

Targeting the A-kinase Anchoring Function on PI3K for Treating Cystic Fibrosis

Molecular Biotechnology Center

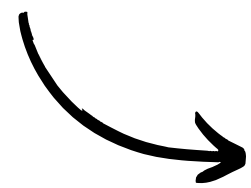
Presented by Erika Siano, Erika Vasile, Federica Dalle,
Marzia Granata Balduzzi, Giorgia Cappello, Alice Ferrari



PI3Ks

Funzioni:

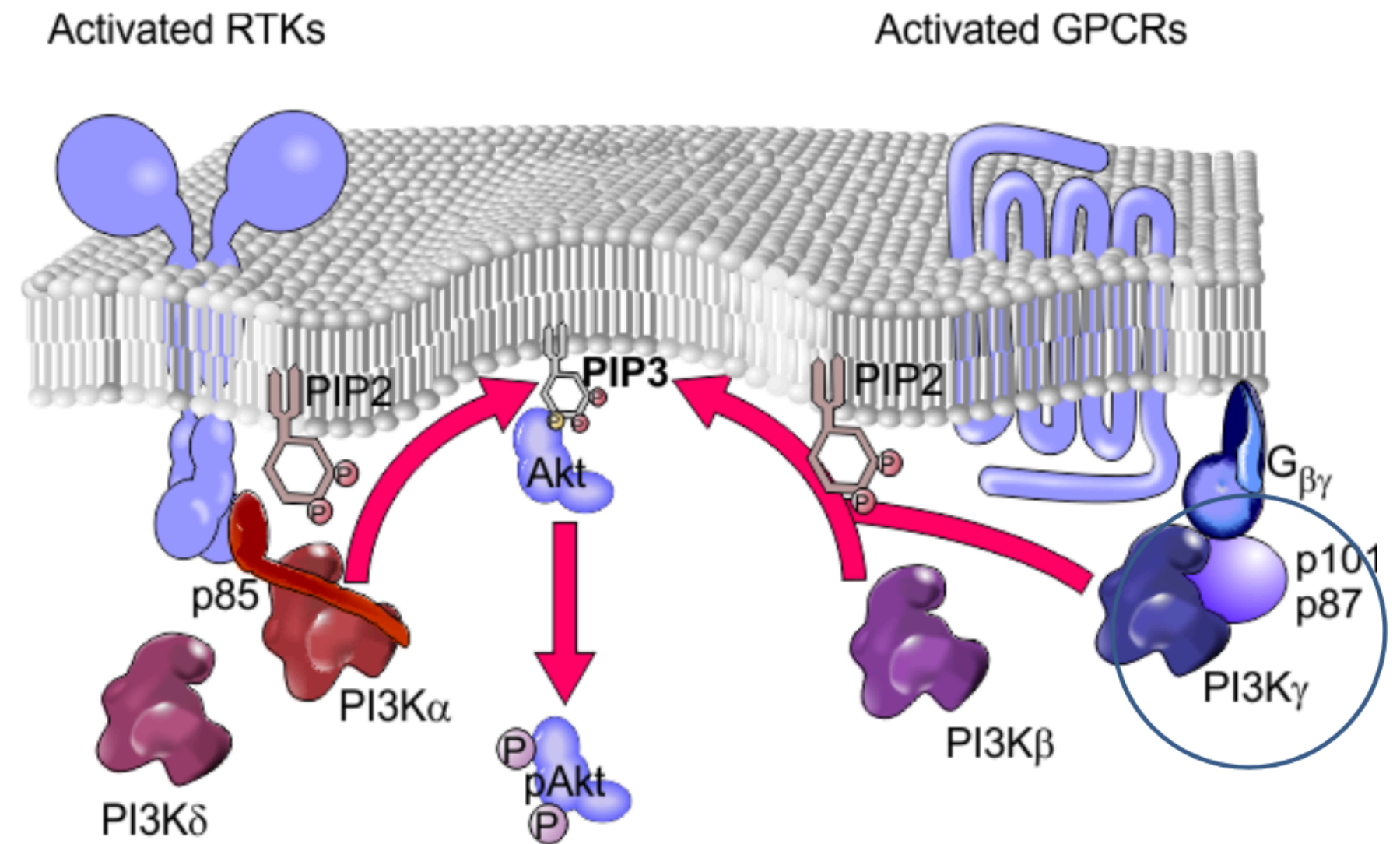
- Chinasi
- Proteine scaffale



tengono associate
più proteine

E' IN GRADO DI CONTROLLARE cAMP

- PKA attiva il complesso PD3 che degrada cAMP
- In assenza di PI3K si va in contro a patologie cardiovascolari



PI3K è coinvolto nei processi di contrazione?

Esperimento su tre topi:

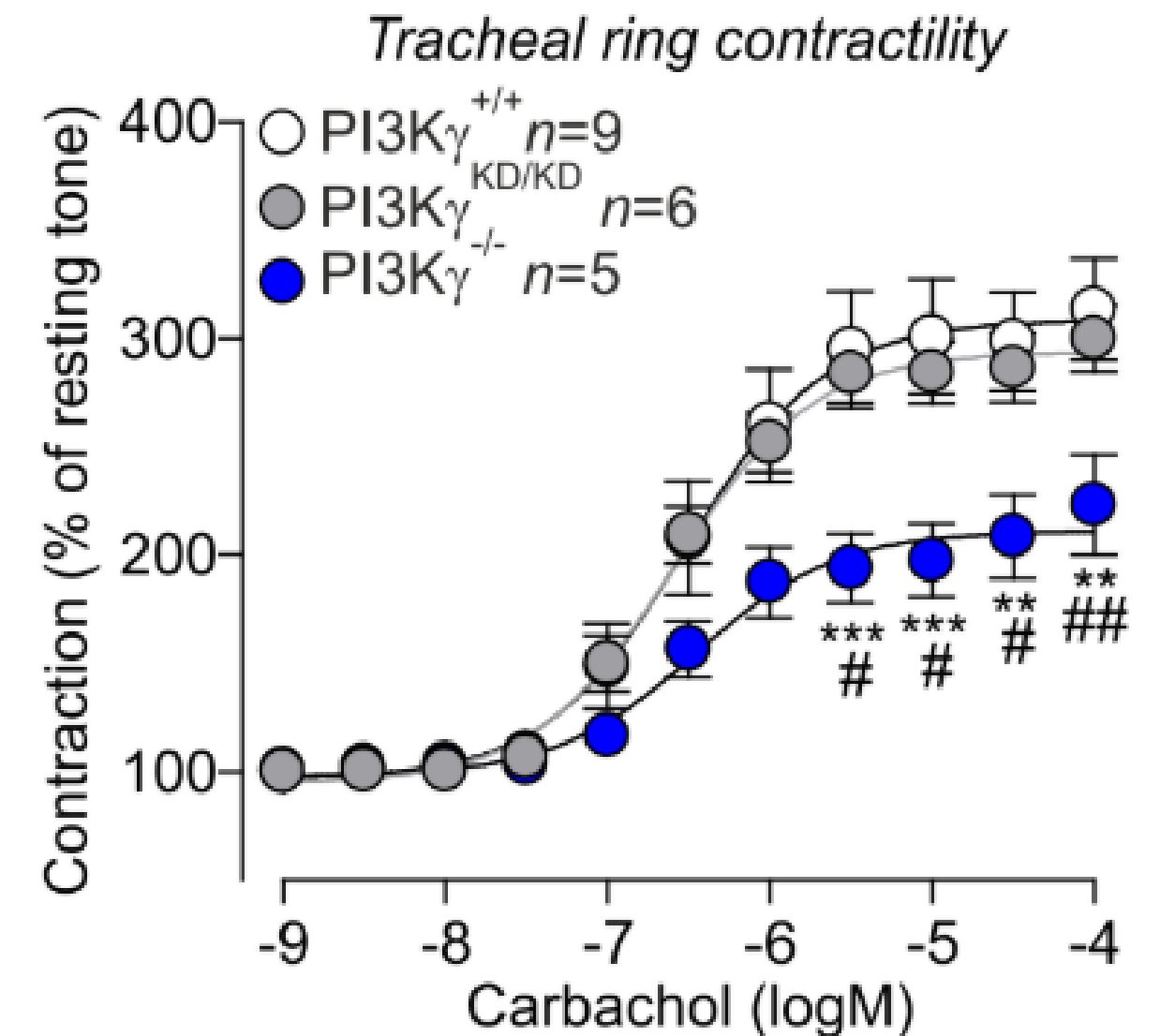
- Topo PI3K
- Topo PI3K KO
- Topo PI3K scaffold



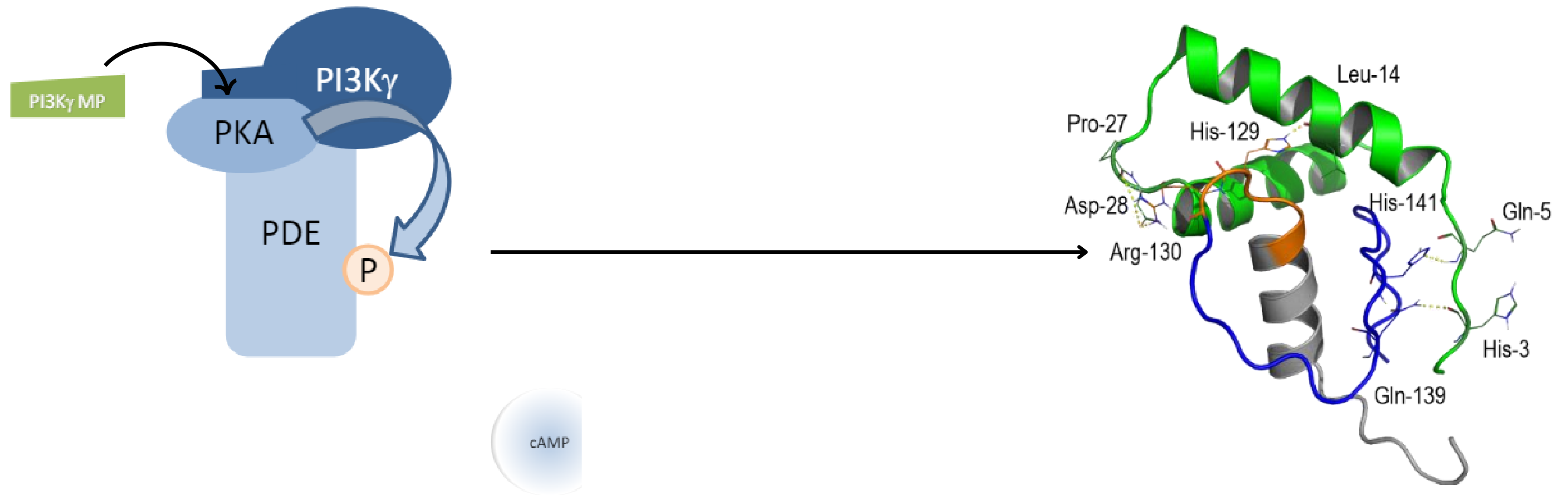
Estrazione anello di trachea

Esposizione a Carbacolo

Contrazione tracheale RIDOTTA
in topi PI3K KO



Targeting di PI3k con un peptide mimetico



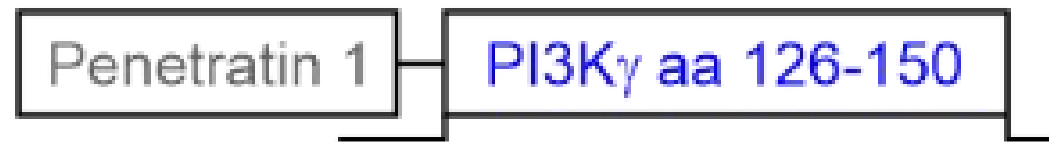
Il Peptide ricalca la forma della coda (all'n-terminale) di PI3k.

Peptide compete con proteina PI3K per legare PKA impedendo la degradazione di cAMP.

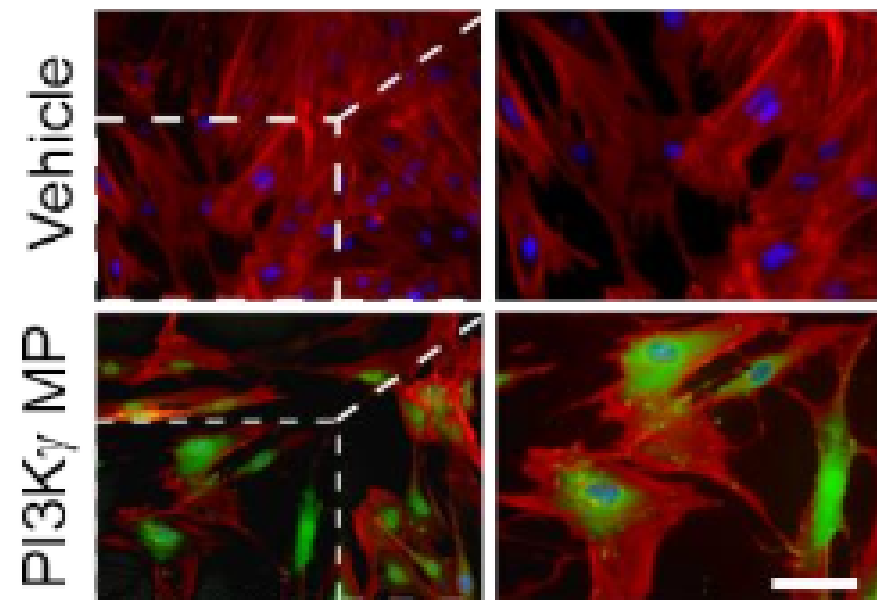
PENETRATINA → aumenta permeabilità in membrana

PI3K γ MP internalization in Human Bronchial Smooth Muscle Cells

PI3K γ mimetic peptide (MP)

