

# 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:

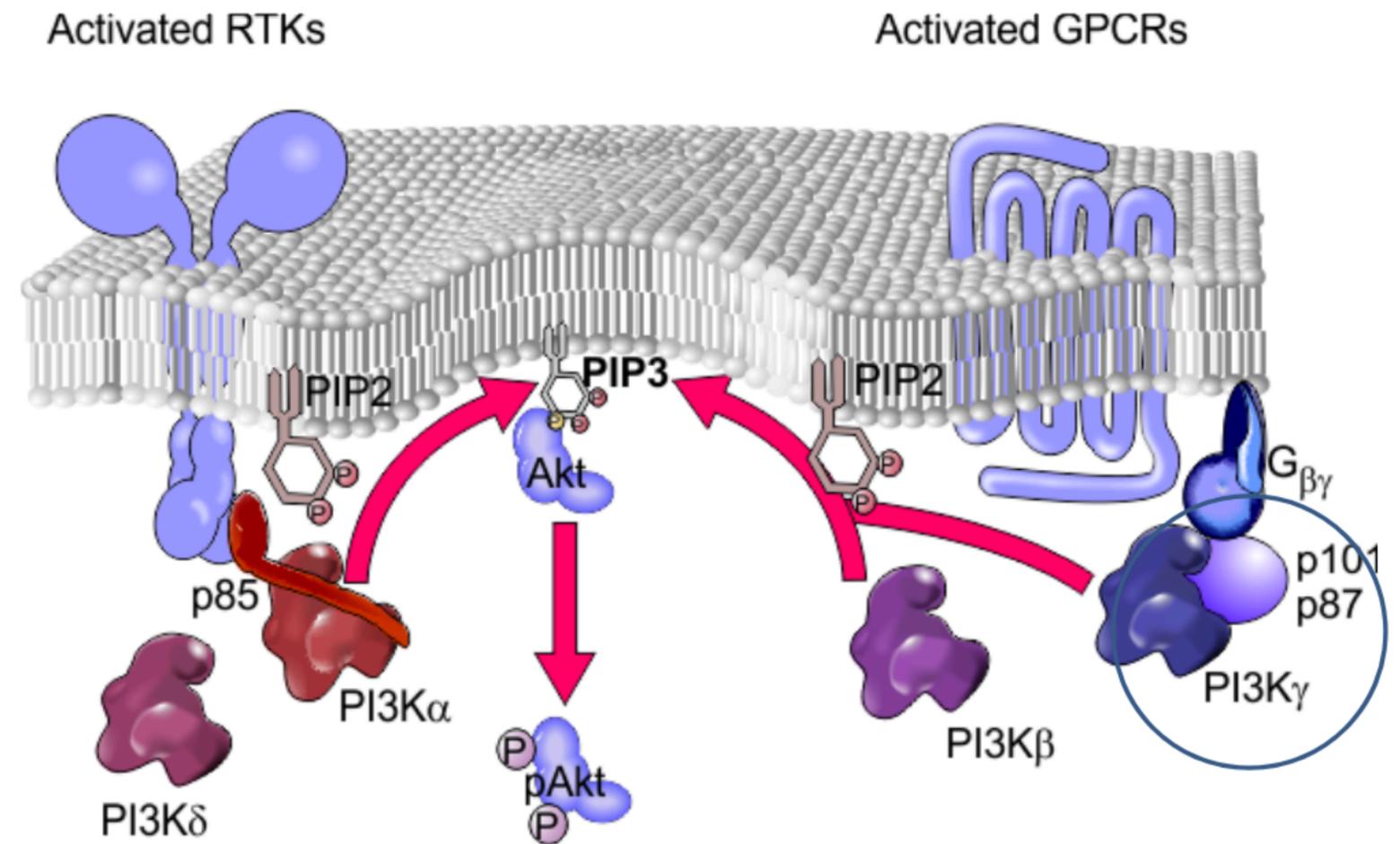
- Chinasi
- Proteine scaffale



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:

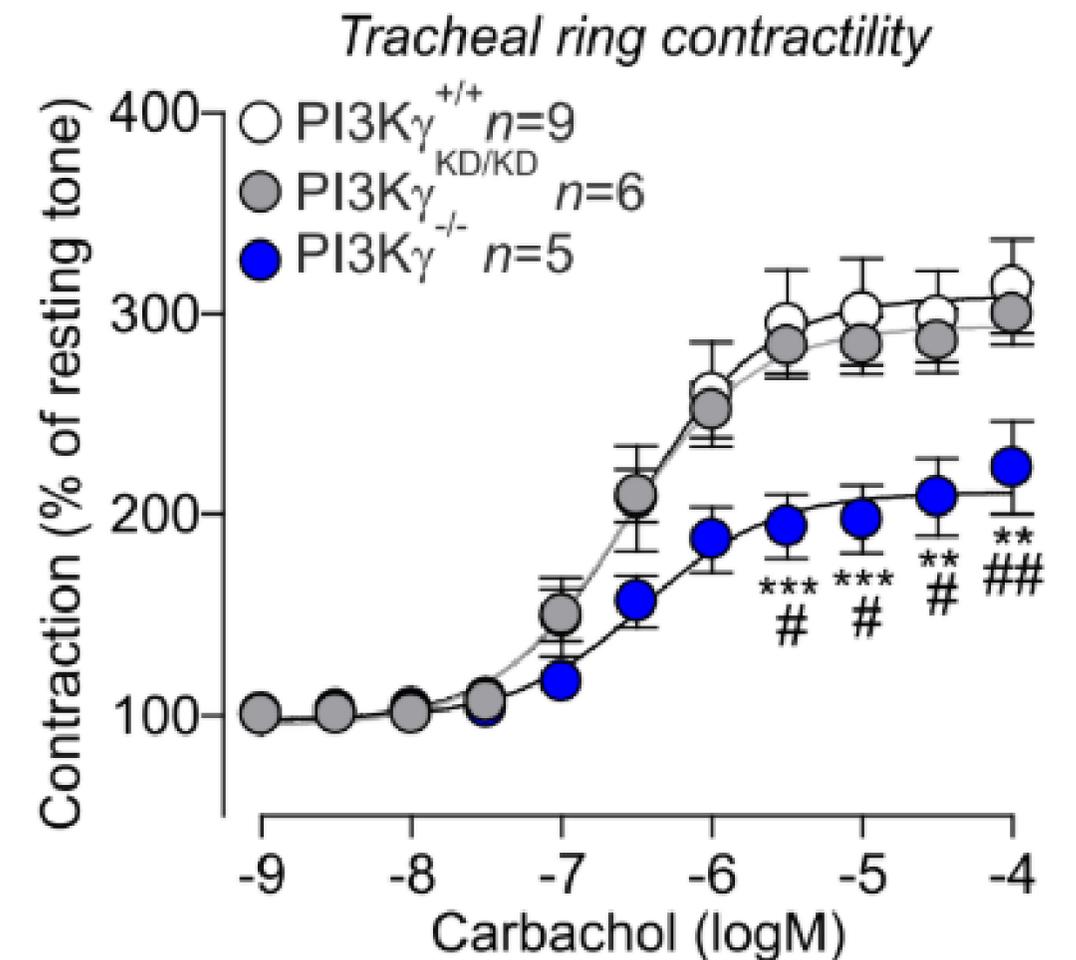
- Topo PI3K
- Topo PI3K KO
- Topo PI3K scaffold



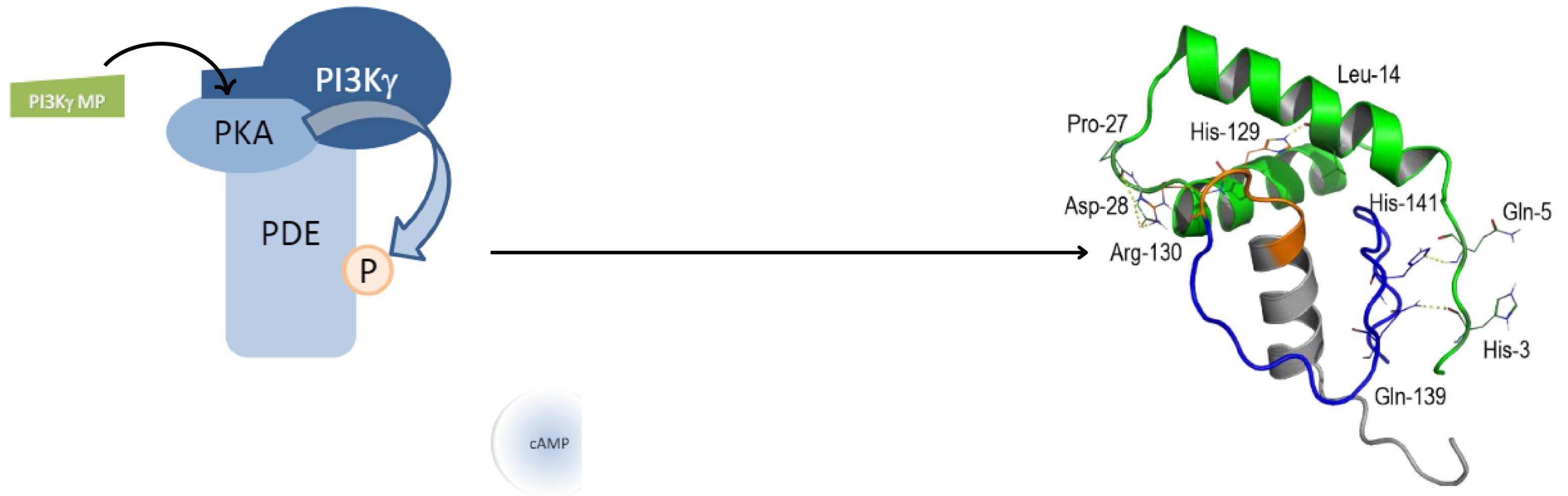
Estrazione anello di trachea

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.

