

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 954 360

a nome: Glycomine, Inc.

a: San Carlos, CA 94070 - USA

dal titolo: Preparazione farmaceutica di carboidrati per uso terapeutico.

DESCRIZIONE

RIFERIMENTO INCROCIATO ALLE DOMANDE CORRELATE

Questa domanda rivendica il vantaggio della domanda provvisoria U.S. numero 61/878,591, depositata il 16 settembre 2013.

CAMPO

La presente invenzione riguarda composizioni contenenti mannosio-1-fosfato incapsulato in una particella lipidica per la somministrazione all'interno di una cellula, e usi di tali composizioni in metodi per rilasciare mannosio-1-fosfato incapsulato all'interno di cellule e metodi per il trattamento di malattie e disturbi, come disturbi congeniti della glicosilazione (CDG).

PRECEDENTE

La glicosilazione, l'attacco enzimatico dei carboidrati (glicani) alle proteine e ai lipidi, è una modificazione co-traduzionale e post-traduzionale

(PTM) più comune di qualsiasi altro PTM in quanto si applica alla maggior parte delle proteine sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso (ER). La glicosilazione svolge un ruolo critico in una varietà di processi biologici della membrana e delle proteine secrete. Nell'ER, la glicosilazione definisce la struttura e il ripiegamento delle proteine e agisce come un meccanismo di controllo della qualità che determina l'esportazione di proteine correttamente piegate al Golgi o prende di mira quelle mal ripiegate per la degradazione. Le porzioni di glicani possono anche agire come ligandi per i recettori della superficie cellulare per mediare l'attaccamento cellulare o stimolare le vie di trasduzione del segnale. I disturbi congeniti della glicosilazione, noti anche come sindromi CDG, sono un gruppo di malattie genetiche rare in cui le proteine e/o lipidi dei tessuti sono carrier di glicosilazione difettosa e/o mancanza di glicosilazione. Queste malattie sono legate a numerose carenze enzimatiche e spesso causano gravi, a volte fatali, menomazioni del sistema nervoso, dei muscoli, dell'intestino e di molti altri sistemi di organi.

I sintomi clinici comuni nei bambini con CDG includono ipotonia, ritardo dello sviluppo, ritardo della

crescita, disfunzione epatica, coagulopatia, ipotiroidismo, esotropia, modello di grasso anormale e capezzoli invertiti, ipoglicemia, convulsioni, ipoplasia cerebellare ed episodi simili a ictus in un bambino con ritardo dello sviluppo. In età avanzata, nell'adolescenza e nell'età adulta, la presentazione può includere atassia, deterioramento cognitivo e assenza di pubertà nelle femmine, piccoli testicoli nei maschi, retinite pigmentosa, scoliosi, contratture articolari e neuropatia periferica.

Il CDG può essere classificato in due gruppi: CDG tipo I e CDG tipo II. Il CDG tipo I è caratterizzato da difetti nelle fasi iniziali della glicosilazione proteica N-legata, cioè la biosintesi dell'oligosaccaride legato a dolicolo pirofosfato (DLO), che si verificano nell'ER, o il trasferimento del DLO ai residui di asparagina di polipeptidi nascenti. Il CDG di tipo II comporta difetti nell'ulteriore elaborazione (sintetica o idrolitica) del glicano legato alle proteine. Attualmente sono state identificate ventidue varianti di CDG di tipo I e quattordici di tipo II. Uno dei sottotipi più comuni di CDG è il CDG-Ia (circa il 70% di tutti i casi di CDG), caratterizzato da perdita o riduzione dell'attività della fosfomannomutasi 2 (PMM) che porta

a carenza o insufficienza della N-glicosilazione intracellulare (Jaeken et al. *J. Of Inherit. Met. Disease*. 2008, 31: 669-672). Il PMM è responsabile della conversione del mannosio-6-fosfato in mannosio-1-fosfato.

Sebbene siano stati esplorati diversi approcci allo sviluppo di terapie per la CDG, i ricercatori continuano la loro ricerca di una cura adeguata o di una terapia per mitigare la malattia stessa. I trattamenti esistenti per le manifestazioni includono, ad esempio, integratori alimentari, alimentazione tramite sondino e un'ampia gamma di terapie che tentano di trattare il reflusso gastro-esofageo, il vomito persistente, i ritardi dello sviluppo, le anomalie oculari e l'ipotiroidismo. I pazienti richiedono anche idratazione per via endovenosa (IV) e terapia fisica per episodi ictus simili. Gli adulti con sintomi ortopedici spesso richiedono sedie a rotelle, dispositivi di trasferimento e trattamento chirurgico per la scoliosi (Sparks et al., *Disorders of Glycosylation Overview*. 2005 In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., editori. *GeneReviews™*. Seattle (WA): Università di Washington, Seattle; 1993-2013).

Attualmente, CDG-Ib è l'unico CDG noto per il quale è disponibile un trattamento relativamente efficace,

vale a dire la somministrazione orale di D-mannosio. Tuttavia, tale terapia potrebbe non essere altrettanto efficace nel trattamento dei pazienti con CDG-Ia e attualmente ci sono opzioni di trattamento limitate per altri sottotipi di CDG di tipo I e malattie di tipo II di CDG. Uno dei motivi della mancanza di una terapia consolidata per i disturbi CDG-I può essere dovuto alla pletora di fenotipi clinici eterogenei presentati che non mostrano una correlazione diretta con l'attività dell'enzima PMM.

I pazienti che soffrono di una riduzione dell'attività del PMM hanno una ridotta produzione di mannosio-1-fosfato (Man-1-P), associata a sintomi di compromissione multiviscerale. Al fine di superare la carenza di produzione di PMM, è importante fornire agli enzimi a valle il substrato richiesto (cioè Man-1-P). Tuttavia, la consegna e il mantenimento di un tale apporto sistemico di Man-1-P è problematico, poiché gli enzimi extracellulari all'interno dei fluidi corporei degradano Man-1-P quando somministrati in modo esogeno mediante somministrazione orale o endovenosa. Un altro problema con Man-1-P consegnato esogenamente è che la sua alta polarità impedisce a Man-1-P di penetrare all'interno della cellula (cioè, citosol) e quindi di trattare la carenza nella

produzione di PMM.

I derivati del Man-1-P polare possono essere sintetizzati per rendere Man-1-P più permeabile alle cellule (pubblicazione del brevetto US 2009/0054353). Questo approccio, tuttavia, è anche problematico, poiché è stato dimostrato che il derivato Man-1-P permeabile alle cellule è instabile per uso clinico o citotossico attraverso i sottoprodotti del derivato Man-1-P (Eklund et al., *Glycobiology* 2005, 15: 1084-1093; Rutschow et al. *Bioorg Med Chem* 2002, 10: 4043-4049; e Hardre et al., *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17: 152-155).

Altre potenziali terapie si sono concentrate sull'inibizione degli enzimi che catabolizzano il mannosio-6-fosfato (Man-6-P), un precursore dell'Man-1-P, tramite l'inibizione delle isomerasi del fosfomannosio (PMI). L'approccio si concentra sul forzare la reazione verso l'ottimizzazione dell'omeostasi, che con l'uso di inibitori di PMI, sarebbe stata deviata verso la produzione di Man-6-P. Questi approcci, tuttavia, sono inefficaci come opzioni di trattamento clinico a causa della loro tossicità associata, degli effetti collaterali fuori bersaglio e della scarsa penetrazione selettiva dei tessuti.

Di conseguenza, esistono esigenze insoddisfatte per composizioni e metodi migliorati per fornire carboidrati, come Man-1-P, all'interno della cellula al fine di trattare disturbi, come un disturbo congenito della glicosilazione (CDG), a soggetti (tra cui, ad esempio, esseri umani) che necessitano di tale trattamento.

BREVE SOMMARIO

La presente descrizione soddisfa le esigenze non soddisfatte sopra descritte fornendo mannosio-1-fosfato incapsulato da nanovettori che affrontano i problemi di citotossicità e stabilità associati alle cellule permeabilizzanti o all'uso di derivati di carboidrati. Utilizzando percorsi endocitotici, i nanocarrier possono entrare all'interno della cellula e fornire mannosio-1-fosfato nel citosol di una cellula. Questa implementazione di nanovettori che incapsulano mannosio-1-fosfato, facilita simultaneamente la facilità della terapia, consentendo a dosaggi più elevati del mannosio-1-fosfato di raggiungere la via della glicosilazione biochimica, nonché una potenziale facilitazione della somministrazione. L'invenzione rivendicata fornisce composizioni per l'uso in terapie sostitutive di carboidrati per, ma non limitate a, il trattamento di

malattie di tipo I e II di CDG.

La presente descrizione affronta anche esigenze non soddisfatte relative a terapie efficaci per malattie, come malattie da CDG, nonché questioni relative alla somministrazione di tali terapie. In alcuni aspetti, la descrizione fornisce composizioni per l'uso in un metodo per fornire mannosio-1-fosfato al citosol delle cellule. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria, si ritiene che tale metodo di somministrazione dei carboidrati (*ad esempio*, come parte di un medicamento) eviterebbe il lavoro degli enzimi citosolici geneticamente difettosi, vale a dire la fosfomannomutasi (PMM) e la fosfomannosio isomerasi (PMI), che si trovano prevalenti nei disturbi CDG I.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni della presente descrizione possono comportare il rilascio di mannosio-1-fosfato nel citosol della cellula utilizzando nanocarrier. In particolare, nanostrutture lamellari lipide-sterolo-acqua biodegradabili e biocompatibili possono essere utilizzate per incapsulare il mannosio-1-fosfato. Il medicinale descritto rappresenta l'opzione di trattamento più potente e praticabile per disturbi, come il disturbo CDG Ia.

In alcune forme di realizzazione, la presente

descrizione fornisce composizioni contenenti una particella lipidica e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, e usi per utilizzare tali composizioni per fornire il mannosio-1-fosfato all'interno delle cellule e per trattare malattie e disturbi, come disturbi congeniti della glicosilazione (CDG).

In alcune forme di realizzazione, le composizioni qui descritte sono medicinali. Tali composizioni (ad esempio, medicinali) possono includere una sospensione acquosa di liposomi che racchiudono, mannosio-1-fosfato. I liposomi possono essere preparati da lipidi che formano vescicole, come, ma non solo, la fosfatidilcolina (PC). Il liposoma può anche essere preparato in combinazione con uno sterolo, vale a dire il colesterolo. Il liposoma completo è arricchito con polietilenglicole (PEG), o PEGilato, al fine di migliorare la circolazione e la permanenza con i fluidi corporei dopo la somministrazione, nonché proteggere il liposoma dalla degradazione prematura e dall'escrezione del farmaco dal corpo di un soggetto che necessita di tale trattamento.

Di conseguenza, alcuni aspetti della presente divulgazione si riferiscono a una composizione

comprendente una particella lipidica, comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare, e mannosio-1-fosfato.

Altri aspetti della presente descrizione riguardano una composizione contenente un liposoma.

Altri aspetti della presente descrizione riguardano una composizione farmaceutica contenente una composizione di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

Altri aspetti non rivendicati della presente descrizione riguardano un kit contenente una composizione di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione per uso in uno qualsiasi dei metodi qui descritti.

Altri aspetti non rivendicati della presente descrizione riguardano un metodo per somministrare un carboidrato a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una composizione di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, la composizione viene somministrata per via orale, topica, dermica, nasale, endovenosa, intramuscolare,

intraperitoneale, intracerebrospinale, intracranica, intraspinale, sottocutanea, intraarticolare, intrasinoviale o intratecale.

Altri aspetti della presente descrizione riguardano le composizioni dell'invenzione per l'uso in un metodo per somministrare un mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una composizione di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per via orale, topica, dermica, nasale, endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, intracranica, intraspinale, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoviale o intratecale.

