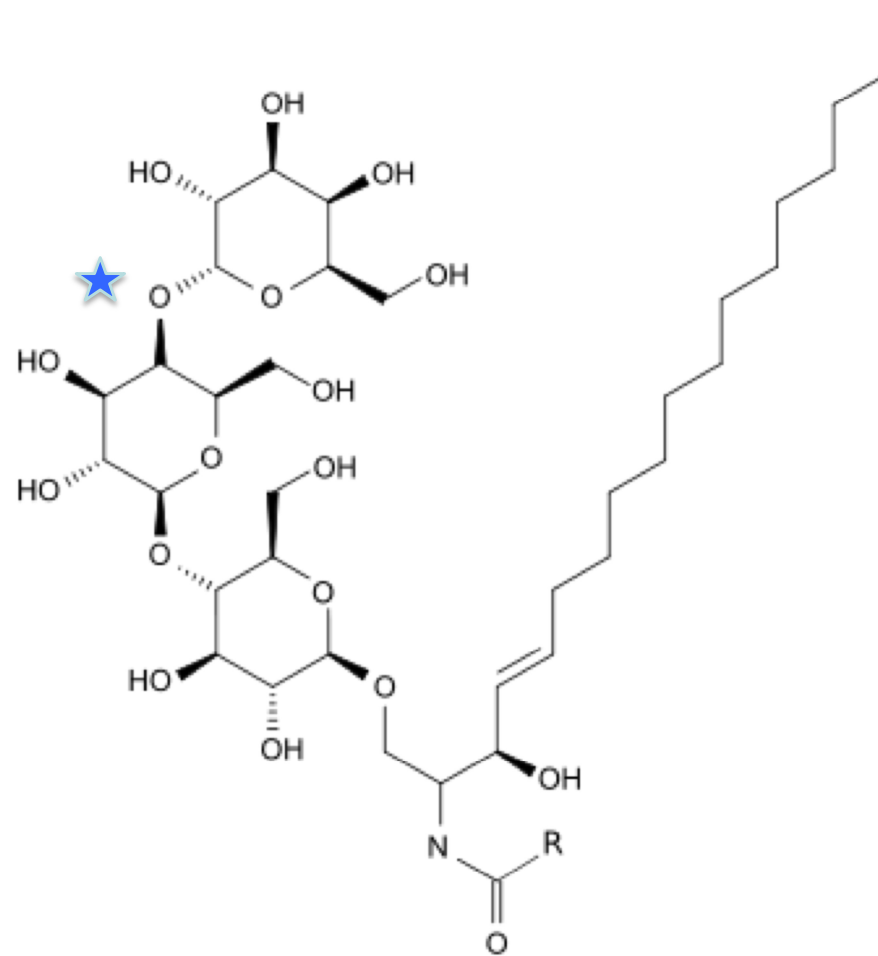
I sintomi e i segni clinici comprendono: ritardato sviluppo, febbre, acroparestesie (dolore alle mani e ai piedi), dolori acuti di natura neuropatica, ipo-anidrosi (difficoltà nel sudare), dispnea, nausea, cefalea, alterazioni oftalmologiche, cardiopatie, nefropatia fino all'insufficienza renale cronica.

Sopravvivenza media: 41 anni; Incidenza: 1/40.000 – 1/60.000

Fabrazyme®

Fabrazyme (agalsidase beta) è usato per trattare pazienti con la malattia di Fabry. Fabrazyme fa diminuire la quantità di globotriaosilceramide (GL-3), che si accumula principalmente ma non solo in cellule che contornano i vasi del rene.

Globotriaosylceramide



Malattia di Pompe

La Malattia di Pompe è causata da una mutazione genetica che blocca la produzione dell'enzima **alfa-glucosidasi acida (GAA)** lisosomiale. La Malattia di Pompe (o glicogenosi di tipo 2, GSD II) è **una malattia neuromuscolare rara, caratterizzata da un difetto del metabolismo del glicogeno** dovuto al deficit dell'enzima lisosomiale alfa-glucosidasi acida. L'assenza o la riduzione dell'attività enzimatica ha come diretta conseguenza l'accumulo di glicogeno nei tessuti con un lento e progressivo indebolimento della muscolatura