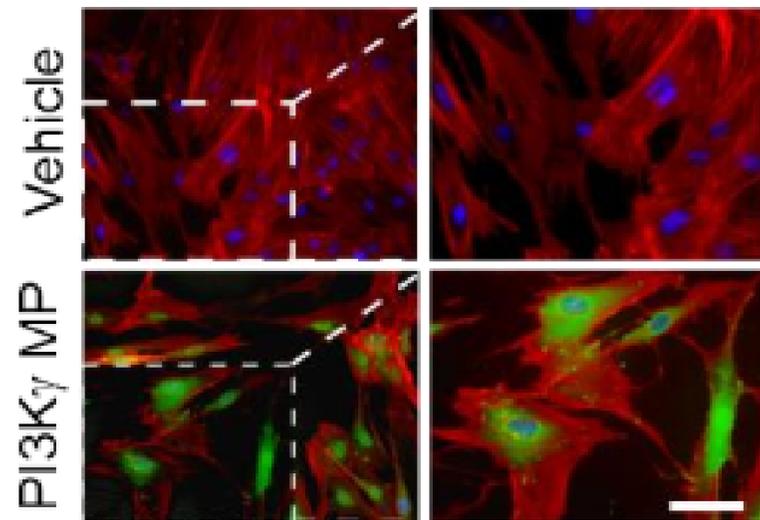
PENETRATINA → aumenta permeabilità in membrana

**PI3K $\gamma$  MP internalization in Human Bronchial Smooth Muscle Cells**

PI3K $\gamma$  mimetic peptide (MP)

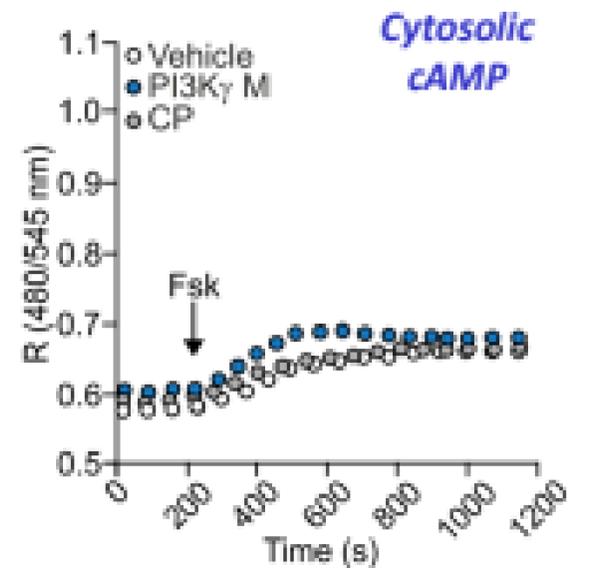
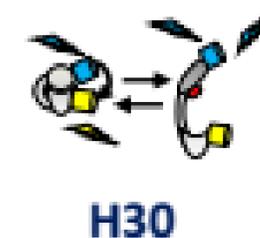
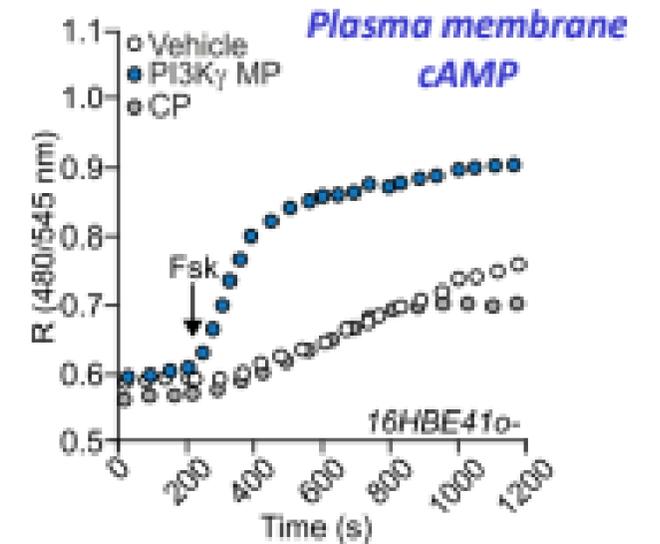
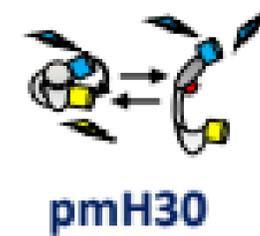
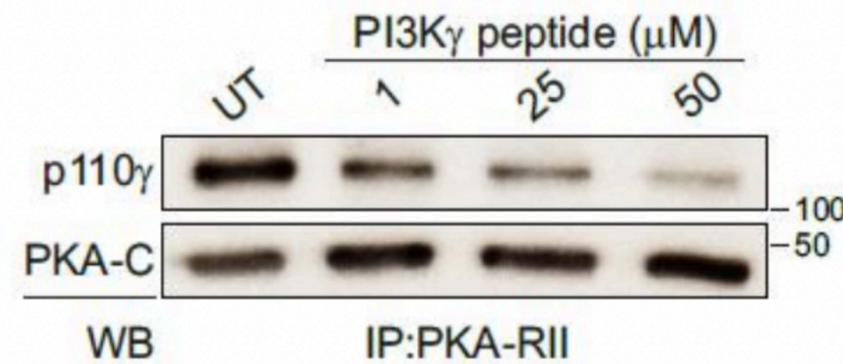


KATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAF



FITC peptide/Actin/DAPI  
hBSMCs

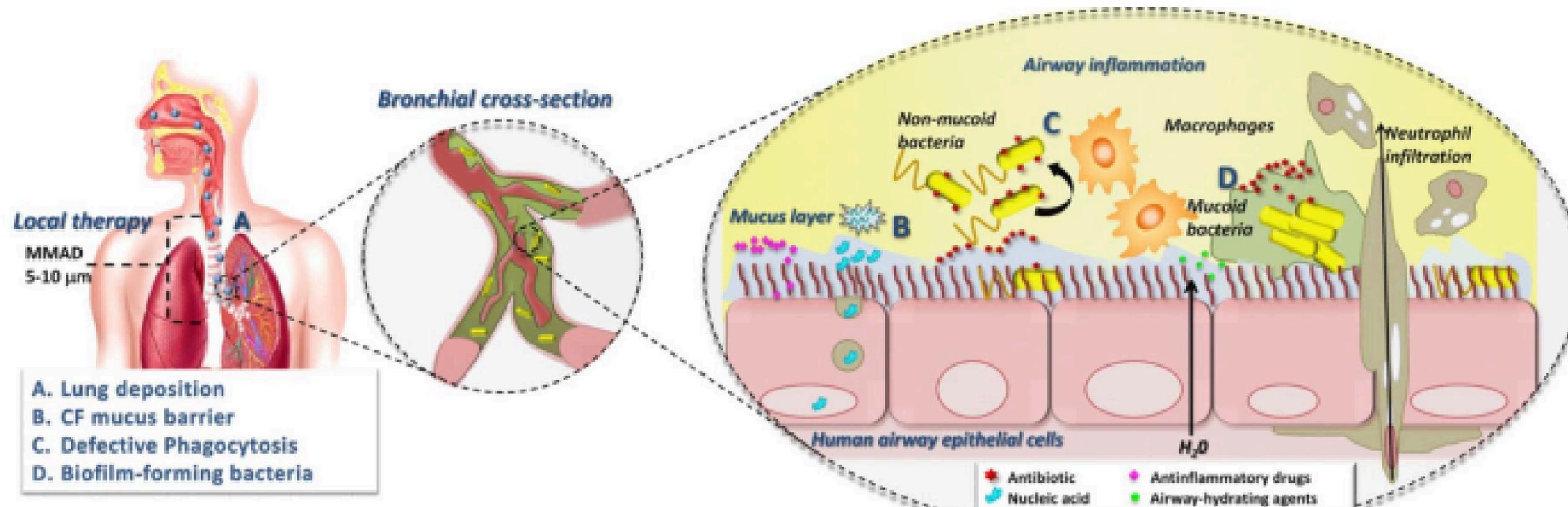
**Disruption of PKA/PI3K $\gamma$  binding by the PI3K $\gamma$ MP**