Altri aspetti della presente descrizione riguardano le composizioni dell'invenzione per l'uso in un metodo per trattare un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una composizione di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione. In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è selezionato da un disturbo CDG di tipo I, un disturbo CDG-Ia, un disturbo CDG di tipo II, un disturbo CDG-IIc e un disturbo CDG-

IIf. In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è un disturbo CDG-Ia. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per via orale, topica, dermica, nasale, endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, intracranica, intraspinale, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoviale o intratecale.

DESCRIZIONE DEI DISEGNI

FIG. 1A raffigura una struttura esemplare di mannosio-1-fosfato (M1P). FIG. 1B raffigura una struttura esemplare di polietilenglicole (PEG). FIG. 1C raffigura una struttura esemplare di fosfatidiletanolamina (PE) attaccata al PEG. FIG. 1D raffigura una struttura esemplare di fosfatidilcolina (PC).

FIG. 2 raffigura un esemplare la struttura di una composizione liposomiale contenente un carboidrato incapsulato all'interno del nucleo del liposoma.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Nel presente documento sono composizioni lipidiche contenenti una particella lipidica e mannosio-1-fosfato che sono in grado di fornire mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula inclusi, senza limitazione, il citoplasma, il reticolo endoplasmatico

e il Golgi. Nanocarrier adatti includono, ma non sono limitati a, liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi.

Come descritto nella presente, la composizione di nanocarrier adatti non è limitata a nessuna classe e peso molecolare di lipidi, polietilenglicole o loro derivati. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione riguarda in modo più specifico, ma non limitato a, preparazioni liposomiali di mannosio-1-fosfato.

Come descritto in alcune forme di realizzazione, non rivendicati della presente descrizione può essere integrato in liposomi progettati per un targeting specifico all'interno della cellula, ER o Golgi. Può essere utilizzato un approccio chemioenzimatico alla sintesi di oligosaccaride legato al dolicol pirofosfato (Wang Z. et al., *Science*, 2013, 341, 379-383 e Weerapana E. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 13766-13767). In alcune forme di realizzazione, le preparazioni liposomiali possono essere ottimizzate per ciascun compartimento cellulare mirato come descritto in Torchilin V. et al., *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003, 4, 133-140; Pollock S. et al., *FASEB*, 2010, 24, 1866-1878; Fujiwara T. et al., *Int. J. Pharm.*, 2010, 386, 122-130; e WO 2009/118658 A2.

In altre forme di realizzazione, la modifica architettonica a un liposoma può includere, ma non limitatamente a, catene di colesterolo emisuccinato (CH) e di polietilenglicole (PEG). Come descritto nella presente, tali modifiche possono proteggere dalla degradazione il mannosio-1-fosfato della nanoparticella personalizzata e aumenteranno la circolazione e/o il tempo di permanenza del farmaco all'interno del corpo.

Di conseguenza, la presente descrizione fornisce composizioni lipidiche contenenti una particella lipidica comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare, e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica come definito nelle rivendicazioni, in cui le composizioni lipidiche sono in grado di rilasciare il carboidrato all'interno di una cellula. In alcune forme di realizzazione, tali composizioni lipidiche che trasportano mannosio-1-fosfato sono utili per trattare, prevenire o ridurre il rischio di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita. In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica può essere un liposoma, una

micella, una nanoparticella lipidica solida o un fastidioso. In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica contiene una molecola che è in grado di minimizzare la degradazione della particella lipidica e/o migliorare la permanenza della particella lipidica quando somministrata a un soggetto e/o rende la particella lipidica immunotollerante quando somministrata a un soggetto. Come descritto nel presente documento, tali molecole possono schermare, o proteggere in altro modo, la particella lipidica e il mannosio-1-fosfato incapsulato della presente descrizione dalla degradazione e possono anche aumentare la permeabilità cellulare, la circolazione e/o il tempo di permanenza della particella lipidica quando la particella lipidica viene somministrata a un soggetto che ne necessita. Inoltre, tali molecole possono consentire alla particella lipidica di evitare il rilevamento da parte del sistema immunitario di un soggetto che ne necessita a cui viene somministrata la particella lipidica, e come tali sono considerate molecole invisibili. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, la molecola è una molecola invisibile che è in grado di indurre immunotolleranza quando somministrata a un soggetto che ne necessita. La molecola adatta è il polietilenglicole (PEG).

Pertanto, in certi aspetti, la presente descrizione fornisce una composizione contenente una particella lipidica comprendente una particella lipidica, comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, dove la particella lipidica contiene una molecola che è in grado di minimizzare la degradazione della particella lipidica e/o aumentare la permanenza della particella lipidica quando somministrata a un soggetto, e/o rende la particella lipidica immunotollerante quando somministrato a un soggetto. La molecola è il polietilenglicole (PEG).

In alcuni aspetti, la presente divulgazione fornisce una composizione contenente una particella lipidica, comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare; e mannosio-1-fosfato incapsulati nella particella lipidica, dove la particella lipidica comprende colina, etanolamina, glicerolo, inositolo o una loro combinazione. La particella lipidica contiene una molecola che è in

grado di minimizzare la degradazione della particella lipidica e/o migliorando la permanenza della particella lipidica quando somministrata a un soggetto e/o rende la particella lipidica immunotollerante quando somministrata a un soggetto. La molecola è polietilenglicole (PEG).

In alcuni aspetti, la presente divulgazione fornisce una composizione contenente un liposoma, comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare e mannosio-1-fosfato incapsulato nel liposoma, in cui il liposoma comprende colesterolo e fosfatidiletanolamina (PE) attaccati a polietilenglicole (PEG).

Inoltre, sono fornite composizioni farmaceutiche contenenti una composizione lipidica contenente mannosio-1-fosfato della presente descrizione in combinazione con veicoli farmaceuticamente accettabili.

La presente descrizione fornisce una composizione lipidica contenente mannosio-1-fosfato della presente descrizione per l'uso in un metodo per fornire mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula a un soggetto che ne necessita. La presente descrizione

fornisce inoltre metodi per utilizzare una composizione lipidica contenente carboidrati della presente descrizione per trattare, prevenire o ridurre il rischio di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita.

Particelle lipidiche

Alcuni aspetti della presente descrizione si riferiscono a composizioni contenenti particelle lipidiche che contengono mannosio-1-fosfato incapsulati all'interno della particella lipidica.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "*particella lipidica*" si riferisce a particelle formate da lipidi in una soluzione acquosa. Esempi adatti di particelle lipidiche includono, senza limitazione, liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide, niosoma, liposfere, emulsioni ed emulsioni.

Come utilizzato nel presente documento, un carboidrato che è "*incapsulato*" in una particella lipidica, si riferisce a una particella lipidica che fornisce un agente attivo o agente terapeutico, come un carboidrato della presente descrizione, con incapsulamento completo, incapsulamento parziale o entrambi. In alcune varianti, almeno una parte dei carboidrati può essere "*incapsulato*" da una particella

lipidica e localizzato all'interno del nucleo di una particella lipidica e/o all'interno della superficie interna (ad esempio la membrana) di una particella lipidica. In alternativa, in altre varianti, l'intero carboidrato può essere "incapsulato" da una particella lipidica e localizzato all'interno del nucleo di una particella lipidica e/o all'interno della superficie interna (ad esempio la membrana) di una particella lipidica.

Può essere usata qualsiasi particella lipidica nota nella tecnica adatta per rilasciare un carboidrato incapsulato della presente descrizione all'interno di una cellula. Esempi di particelle lipidiche adatte includono, senza limitazione, liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione hanno una dimensione media delle particelle che varia da circa 0,02 micron di diametro a circa 0,5 micron di diametro.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione hanno una dimensione media delle particelle di circa 0,02 micron di diametro, circa 0,03 micron di diametro, circa 0,04 micron di diametro, circa 0,05 micron di diametro, circa 0,06 micron di diametro, circa 0,07 micron di

diametro, circa 0,08 micron di diametro, circa 0,09 micron di diametro, circa 0,10 micron di diametro, circa 0,15 micron di diametro, circa 0,20 micron di diametro, circa 0,25 micron di diametro, circa 0,30 micron di diametro, circa 0,35 micron di diametro, circa 0,40 micron di diametro, circa 0,45 micron di diametro o circa 0,50 micron di diametro.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione sono in grado di rilasciare mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula, come il citoplasma, il reticolo endoplasmatico o il Golgi.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono essere ottimizzate per il targeting a particolari organelli all'interno di una cellula, inclusi, senza limitazione, il reticolo endoplasmatico (ER), il Golgi e il lisosoma. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono essere ottimizzate per essere indirizzate a particolari tessuti e/o organi in un soggetto. I metodi per ottimizzare le particelle lipidiche per colpire organelli, tessuti e organi specifici sono ben noti nell'arte (ad esempio Torchilin V. et al., *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003, 4, 133-140; Torchilin V. et

al., *J. Drug Target.*, 2011, 19, 606-614; Huwyler J. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, 282: 1541-1546; Pollock S. et al., *FASEB*, 2010, 24, 1866-1878; Fujiwara T. et al., *Int. J. Pharm.*, 2010, 386, 122-130; e WO 2009/118658).

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione contengono mannosio-1-fosfato, che quando somministrato all'interno di una cellula di un soggetto (incluso, ad esempio, un essere umano) che ne necessita può indurre almeno 0,05 volte ad un aumento di almeno 10 volte nella produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore, rispetto alla produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore in assenza di particelle lipidiche della presente descrizione contenenti mannosio-1-fosfato. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche fornite nel presente documento, quando somministrate a un soggetto (incluso, ad esempio, un essere umano) che ne necessita, possono indurre almeno 0,05 volte, almeno 0,1 volte, almeno 0,2 volte, almeno 0,3 volte, almeno 0,4 volte, almeno 0,5 volte, almeno 0,6 volte, almeno 0,7 volte, almeno 0,8 volte, almeno 0,9 volte, almeno 1 volta, almeno 1,5 volte, almeno 2 volte, almeno 2,5 volte, almeno 3 volte, almeno 3,5 volte,

almeno 4 volte, a almeno 4,5 volte, almeno 5 volte, almeno 5,5 volte, almeno 6 volte, almeno 6,5 volte, almeno 7 volte, almeno 7,5 volte, almeno un aumento di 8 volte, almeno 8,5 volte, almeno 9 volte, almeno 9,5 volte o almeno 10 volte nella produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore nel soggetto, come rispetto alla produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore nel soggetto in assenza di somministrazione di tali particelle lipidiche al soggetto.

Come utilizzato nel presente documento a "*oligosaccaride legato a lipidi di ordine superiore*" si riferisce a un oligosaccaride avente almeno cinque subunità monosaccaridiche e che è legato a un lipide. Ad esempio, un oligosaccaride legato di ordine superiore può riferirsi a un oligosaccaride contenente almeno quattro subunità di mannosio (Man4), cinque subunità di mannosio (Man5), sei subunità di mannosio (Man6), sette subunità di mannosio (Man7), otto subunità di mannosio (Man8), o nove subunità del mannosio (Man9) e un disaccaride N-acetilglucosamina (GlcNAc2), dove l'oligosaccaride è legato a un dolicolo. In alcune forme di realizzazione, gli oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore possono includere una porzione di oligosaccaride che

include Man4GlcNAc2, Man5GlcNAc2, Man6GlcNAc2, Man7GlcNAc2, Man8GlcNAc2, Man8GlcNAc2 o qualsiasi loro combinazione.

Liposomi

In alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione può essere un liposoma. Come utilizzato nel presente documento, un "liposoma" si riferisce a una vescicola composta da un doppio strato lipidico in fase lamellare. Può essere usato qualsiasi liposoma adatto noto nell'arte. In alcune forme di realizzazione, il liposoma ha una nanostruttura lamellare. Come utilizzato nel presente documento, il termine "nanostruttura lamellare" si riferisce a una nanostruttura, come una particella lipidica, che include doppi strati anfifilici paralleli separati da un lume.