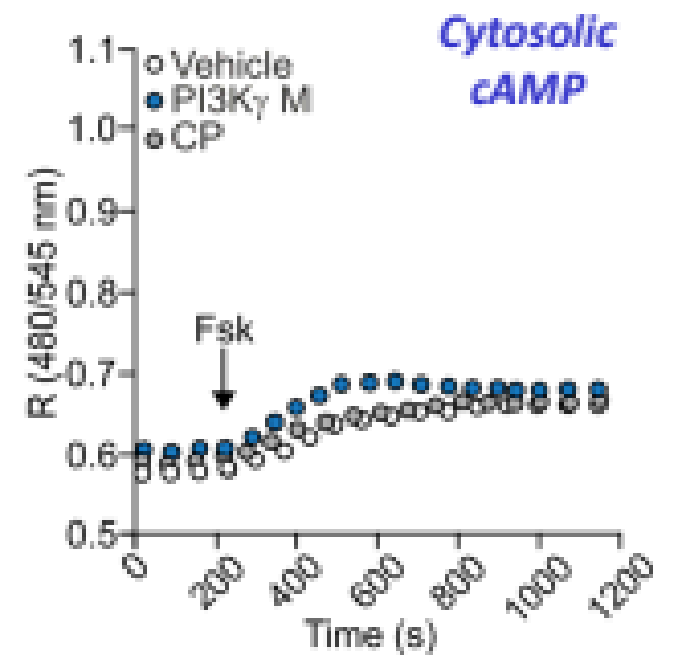
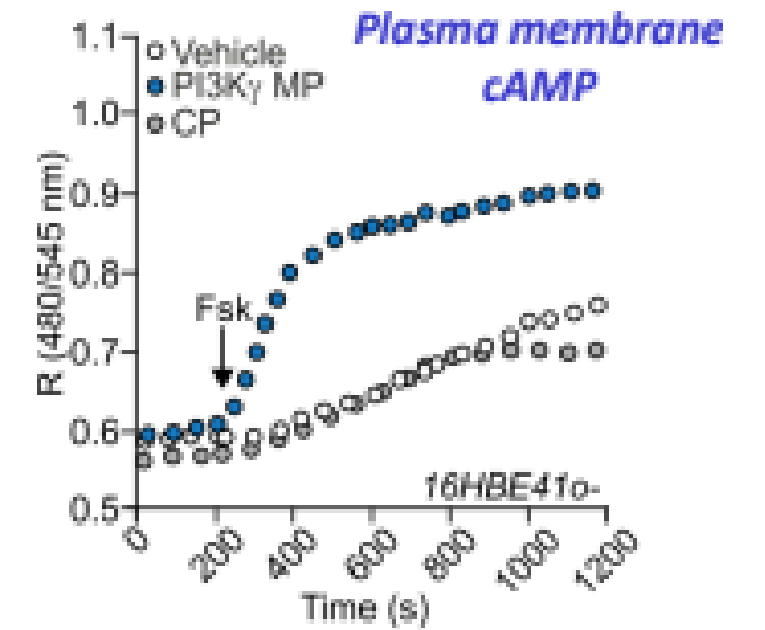
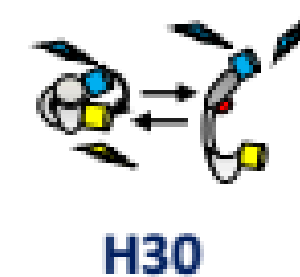
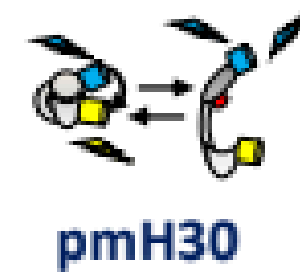
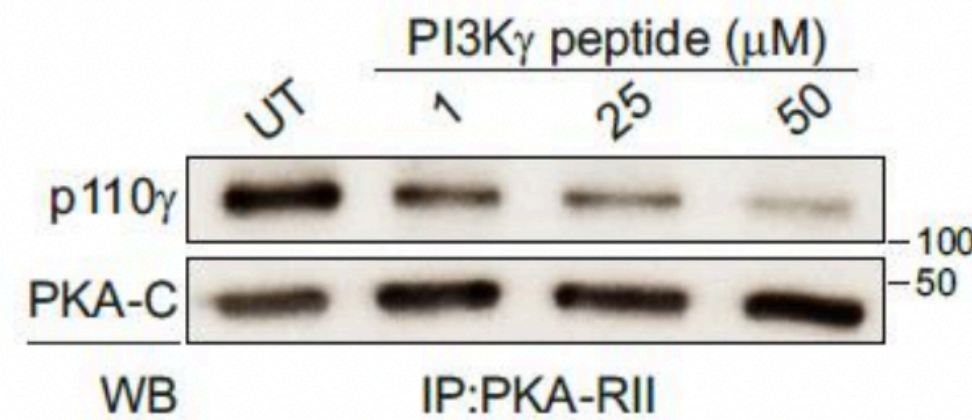


KATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAF



FITC peptide/Actin/DAPI
hBSMCs

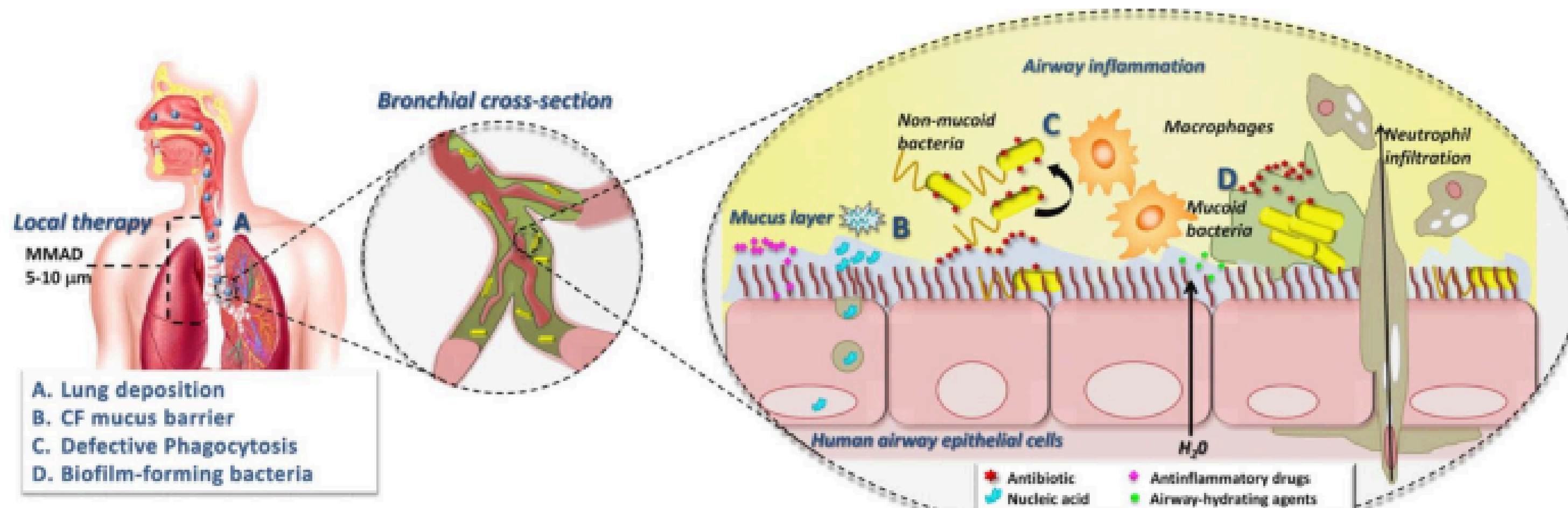
Disruption of PKA/PI3K γ binding by the PI3K γ MP



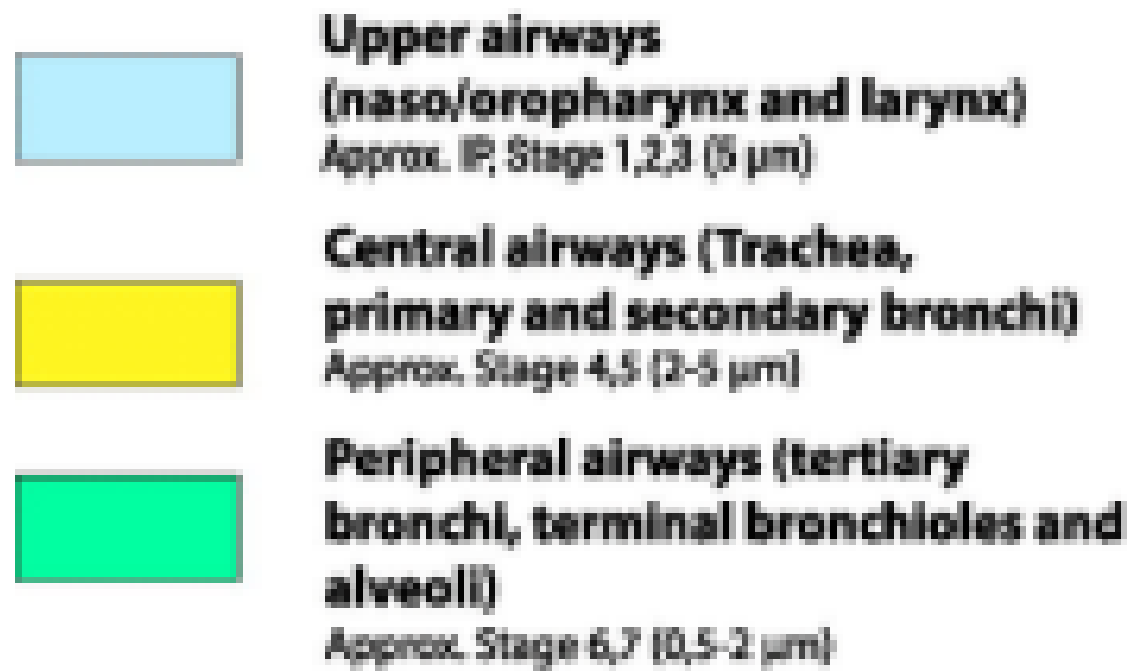
Utilizzo del peptide come farmaco per aumentare cAMP nelle vie respiratorie

Sono necessarie determinate caratteristiche per considerare il peptide come un possibile farmaco inalatorio per le patologie polmonari:

- Le dimensioni aerodinamiche
- Superare barriere biologiche
- Penetrare le vie respiratorie
- Persistere nelle vie aeree

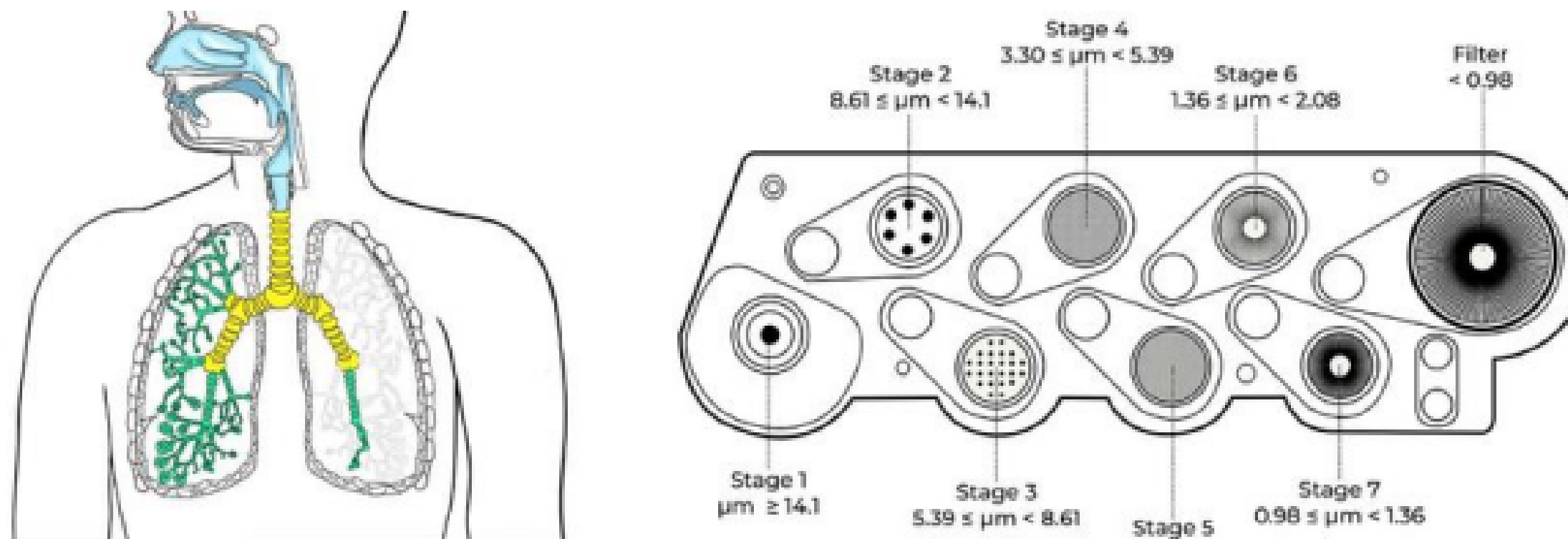


Test 1: Validare se il peptide ha le caratteristiche potenziali come farmaco per inalazione



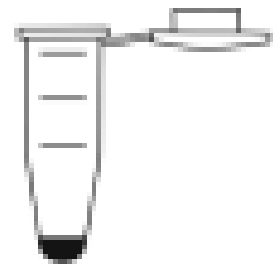
NGI Cup	Particles (micron)
S1	14.10
S2	8.61
S3	5.39
S4	3.30
S5	2.08
S6	1.36
S7	0.98

Next generation impactor (NGI)



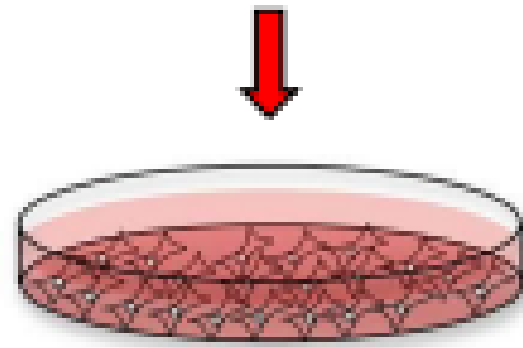
Test 2: Validare se il peptide è resistente a componenti dell'ambiente polmonare