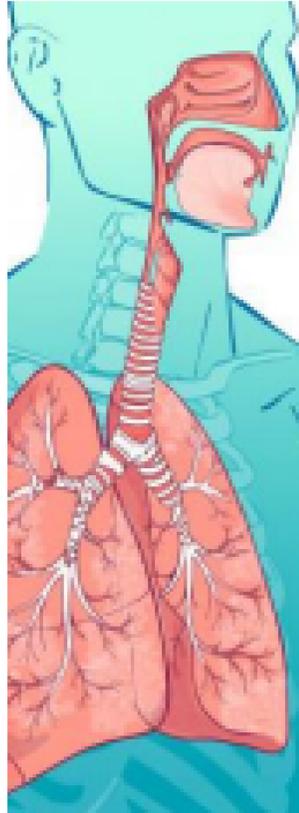
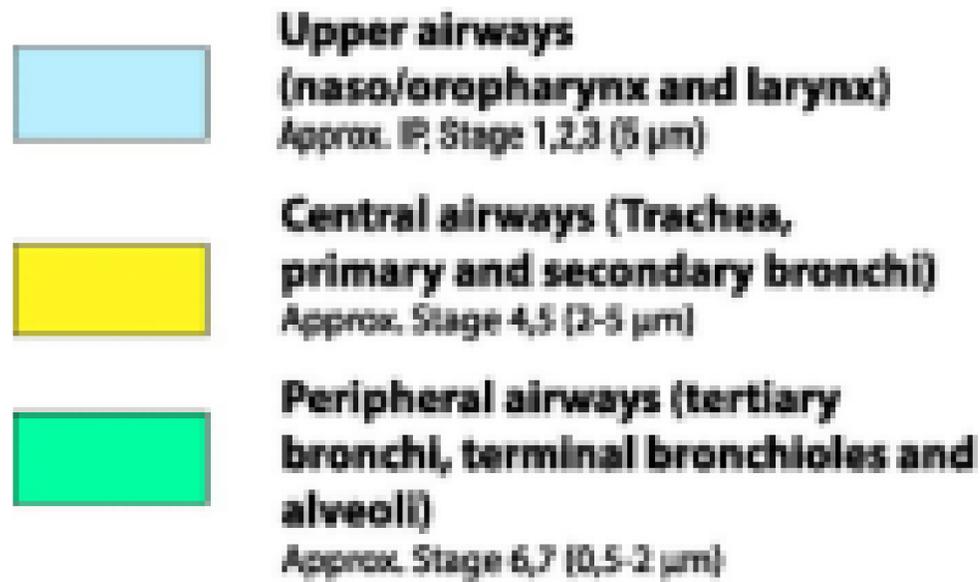
# Utilizzo del peptide come farmaco per aumentare cAMP nelle vie respiratorie

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

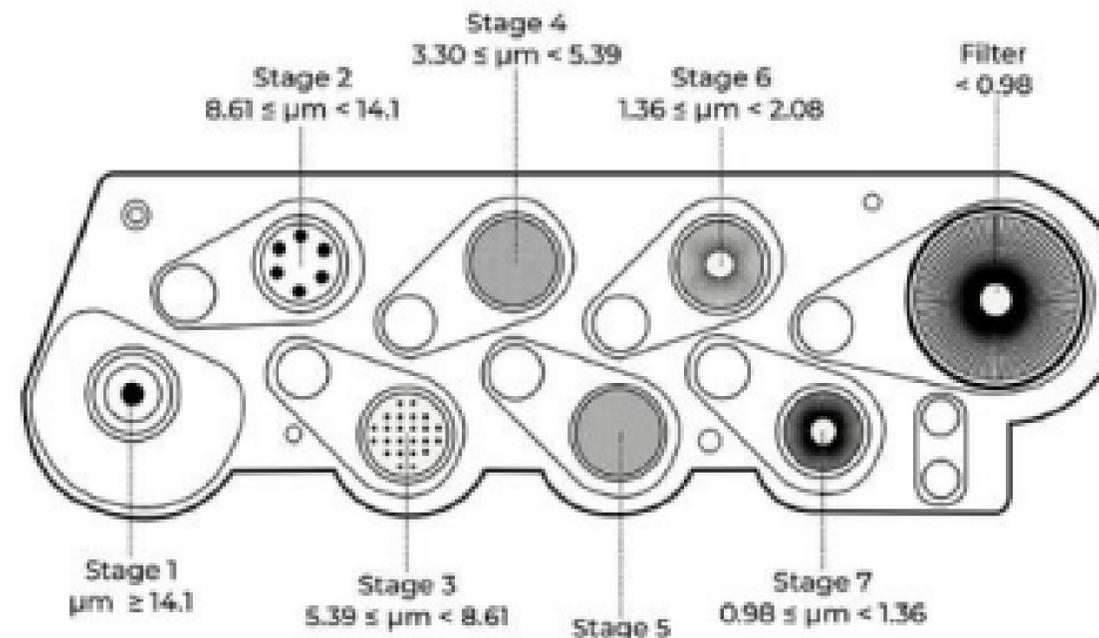
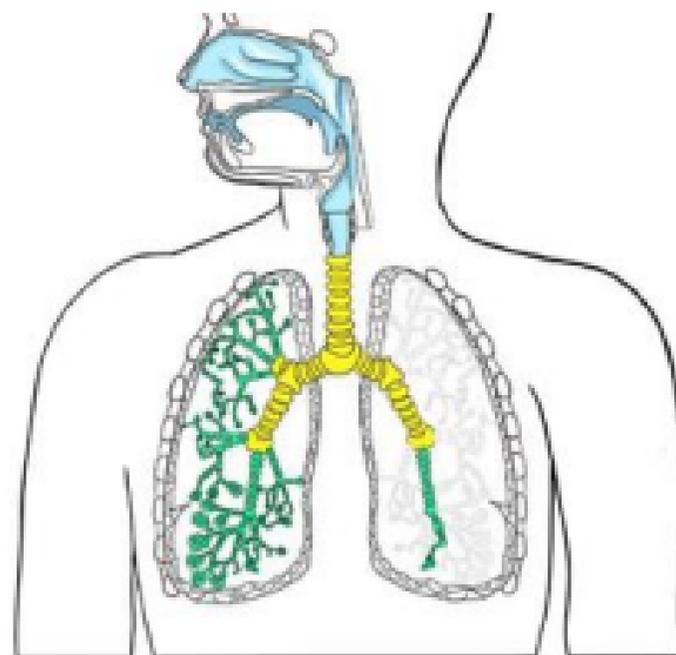


# Test 1: Validare se il peptide ha le caratteristiche potenziali come farmaco per inalazione



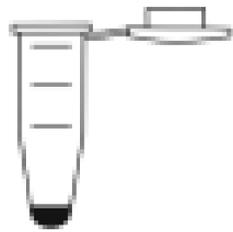
NGI Cup	Particles (micron)
S1	14.10
S2	8.61
S3	5.39
S4	3.30
S5	2.08
S6	1.36
S7	0.98

## Next generation impactor (NGI)



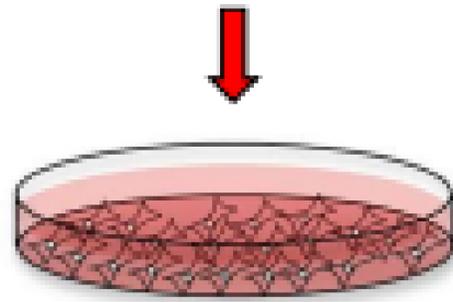
# Test 2: Validare se il peptide è resistente a componenti dell'ambiente polmonare

1. PI3K $\gamma$  MP + HNE

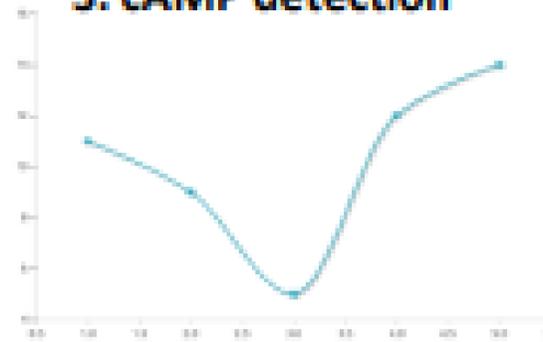


directly on  
16HBE cells

2. Cell treatment



3. cAMP detection

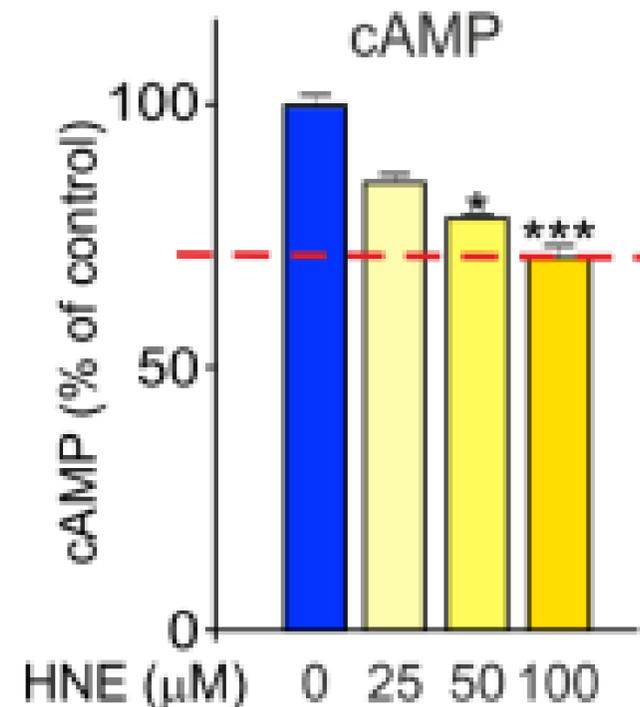


Resistance to Proteases  
(Human neutrophil elastase - HNE)