I liposomi della presente descrizione possono essere preparati con qualsiasi metodo adatto noto nell'arte e qui descritto. Esempi di metodi adatti per preparare liposomi includono, senza limitazione, la distruzione di membrane biologiche, come per dispersione meccanica comprendente sonicazione, idratazione a film sottile, emulsioni, cella a pressione francese, estrusione e ricostituzione di vescicole essiccate; dispersione di solventi compresa iniezione di etanolo, iniezione di

etere, doppia emulsione, fase inversa e vaporizzazione; e metodi di rimozione del detergente. In alcune forme di realizzazione, il liposoma è un liposoma invisibile che può essere immunotollerante. Come utilizzato nel presente documento, il termine "*liposoma invisibile*" si riferisce a liposomi in grado di evitare il rilevamento da parte del sistema immunitario di un soggetto. In quanto tale, un liposoma invisibile può essere immunotollerante. Ad esempio, il soggetto potrebbe essere un essere umano.

Micelle

In alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione può essere una micella. Come utilizzato nel presente documento, una "*micella*" si riferisce ad un aggregato di molecole tensioattive (ad esempio saponi, detergenti, acidi grassi, lipidi, fosfolipidi, ecc.) che sono disperse in un colloide liquido. Una micella in soluzione acquosa può formare un aggregato con regioni di testa idrofile a contatto con il solvente circostante, sequestrando le regioni di coda idrofobe all'interno della micella. Può essere usata qualsiasi micella adatta nota nell'arte. In alcune forme di realizzazione, le micelle possono essere sferiche. Le micelle della presente descrizione possono essere

preparate con qualsiasi metodo adatto noto nell'arte. Esempi di metodi adatti per la preparazione di micelle includono, senza limitazione, la dissoluzione diretta e la dialisi diretta o microemulsionante, che possono comprendere la preparazione mediante metodi di rimozione del solvente con detergente o miscibile in acqua.

Nanoparticelle lipidiche solide

In alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione può essere una nanoparticella lipidica solida. Come utilizzato nel presente documento, una "*nanoparticelle lipidiche solide*" (SLN) si riferisce a lipidi in emulsioni acquose composte da lipidi che sono generalmente solidi a temperature di almeno 50°C e tipicamente contengono una matrice lipidica solida che può solubilizzare le molecole lipofile. In alcune varianti, le nanoparticelle lipidiche solide hanno un diametro compreso tra 10 e 1000 nanometri. Le nanoparticelle lipidiche solide possono proteggere i composti attivi incorporati, come mannosio-1-fosfato, contro la degradazione chimica e possono anche dimostrare flessibilità nel modulare il rilascio di tali composti. Il nucleo lipidico delle nanoparticelle lipidiche solide può essere stabilizzato da

tensioattivi (ad esempio emulsionanti). Il lipide può tipicamente includere trigliceridi, digliceridi, monogliceridi, acidi grassi, steroidi e/o cere. Può essere usata qualsiasi nanoparticella lipidica solida adatta nota nell'arte. Le nanoparticelle lipidiche solide della presente descrizione possono essere preparate con qualsiasi metodo adatto noto nell'arte. Esempi di metodi adatti per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide includono, senza limitazione, microemulsificazione, omogeneizzazione ad alta pressione, precipitazione e dispersione ad ultrasuoni di film.

Niosomi

In alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione può essere un niosoma. Come utilizzato nel presente documento, un "niosoma" si riferisce a una struttura vescicolare formata da un doppio strato di molecole tensioattive non ioniche e che contiene un nucleo acquoso. I niosomi sono strutturalmente simili ai liposomi nell'avere una struttura lamellare, tuttavia, i materiali utilizzati per preparare i niosomi li rendono più stabili contro la degradazione idrolitica. Esempi di materiali di preparazione nocivi adatti includono, senza limitazione, steroli e uno o più tensioattivi non

ionici. Può essere usato qualsiasi niosoma adatto noto nell'arte. I niosomi della presente descrizione possono essere preparati con qualsiasi metodo adatto noto nell'arte. Esempi di metodi adatti per la preparazione di micelle includono, senza limitazione, iniezione di etere, agitazione, metodo a bolle, evaporazione in fase inversa, sonicazione, estrusione di membrane multiple e microfluidazione.

Componenti delle particelle lipidiche

Le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) contengono uno o più lipidi. Come utilizzato nel presente documento, il termine "lipidico" si riferisce a una sostanza di origine biologica o sintetica che è solubile o parzialmente solubile in solventi organici o che si ripartisce in un ambiente idrofobo quando presente in fase acquosa. In alcune varianti, i lipidi possono essere suddivisi in almeno tre classi: (1) "lipidi semplici", che includono, senza limitazione, grassi, oli e cere; (2) "lipidi composti", che includono, senza limitazione, fosfolipidi e glicolipidi; e (3) "lipidi derivati", che includono, senza limitazione, steroidi. In alcune varianti, il lipide può essere un lipide neutro o un lipide anfifilico. Come utilizzato nel

presente documento, il termine "*lipidi neutri*" si riferisce a un lipide che esiste in forma zwitterionica non caricata o neutra a un pH selezionato. A pH fisiologico, tali lipidi possono includere, ad esempio, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramide, sfingomieline, cefalina, colesterolo, cerebrosidi e diacilgliceroli. Come utilizzato nel presente documento, il termine "*lipidi anfifilici*" si riferisce a un lipide che contiene sia gruppi polari, solubili in acqua, sia gruppi non polari, insolubili in acqua. Esempi di lipidi adatti includono, senza limitazione, lipidi formanti doppio strato, lipidi non formanti doppio strato, lipidi anfifilici, lipidi naturali, fosfolipidi, glicerolipidi, sfingolipidi, fosfatidilglicerolo, acido fosfatidico, liso-lipidi, acidi grassi, sfingomieline, glicosfingolipidi, glucolipidi, glicolipidi, solfatidi, lipidi con acidi grassi eteri ed esteri, lipidi polimerizzabili, lipidi sintetici e lipidi semisintetici. I lipidi sintetici o semisintetici possono essere prodotti tramite deacilazione o riacilazione di lipidi naturali. Caratteristiche adatte dei lipidi sintetici e semisintetici includono, senza limitazione, gli acidi grassi miristoile, palmitoile e stearoile. In

alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono contenere una miscela di due o più tipi di lipidi. Tale miscela può essere presente in qualsiasi rapporto adatto per incapsulare mannosio-1-fosfato e fornire tale mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono contenere un lipide selezionato tra fosfolipide, un glicerolipide, uno sfingolipide e qualsiasi loro combinazione. Come descritto nella presente, un tale lipide ha un gruppo di testa polare e una coda di acido grasso che può essere collegata, ad esempio, da un legame estereo o etero.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono contenere uno o più lipidi aventi gruppi di testa polari. I lipidi possono contenere qualsiasi adatto gruppo di testa polare noto nell'arte. Esempi di gruppi di teste polari adatti includono, senza limitazione, colina, etanolamina, serina, glicerolo, inositolo e qualsiasi loro combinazione.

In alcune forme di realizzazione, le particelle

lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono essere, senza limitazione, nanostrutture lamellari che contengono un lipide anfifilico. Esempi di lipidi anfifilici adatti includono, senza limitazione, fosfolipidi, colesterolo, glicolipidi, acidi grassi, acidi biliari, saponine e tensioattivi.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono contenere uno o più fosfolipidi. Le particelle lipidiche della presente descrizione possono contenere qualsiasi fosfolipide adatto noto nell'arte. Esempi di fosfolipidi adatti includono, senza limitazione, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerolo (PG), fosfatidilinositolo (PI) e qualsiasi loro combinazione. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente divulgazione possono contenere fosfatidilcolina (PC). In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente divulgazione possono contenere fosfatidiletanolamina (PE). In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della

presente divulgazione possono contenete
fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE).

In alcune forme di realizzazione, una specie fosfolipidica della presente descrizione può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione fino all'80% molare. In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide della presente descrizione può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione a una concentrazione fino al 5 percento molare, fino al 10 percento molare, fino al 20 percento molare, fino al 30 percento molare, fino al 40 percento molare, fino al 50 percento molare, fino al 60 percento molare, fino al 70 percento molare o fino all'80 percento molare. In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide della presente descrizione può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione di circa il 70 percento molare.

Una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) può essere modificata per includere, ad esempio, una molecola, come una molecola

invisibile, che scherma o protegge in altro modo, mannosio-1-fosfato incapsulato dalla degradazione e che migliora la permeabilità cellulare, la circolazione e/o il tempo di permanenza della composizione lipidica contenente mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula, tessuto, organo e/o corpo di un soggetto a cui è somministrato il mannosio-1-fosfato- contenente composizione lipidica. Senza voler essere vincolati dalla teoria, una particella lipidica della presente descrizione aumenta notevolmente la permeabilità cellulare dei carboidrati, che sono altrimenti incapaci di attraversare la membrana plasmatica. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione include una molecola che è in grado di minimizzare la degradazione della particella lipidica e/o migliorare la permanenza della particella lipidica quando somministrata a un soggetto, e/o rende la particella lipidica immunotollerante quando somministrato a un soggetto. La molecola è il polietilenglicole (PEG). Come usato nella presente, il termine "*Lipide neutro PEGilato*" si riferisce a un lipide neutro, a un pH selezionato, a cui è stato coniugato un polietilenglicole.

Come utilizzati nella presente, i termini "*ossido di*

etilene", *"ossirano"*, *"epossietano"*, *"ossido di dimetilene"*, e *"ossaciclopropano"* possono essere usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un etere ciclico avente la formula C_2H_4O .

Come utilizzati nella presente, i termini *"polietilenglicole"*, *"PEG"*, *"ossido di polietilene"*, *"PEO"*, *"poliossietilene"*, e *"POE"* possono essere usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un composto di polietere composto da due o più subunità di ossido di etilene. *"Glicole polietilenico"* può essere composto da oligomeri di ossido di etilene (ad esempio, aventi da due a nove subunità monomeriche di ossido di etilene) o polimeri di ossido di etilene (ad esempio, aventi dieci o più nove subunità monomeriche di ossido di etilene).

La particella lipidica della presente descrizione è modificata per includere uno o più lipidi coniugati a polietilenglicole (PEG) al fine di consentire alla particella lipidica di evitare il rilevamento da parte del sistema immunitario di un soggetto a cui è somministrata la particella lipidica. In alcune forme di realizzazione, una particella lipidica della presente descrizione (*ad esempio*, liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) aumenta la permeabilità cellulare per i carboidrati idrofobici,

come mannosio-1-fosfato, che altrimenti non sono in grado di attraversare da soli la membrana cellulare.

Di conseguenza, le particelle lipidiche della presente descrizione contengono glicole polietilenico (PEG) coniugato a un fosfolipide. Senza voler essere vincolati ad alcuna teoria, tali modifiche possono proteggere le particelle lipidiche dall'opsonizzazione.

Il polietilenglicole (PEG) è presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione che varia da circa 0,5 percento molare a circa 20 percento molare. In alcune forme di realizzazione, il PEG può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione di circa 0,5 percento molare, circa 1 percento molare, circa 2 percento molare, circa 3 percento molare, circa 4 percento molare, circa 5 percento molare, circa 6 percento molare, circa 7 percento molare, circa 8 percento molare, circa 9 percento molare, circa 10 percento molare, circa 11 percento molare, circa 12 percento molare, circa 13 percento molare, circa 14 percento molare, circa 15

percento molare, circa 16 percento molare, circa 17 percento molare, circa 18 percento molare, circa 19 percento molare o circa 20 percento molare.