1. PI3K γ MP + HNE

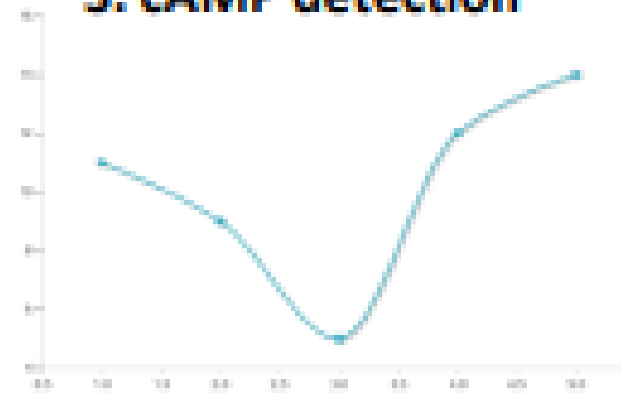


directly on
16HBE cells

2. Cell treatment



3. cAMP detection



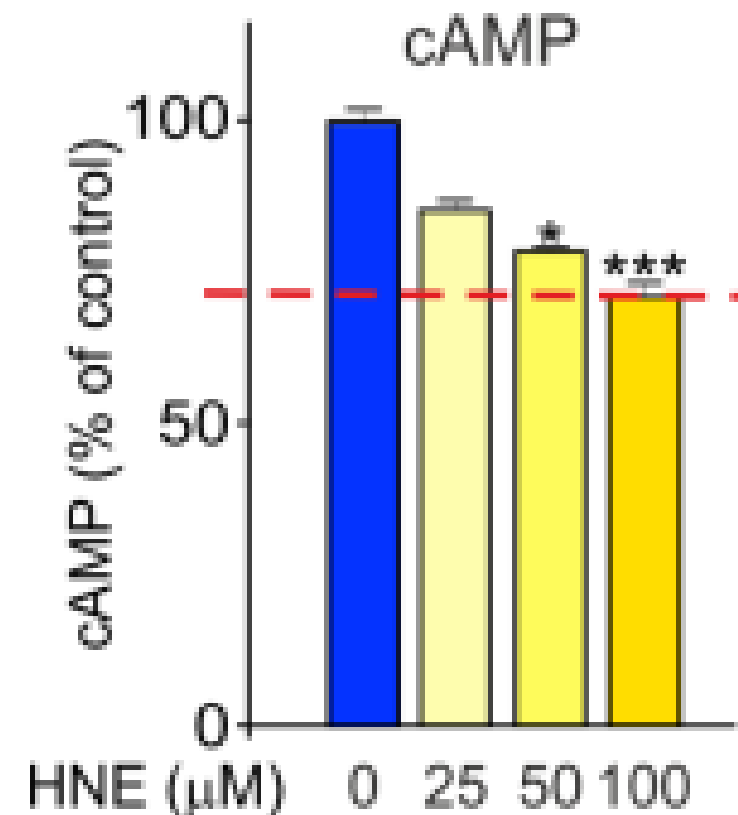
*Resistance to Proteases
(Human neutrophil elastase - HNE)*

PI3K γ MP



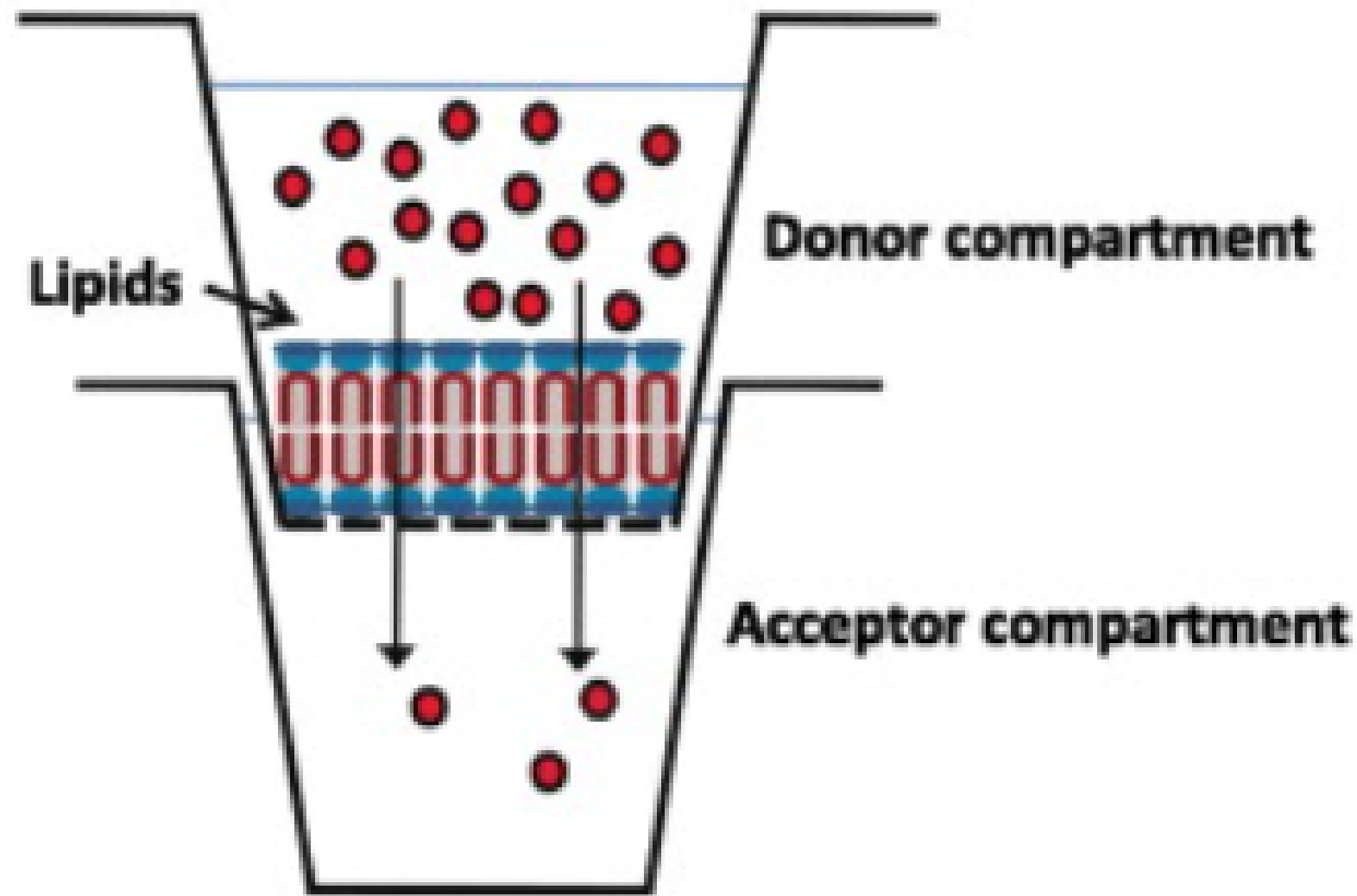
+Elastase

cAMP



Si osserva una riduzione dell'attività del peptide in presenza di elastasi (75%) ma è da considerarsi una buona resistenza

Test 3: Validare se il peptide è in grado di attraversare la barriera biologica del muco



In presenza di sputo ottenuto da paziente di Fibrosi Cistica viene ridotta la capacità del peptide di penetrare nella camera accettrice ma rimane sopra la soglia considerata di riferimento per i composti medio permeabili