PI3K $\gamma$  MP



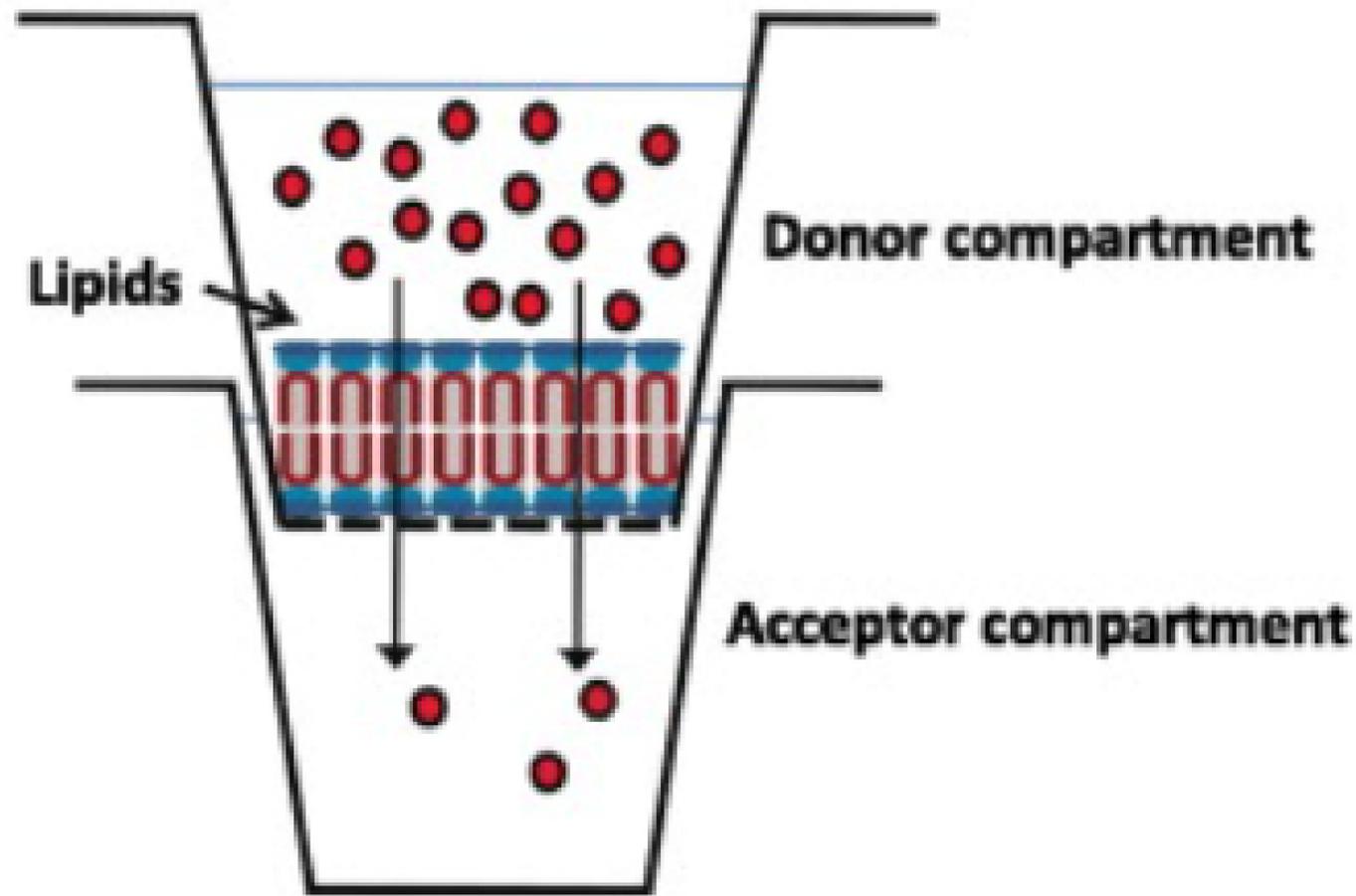
cAMP



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

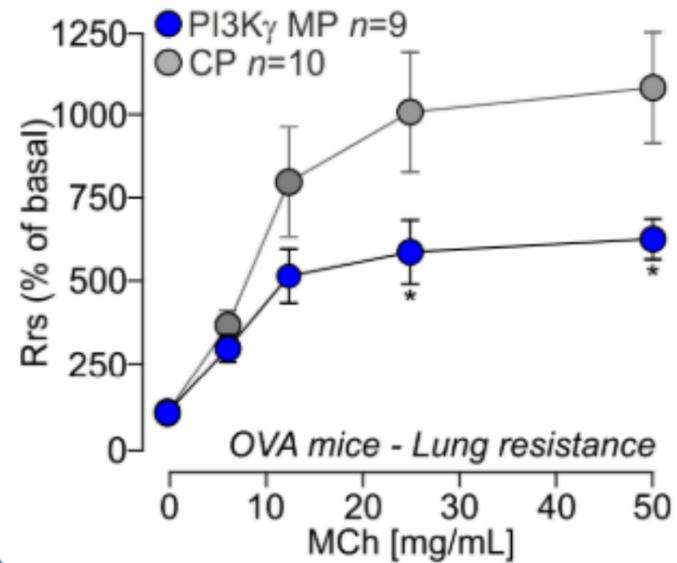


Inflammatory Cells

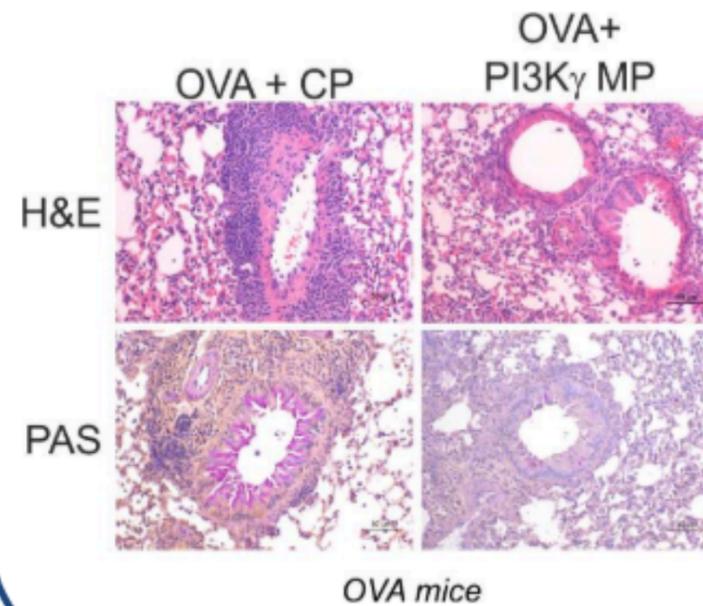