In alcune forme di realizzazione, il polietilenglicole (PEG) può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione di peso molecolare che varia da circa 200 Da a circa 10.000 Da. In alcune forme di realizzazione, il polietilenglicole (PEG) può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione di peso molecolare di circa 200 Da, circa 300 Da, circa 400 Da, circa 500 Da, circa 600 Da, circa 700 Da, circa 800 Da, circa 900 Da, circa 1.000 Da, circa 1.500 Da, circa 2.000 Da, circa 2.500 Da, circa 3.000 Da, circa 3.500 Da, circa 4.000 Da, circa 4.500 Da, circa 5.000 Da, circa 5.500 Da, circa 6.000 Da, circa 6.500 Da, circa 7.000 Da, circa 7.500 Da, circa 8.000 Da, circa 8.500 Da, circa 9.000 Da, circa 9.500 Da, o circa 10.000 Da.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e

niosomi) contengono PEG coniugato a un fosfolipide della presente descrizione. Il PEG può essere coniugato con uno o più tra fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerolo (PG), fosfatidilinositolo (PI) e qualsiasi loro combinazione. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono contenere PEG coniugato a fosfatidilcolina (PC). In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione possono contenere PEG coniugato a fosfatidiletanolamina (PE).

In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide coniugato a polietilenglicole (PEG) può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione che varia da circa 0,5 percento molare a circa 20 percento molare. In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide coniugato a polietilenglicole (PEG) può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione di circa 0,5 percento molare, circa 1 molare percento, circa 2

percento molare, circa 3 percento molare, circa 4 percento molare, circa 5 percento molare, circa 6 percento molare, circa 7 percento molare, circa 8 percento molare, circa 9 percento molare, circa 10 percento molare, circa 11 molare percento, circa 12 percento molare, circa 13 percento molare, circa 14 percento molare, circa 15 percento molare, circa 16 percento molare, circa 17 percento molare, circa 18 percento molare, circa 19 percento molare, o circa 20 percento molare. In alcune forme di realizzazione, un fosfolipide coniugato a polietilenglicole (PEG) può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione di circa il 2 percento molare.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono contenere uno o più steroli. Esempi di composti adatti includono, senza limitazione, colesterolo e colesterolo emisuccinato (CH), dicetilfosfato e Solulan C24.

In alcune forme di realizzazione, uno sterolo della presente descrizione, come il colesterolo, può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle,

nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione fino al 40 per cento molare. In alcune forme di realizzazione, uno sterolo della presente descrizione, come il colesterolo, può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) a una concentrazione fino al 5% molare, fino al 10 per cento molare, fino al 15 per cento molare, fino al 20 per cento molare, fino al 30 per cento molare o fino al 40 per cento molare. In alcune forme di realizzazione, uno sterolo della presente descrizione, come il colesterolo, può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione al massimo del 15% molare. In alcune forme di realizzazione, uno sterolo della presente descrizione, come il colesterolo, può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) con un rapporto molare di 1:1 o 2:1.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono contenere uno o più acidi grassi. In alcune forme di realizzazione, gli acidi grassi della

presente descrizione possono avere una catena di carbonio che varia in lunghezza da circa 14 atomi di carbonio a circa 18 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono contenere uno o più lipidi neutri. In alcune forme di realizzazione, un lipide neutro della presente descrizione può essere PEGilato (cioè coniugato a PEG). In alcune forme di realizzazione, un lipide neutro PEGilato della presente descrizione può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione che varia da circa 0,2 percento molare a circa 20 percento molare. In alcune forme di realizzazione, un lipide neutro della presente descrizione può essere PEGilato (cioè coniugato a PEG). In alcune forme di realizzazione, un lipide neutro PEGilato della presente descrizione può essere presente in una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione di circa 0,5 percento molare, circa 1 percento molare, circa 2 percento molare, circa 3 percento molare, circa 4 molare percento, circa 5 percento molare, circa 6 percento molare, circa 7 percento molare, circa 8 percento molare, circa 9

percento molare, circa 10 percento molare, circa 11 percento molare, circa 12 percento molare, circa 13 percento molare, circa 14 molare percento, circa 15 percento molare, circa 16 percento molare, circa 17 percento molare, circa 18 percento molare, circa 19 percento molare, o circa 20 percento molare.

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono essere modificate per colpire organelli e/o tessuti specifici. Qualsiasi metodo adatto noto nell'arte può essere usato per indirizzare una particella lipidica a un organello e/o tessuto. Esempi adatti includono, senza limitazione, la modifica del materiale utilizzato per la preparazione della particella lipidica stessa (ad esempio, utilizzando miscele distinte e rapporti molari di fosfolipidi come PC, PS, PI e PE), attacco covalente di un linker (ad esempio, catene peptidiche come catene di poli-arginina e ottadecil-rodamina B) sulla superficie delle particelle lipidiche o una modifica dell'anticorpo. Ad esempio, la modifica dell'ottadecil-rodamina B può indirizzare una particella lipidica al lisosoma delle cellule. In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche

della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi) possono essere liposomi coniugati con anticorpi, o immunoliposomi, che possono essere utilizzati per dirigere mannosio-1-fosfato incapsulato della presente descrizione ai tessuti malati e /o organi.

Carboidrati

Altri aspetti della presente descrizione riguardano composizioni contenenti mannosio-1-fosfato incapsulato all'interno di una particella lipidica della presente descrizione (ad esempio liposomi, micelle, nanoparticelle lipidiche solide e niosomi).

In alcune forme di realizzazione, il mannosio-1-fosfato può essere presente all'interno di una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione che varia da circa 0,10 mg per ml di particella lipidica a circa 10 mg per ml di particella lipidica. In alcune forme di realizzazione, il mannosio-1-fosfato può essere presente all'interno di una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione di circa 0,10 mg per ml di particella lipidica, circa 0,20 mg per ml di particella lipidica, circa 0,30 mg per ml di particella lipidica, circa 0,40 mg per ml di particelle lipidiche, circa 0,50 mg per ml di particelle lipidiche, circa 0,60 mg

per ml di particelle lipidiche, circa 0,70 mg per ml di particelle lipidiche, circa 0,80 mg per ml di particelle lipidiche, circa 0,90 mg per ml di lipidi particella, circa 1 mg per ml di particella lipidica, circa 1,50 mg per ml di particella lipidica, circa 2 mg per ml di particella lipidica, circa 2,50 mg per ml di particella lipidica, circa 3 mg per ml di particella lipidica, circa 3,50 mg per ml di particelle lipidiche, circa 4 mg per ml di particelle lipidiche, circa 4,50 mg per ml di particelle lipidiche, circa 5 mg per ml di particelle lipidiche, 5,50 mg per ml di particelle lipidiche, circa 6 mg per ml di particelle lipidiche, 6,50 mg per ml di particella lipidica, circa 7 mg per ml di particella lipidica, 7,50 mg per ml di parte lipidica ghiaccio, circa 8 mg per ml di particelle lipidiche, 8,50 mg per ml di particelle lipidiche, circa 9 mg per ml di particelle lipidiche, circa 9,50 mg per ml di particelle lipidiche o circa 10 mg per ml di particelle lipidiche. In alcune forme di realizzazione, mannosio-1-fosfato può essere presente all'interno di una particella lipidica della presente descrizione ad una concentrazione di circa 1 mg per mL di particella lipidica.

Mannosio-1-fosfato è un carboidrato endogeno. Come utilizzato nel presente documento, "carboidrato

endogeno" si riferisce a un carboidrato che si trova come prodotto naturale in un soggetto (incluso, ad esempio, un essere umano). Dovrebbe essere inteso, tuttavia, che un carboidrato endogeno può essere (i) prodotto naturalmente da un soggetto (incluso, ad esempio, un essere umano) ed estratto dalle cellule viventi di tale soggetto, o (ii) prodotto sinteticamente. In alcune forme di realizzazione, viene prodotto il carboidrato endogeno *in vivo* da un soggetto (incluso, ad esempio, umano). In altre forme di realizzazione, il carboidrato endogeno è prodotto naturalmente da una cellula derivata da un soggetto (incluso, ad esempio, umano), come una linea cellulare coltivata. Pertanto, la fonte di tali carboidrati endogeni può includere, senza limitazione, una fonte sintetica (ad esempio sintesi chimica) o una fonte naturale (ad esempio estrazione, isolamento o purificazione da un soggetto o cellula che produce naturalmente il carboidrato endogeno o un ricombinante cellula, come una cellula batterica, che è stata geneticamente modificata per produrre il carboidrato endogeno). Esempi di carboidrati endogeni possono includere, senza limitazione, carboidrati coinvolti nella glicosilazione proteica e lipidica.

In altre forme di realizzazione non rivendicate, il

carboidrato è un oligosaccaride legato al pirofosfato di dolico, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, dove Glc = glucosio, Man = mannosio, GlcNAc = N-acetilglucosammina, P = fosfato e Dol = dolico con una catena di lunghezza compresa, ma non limitata, a 14-18 unità isopreniche. Può essere usato qualsiasi metodo adatto noto nella tecnica per la preparazione di oligosaccaridi legati al pirofosfato di dolicolo. In un esempio, un approccio chemioenzimatico può essere utilizzato per sintetizzare un oligosaccaride legato al pirofosfato di dolicolo (ad esempio, Wang Z. et al., *Science*, 2013, 341, 379-383 e Weerapana E. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 13766-13767).

Altri aspetti non rivendicati della presente divulgazione riguardano composizioni contenenti glicolipidi incapsulati in una particella lipidica della presente divulgazione. È possibile utilizzare qualsiasi glicolipide adatto conosciuto nella tecnica. I glicolipidi includono, senza limitazioni, qualsiasi classe e peso molecolare di lipidi e carboidrati.

In alcune forme di realizzazione, mannosio-1-fosfato della presente descrizione possono essere integrati in particelle lipidiche della presente descrizione, come liposomi, che possono essere progettati per un targeting specifico all'interno di una cellula, l'ER

di una cellula o il Golgi di una cellula.

Composizioni farmaceutiche

Le composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica possono essere incorporate in una varietà di formulazioni per uso terapeutico (*ad esempio*, per somministrazione) o nella fabbricazione di un medicamento (*ad esempio*, per somministrare mannosio-1-fosfato a un soggetto che ne necessita e/o all'interno cellulare di un soggetto che ne necessita e/o per trattare o prevenire una malattia o un disturbo come un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto in necessità) combinando la composizione con veicoli appropriati (inclusi, *ad esempio*, veicoli o diluenti farmaceuticamente accettabili), e possono essere formulati, senza limitazione, in preparazioni in forma liquida, aerosol, semisolida o in polvere.

"*Carrier*" come usati nella presente includono veicoli, eccipienti o stabilizzanti farmaceuticamente accettabili che non sono tossici per la cellula o il soggetto che vi è esposto ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati. Spesso il veicolo fisiologicamente accettabile è una soluzione acquosa

a pH tamponato. Esempi di veicoli fisiologicamente accettabili includono, senza limitazione, tamponi come fosfato, citrato e altri acidi organici; antiossidanti compreso acido ascorbico; polipeptide a basso peso molecolare (inferiore a circa 10 residui); proteine, come albumina sierica, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili come polivinilpirrolidone; amminoacidi come glicina, glutammina, asparagina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati inclusi glucosio, mannosio o destrine; agenti chelanti come EDTA; alcoli di zucchero come mannitolo o sorbitolo; controioni formanti sale come sodio; e/o tensioattivi non ionici come TWEEN™, polietilenglicole (PEG) e PLURONICS™.

Esempi di formulazioni adatte includono, senza limitazione, soluzioni, iniezioni, inalanti, microsfere, aerosol, gel, unguenti, creme, lozioni, polveri, polveri vescicolari secche, compresse e capsule. Le composizioni farmaceutiche possono includere, a seconda della formulazione desiderata, veicoli farmaceuticamente accettabili, non tossici di diluenti, che sono veicoli comunemente usati per formulare composizioni farmaceutiche per la somministrazione animale o umana. Il diluente è scelto in modo da non influenzare l'attività biologica della

combinazione. Esempi di tali diluenti includono, senza limitazione, acqua distillata, acqua tamponata, soluzione salina fisiologica, PBS, soluzione di Ringer, soluzione di destrosio e soluzione di Hank. Una composizione o formulazione farmaceutica della presente descrizione può inoltre includere, senza limitazione, altri veicoli o stabilizzanti ed eccipienti non tossici, non terapeutici, non immunogeni. Le composizioni possono anche includere sostanze aggiuntive per approssimare condizioni fisiologiche, come agenti di regolazione del pH e agenti tampone, agenti di regolazione della tossicità, agenti bagnanti e detergenti. Una composizione farmaceutica della presente descrizione può anche includere uno qualsiasi di una varietà di agenti stabilizzanti, come ad esempio un antiossidante.