PAMPA, test di permeabilità attraverso le membrane artificiali

Effetti terapeutici di pi3ky mp in vivo



Smooth Muscle Cells

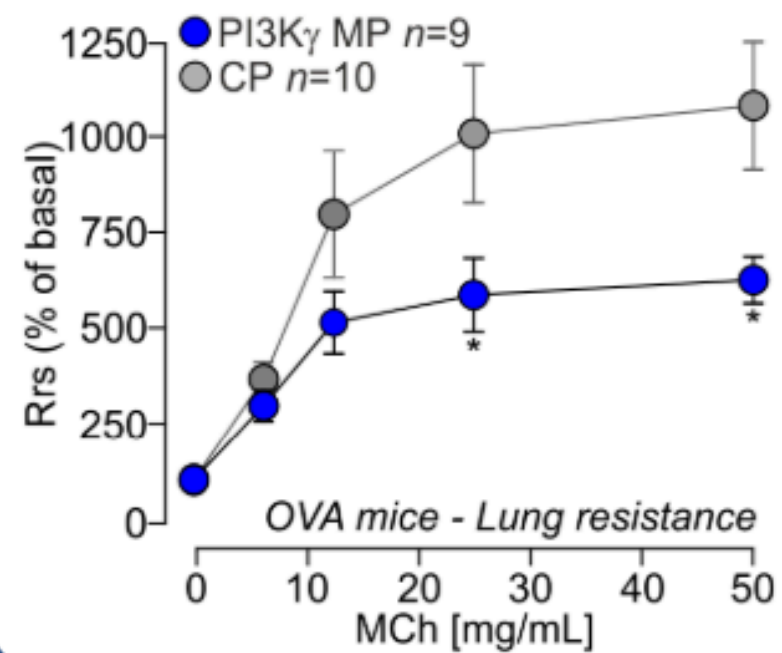


Inflammatory Cells

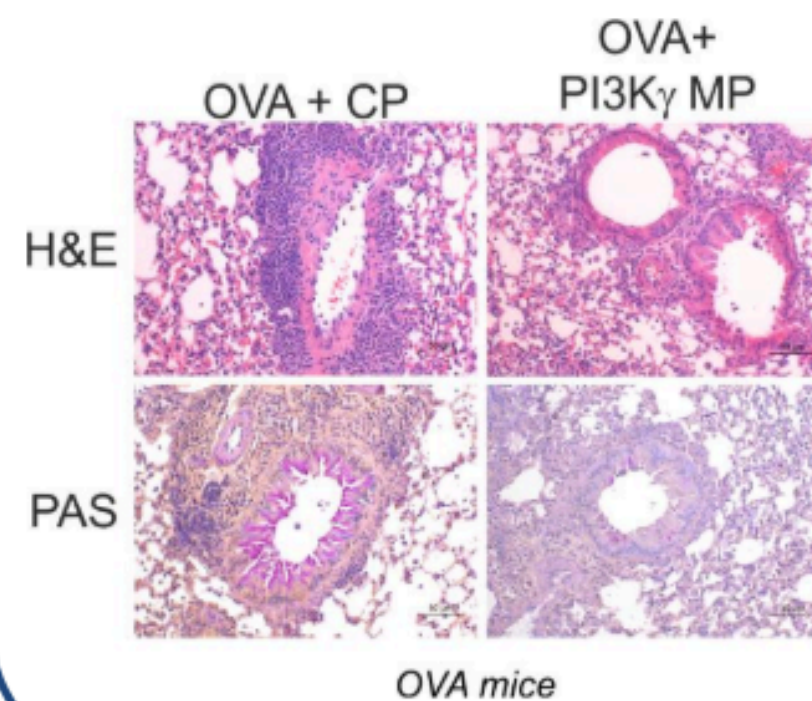


Epithelial Cells

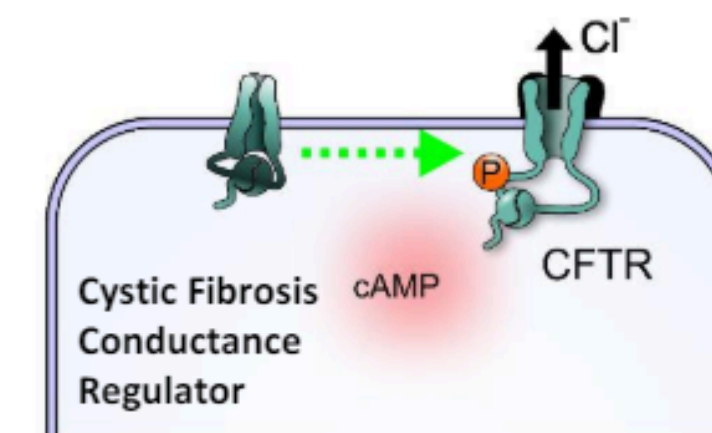
Bronchodilation



Anti-inflammatory effect

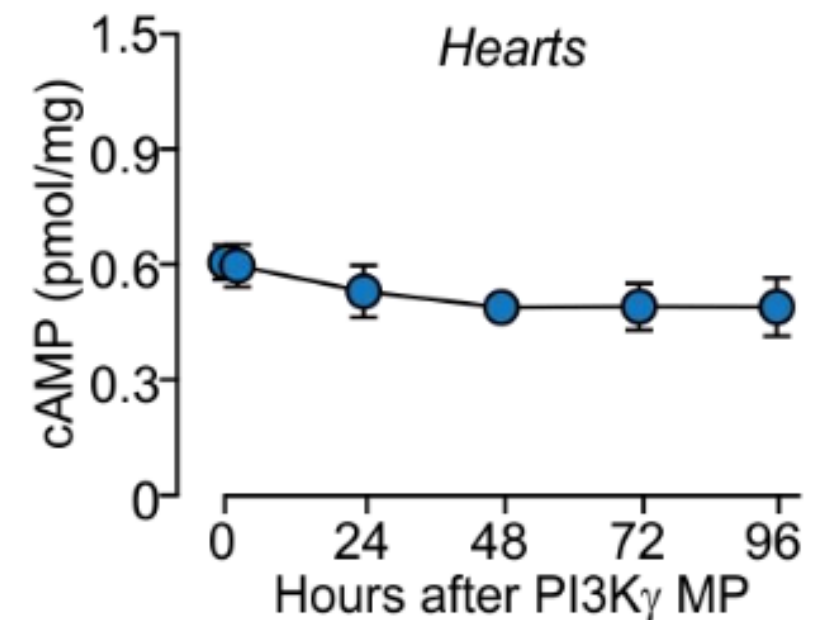
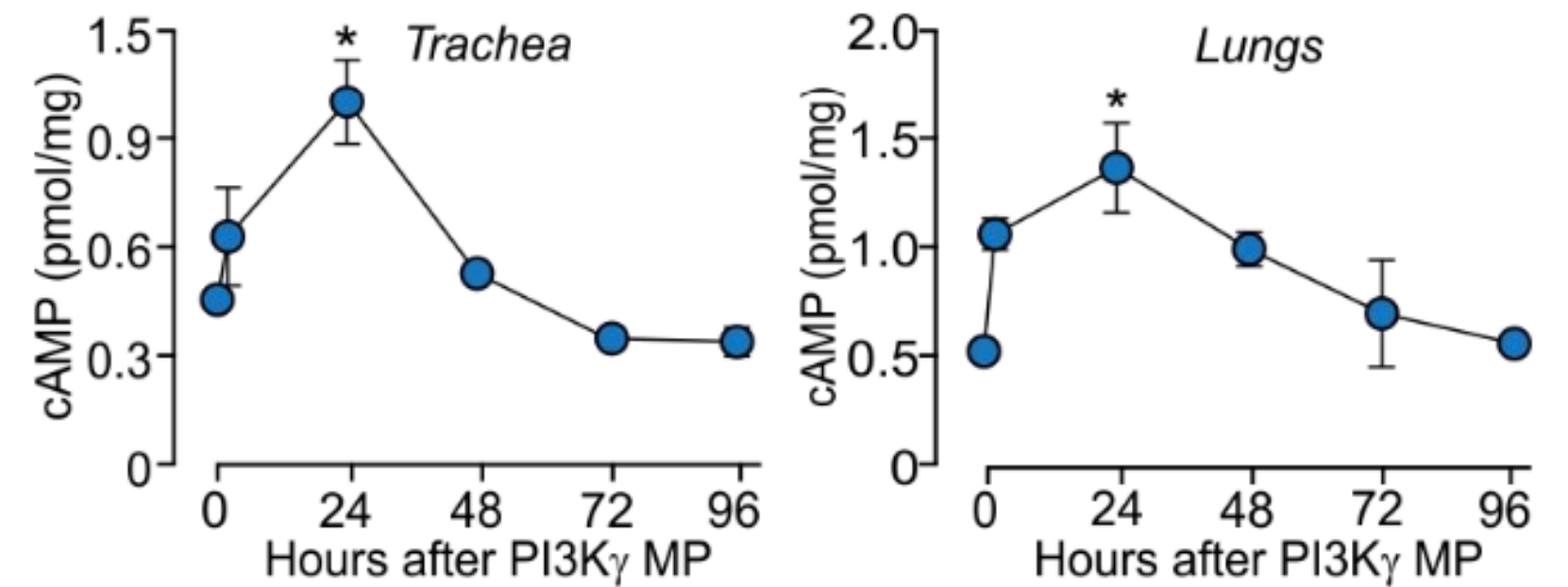
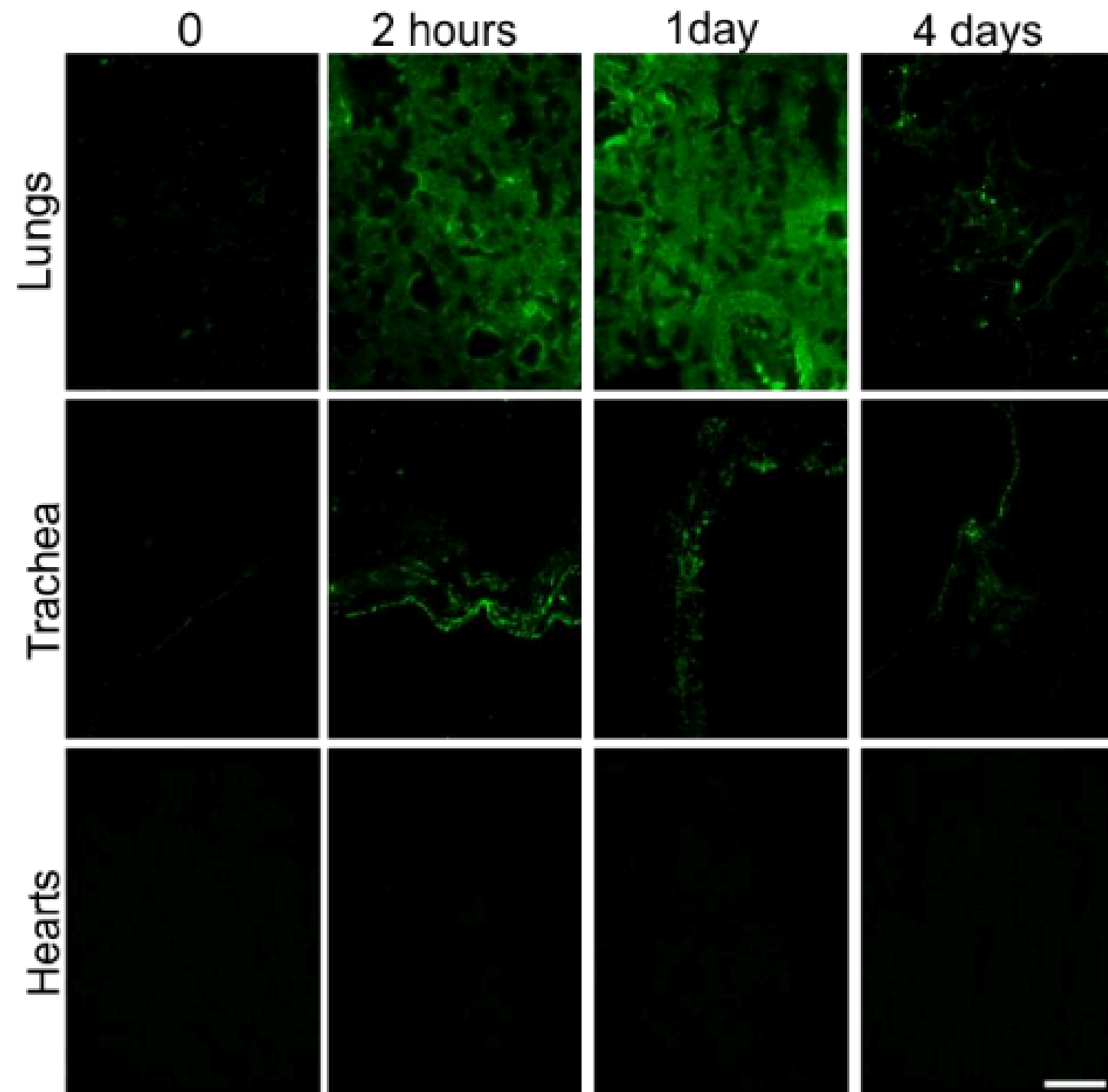


CFTR modulator



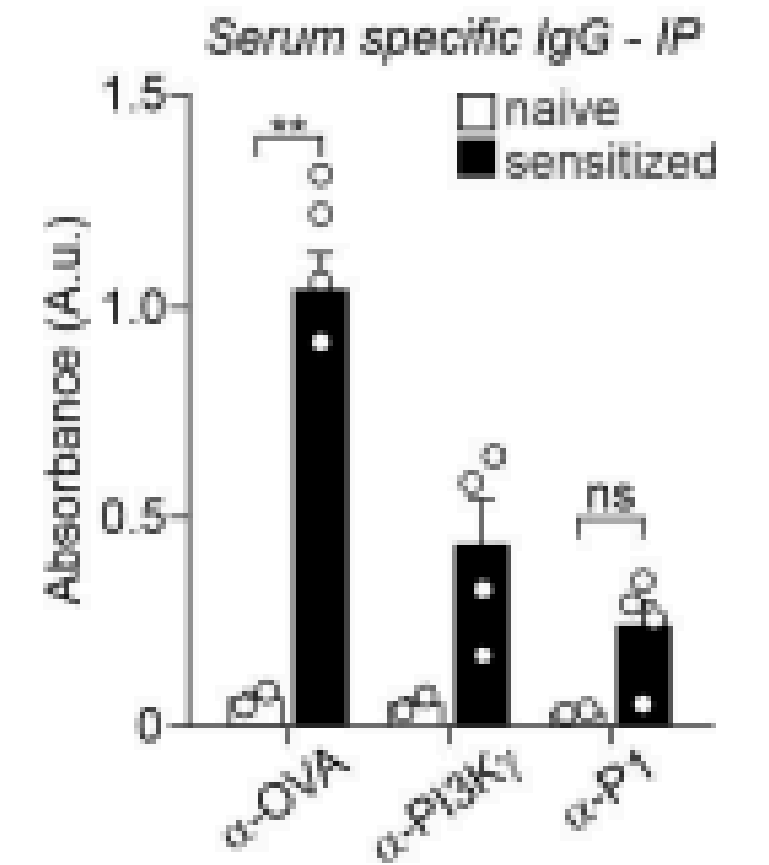
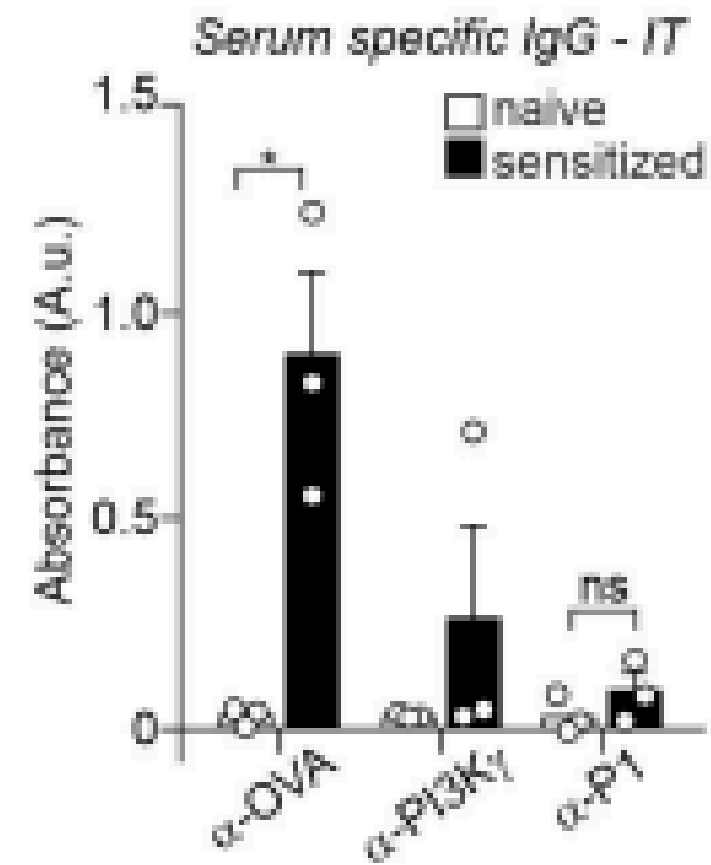
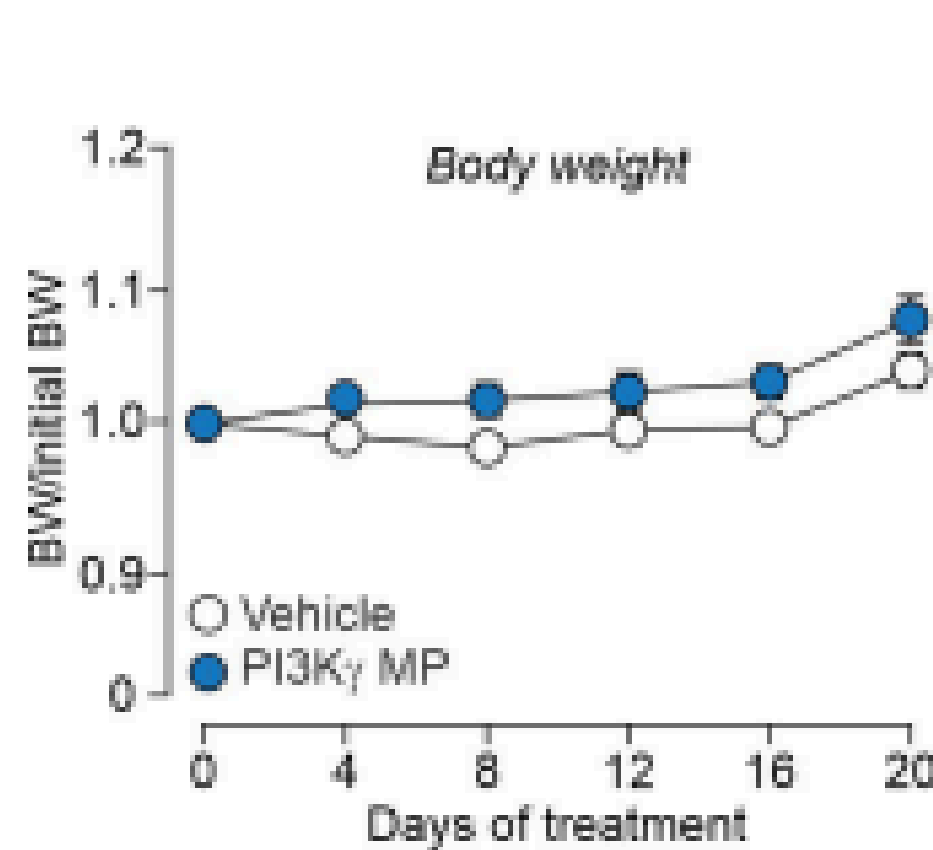
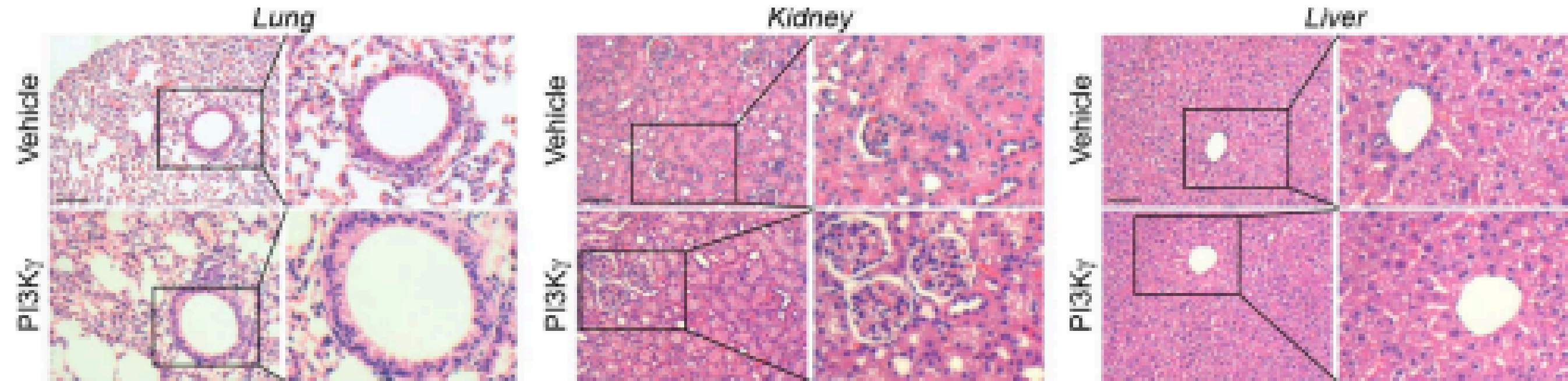
Prova in vivo su topi tratti con installazione intratracheale di PI3K γ mp

PI3K γ mp raggiunge la trachea e il polmone, resiste per un tempo relativamente lungo e si correla parallelamente ad un aumento di cAMP

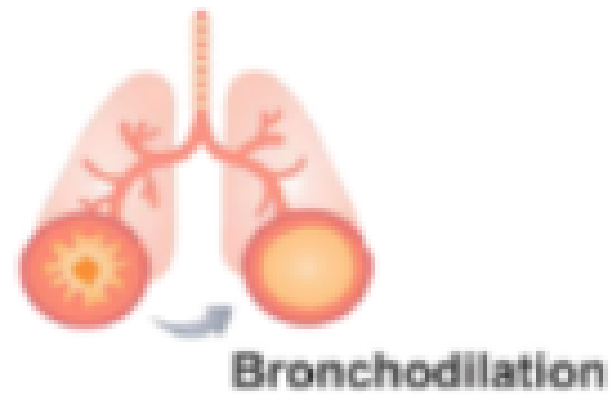


Verifica di PI3K γ mp in vivo:

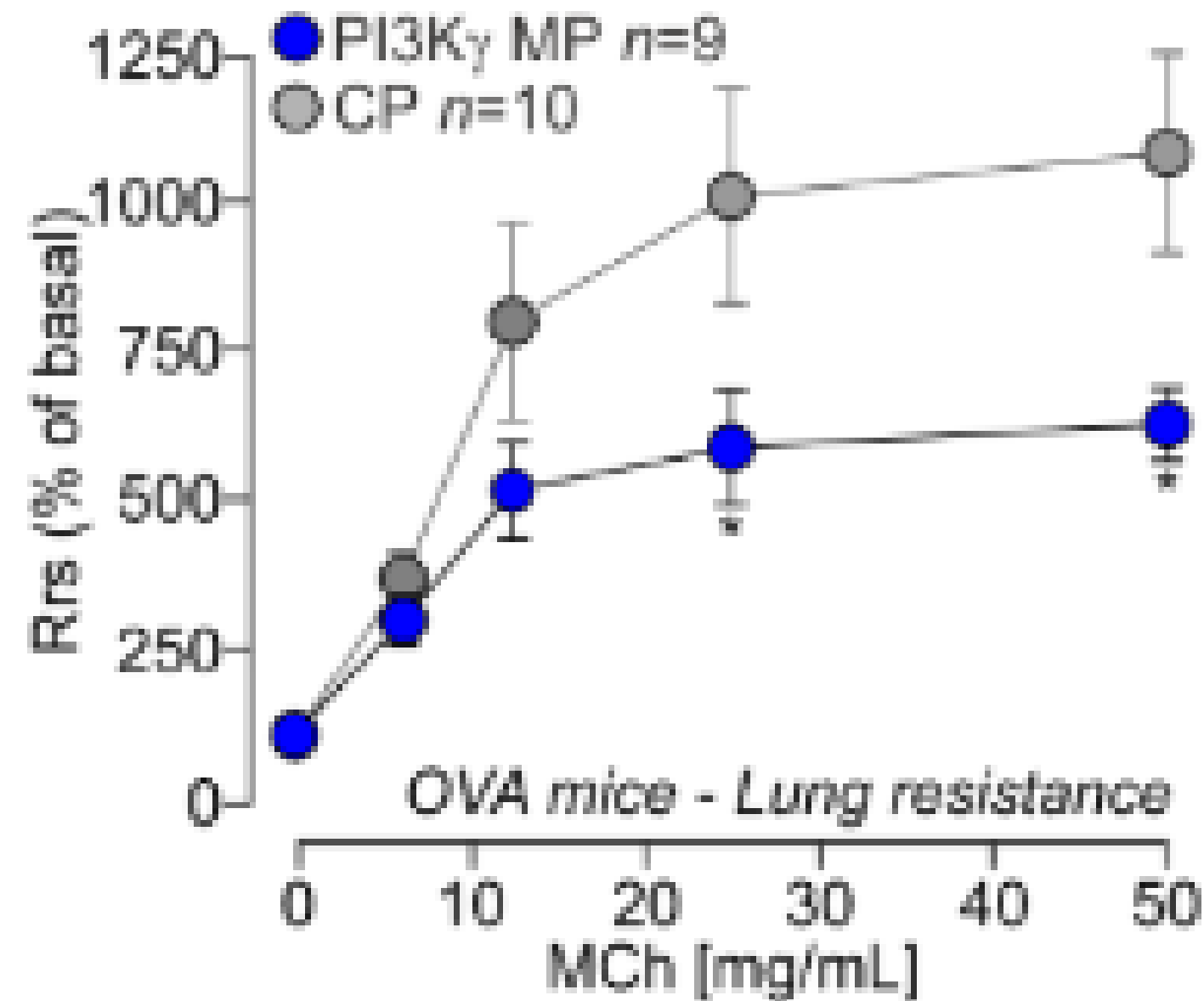
- Tollerabilità



Verifica di PI3K γ in vivo:



Bronchodilation

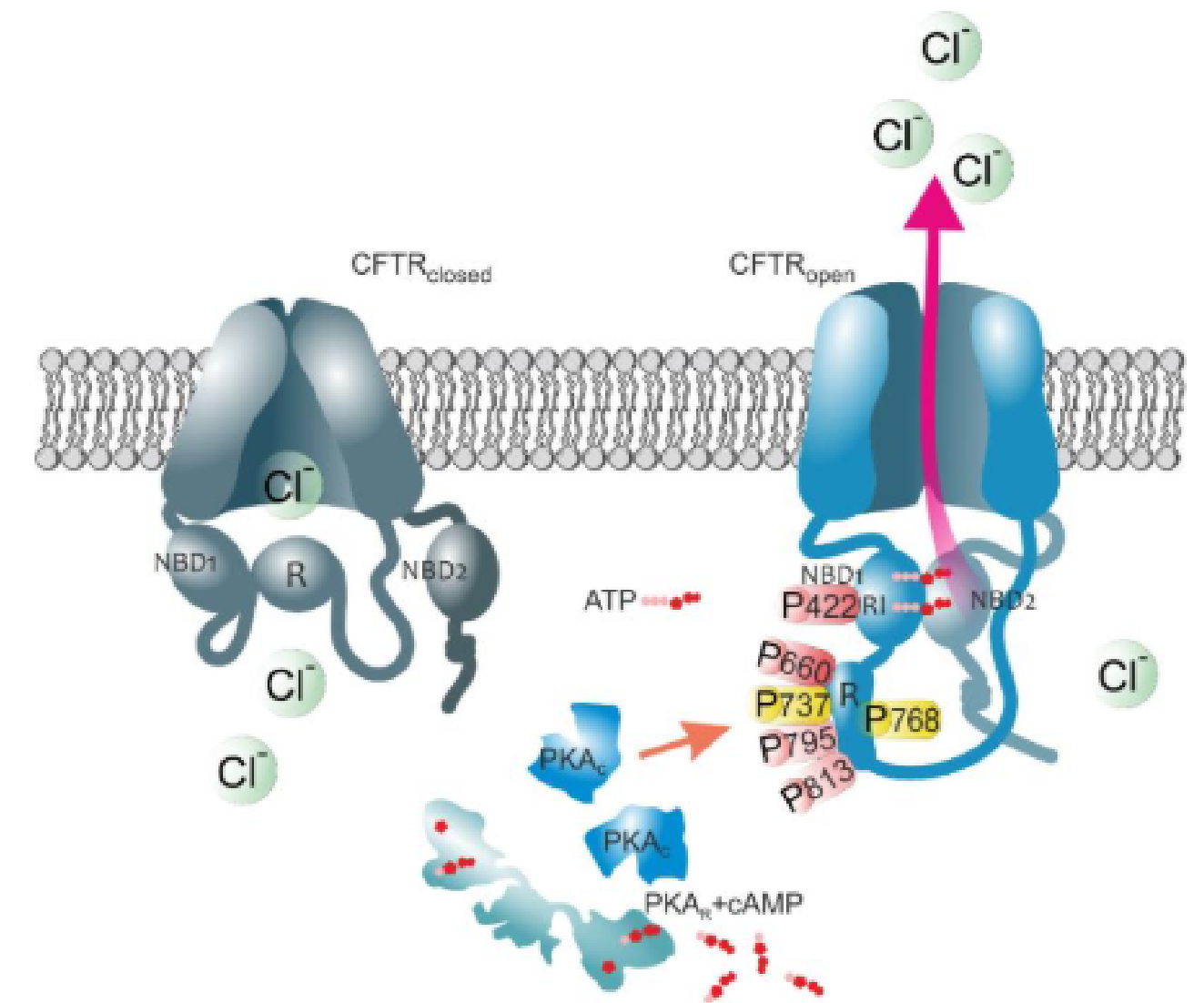


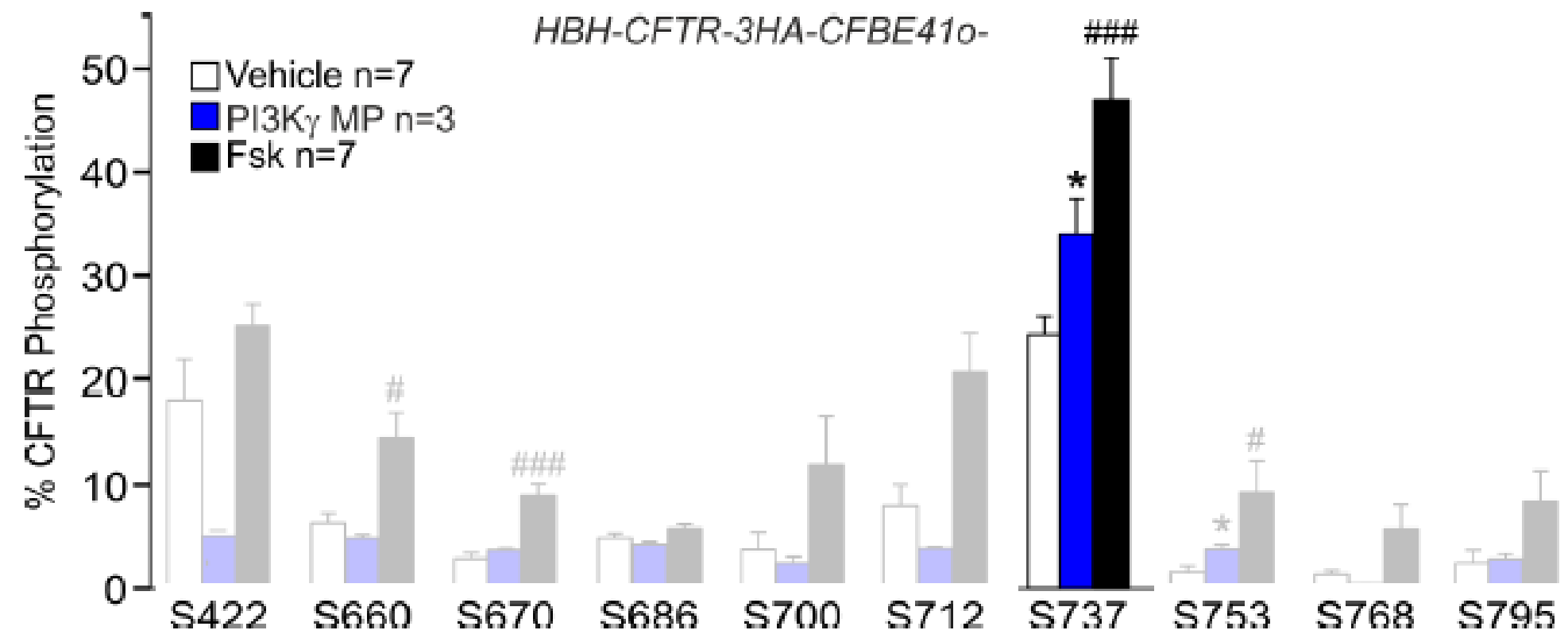
La PI3Kγ MP innesca l'apertura di CFTR

cAMP ha un ruolo fondamentale in CFTR.

CFTR viene aperto tramite fosforilazione da parte di PKA sul dominio R

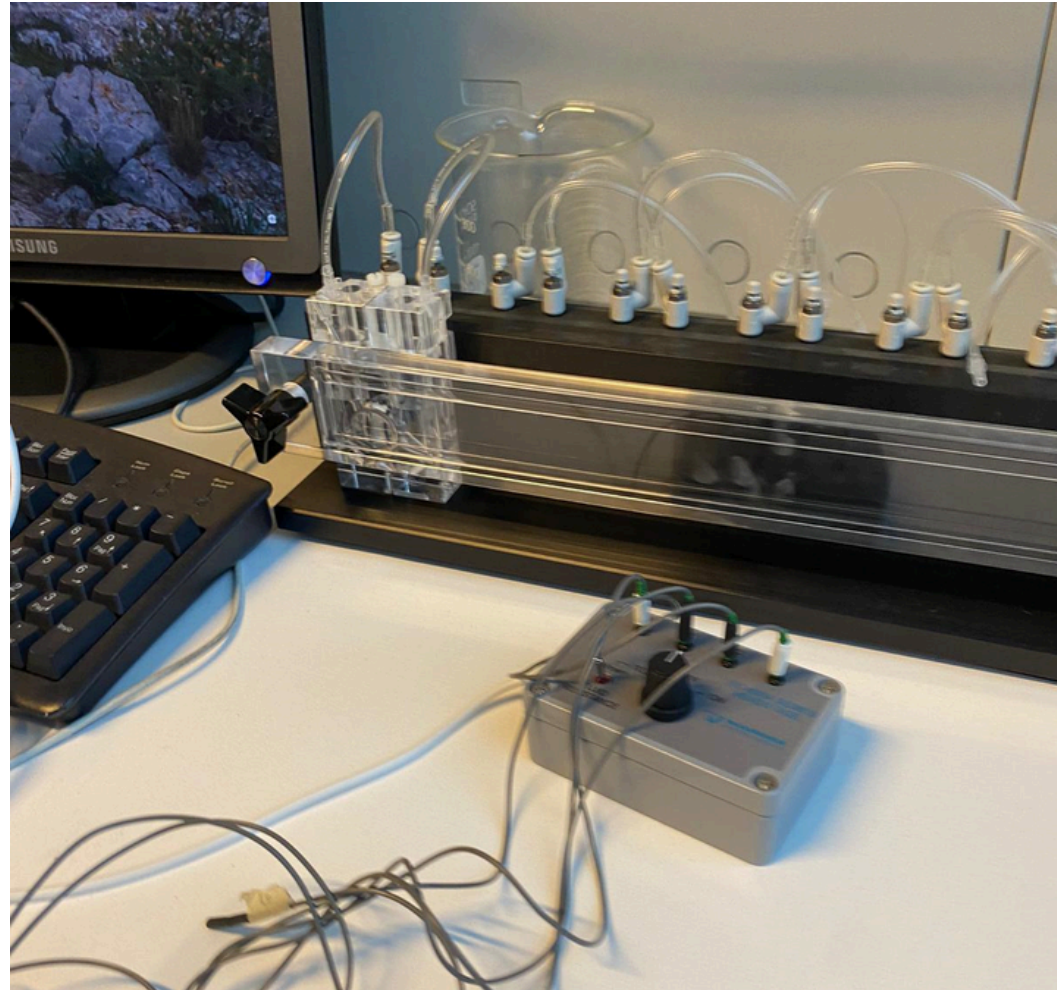
Ma dove avviene precisamente la fosforilazione del dominio R?





La serina 737 viene fosforilata da PKA (attivata da cAMP).