Epithelial Cells

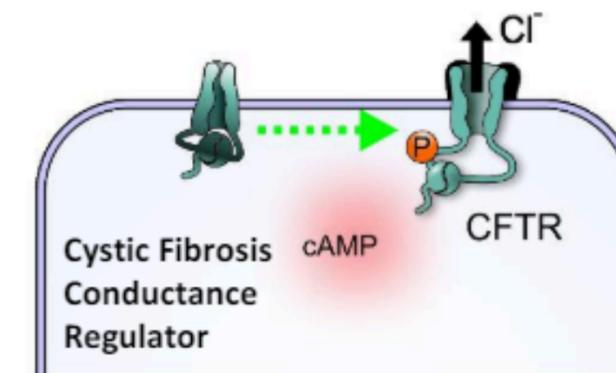
## Bronchodilation



## Anti-inflammatory effect

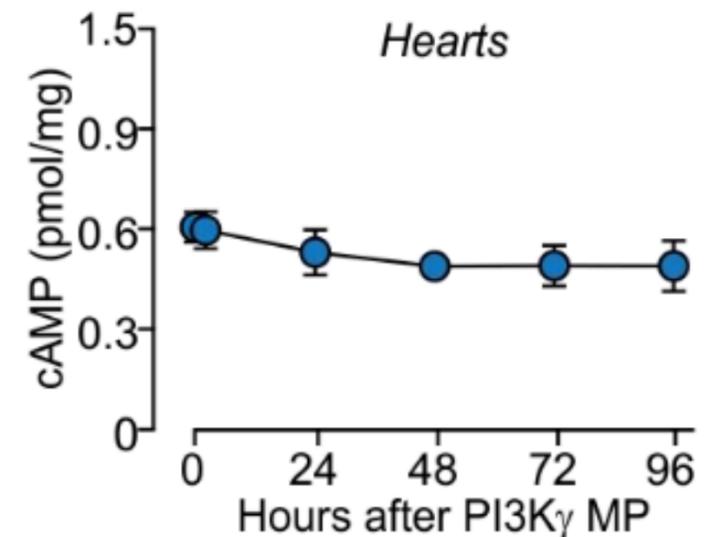
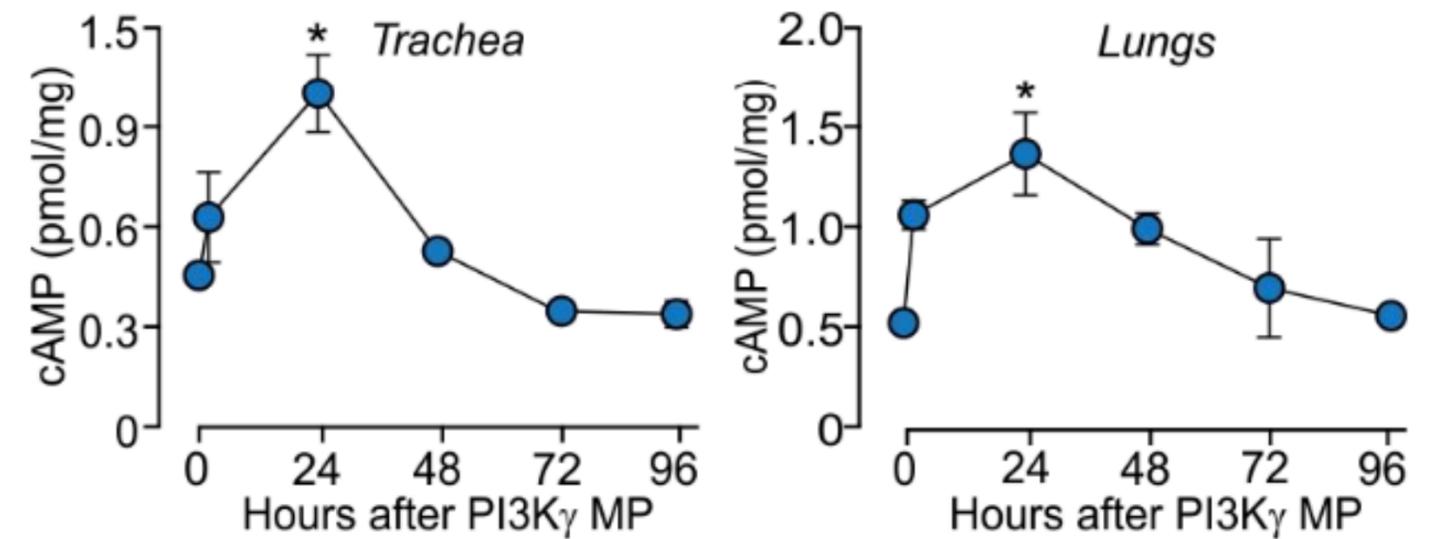
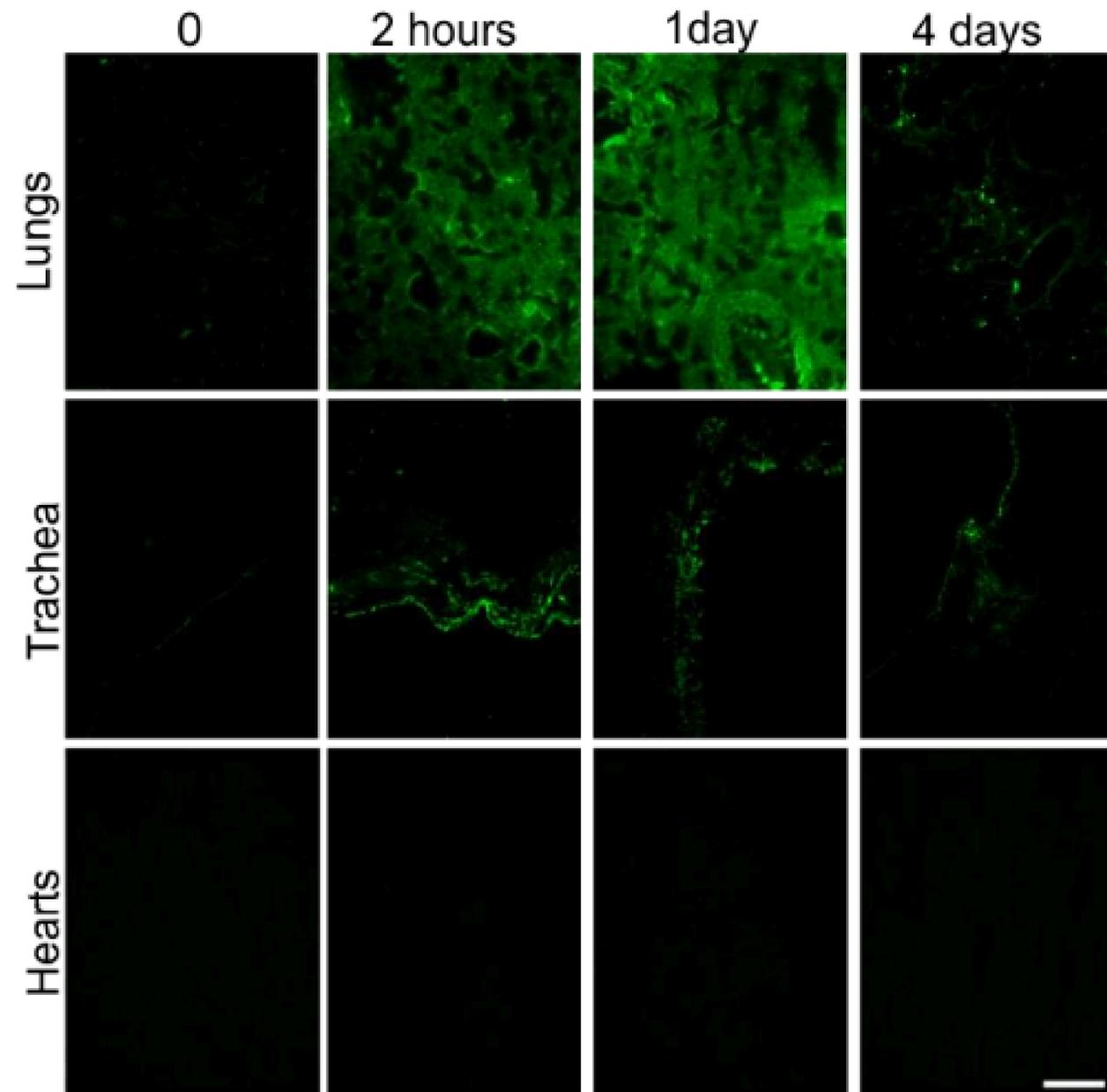