Per la somministrazione orale, il principio attivo può essere somministrato in forme di dosaggio solide, come capsule, compresse e polveri, o in forme di dosaggio liquide, come elisir, sciroppi e sospensioni. I componenti attivi possono essere incapsulati in capsule di gelatina insieme a ingredienti inattivi e veicoli in polvere, come glucosio, lattosio, saccarosio, mannitolo, amido, cellulosa o derivati della cellulosa, magnesio stearato, acido stearico,

saccarina sodica, talco, carbonato di magnesio. Esempi di ingredienti inattivi aggiuntivi che possono essere aggiunti per fornire colore, gusto, stabilità, capacità tampone, dispersione o altre caratteristiche desiderabili note sono ossido di ferro rosso, gel di silice, sodio laurilsolfato, biossido di titanio e inchiostro bianco commestibile. Diluenti simili possono essere usati per fare compresse pressate. Sia le compresse che le capsule possono essere fabbricate come prodotti a rilascio prolungato per fornire un rilascio continuo di farmaci per un periodo di ore. Le compresse pressate possono essere rivestite di zucchero o rivestite con film per mascherare qualsiasi sapore sgradevole e proteggere la compressa dall'atmosfera, o rivestite con enterico per la disintegrazione selettiva nel tratto gastrointestinale. Le forme di dosaggio liquide per la somministrazione orale possono contenere coloranti e aromi per aumentare l'accettazione da parte del paziente.

Le formulazioni adatte alla somministrazione parenterale includono soluzioni iniettabili sterili, acquose e non acquose, che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici e soluti che rendono la formulazione isotonica con il sangue del

destinatario previsto e sospensioni sterili acquose e non acquose che possono includere agenti sospendenti, solubilizzanti, agenti addensanti, stabilizzanti e conservanti.

I componenti utilizzati per formulare le composizioni farmaceutiche sono preferibilmente di elevata purezza e sono sostanzialmente privi di contaminanti potenzialmente dannosi (*ad esempio*, almeno di grado alimentare nazionale (NF), generalmente almeno di grado analitico e più tipicamente almeno di grado farmaceutico). Inoltre, composizioni destinate all'uso *in vivo* sono generalmente sterili. Nella misura in cui un dato composto deve essere sintetizzato prima dell'uso, il prodotto risultante è tipicamente sostanzialmente privo di agenti potenzialmente tossici, in particolare di endotossine, che possono essere presenti durante il processo di sintesi o purificazione. Anche le composizioni per la somministrazione parentale sono sterili, sostanzialmente isotoniche e realizzate in condizioni GMP.

Dosaggi farmaceutici

Si possono usare composizioni farmaceutiche della presente descrizione contenenti una composizione contenente una particella lipidica della presente

descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica (*ad esempio*, somministrato a un soggetto che necessita di trattamento con mannosio-1-fosfato, come un individuo umano) secondo metodi noti, come somministrazione orale, somministrazione endovenosa in bolo o per infusione continua per un periodo di tempo, per via intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, intracranica, intraspinale, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoviale, intratecale, orale, topica o inalatoria.

I dosaggi e la concentrazione desiderata delle composizioni farmaceutiche della presente descrizione possono variare a seconda dell'uso particolare previsto. La determinazione del dosaggio appropriato o della via di somministrazione rientra ampiamente nell'abilità di un artigiano ordinario. Gli esperimenti sugli animali forniscono una guida affidabile per la determinazione di dosi efficaci per la terapia umana. La scalabilità interspecie delle dosi efficaci può essere eseguita seguendo i principi descritti in Mordenti, J. e Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46.

Per la somministrazione *in vivo* di una qualsiasi delle composizioni della presente descrizione contenente una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica, le normali quantità di dosaggio possono variare da 10 ng/kg fino a 100 mg/kg di un soggetto peso corporeo al giorno.

La somministrazione di una composizione della presente descrizione contenente una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica può essere continua o intermittente, a seconda, ad esempio, delle condizioni fisiologiche del ricevente, se lo scopo della la somministrazione è terapeutica o profilattica e altri fattori noti al tecnico del ramo.

Rientra nell'ambito della presente descrizione che differenti formulazioni saranno efficaci per differenti trattamenti e differenti disturbi, e che la somministrazione intesa a trattare un organo o tessuto specifico può richiedere la somministrazione in un modo diverso da quello ad un altro organo o tessuto. Inoltre, i dosaggi possono essere somministrati mediante una o più somministrazioni separate, oppure mediante infusione continua. Per somministrazioni ripetute per diversi giorni o più, a seconda della

condizione, il trattamento viene sostenuto fino a quando non si verifica la soppressione desiderata dei sintomi della malattia. Tuttavia, possono essere utili altri regimi di dosaggio. Il progresso di questa terapia è facilmente monitorabile con tecniche e saggi convenzionali.

Pertanto, in alcune varianti, le composizioni fornite nella presente possono essere somministrate in modo cronico o intermittente a un soggetto (incluso, ad esempio, un essere umano) che ne necessita. La somministrazione "*cronico*" si riferisce alla somministrazione del/i medicinale/i in modalità continua rispetto a quella acuta, in modo da mantenere l'effetto terapeutico iniziale (attività) per un periodo di tempo prolungato. "*Intermittente*" la somministrazione si riferisce a un trattamento che non viene eseguito consecutivamente senza interruzione, ma piuttosto è di natura ciclica.

Usi terapeutici

La presente descrizione fornisce composizioni contenenti una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica che sono in grado di rilasciare mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula. Queste composizioni sono utili per somministrare mannosio-1-

fosfato a un soggetto che necessita di tali carboidrati.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "soggetto" si riferisce a un mammifero, come un animale umano, domestico, come un soggetto felino o canino, un animale da fattoria (ad esempio bovino, equino, caprino, ovino e suino), un animale selvatico (in natura o in un giardino), animale da ricerca, come topo, ratto, coniglio, capra, pecora, maiale, cane e gatto e uccelli. In una forma di realizzazione, il soggetto è un essere umano.

In alcune varianti, il soggetto potrebbe essere a rischio. Ad esempio, in una variante, il soggetto è un essere umano a rischio. Come utilizzato nel presente documento, un soggetto "a rischio" di sviluppare una particolare malattia, disturbo o condizione, come un disturbo congenito della glicosilazione, può avere o meno una malattia rilevabile o sintomi di malattia e può o meno aver mostrato malattia o sintomi rilevabili prima dei metodi di trattamento descritti qui. "A rischio" denota che un individuo ha fattori di rischio, che sono parametri misurabili che sono correlati allo sviluppo di una particolare malattia, disturbo o condizione, come noto nell'arte. Un soggetto che ha uno o più di questi fattori di rischio ha una maggiore

probabilità di sviluppare una particolare malattia, disturbo o condizione come un disturbo congenito della glicosilazione, rispetto a un soggetto senza uno o più di questi fattori di rischio.

In alcune forme di realizzazione, composizioni contenenti una particella lipidica della presente descrizione e un mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica possono anche essere utilizzate per rilasciare mannosio-1-fosfato all'interno della cellula di un soggetto che ne necessita. In alcune forme di realizzazione, le composizioni contenenti una particella lipidica della presente descrizione mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica possono essere utilizzate per prevenire, ridurre il rischio o trattare una malattia o un disturbo, come un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita. Di conseguenza, come descritto nella presente, le composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica possono essere utilizzate per fornire un mannosio-1-fosfato a un soggetto che ne necessita, per fornire mannosio-1-fosfato all'interno della cellula di un soggetto che ne necessita, e per trattare,

prevenire o ridurre il rischio di una malattia o disturbo, come un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita. In alcune forme di realizzazione, il soggetto ha una tale malattia o disturbo. In alcune forme di realizzazione, il soggetto è un essere umano che ha una tale malattia o disturbo.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "*disturbi congeniti della glicosilazione*" (CDG) si riferisce a un gruppo di malattie genetiche che provocano errori del metabolismo in cui la glicosilazione di una varietà di proteine tissutali e/o lipidi è carente o difettosa. I disturbi congeniti della glicosilazione possono anche essere conosciuti come sindromi CDG. Le sindromi CDG possono spesso causare malfunzionamenti gravi, occasionalmente fatali, di diversi sistemi di organi, come il sistema nervoso, il cervello, i muscoli e l'intestino, nei neonati affetti. Le manifestazioni delle sindromi CDG possono variare da grave ritardo dello sviluppo e ipotonia che iniziano nell'infanzia, all'ipoglicemia e all'enteropatia con perdita di proteine con sviluppo normale. Il ritardo dello sviluppo può essere un'indicazione iniziale comune per una diagnosi di CDG. Uno dei sottotipi più comuni di sindromi CDG è

CDG-Ia (noto anche come PMM2-CDG) dove il difetto genetico porta alla perdita della fosfomannomutasi 2, che è l'enzima responsabile della conversione del mannosio-6-fosfato in mannosio-1-fosfato.

Le sindromi CDG possono essere classificate come tipo I (CDG-I) e tipo II (CDG-II). Tale classificazione può dipendere dalla natura e dalla posizione del difetto biochimico nella via metabolica relativa all'azione dell'oligosaccariltransferasi. I metodi per lo screening per il sottotipo CDG possono includere l'analisi dello stato di glicosilazione della transferrina mediante, ad esempio, focalizzazione isoelettrica o ESI-MS. Esempi di CDG tipo I includono, senza limitazione, Ia (PMM2-CDG), Ib (MPI-CDG), Ic (ALG6-CDG), Id (ALG3-CDG), Ie (DPM1-CDG), If (MPDU1-CDG), Ig (ALG12-CDG), Ih (ALG8-CDG), Ii (ALG2-CDG), Ij (DPAGT1-CDG), Ik (ALG1-CDG), 1L (ALG9-CDG), Im (DOLK-CDG), In (RFT1-CDG), Io (DPM3-CDG), Ip (ALG11-CDG), Iq (SRD5A3-CDG), Ir (DDOST-CDG), DPM2-CDG, TUSC3-CDG, MAGT1-CDG, DHDDS-CDG e I/IIx. Esempi di CDG tipo II includono, senza limitazione, IIa (MGAT2-CDG), IIb (GCS1-CDG), IIc (SLC335C1-CDG), IId (B4GALT1-CDG), IIe (COG7-CDG), IIf (SLC35A1-CDG), IIg (COG1-CDG), IIh (COG8-CDG), Iii (COG5-CDG), IIj (COG4-CDG), IIL (COG6-CDG), ATP6V0A2-CDG, MAN1B1-CDG e ST3GAL3-CDG.

I disturbi congeniti della glicosilazione (CDG) che possono essere trattati con composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica includono, senza limitazione, Ia (PMM2-CDG), Ib (MPI-CDG), Ic (ALG6-CDG), Id (ALG3-CDG), Ie (DPM1-CDG), If (MPDU1-CDG), Ig (ALG12-CDG), Ih (ALG8-CDG), Ii (ALG2-CDG), Ij (DPAGT1-CDG), Ik (ALG1-CDG), 1L (ALG9-CDG), Im (DOLK-CDG), In (RFT1-CDG), Io (DPM3-CDG), Ip (ALG11-CDG), Iq (SRD5A3-CDG), Ir (DDOST-CDG), DPM2-CDG, TUSC3-CDG, MAGT1-CDG, DHDDS-CDG, I/IIx, IIa (MGAT2-CDG), IIb (GCS1-CDG), IIc (SLC335C1-CDG), IIId (B4GALT1-CDG), IIe (COG7-CDG), IIIf (SLC35A1-CDG), IIg (COG1-CDG), IIh (COG8-CDG), IIIi (COG5-CDG), IIj (COG4-CDG), IIL (COG6-CDG), ATP6V0A2-CDG, MAN1B1-CDG e ST3GAL3-CDG.