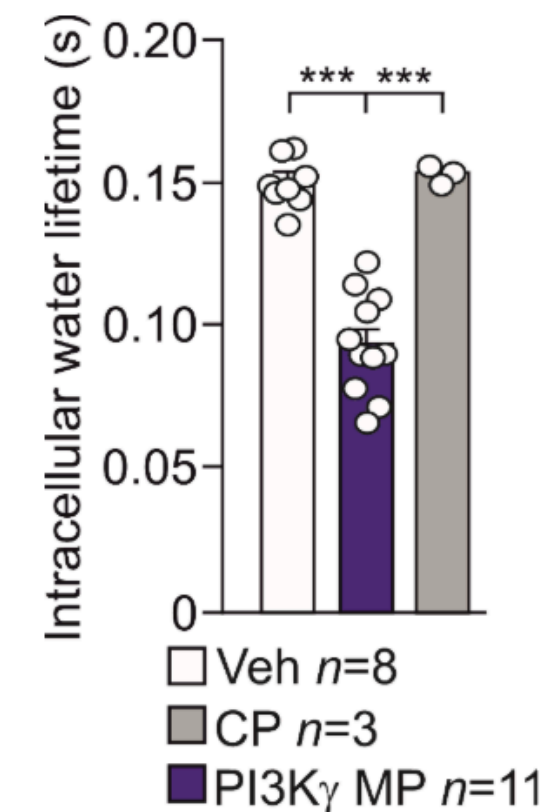
E' quindi l'amminoacido "attivante" del dominio R che provoca l'apertura del canale



Esperimento in camera di Ussing su cellule di epitelio bronchiale.

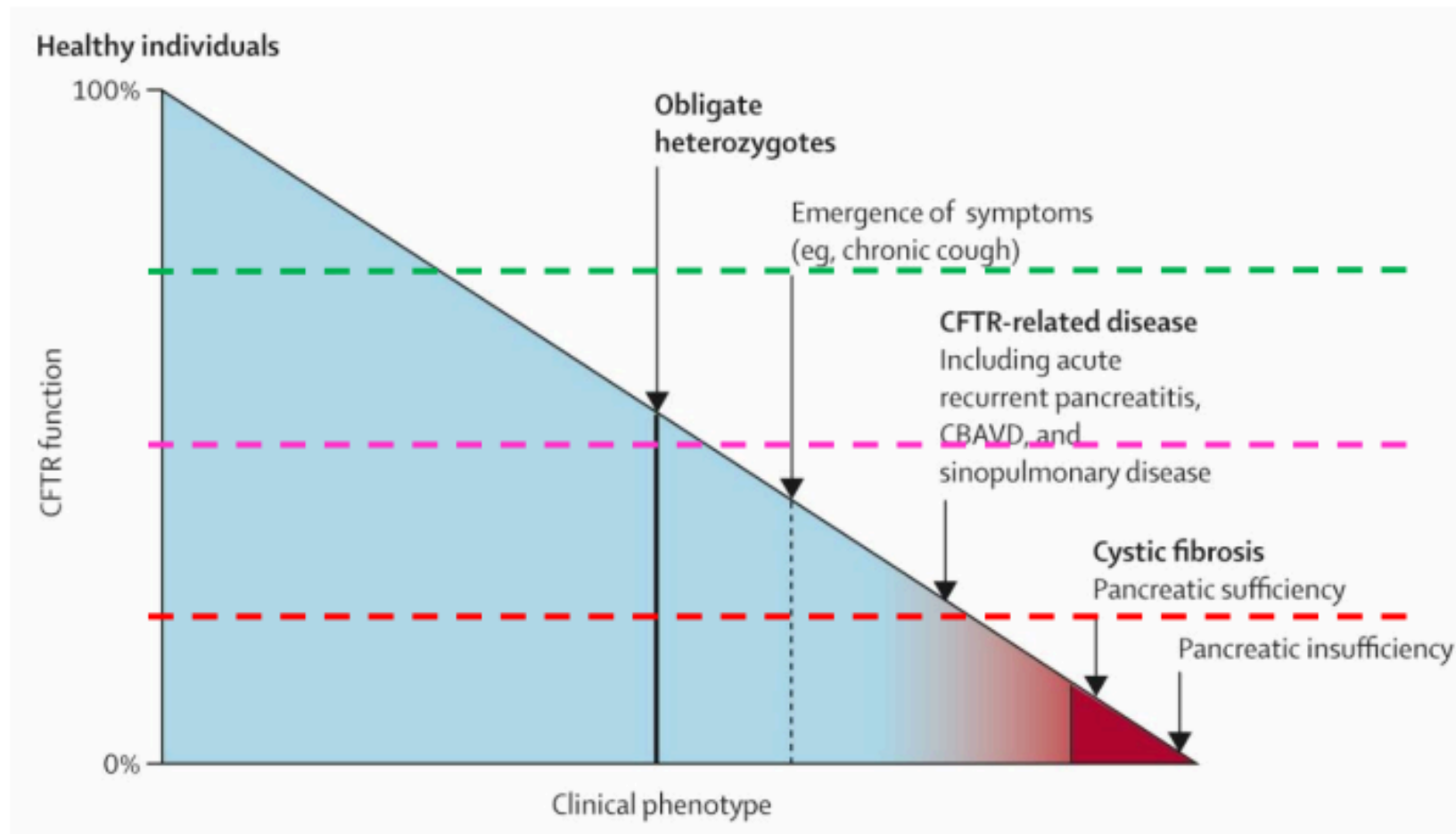
In presenza di cAMP e del peptide c'è passaggio di corrente dovuto all'apertura del canale.

Water residence time (τ_{in}) determined by ^1H NMR relaxometry



La tecnica NMR misura il tempo di resistenza dell'acqua in cellule epiteliali bronchiali per vederne il flusso. Dopo l'aggiunta del peptide c'è maggiore fuori uscita di acqua quindi maggiore fluidicità del muco

L'applicazione clinica del peptide si focalizza sulla mutazione delta 508 nella fibrosi cistica



Ultimate goal



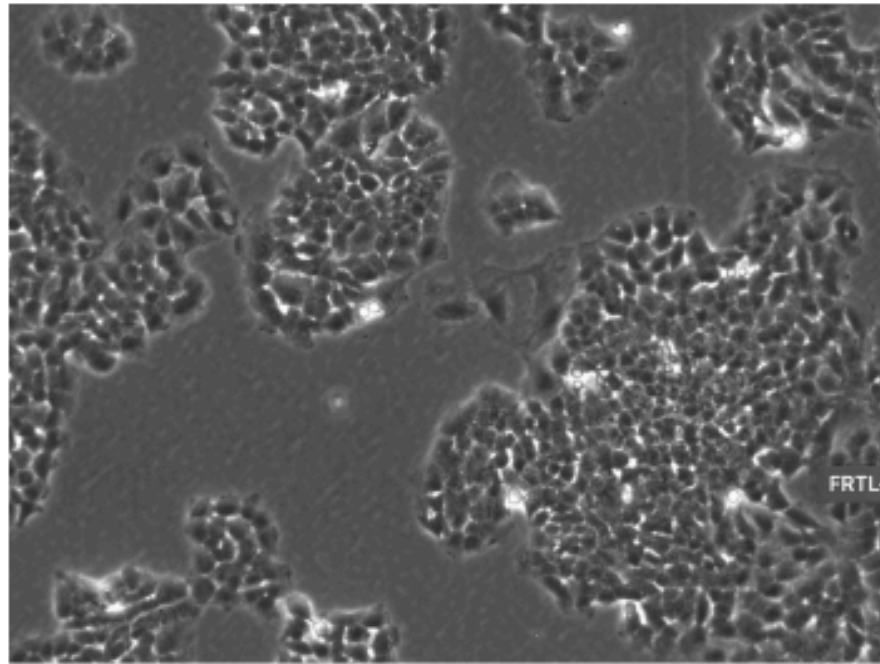
Trikafta™

Orkambi™

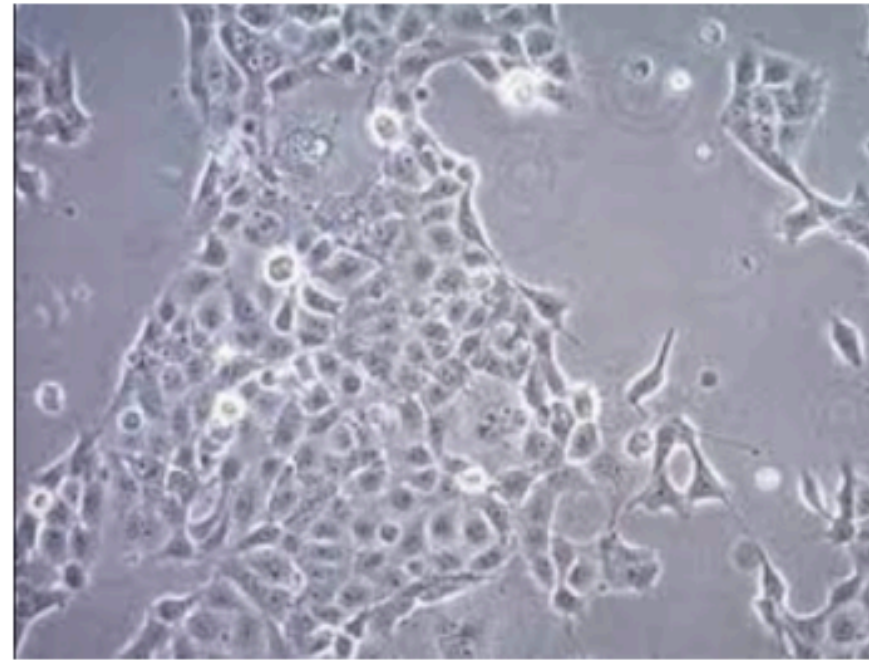
L'uso del peptide associato ai modulatori può superare la soglia del 50%?

Modelli in vitro

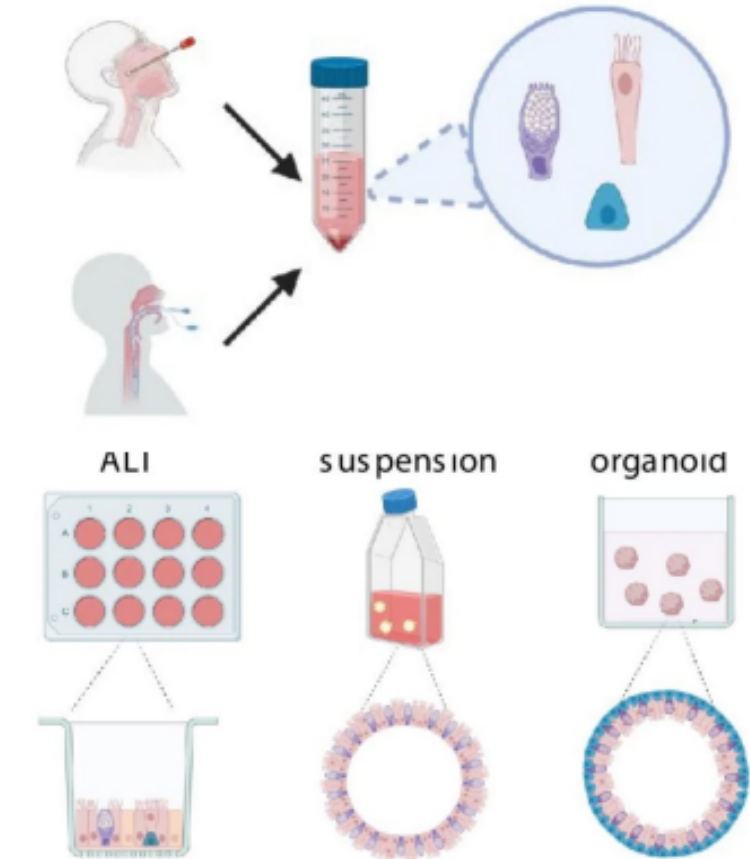
- **Stable Cell Lines**
Fischer Rat Thyroid Cells