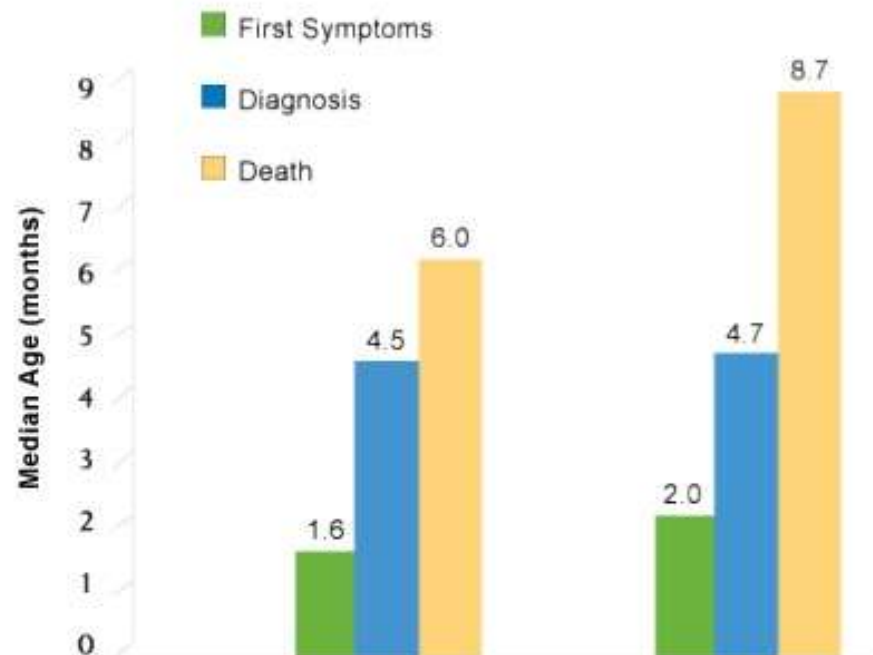
Pompe's Disease

- **Genetics**
 - Autosomal recessive
 - Pan-ethnic 1/40,000 – 1/146,000
 - Infantile and late onset forms
 - Glycogen storage disease type II
 - Acid alpha-glucosidase deficiency
 - Over 200 different mutations account for clinical heterogeneity
-

Pompe's Disease

- Clinical features infantile form
 - Normal birth history
 - Age at presentation 2-4 months
 - Muscle weakness, hypotonia
 - Macroglossia
 - Hypertrophic cardiomyopathy
 - Respiratory failure
 - Early death

Infantile Pompe's Disease Survival



Malattia di Pompe - MYOZYME® e LUMIZYME® (alglucosidase alfa)

Myozyme e Lumizyme contengono un enzima lisosomiale specifico per glicogeno indicato per pazienti nei quali la **malattie di Pompe** (deficit di α -glucosidasi acida) compare in tenera età (Myozyme) o dopo gli 8 anni (late onset, Lumizyme) e che non presentano evidenza di ipertrofia cardiaca (costo da 300.000 a 600.000 \$/anno).

L'enzima si lega al recettore del mannosio-6-P

Complications of Enzyme Replacement Therapy (Pompe's)

- 100% of patients had adverse events
 - Fever
 - Decrease oxygen sats
 - Tachycardia
 - Cyanosis
 - Hypotension
 - Rash, urticaria, flushing, pallor
 - Bronchospasm

Sindrome di Zellweger o sindrome cerebroepatorenale (autosomale recessivo)

- È un disordine genetico eterogeneo, causato da alterazioni in uno qualunque dei numerosi geni coinvolti nella biogenesi dei perossisomi, i cosiddetti PEX (ad es., PEX1 (2/3 dei casi), PEX2, PEX3, PEX5, PEX6, PEX10, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX26, PEX11 β), che codificano proteine essenziali al loro corretto assemblaggio.
- Le manifestazioni cliniche includono: basso tono muscolare, dismorfismi facciali, compromissione della crescita, disfunzioni sensoriali (perdita di vista e udito) e neurologiche, insufficienza renale e endocrina, anomalie scheletriche, e ritardo nello sviluppo, convulsioni, aspettativa di vita breve
- 13 gruppi di complementazione

Sindrome di Zellweger o sindrome cerebroepatorenale (autosomale recessiva)

- L'alterazione della funzione perossisomiale e la conseguente incapacità di metabolizzare gli acidi grassi a catena molto lunga e ramificati porta all'accumulo di metaboliti tossici. Demielizzazione per mancata/bassa sintesi di plasmalogeni.
- Alterazioni a livello cerebrale, epatico, renale e scheletrico
- Morte entro un anno di vita