## CFTR modulator



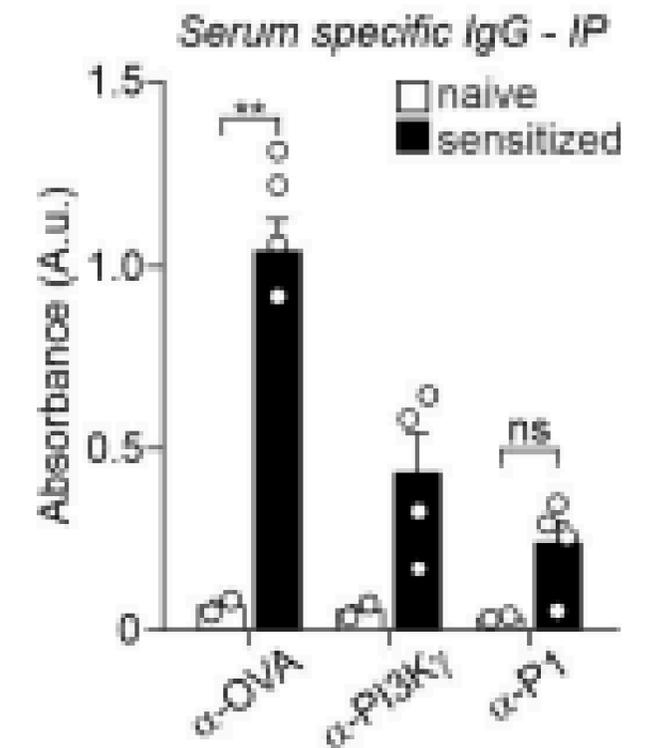
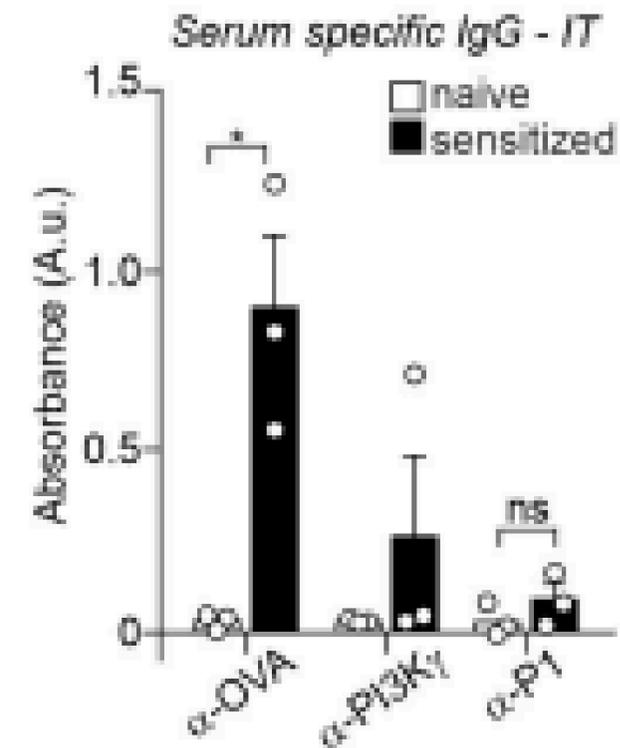
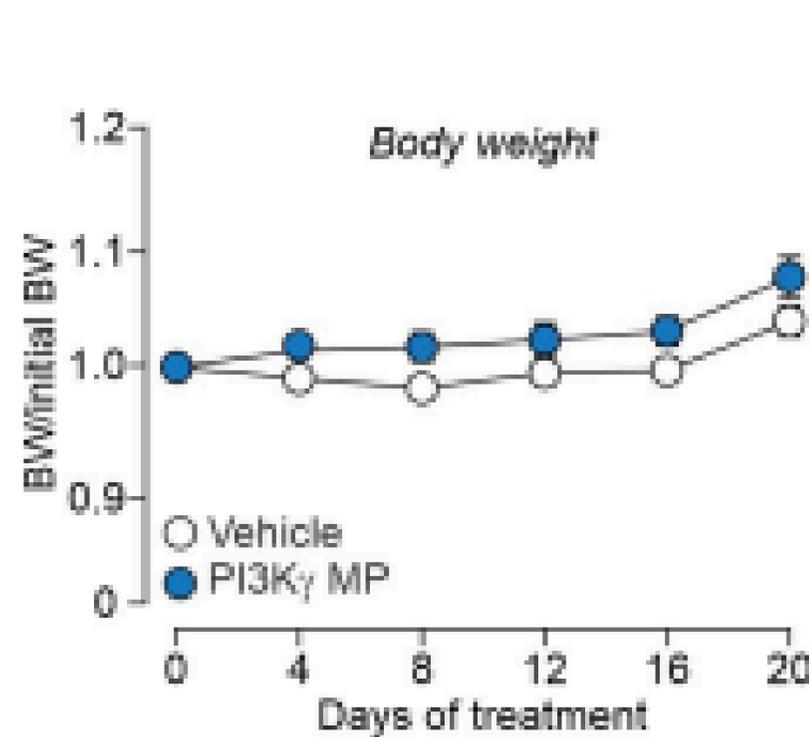
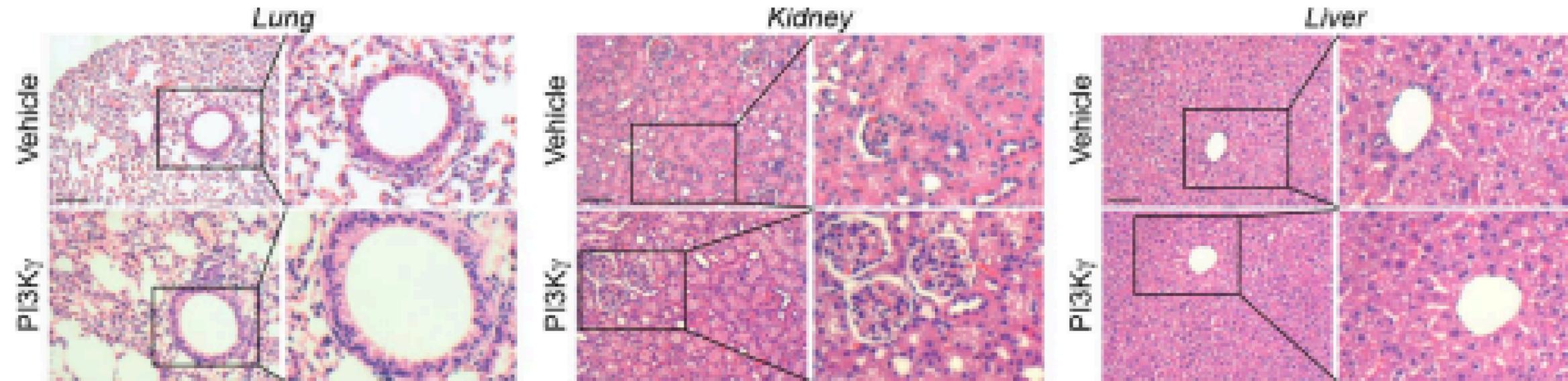
# Prova in vivo su topi tratti con installazione intratracheale di PI3K $\gamma$ mp