Di conseguenza, le composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica possono essere utilizzate per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) della presente informativa. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce

composizioni per l'uso in metodi per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi in soggetti che hanno un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) della presente descrizione somministrando al soggetto una composizione della presente descrizione contenente un lipide particella della presente descrizione e mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica per, ad esempio, fornire un carboidrato al soggetto per correggere, o altrimenti migliorare la glicosilazione proteica e/o lipidica nel soggetto.

In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni della presente invenzione per l'uso in metodi per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace della composizione comprendente una particella lipidica; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce metodi per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità

terapeuticamente efficace della composizione comprendente una particella lipidica comprendente ossido di etilene; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni della presente invenzione per l'uso in metodi per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace della composizione comprendente una particella lipidica; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, in cui la particella lipidica comprende colina, etanolamina, glicerolo, inositolo o qualsiasi loro combinazione. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni della presente invenzione per l'uso in metodi per trattare, prevenire o migliorare uno o più sintomi di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace della composizione comprendente un liposoma; e mannosio-1-fosfato incapsulato nel liposoma, in cui il liposoma comprende colesterolo e fosfatidiletanolamina (PE) attaccati a

polietilenglicole (PEG). In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) può essere un disturbo CDG di tipo I, un disturbo CDG-Ia, un disturbo CDG di tipo II, un disturbo CDG-IIc o un disturbo CDG-IIf. In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è un disturbo CDG-Ia. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per via orale, dermica, nasale o endovenosa.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "*trattamento*" o "*trattare*" è un approccio per ottenere risultati utili o desiderati, compresi i risultati clinici. I risultati clinici benefici o desiderati possono includere uno o più dei seguenti: a) inibizione della malattia o condizione (ad esempio, diminuzione di uno o più sintomi derivanti dalla malattia o condizione e/o diminuzione dell'estensione della malattia o condizione); b) rallentare o arrestare lo sviluppo di uno o più sintomi clinici associati alla malattia o condizione (ad esempio stabilizzare la malattia o condizione, prevenire o ritardare il peggioramento o la progressione della malattia o condizione e/o prevenire o ritardare la diffusione della malattia o la condizione); e/o c) alleviare la

malattia, ovvero causare la regressione dei sintomi clinici (ad esempio, migliorare lo stato di malattia, fornire una remissione parziale o totale della malattia o condizione, potenziare l'effetto di un altro farmaco, ritardare la progressione della malattia, aumentare la qualità della vita e/o prolungare la sopravvivenza.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "*prevenzione*" o "*prevenire*" si riferisce a qualsiasi trattamento di una malattia o condizione che causa il mancato sviluppo dei sintomi clinici della malattia o condizione. I composti possono, in alcune forme di realizzazione, essere somministrati a un soggetto (incluso un essere umano) che è a rischio o ha una storia familiare della malattia o condizione.

Una "*quantità effettivo*" si riferisce ad almeno una quantità efficace, ai dosaggi e per i periodi di tempo necessari, per ottenere il risultato terapeutico o profilattico desiderato. Una quantità effettiva può essere erogato in una o più somministrazioni.

Una "*quantità terapeuticamente efficace*" è almeno la concentrazione minima richiesta per effettuare un miglioramento misurabile di una particolare malattia, disturbo o condizione, come un disturbo congenito della glicosilazione. Una quantità terapeuticamente

efficace nel presente documento può variare in base a fattori quali lo stato della malattia, l'età, il sesso e il peso del soggetto e la capacità delle composizioni lipidiche della presente descrizione di suscitare una risposta desiderata nel soggetto. Una quantità terapeuticamente efficace è anche quella in cui eventuali effetti tossici o dannosi delle composizioni lipidiche della presente descrizione sono controbilanciati dagli effetti terapeuticamente benefici.

In altri aspetti non rivendicati della presente descrizione, composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e un carboidrato della presente descrizione incapsulato dalla particella lipidica possono essere utilizzate per fornire un carboidrato a un soggetto che ne necessita. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione non rivendicate, la presente descrizione fornisce metodi per somministrare un carboidrato a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione comprendente una particella lipidica; e un carboidrato endogeno incapsulato nella particella lipidica. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, la

presente divulgazione fornisce metodi per la somministrazione di un carboidrato a un soggetto che ne ha bisogno, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione che comprende una particella lipidica comprendente ossido di etilene e un carboidrato incapsulato nella particella lipidica. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, la presente divulgazione fornisce metodi per la somministrazione di un carboidrato a un soggetto che ne ha bisogno, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione che comprende una particella lipidica comprendente ossido di etilene e un carboidrato incapsulato nella particella lipidica; e un carboidrato incapsulato nella particella lipidica, dove la particella lipidica comprende colina, etanolamina, glicerolo, inositolo o una loro combinazione. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, la presente descrizione fornisce metodi per somministrare un carboidrato a un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione comprendente un liposoma; e mannosio-1-fosfato incapsulato nel liposoma, in cui il liposoma comprende colesterolo e fosfatidiletanolamina (PE) attaccati a

polietilenglicole (PEG). In alcune forme di realizzazione, in cui una composizione farmaceutica è per l'uso in un metodo per somministrare mannosio-1-fosfatecarboidrato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, il soggetto ha un disturbo congenito della glicosilazione (CDG). In alcune forme di realizzazione, in cui una composizione farmaceutica è per l'uso in un metodo per somministrare mannosio-1-fosfatecarboidrato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) può essere un disturbo CDG di tipo I, un disturbo CDG-Ia, un disturbo CDG di tipo II, un disturbo CDG-IIc e un disturbo CDG-IIf. In alcune forme di realizzazione, in cui una composizione farmaceutica è per l'uso in un metodo per somministrare mannosio-1-fosfatecarboidrato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è un disturbo CDG-Ia.

In altri aspetti della presente descrizione, le composizioni della presente descrizione contenenti una particella lipidica della presente descrizione e un mannosio-1-fosfato incapsulato dalla particella lipidica possono essere utilizzate per fornire un mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un

soggetto che ne necessita. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni della presente divulgazione per l'uso in metodi per somministrare mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione comprendente una particella lipidica; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, in cui la composizione somministrata attraverso la membrana plasmatica cellulare fornendo così il mannosio-1-fosfato all'interno della cellula. che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di una composizione che comprende una particella lipidica comprendente ossido di etilene e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, in cui la composizione somministrata attraverso la membrana plasmatica della cellula fornendo così mannosio-1-fosfato all'interno della cellula. In alcune forme di realizzazione, la presente divulgazione fornisce composizioni della presente divulgazione da utilizzare nei metodi di somministrazione del mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità

terapeuticamente efficace di una composizione che comprende una particella lipidica; e mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica, in cui la particella lipidica comprende colina, etanolamina, glicerolo, inositolo o una loro combinazione, e in cui la composizione somministrata attraversa la membrana plasmatica della cellula fornendo così mannosio-1-fosfato all'interno della cellula. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni della presente divulgazione per l'uso in metodi per somministrare mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, somministrando al soggetto una quantità therapeuticamente efficace di una composizione comprendente un liposoma; e mannosio-1-fosfato incapsulato nel liposoma, in cui il liposoma comprende colesterolo e fosfatidiletanolamina (PE) attaccati al polietilenglicole (PEG), e in cui la composizione somministrata attraversa la membrana plasmatica cellulare fornendo così mannosio-1-fosfato all'interno della cellula. In alcune forme di realizzazione, il soggetto ha un disturbo congenito della glicosilazione (CDG). In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) può essere un disturbo CDG di tipo I, un disturbo CDG-Ia, un disturbo

CDG di tipo II, un disturbo CDG-IIc e un disturbo CDG-IIf. In alcune forme di realizzazione, il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è un disturbo CDG-Ia. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione della composizione induce un aumento da almeno 0,05 ad almeno 2 volte della produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore nel soggetto, rispetto alla produzione cellulare di oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore oligosaccaridi nel soggetto in assenza della composizione. In alcune forme di realizzazione, gli oligosaccaridi legati a lipidi di ordine superiore comprendono Man4GlcNAc2, Man5GlcNAc2, Man6GlcNAc2, Man7GlcNAc2, Man8GlcNAc2, Man9GlcNAc2 o qualsiasi loro combinazione. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per via orale, topica, dermica, nasale, endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, intracranica, intraspinale, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoviale o intratecale.

Articoli di fabbricazione e kit

La presente descrizione fornisce anche ma non rivendica articoli di fabbricazione e/o kit contenenti una composizione della presente descrizione contenente una particella lipidica della presente descrizione e

un carboidrato della presente descrizione incapsulato dalla particella lipidica. Articoli di fabbricazione e/o kit non rivendicati della presente descrizione possono includere uno o più contenitori comprendenti una composizione purificata della presente descrizione. Contenitori adatti possono includere, senza limitazione, flaconi, flaconcini, siringhe e sacche di soluzione IV. I contenitori possono essere formati da una varietà di materiali come vetro o plastica. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, gli articoli di fabbricazione e/o i kit includono inoltre istruzioni per uso secondo uno qualsiasi dei metodi della presente descrizione. In alcune forme di realizzazione non rivendicate, queste istruzioni comprendono una descrizione della somministrazione della composizione contenente una particella lipidica della presente descrizione e un carboidrato della presente descrizione incapsulato dalla particella lipidica per fornire il carboidrato a un soggetto che ne necessita, per fornire il carboidrato a un interno cellulare di un soggetto che ne necessita, o per trattare un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) a un soggetto che ne necessita, secondo uno qualsiasi dei metodi della presente descrizione. In alcune forme di realizzazione

non rivendicate, le istruzioni comprendono una descrizione di come rilevare un disturbo congenito della glicosilazione (CDG), ad esempio in un soggetto, in un campione di tessuto o in una cellula. L'articolo di fabbricazione e/o il kit può inoltre comprendere una descrizione della selezione di un soggetto adatto per il trattamento basato sull'identificazione se quel soggetto ha la malattia e lo stadio della malattia.

Le istruzioni generalmente includono informazioni su dosaggio, schema di dosaggio e via di somministrazione per il trattamento previsto. I contenitori possono essere dosi unitarie, confezioni sfuse (ad esempio confezioni multidose) o dosi subunità. Le istruzioni fornite negli articoli di fabbricazione e/o kit della presente descrizione sono tipicamente istruzioni scritte su un'etichetta o foglietto illustrativo (ad esempio, un foglio di carta incluso nell'articolo di fabbricazione e/o kit), ma istruzioni leggibili da una macchina (ad esempio, sono accettabili anche le istruzioni riportate su un disco di memorizzazione magnetico o ottico).

L'etichetta o il foglietto illustrativo indica che la composizione è utilizzata per fornire un carboidrato e/o trattare, *ad esempio*, un disturbo congenito della glicosilazione (CDG). Possono essere fornite

istruzioni per mettere in pratica uno qualsiasi dei metodi qui descritti.