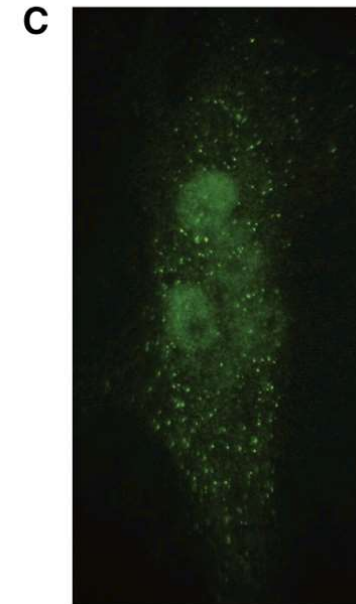
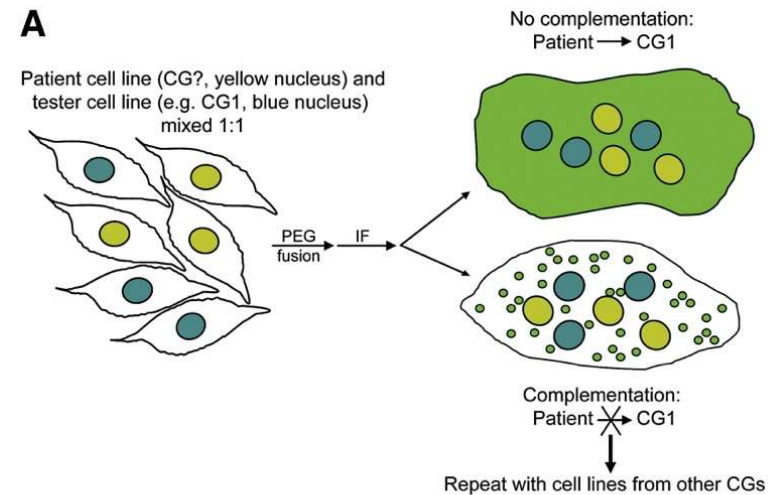
Zellweger syndrome

Somatic cell fusion complementation assay

Antibodies against catalase
(immunofluorescence
microscopy)

B: no complementation

C: complementation



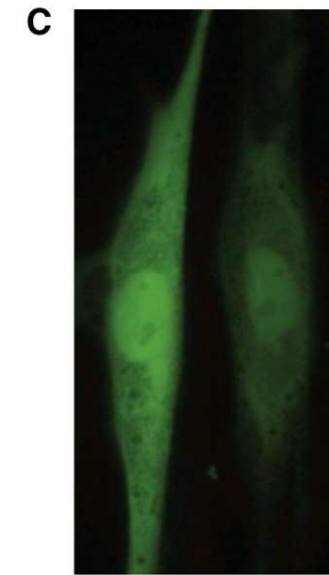
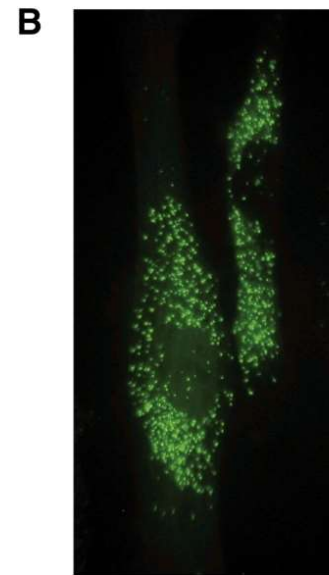
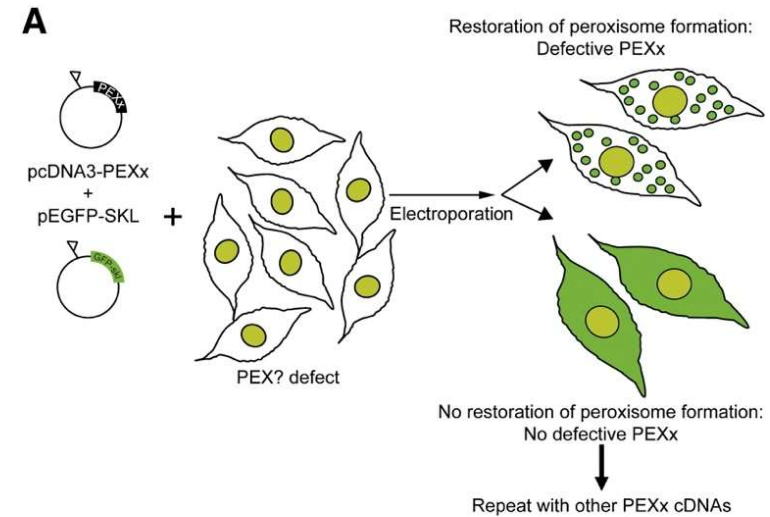
Sindrome di Zellweger

PEX cDNA transfection complementation assay

Examples of cells cotransfected with a PEXx-containing expression plasmid and a plasmid expressing the peroxisomal reporter protein GFP-SKL.