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

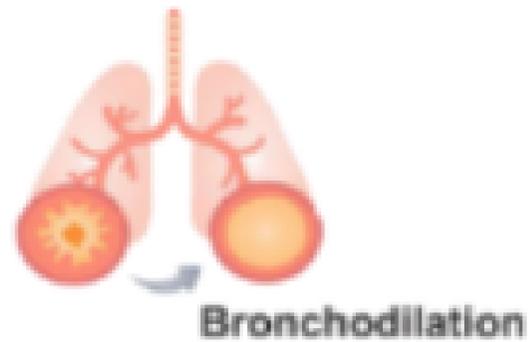


# Verifica di PI3K $\gamma$ mp in vivo:

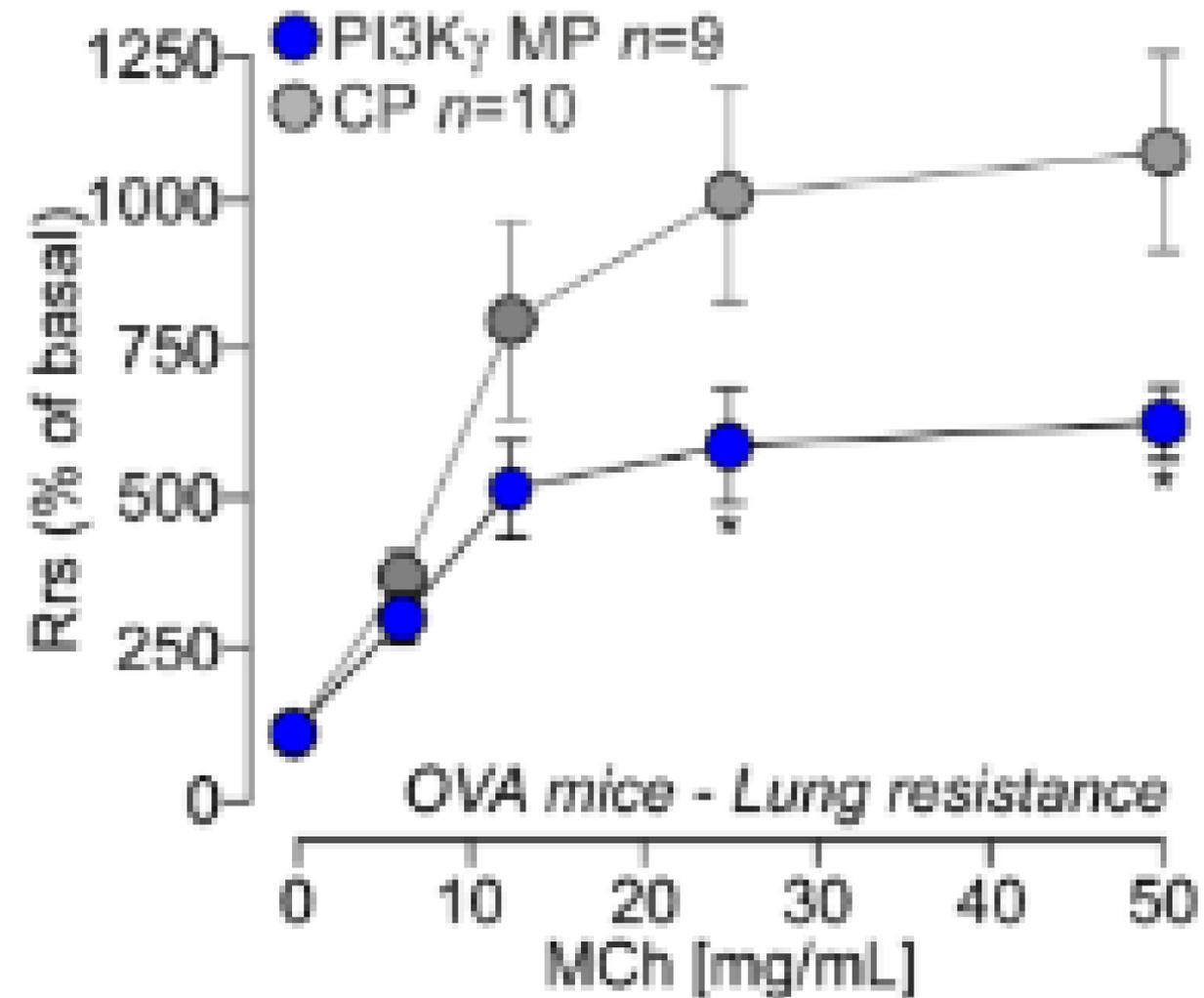
- Tollerabilità



# Verifica di PI3K $\gamma$ mp in vivo:



## Bronchodilation

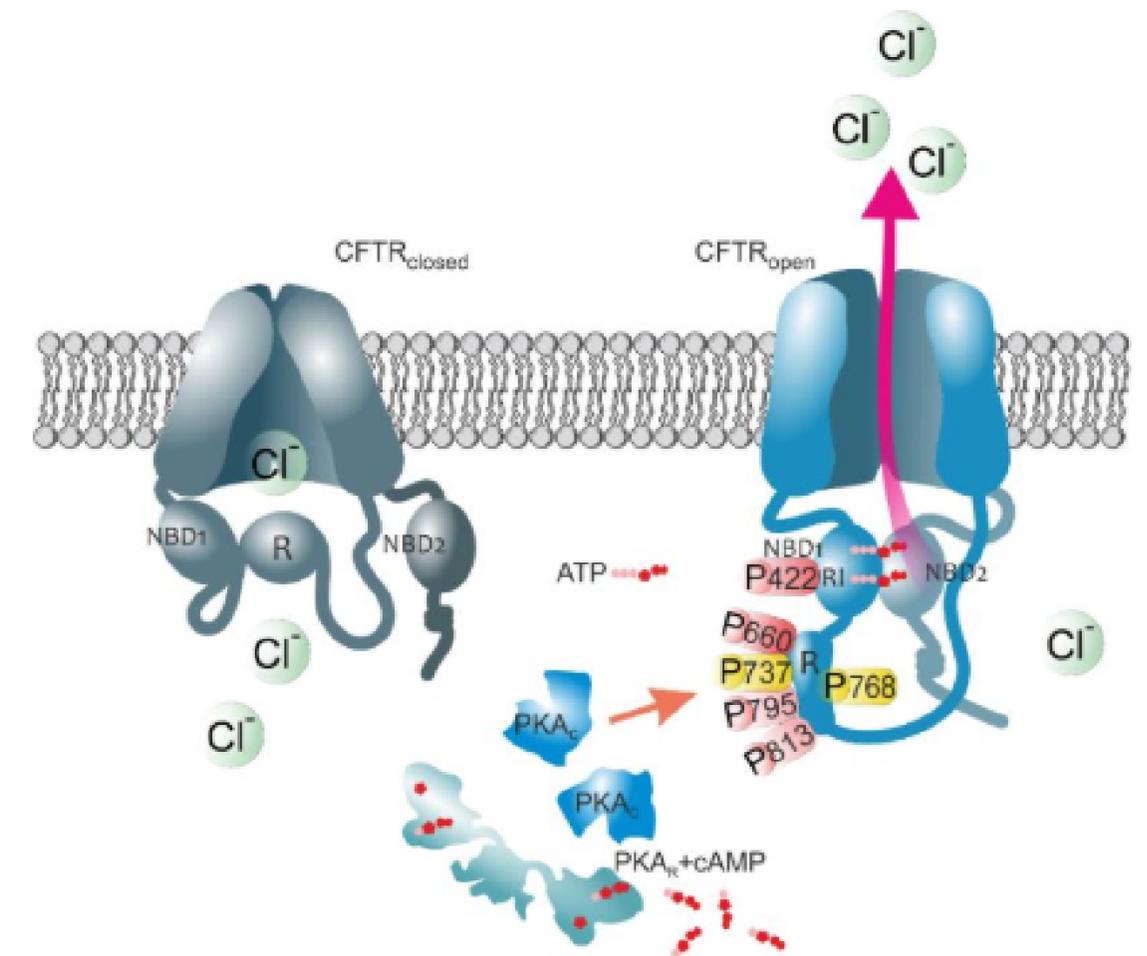


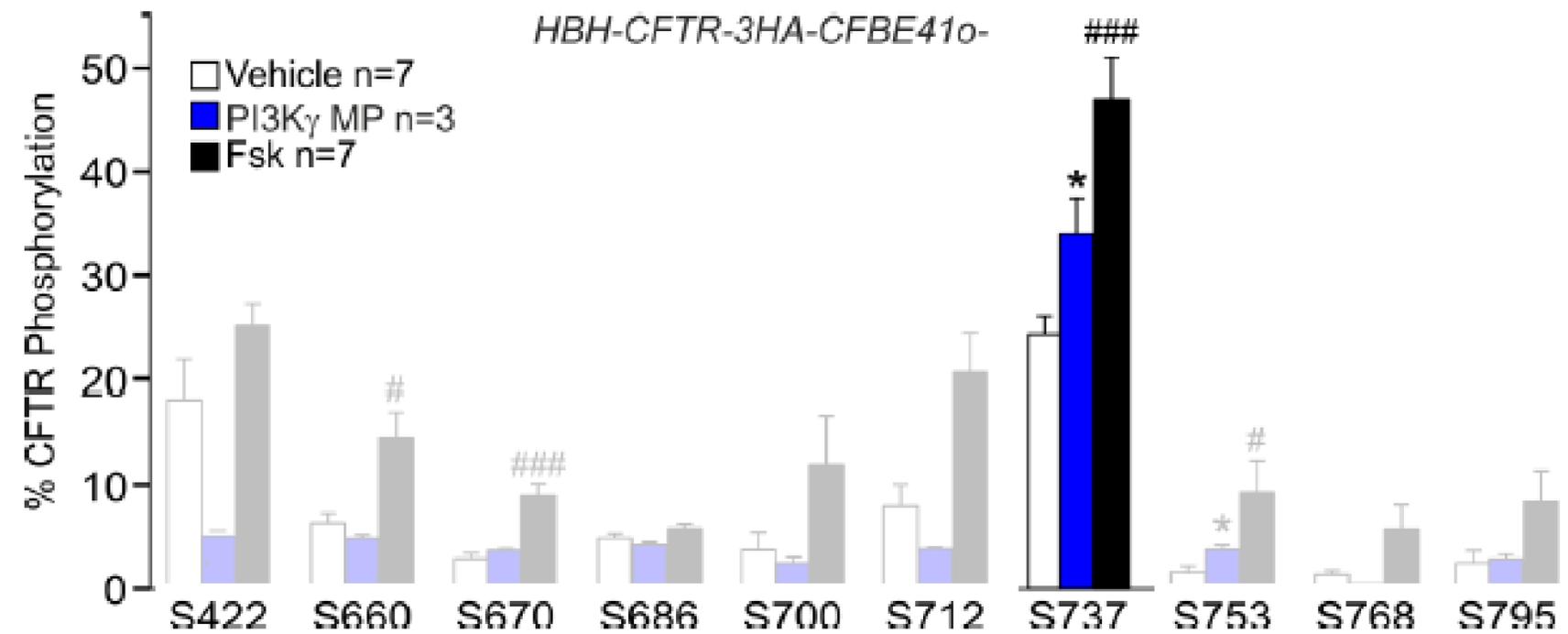
# La PI3K $\gamma$ MP innesca l'apertura di CFTR

cAMP ha un ruolo fondamentale in CFTR.

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

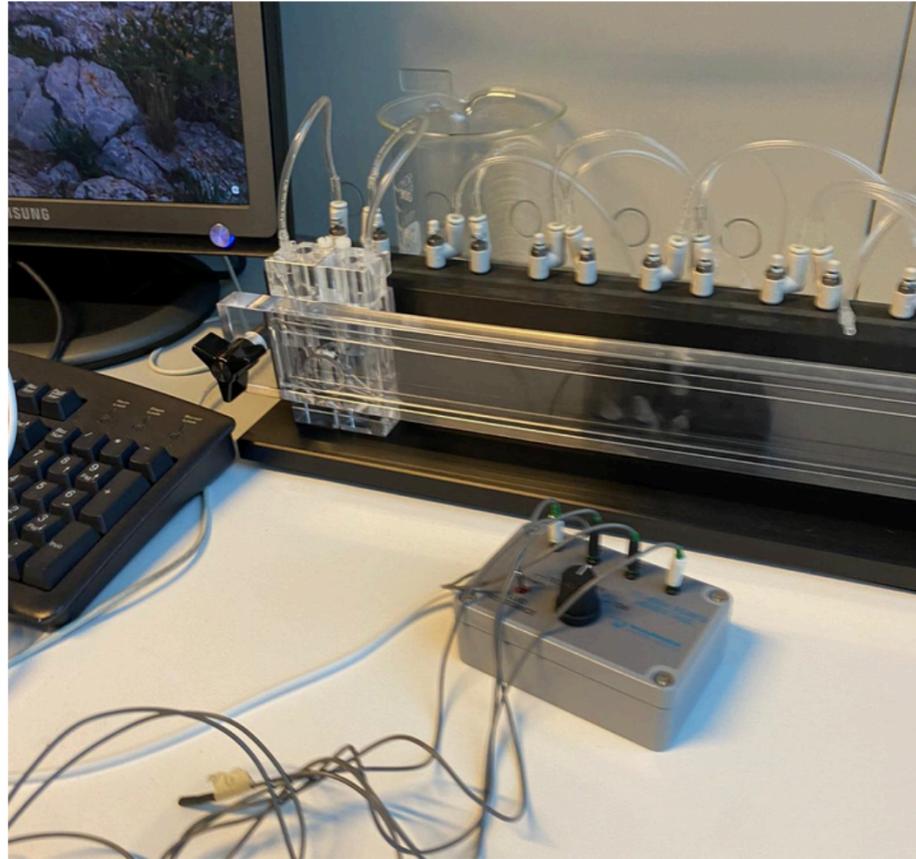
Ma dove avviene precisamente la fosforilazione del dominio R?