Gli articoli di fabbricazione e/o i kit non rivendicati della presente descrizione possono essere in un imballaggio idoneo. L'imballaggio idoneo include, senza limitazioni, fiale, flaconi, vasetti e imballaggi flessibili (*ad esempio*, Mylar sigillato o sacchetti di plastica). Sono anche contemplate confezioni per uso in combinazione con un dispositivo specifico, come un inalatore, un dispositivo di somministrazione nasale (*ad esempio* un atomizzatore) o un dispositivo di infusione come una minipompa. Un articolo di fabbricazione e/o kit può avere una porta di accesso sterile (*ad esempio* il contenitore può essere una sacca di soluzione endovenosa o una fiala avente un tappo perforabile da un ago per iniezione ipodermico). Il contenitore può anche avere una porta di accesso sterile (*ad esempio*, il contenitore può essere una sacca per soluzione endovenosa o una fiala avente un tappo perforabile da un ago per iniezione ipodermico). Almeno un agente attivo nella composizione è un carboidrato in grado di trattare un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) e/o migliorarne uno o più sintomi. Il contenitore può inoltre comprendere un secondo agente

farmaceuticamente attivo.

Articoli di fabbricazione e/o kit possono opzionalmente fornire componenti aggiuntivi come buffer e informazioni interpretative. Normalmente, l'articolo di fabbricazione e/o il kit comprende un contenitore e un'etichetta o uno o più foglietti illustrativi sopra o associati al contenitore.

Salvo diversa definizione, tutti i termini scientifici e tecnici si intendono avere lo stesso significato comunemente usato nell'arte cui si riferiscono. Ai fini della presente informativa si definiscono i seguenti termini.

Il termine "*circa*" come qui utilizzato si riferisce all'usuale intervallo di errore per il rispettivo valore facilmente noto all'esperto del settore tecnico. Riferimento alle "*circa*" un valore o parametro qui include (e descrive) forme di realizzazione che sono dirette a quel valore o parametro *di per sé*. Ad esempio, "*circa x*" include e descrive "*x*" *di per sé*. In alcune forme di realizzazione, il termine "*circa*" quando utilizzato in associazione ad una misura, o utilizzato per modificare un valore, un'unità, una costante, o un intervallo di valori, si riferisce a variazioni di +/- 2%.

Come utilizzato nel presente documento e nelle rivendicazioni accluse, le forme singolari "un", "una" e "il" includono riferimenti plurali salvo che il contesto non indichi chiaramente diversamente. Ad esempio, il riferimento a una "particella lipidica" è un riferimento a da una a molte particelle lipidiche come le quantità molari, e comprende i relativi equivalenti noti agli esperti nella tecnica, e così via.

ESEMPI

L'invenzione sarà compresa più completamente facendo riferimento ai seguenti esempi. Essi non dovrebbero, tuttavia, essere interpretati come limitanti l'ambito dell'invenzione.

Abbreviazioni

"PC" corrisponde alla fosfatidilcolina.

"PE" corrisponde alla fosfatidiletanolamina.

"PEG" corrisponde a 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[ammino(polietilenglicole)-2000] o semplicemente polietilenglicole.

"M1P" corrisponde al mannosio-1-fosfato.

"PBS" corrisponde alla soluzione salina tamponata con fosfato.

"MWCO" corrisponde alla membrana di cut-off del peso molecolare.

Materiali e metodi

Liposomi

I materiali per la preparazione dei liposomi (PC, PE e PE-PEG) sono stati acquistati da Avanti Polar Lipids.

Linee cellulari

I fibroblasti dermici umani CDG-Ia e i fibroblasti dermici umani wild-type sono stati acquistati dal Coriell Institute.

Strumenti della cultura

I terreni di Dulbecco min Eagle sono stati acquistati da Mediatech.

Il terreno essenziale alfa minimo è stato acquistato da Mediatech.

La glutammina e la penicillina-streptomina sono state acquistate da Omega Scientific.

FBS è stato acquistato da Thermo.

Esempio 1: Preparazione di liposomi di mannosio-1-fosfato

Il seguente Esempio dimostra la preparazione di liposomi contenenti mannosio-1-fosfato (M1P-liposomi). La struttura del mannosio-1-fosfato (M1P) è rappresentata in FIG. 1A. Mentre un isomero specifico è raffigurato in FIG. 1A, resta inteso che i carboidrati utilizzati nelle composizioni e nei metodi qui forniti possono essere qualsiasi forma isomerica,

a condizione che tali carboidrati siano carboidrati endogeni per un dato soggetto.

Metodo di preparazione dei liposomi

I liposomi sono stati preparati mediante idratazione a film sottile da fosfatidilcolina (PC), colesterolo e fosfatidiletanolamina (PE) coniugata con topoli-etilene-glicole (PEG). La struttura del PEG è rappresentata in FIG. 1B. In FIG. 1B, in una variazione, n può essere compreso tra 800-5000. In altre varianti, il valore di n potrebbe essere il 2000. In ancora altre varianti, il PEG può essere modificato con meleimmide o NHS-estere a seconda di ciò a cui sarà coniugato il PEG. La struttura della fosfatidiletanolamina attaccata al PEG (PEG-PE) è illustrata in FIG. 1C. La struttura della fosfatidilcolina (PC) è rappresentata in FIG. 1D.

Il solvente sfuso dal film lipidico di PC e colesterolo è stato rimosso mediante evaporazione rotante per 30 minuti, seguito da liofilizzazione per 4 ore per rimuovere tracce di solvente. Successivamente, i liposomi sono stati prima reidratati con una soluzione di mannosio-1-fosfato (M1P) in soluzione salina tamponata con fosfato 1X pH 7,4 (PBS) a una concentrazione M1P di 10 mg/mL. Quindi, è stato ulteriormente aggiunto PBS in modo da ottenere una

concentrazione lipidica di 20 mg/mL. I liposomi sono stati quindi riscaldati a 39°C e dimensionati o estrusi attraverso membrane in policarbonato di dimensione dei pori di 200 nm e quindi di 100 nm utilizzando un mini estrusore portatile. I liposomi sono stati quindi dializzati contro PBS utilizzando una membrana cut-off di peso molecolare di 2 kDa (MWCO).

Dopo questo passaggio, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[ammino(polietilenglicole)-2000] (PEG) è stato aggiunto mediante post-inserimento. In breve, un film sottile di PEG è stato ottenuto essiccando il solvente utilizzando un flusso di N₂ gas e liofilizzazione come accennato in precedenza. Questo film è stato quindi reidratato utilizzando la soluzione liposomiale caricata con M1P preparata. Dopo vortex per 5 minuti, la soluzione è stata incubata a 37°C durante la notte per consentire il post-inserimento del PEG nel nucleo della nanoparticella. La struttura dei liposomi caricati con mannosio-1-fosfato è illustrata in FIG. 2.

Tabella 1

Formulazione	Percentuale molare (%)	Peso (mg)
PC	70	16,7
Colesterolo	30	3,64
DSPE-PEG ₂₀₀₀	2	1,75
M1P	5	1,0

In **Tabella 1**, il volume finale della formulazione del liposoma era di 1 mL.

Esempio 2: misurazione del contenuto di M1P nei liposomi

Il disturbo CDG-Ia è un disturbo della glicosilazione caratterizzato dalla carenza o dalle anomalie associate all'enzima fosfomannomutasi (PMM). Questo disturbo viene diagnosticato testando le glicoproteine sieriche di origine epatica (la transferrina è la proteina clinicamente testata), che sono comunemente sottoglicosilate. Tipicamente la transferrina viene valutata utilizzando la focalizzazione isoelettrica, che sottolineerebbe una drastica diminuzione dell'attività del PMM (l'attività del PMM nei pazienti CDG-Ia è di circa 0,29 nM/min/mg, rispetto alla normale attività del PMM di circa 2,97 nM/min/mg). L'enzima PMM è responsabile della catalizzazione della conversione del mannosio-6-fosfato in mannosio-1-fosfato, che è a sua volta un precursore per la sintesi finale di $G_3M_9Gn_2$ -P-P-Dolichol, che a sua volta è un precursore dell'oligosaccaride legato a lipidi (LLO). Questo è rappresentato dalla seguente rappresentazione schematica della via di glicosilazione metabolica: glucosio → glucosio-6-fosfato → fruttosio-6-fosfato → mannosio → mannosio-6-fosfato → mannosio-1-fosfato →

GDP-mannosio → peptide N-glicosilazione.

I tipici oligosaccaridi LLO includono le subunità di mannosio (M) legate ad un N-acetilglucosamina disaccaride (Gn₂). La diminuzione dell'attività del PMM ostacola quindi la piena maturazione degli oligosaccaridi LLO, che in genere variano in dimensioni da M₅Gn₂ a M₉Gn₂. Gli oligosaccaridi LLO immaturi risultanti non sono LLO completamente funzionali e sono tipicamente troncati. Gli oligosaccaridi LLO immaturi hanno tipicamente dimensioni di M₂Gn₂ e M₃Gn₂.

L'analisi delle catene di oligosaccaridi sintetizzate viene tipicamente eseguita incubando i fibroblasti con mannosio radiomarcato per verificare qualsiasi divergenza dai modelli stabiliti di maturazione degli oligosaccaridi. Ciò si ottiene in genere etichettando gli oligosaccaridi appena sintetizzati all'interno dei fibroblasti umani con [2-³H]mannosio. Dopo l'incubazione con mannosio marcato, i lisati cellulari vengono digeriti per analizzare ulteriormente gli zuccheri marcati mediante cromatografia. Tuttavia, è necessaria una fornitura costante di mannosio per garantire una produzione continua della catena saccaridica. (S. Catherine Hubbard e Phillips W. Robbins. Journal of Biological Chemistry (1980) 255:

11782-11793). Un problema con l'approccio di fornire sistematicamente mannosio all'interno del corpo per trattare disturbi, come CDG-Ia, è l'incapacità del mannosio di attraversare la membrana plasmatica. Quindi vari derivati del mannosio sono stati valutati per la loro capacità di accumularsi all'interno del citosol delle cellule. Tuttavia, questo approccio è anche problematico, a causa della tossicità e dell'instabilità di tali derivati.

L'esempio seguente dimostra la capacità dei liposomi M1P di guidare la biosintesi e la piena maturazione di vari oligosaccaridi LLO. Questo approccio evita la necessità di permeabilizzare le cellule o di utilizzare un derivato del mannosio.

Preparazione del campione lipidico

I lipidi sono stati precipitati con Triton X-100 al 10% utilizzando un rapporto di 1:1 liposoma:detergente, rispettivamente. Il precipitato lipidico è stato rimosso mediante centrifugazione. M1P isolato è stato trattato con HCl ad una concentrazione finale di 0,1 N; Il legame 1-fosforo è stato idrolizzato per 15 minuti a 100°C. I campioni sono stati essiccati in un vuoto veloce in preparazione per l'etichettatura con un fluoroforo per il rilevamento e la quantificazione come descritto da Alwael et al.

(*Metodi anali*, 2011, 3, 62). La concentrazione di M1P nei liposomi era di 1,0 mg per millilitro di formulazione equivalente al 5% della concentrazione lipidica totale.

Prove/Terapeutiche

È stata valutata l'internalizzazione cellulare nel citosol e la successiva integrazione dei liposomi M1P (come preparato nell'Esempio 1) *in vitro* utilizzando fibroblasti dermici umani primari derivati da pazienti affetti da disturbo CDG-Ia (fibroblasti CDG-Ia) e fibroblasti dermici umani wild-type. Per la valutazione della capacità dei liposomi M1P di correggere i difetti di glicosilazione proteica, i liposomi M1P sono stati somministrati a fibroblasti primari CDG di tipo I derivati da pazienti affetti da disturbo CDG-Ia. La capacità di portare avanti la glicosilazione è stata valutata confrontando la struttura della glicoproteina N-glicano prima e dopo il trattamento. Tale confronto ha richiesto l'analisi degli N-glicani mediante cromatografia in fase normale.

Utilizzando le vie endocitotiche, i liposomi M1P possono entrare all'interno della cellula e rilasciare il loro carico nel citosol. A causa della capacità di fornire un mannosio-1-fosfato non modificato nel

citosol, l'analisi è stata eseguita sull'assemblaggio di oligosaccaridi LLO in fibroblasti wild-type e fibroblasti derivati da un paziente CDG-Ia (fibroblasti CDG-Ia). Le strutture LLO sono state isolate dai fibroblasti wild-type (con attività PMM al 100%) e dai fibroblasti CDG-Ia (con attività PMM 10%) e le quantità delle strutture LLO sono state confrontate utilizzando metodi cromatografici.