B: complementation

C: no complementation



Adrenoleucodistrofia

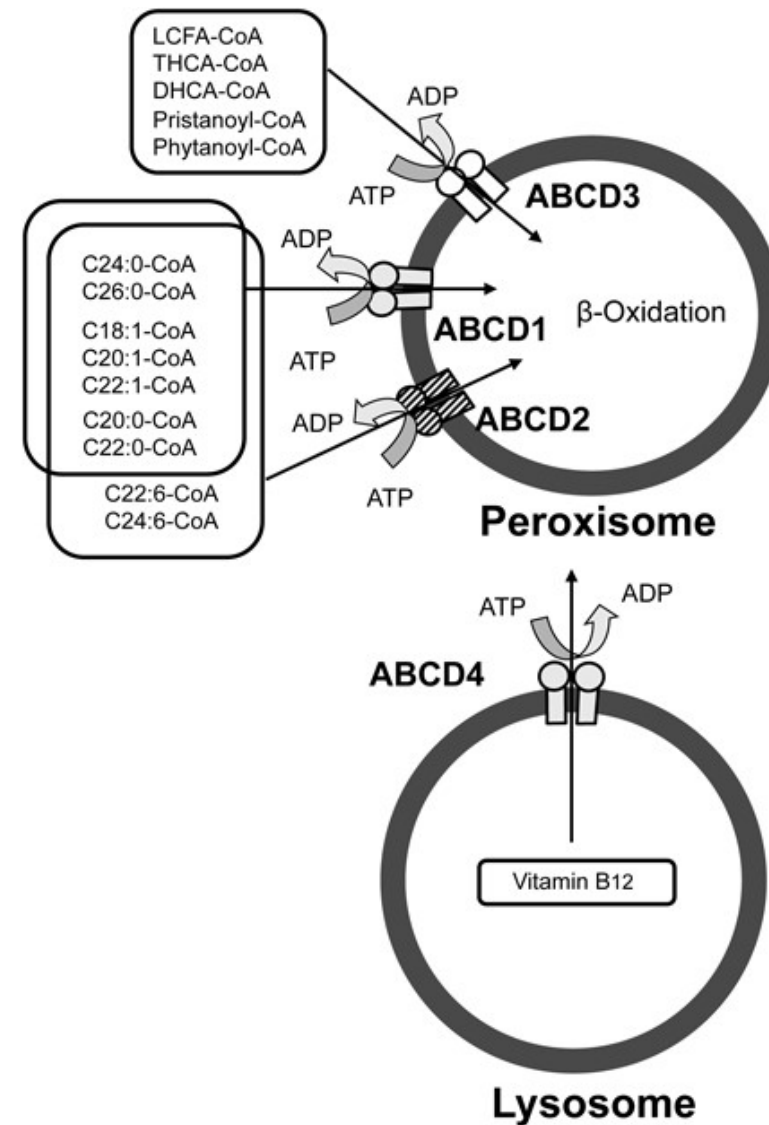
- Deficit del trasportatore di membrana **ABCD1** (trasportatore degli acidi grassi a catena molto lunga nei perossisomi, più di 650 mutazioni identificate)
- Determina accumulo di acidi grassi a catena lunga
- Demielinizzazione progressiva che conduce a vita vegetativa e a morte
- L'accumulo di questi acidi grassi è tossico per le ghiandole surrenali e per lo strato isolante di lipidi della mielina. Si pensa che l'accumulo di acidi grassi a catena molto lunga promuova un processo infiammatorio nel cervello che porta alla rottura della guaina mielinica.

The possible function of ABC transporters on peroxisomal membranes

ABCD1 and **ABCD2** have overlapping substrate specificities toward saturated and monounsaturated VLCFA-CoAs. However, **ABCD1** has higher specificity to C24:0-CoA and C26:0-CoA than **ABCD2**. In contrast, **ABCD2** has higher specificity for C22:0-CoA and C20:0-CoA than **ABCD1**. **ABCD2**, but not **ABCD1**, has an affinity for polyunsaturated VLCFA-CoA.

ABCD3 is thought to be involved in the transport of LCFA-CoA, branched chain acyl-CoA, THCA-CoA and DHCA-CoA.

DHCA: dihydroxycholestanoic acid
THCA: trihydroxycholestanoic acid
VLCFA: very long chain fatty acids



Condrodisplasia punteggiata rizomelica (tipo I)

Mutazione nel gene Pex7, che codifica per il recettore citosolico coinvolto nell'importazione di un piccolo insieme di proteine della matrice dei perossisomi caratterizzate dal segnale PTS-2 dal lato N-terminale. Tra queste l'enzima alchilglicerone fosfato sintasi richiesto per la sintesi dei plasmalogeni

Si tratta di una malattia grave in cui il tasso di sopravvivenza dopo 10 anni è basso.

- I sintomi includono:
- Accorciamento prossimale (rizomelia) dell'omero e, in misura minore, del femore.
- Calcificazioni puntiformi nella cartilagine (condrodisplasia puntiforme)
- Riduzione del peso, della lunghezza e della circonferenza cranica alla nascita
- Crisi epilettiche
- Grave deficit intellettivo
- Crescita stentata
- Cataratta