- **Immortalized Human Respiratory Cell Lines**
CF and Non-CF Cells



- **Primary Respiratory Cell Lines**
Bronchial and Nasal Cells



Le cellule FRT

- studi elettrofisiologici
- Camera di Ussing
- Patch Clamp
- Western Blot

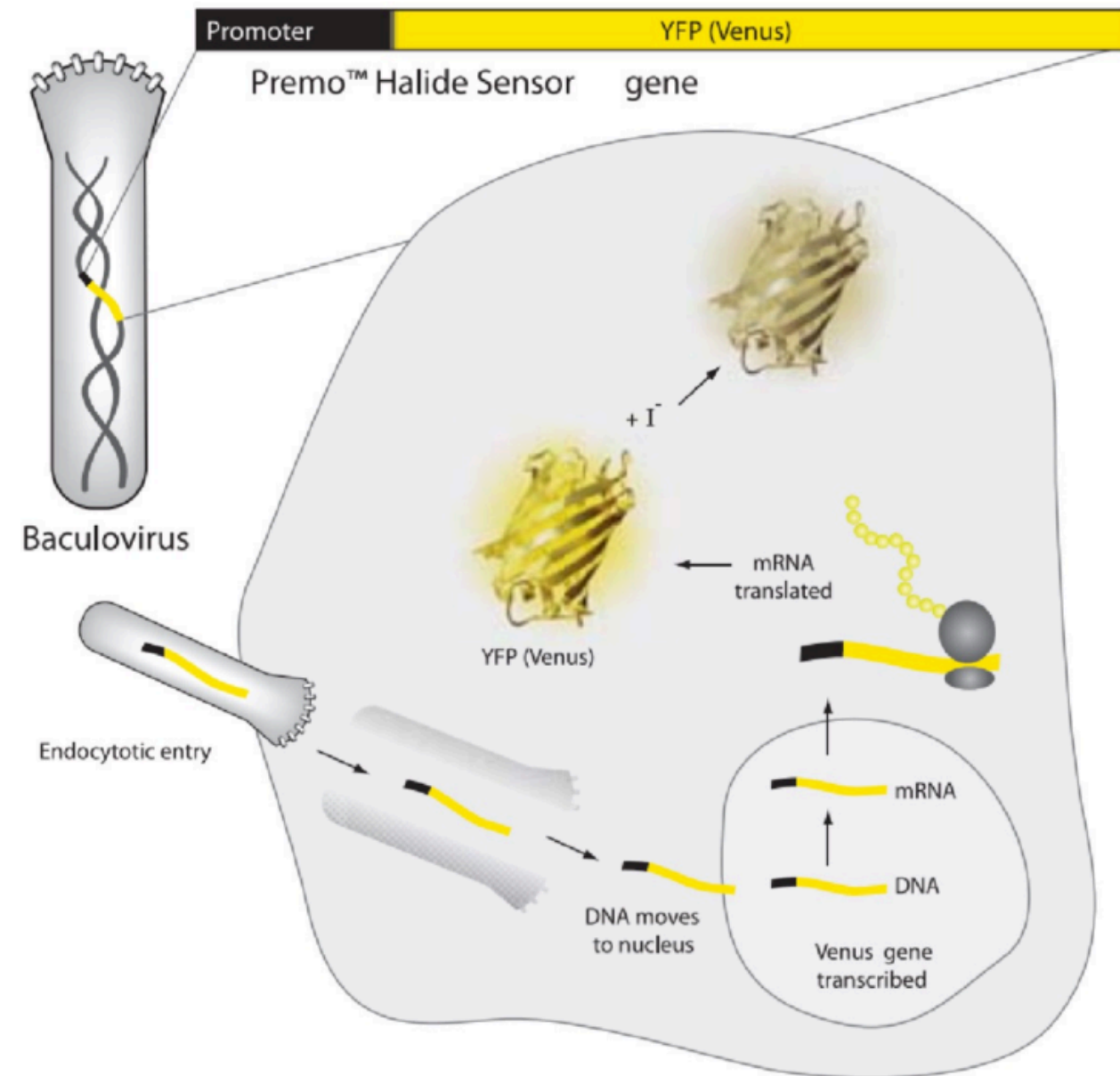
Le cellule 16HBE14o-/CFBE41o-

- studi elettrofisiologici
- Camera di Ussing
- Patch Clamp
- Western Blot

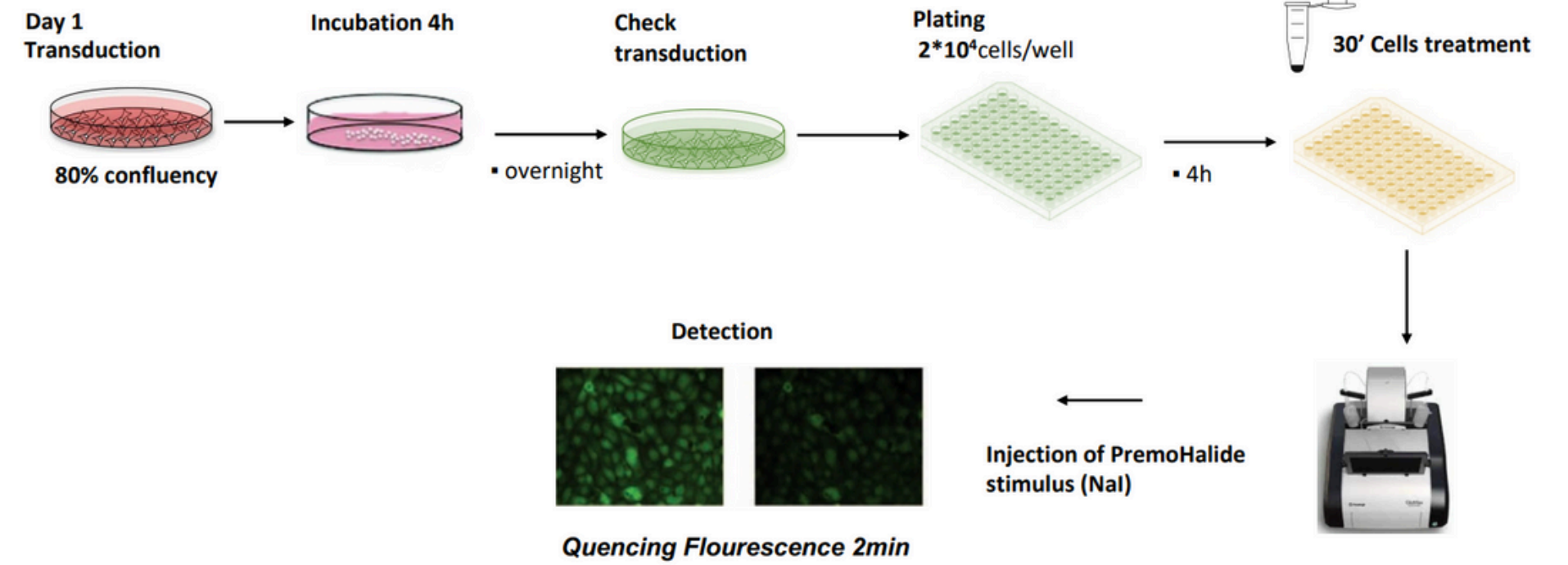
Le cellule respiratorie primarie

- Corrente di cortocircuito (Isc)
- Studio delle mutazioni CFTR

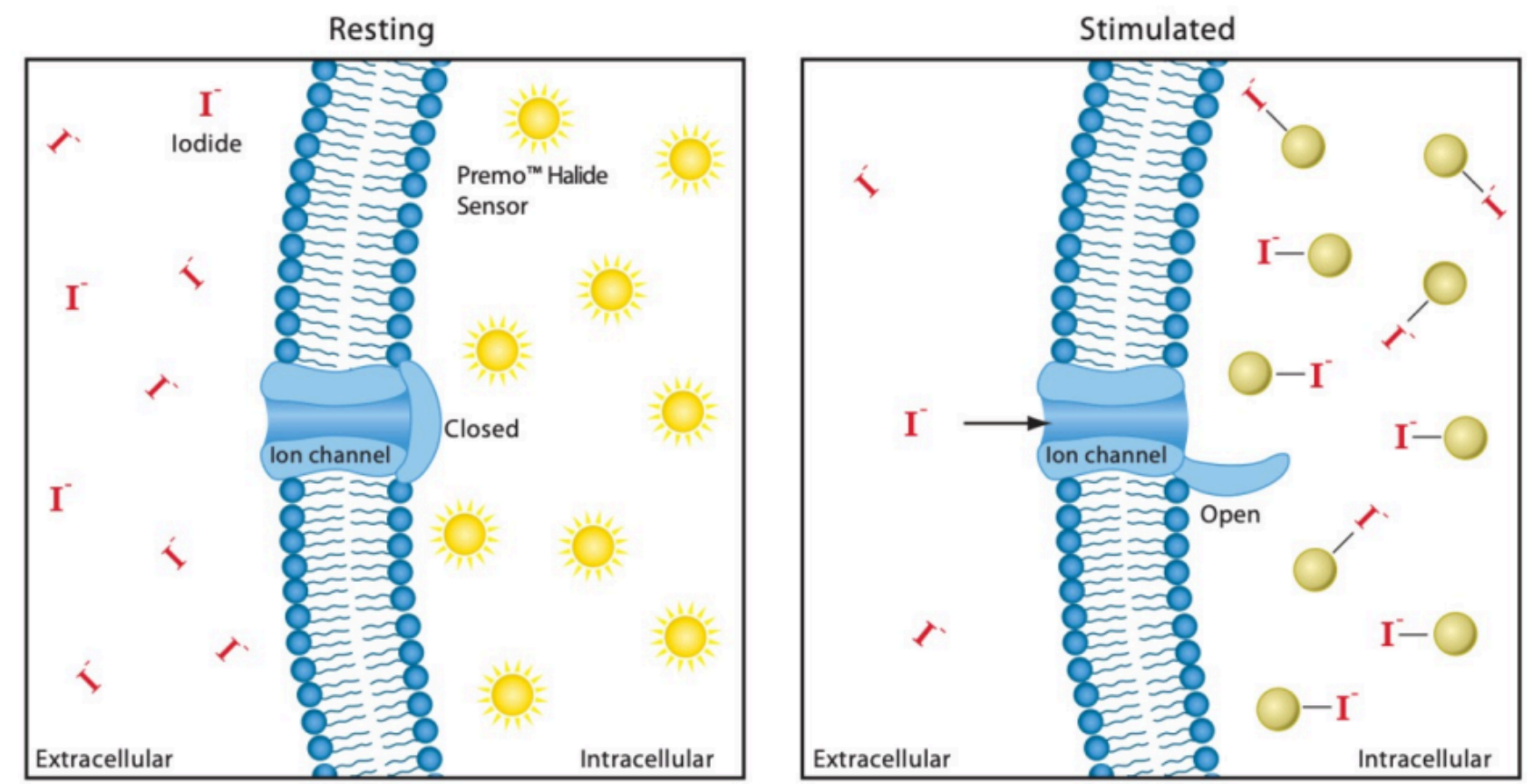
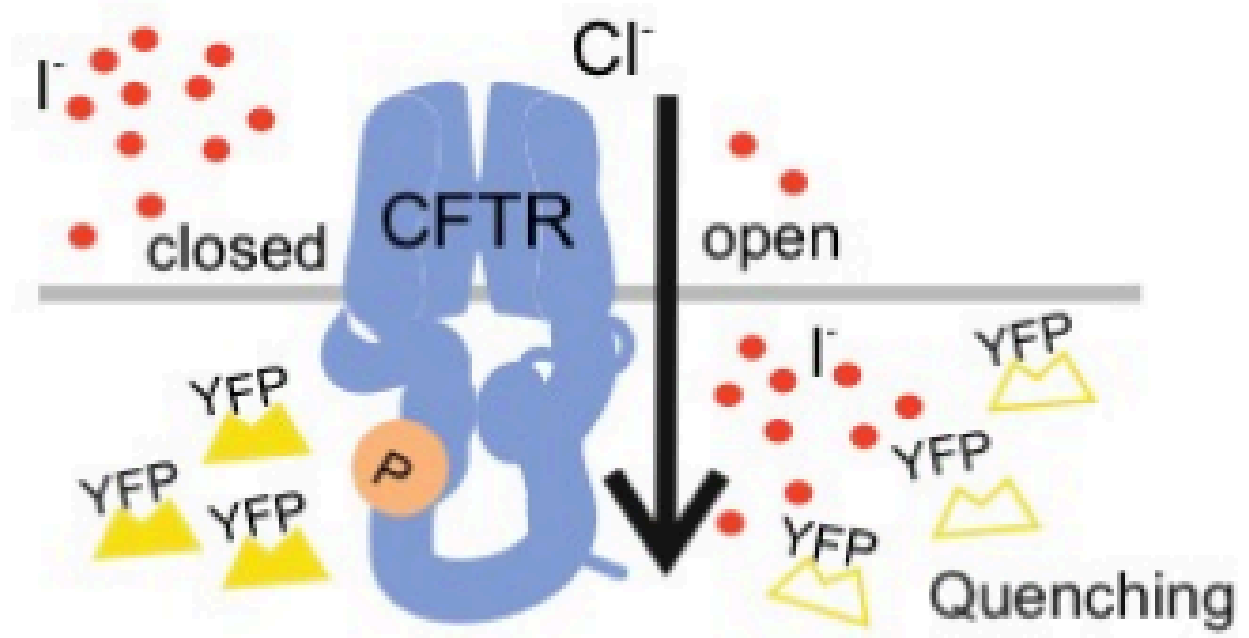
YFP