I fibroblasti dermici CDG-Ia producono una serie di specie di oligosaccaridi legati a lipidi troncati (LLO) di dimensioni variabili da M_2Gn_2 a M_5Gn_2 con M_2Gn_2 e M_3Gn_2 che sono predominanti. I liposomi M1P dell'Esempio 1 sono stati testati per valutare la loro capacità di normalizzare la distribuzione di vari oligosaccaridi LLO. I fibroblasti CDG-Ia coltivati in terreni DMEM a basso contenuto di glucosio sono stati incubati con 300 μ M di M1P nudo (M1P) e 300 μ M di M1P-liposomi (M1PL). Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e gli oligosaccaridi LLO sono stati recuperati, idrolizzati, modificati con fluoroforo e analizzati mediante cromatografia in fase normale come descritto da Gao et al. (*Metodi in Enzimologia*, 2006, 415, 3-20) e Bones et al. (*Anal. Chem*, 2011, 83(13), 5344-52). L'area di picco di ciascun LLO è stata normalizzata al contenuto proteico prima del calcolo

dell'abbondanza percentuale.

I risultati sono illustrati nella **Tabella 2**. La distribuzione di vari oligosaccaridi LLO da fibroblasti wild-type variava da M_2Gn_2 a M_7Gn_2 . Il trattamento dei fibroblasti CDG-Ia con liposomi M1P ha inibito la sintesi di oligosaccaridi LLO troncati M_2Gn_2 e M_3Gn_2 , e ha spostato la produzione verso specie di oligosaccaridi LLO più grandi causando un aumento dell'espressione di strutture M_5Gn_2 - M_7Gn_2 (**Tabella 2**). La quantità di M_5Gn_2 LLO prodotto dopo il trattamento dei fibroblasti CDG-Ia con M1P-liposomi era tre volte maggiore della quantità nei fibroblasti CDG-Ia non trattati e due volte la quantità nei fibroblasti CDG-Ia trattati con M1P nudo (**Tabella 2**). Inoltre, oligosaccaridi LLO di ordine superiore (ad esempio, M_6Gn_2 e M_7Gn_2) sono stati osservati nei fibroblasti CDG-Ia dopo trattamento con liposomi M1P (**Tabella 2**). Tali oligosaccaridi LLO di ordine superiore non sono stati osservati nei fibroblasti CDG-Ia prima del trattamento con liposomi M1P. Inoltre, la quantità di oligosaccaridi M_6Gn_2 e M_7Gn_2 LLO nei fibroblasti CDG-Ia dopo il trattamento con liposomi M1P erano paragonabili alla quantità nei fibroblasti wild-type (**Tabella 2**).

La normalizzazione completa non è stata osservata in

tutti i casi, poiché l'approccio analitico utilizzato ha rilevato sia oligosaccaridi LLO di nuova sintesi che oligosaccaridi LLO precedentemente prodotti nella cellula.

Tabella 2

Genotipo	Trattamento	M ₂ Gn ₂	M ₃ Gn ₂	M ₄ Gn ₂	M ₅ Gn ₂	M ₆ Gn ₂	M ₇ Gn ₂
Normale	Nessuno	18	10	36	32	4,5	0,4
CDG-Ia	Nessuno	31	38	24	6,2		
CDG-Ia	300 µM M1PL	18	28	31	18	3,9	0,5
CDG-Ia	300 µM M1P	40	24	27	8,9		

Tabella 2 illustra le normali analisi cromatografiche in fase della distribuzione degli oligosaccaridi LLO (espressa come percentuale, %) nei fibroblasti wild-type e nei fibroblasti CDG-Ia. Gli oligosaccaridi LLO contengono due o più subunità di mannosio (Man) e un disaccaride N-acetilglucosamina (GlcNAc₂). Nella **Tabella 2**, "M₂Gn₂" corrisponde a Man₂GlcNAc₂, "M₃Gn₂" corrisponde a Man₃GlcNAc₂, "M₄Gn₂" corrisponde a Man₄GlcNAc₂, "M₅Gn₂" corrisponde a Man₅GlcNAc₂, "M₆Gnc₂" corrisponde a Man₆GlcNAc₂ e "M₇Gn₂" corrisponde a Man₇GlcNAc₂.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente:

(i) particella lipidica, comprendente una particella

lipidica, comprendente uno o più lipidi coniugati con polietilenglicole (PEG), in cui il PEG è presente in una concentrazione compresa tra circa lo 0,5 per cento molare e circa il 20 per cento molare, e

(ii) mannosio-1-fosfato incapsulato nella particella lipidica.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui la particella lipidica è un liposoma.

3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui uno qualsiasi o più degli uno o più lipidi sono fosfolipidi.

4. Composizione secondo la rivendicazione 3, in cui uno qualsiasi o più degli uno o più fosfolipidi sono fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerolo (PG) o fosfatidilinositolo (PI).

5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il PEG ha un peso molecolare da circa 200 Da a circa 10.000 Da.

6. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la particella lipidica comprende inoltre colesterolo o uno o più glicerolipidi, sfingolipidi, acidi grassi o una loro combinazione.

7. Composizione farmaceutica comprendente la

composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, e un veicolo farmaceuticamente accettabile.

8. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 per l'uso in un metodo di somministrazione di mannosio-1-fosfato all'interno di una cellula di un soggetto che ne necessita, comprendente la somministrazione della composizione o della composizione farmaceutica al soggetto, in cui la composizione somministrata attraversa la membrana plasmatica cellulare per somministrare il carboidrato all'interno della cellula.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 da utilizzare in un metodo di trattamento di un disturbo congenito della glicosilazione (CDG) in un soggetto che ne necessita, comprendente la somministrazione al soggetto della composizione o della composizione farmaceutica.

10. Composizione o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 9, in cui CDG è CDG-Ia, CDG-Ib, CDG-Ic, CDG-Id, CDG-Ie, CDG-If, CDG-Ig, CDG-Ih, CDG-Ii, CDG-Ij, CDG-Ik, CDG-1L, CDG-Im, CDG-In, CDG-Io, CDG-Ip, CDG-Iq, CDG-Ir, DPM2-CDG, TUSC3-CDG, MAGT1-CDG, DHDDS-CDG e CDG-I/lix, opzionalmente un

disturbo CDG-Ia, CDG-Ie, CDG-Ii, CDG-Ik, CDG-Io, CDG-Ip o DPM2-CDG.

11. Composizione o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 9 comprendente la somministrazione al soggetto della composizione o della composizione farmaceutica, in cui il disturbo congenito della glicosilazione (CDG) è un disturbo CDG-Ia.

Didascalia delle figure:

FIG. 2

micron; colesterolo; fosfolipide; carboidrato.

EP 3 954 360 B1

FIG. 1A

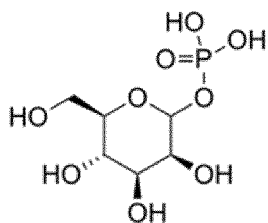


FIG. 1B

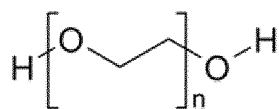


FIG. 1C

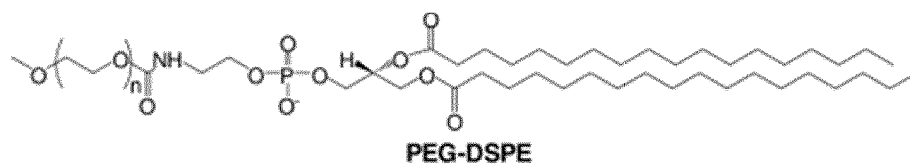
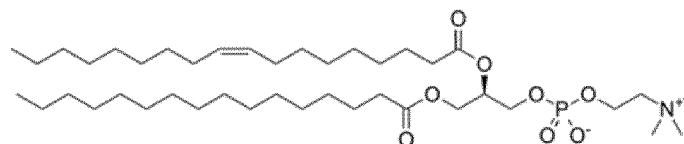


FIG. 1D



EP 3 954 360 B1

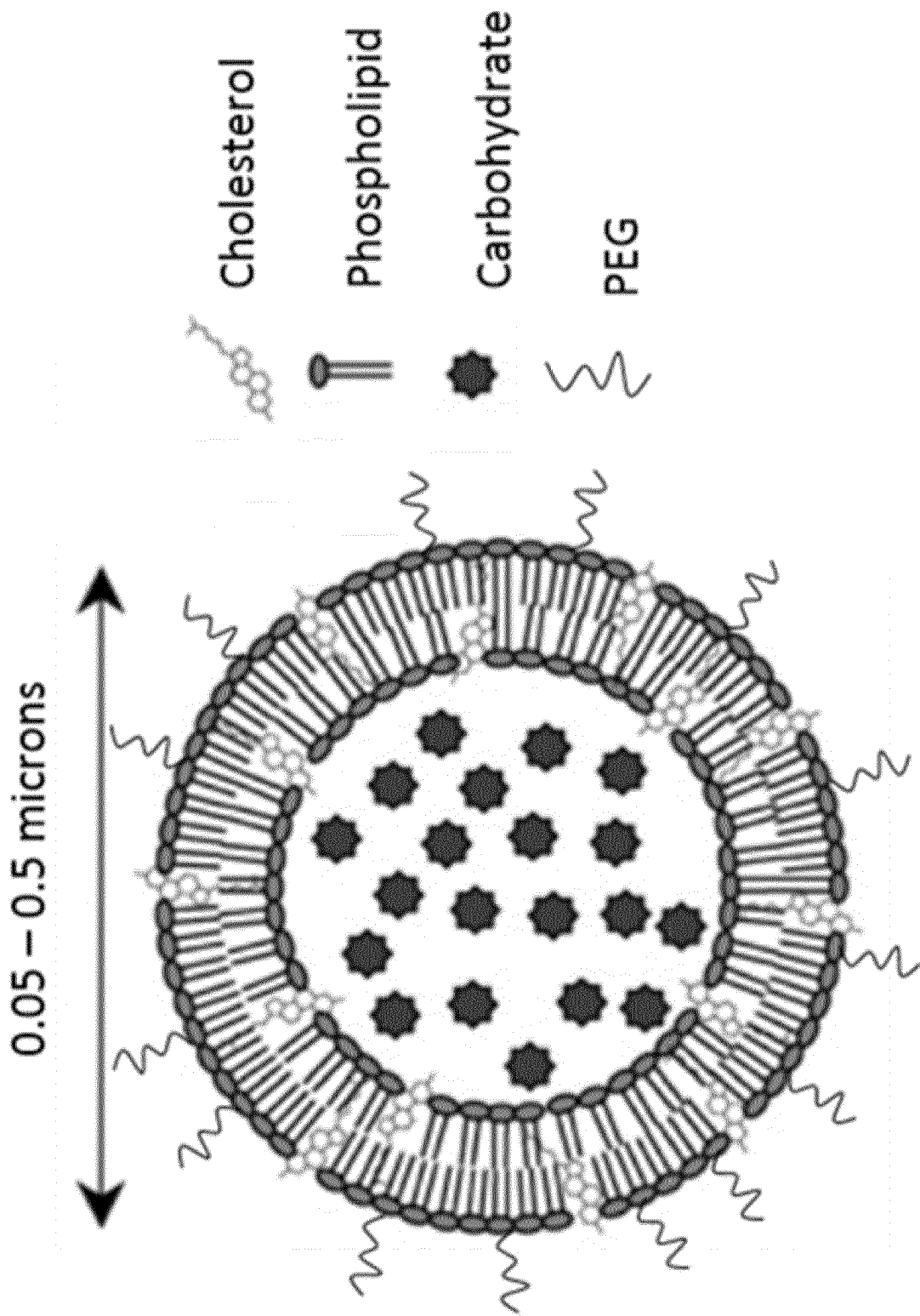


FIG. 2