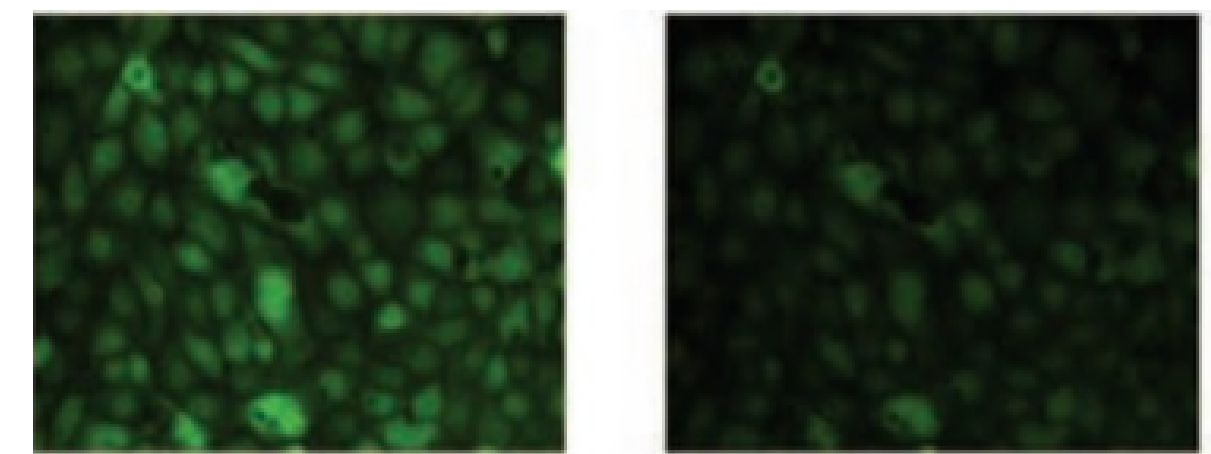
WORKFLOW



Premo™ Halide Sensor

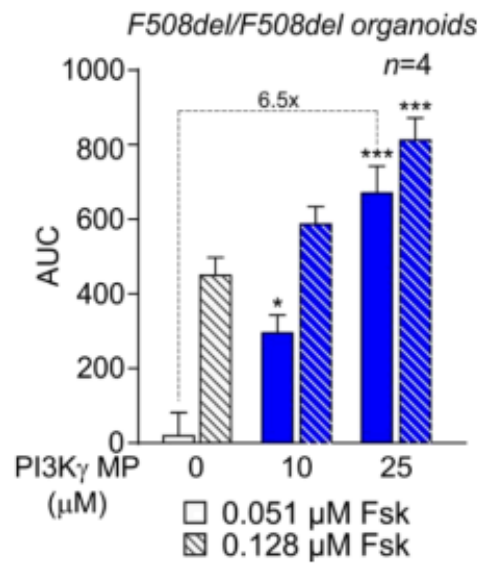
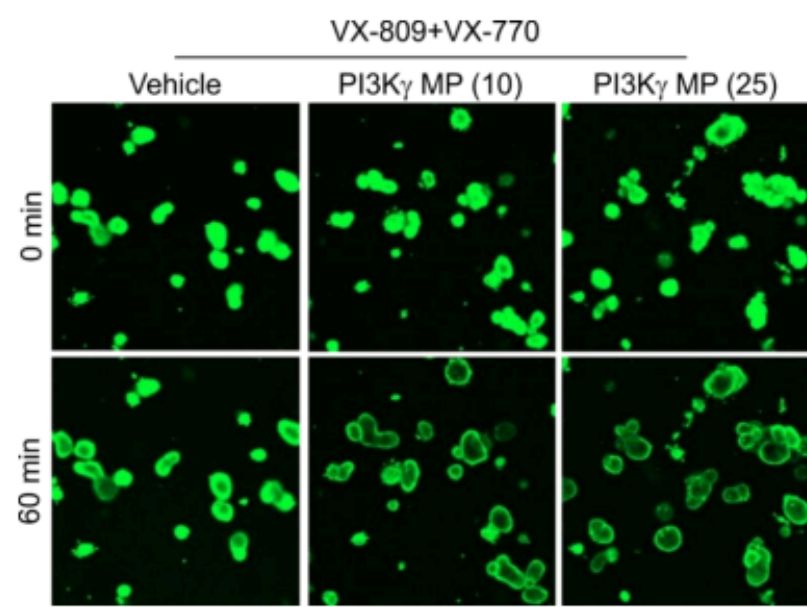
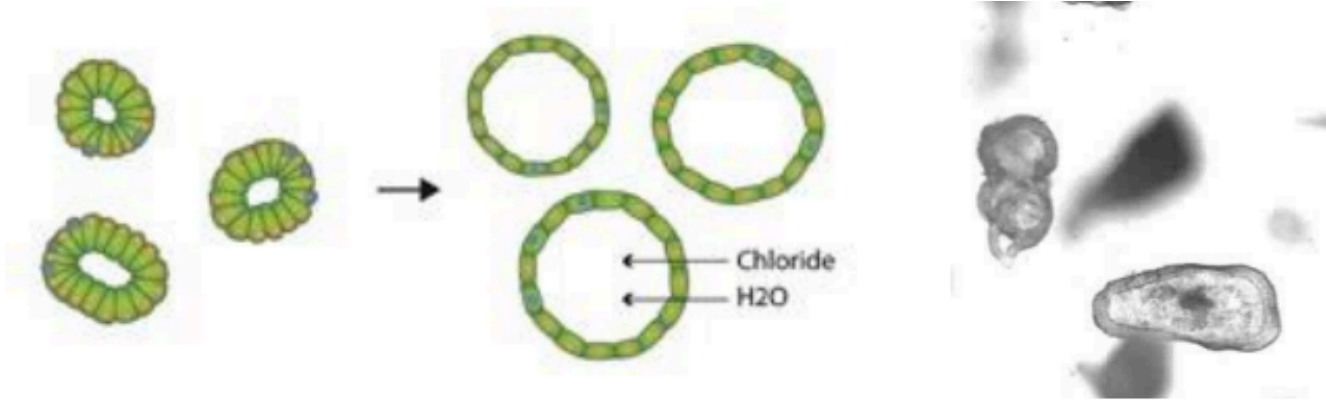
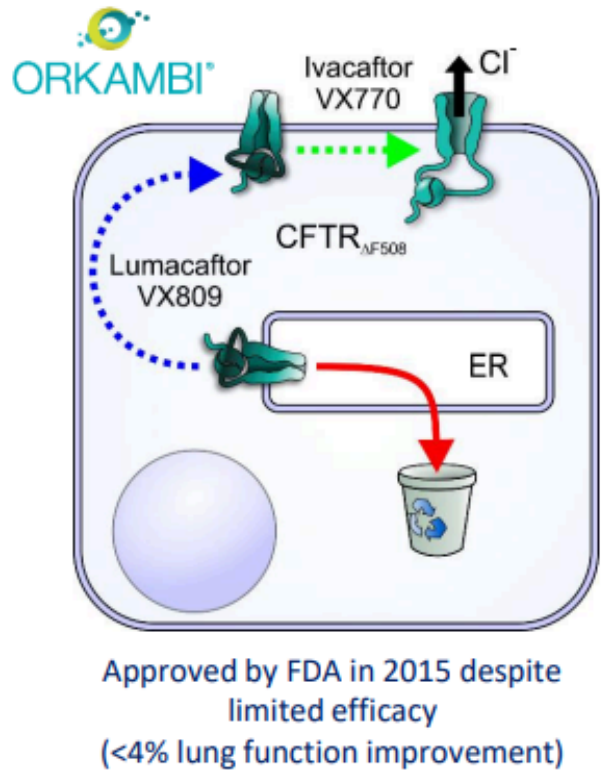
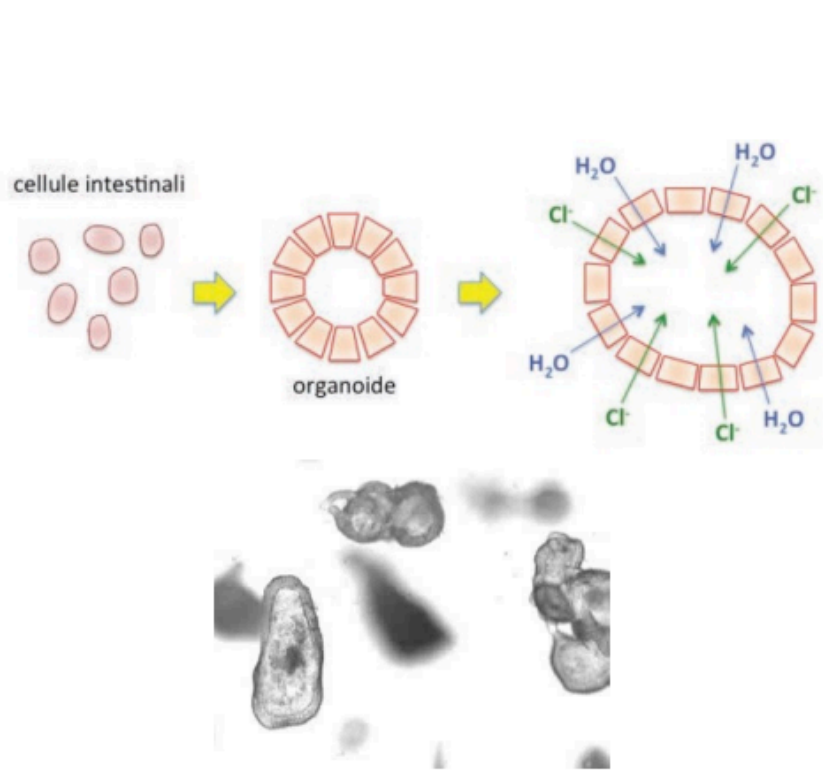


Detection



Quenching Fluorescence 2min

Il PI3K γ MP potenzia l'effetto dei modulatori del CFTR



Conclusioni

Il peptide PI3Ky MP ha degli ottimi effetti di:

- broncodilatazione
- anti-infiammazione
- modulatore del CFTR.

Tutte queste caratteristiche rendono il peptide un ottimo strumento per manipolare la segnalazione mediata da cAMP nei polmoni, imitando il nucleo dell'interazione nativa di PI3Ky con PKA, con dei possibili risvolti terapeutici.

Infatti:

- E' adatto per l'inalazione
- E' in grado di superare le barriere biologiche imposte dai polmoni malati.

Dati confermano che

- L'inalazione di PI3Ky MP promuove un'elevata persistenza di cAMP nei polmoni, inducendo il rilassamento del muscolo liscio delle vie aeree e riducendo l'infiltrazione di neutrofili.
- Nelle cellule epiteliali, PI3Ky MP eleva i livelli di cAMP nelle vicinanze del CFTR, inducendo la fosforilazione mediata da PKA della serina 737 attivante.
- PI3Ky MP potenzia gli effetti dei modulatori CFTR esistenti nel recuperare la funzione del F508del-CFTR.

KIT2014 (Pat. Appl. WO 2016/103176)



Patent Approved in EU
& USA

- Orphan Drug Designation (Feb. 2017) by European Medicine Agency (EMA)



Orphan Drug
Designation

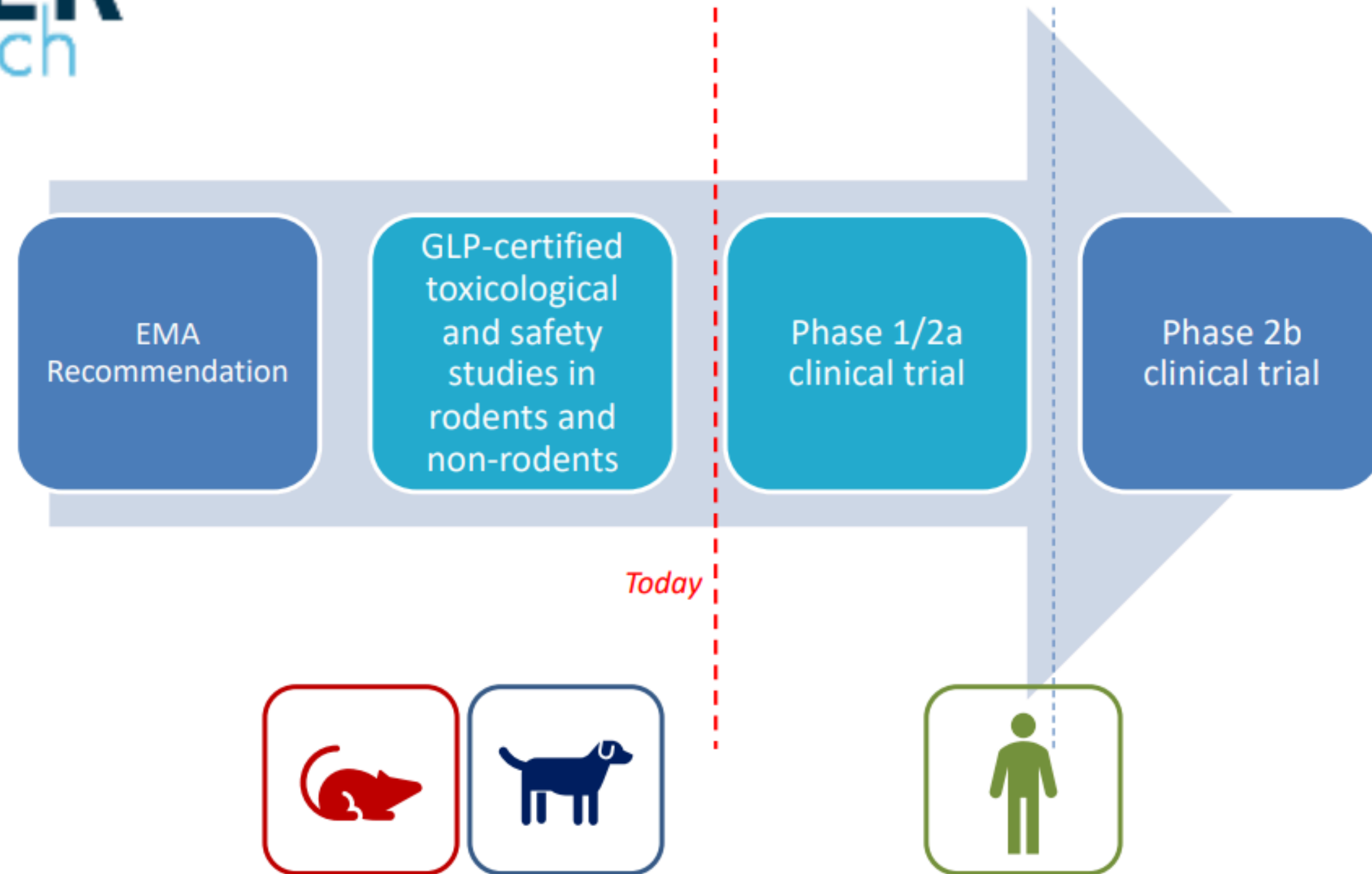
- "Scientific Advice" obtained from EMA for preclinical development (Oct. 2018)



Scientific Advice
from EMA



Prospettive future

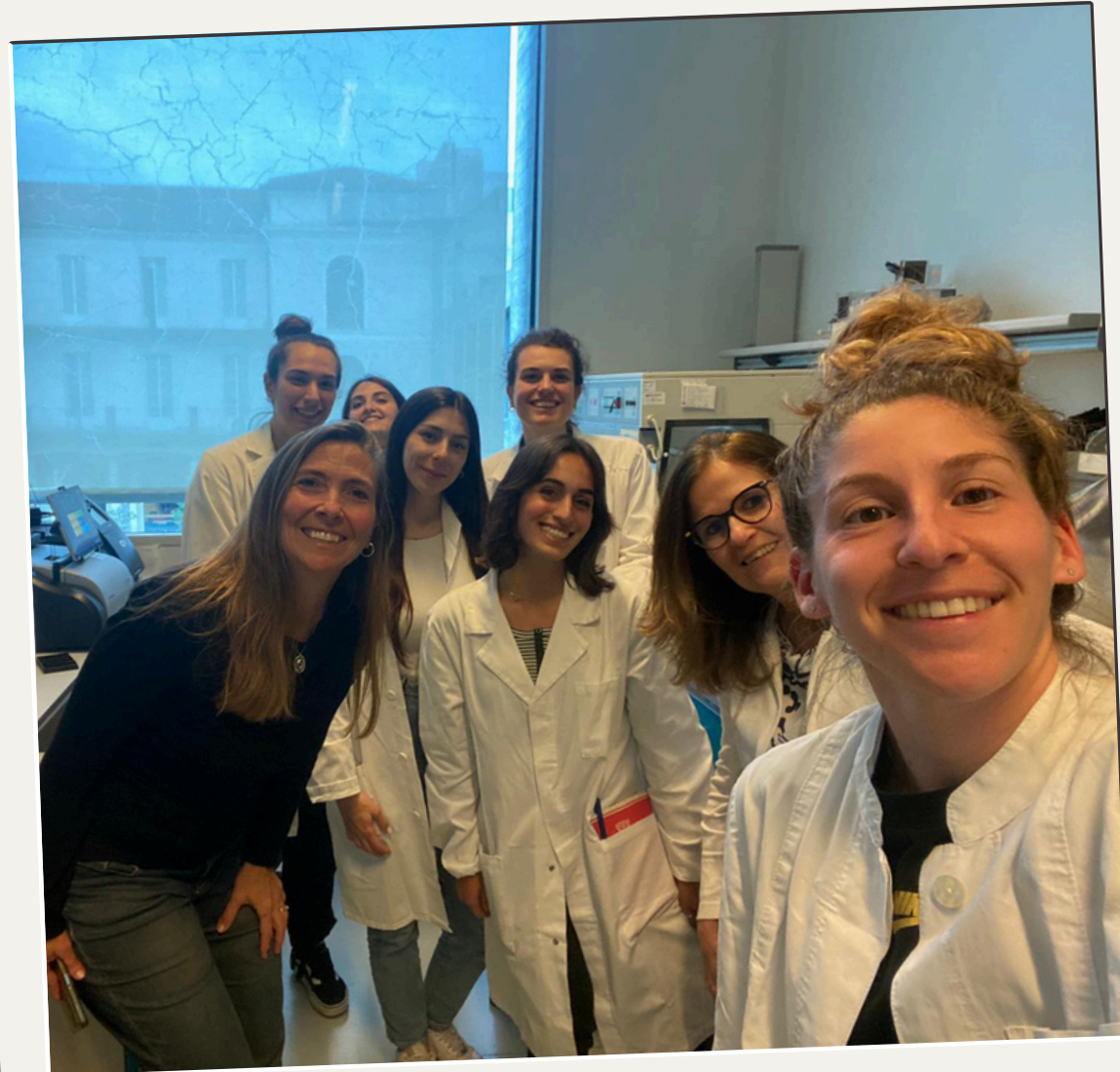


Ma la ricerca non si ferma...



Studi su nuovi possibili peptidi sono tutt'oggi in attivo studio.

Gli obiettivi sono quelli di renderli più resistenti alle proteasi e di indirizzarli contro mutazioni di classe III e IV.



Grazie dell'attenzione!