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

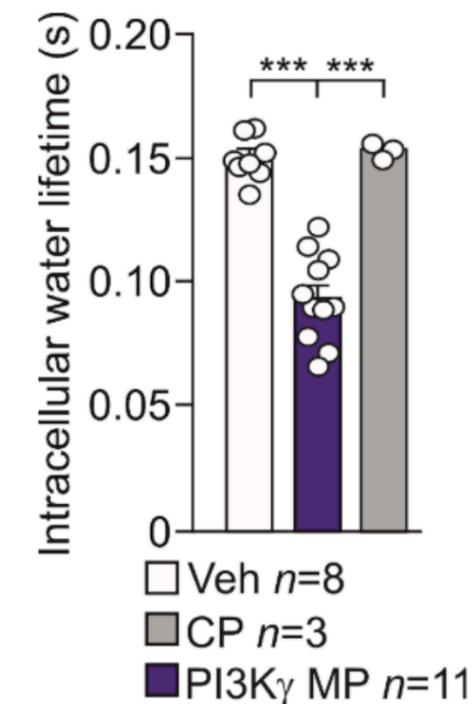
E' quindi l'amminoacido "attivante" del dominio R che provoca l'apertura del canale



Esperimento in camera di Ussing su cellule di epitelio bronchiale.

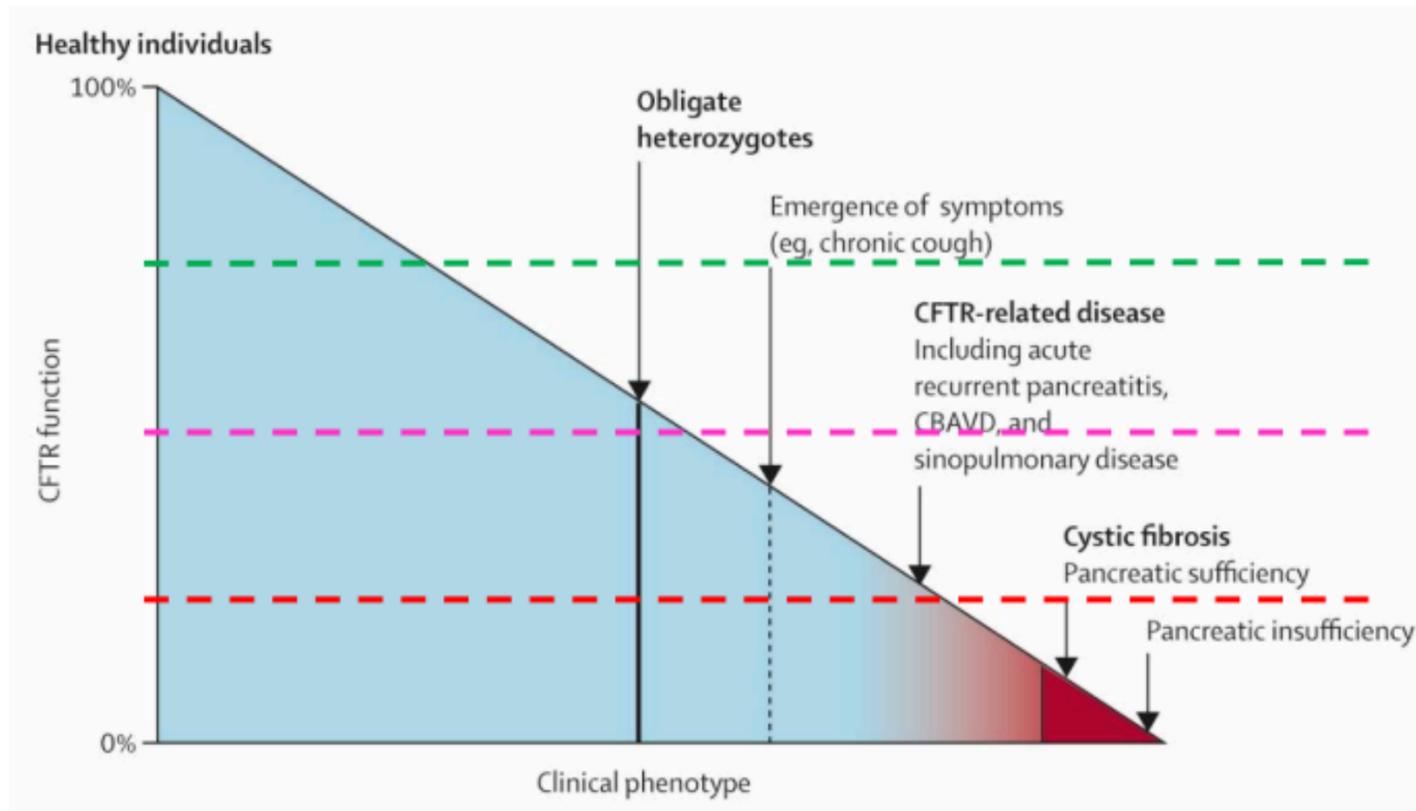
In presenza di cAMP e del peptide c'è passaggio di corrente dovuto all'apertura del canale.

Water residence time ( $\tau_{in}$ ) determined by  $^1\text{H}$  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

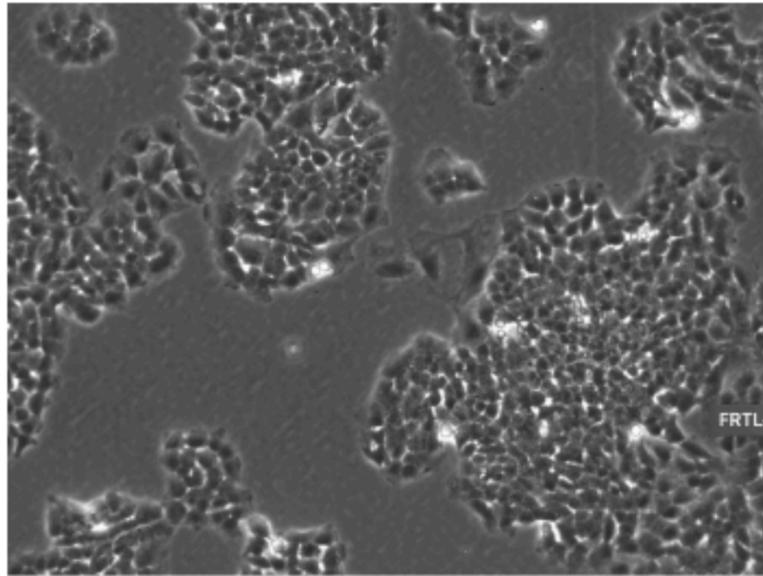
# L'applicazione clinica del peptide si focalizza sulla mutazione delta 508 nella fibrosi cistica



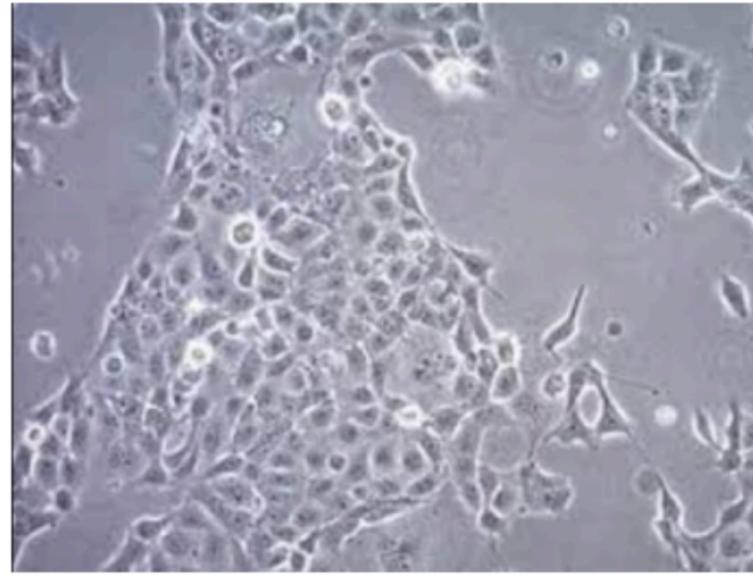
L'uso del peptide associato ai modulatori può superare la soglia del 50%?

# Modelli in vitro

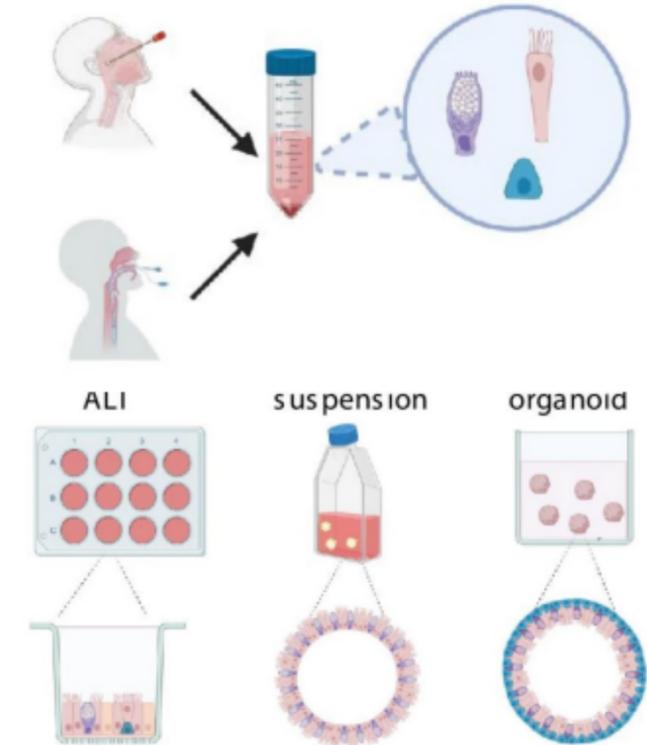
- **Stable Cell Lines**  
**Fischer Rat Thyroid Cells**



- **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

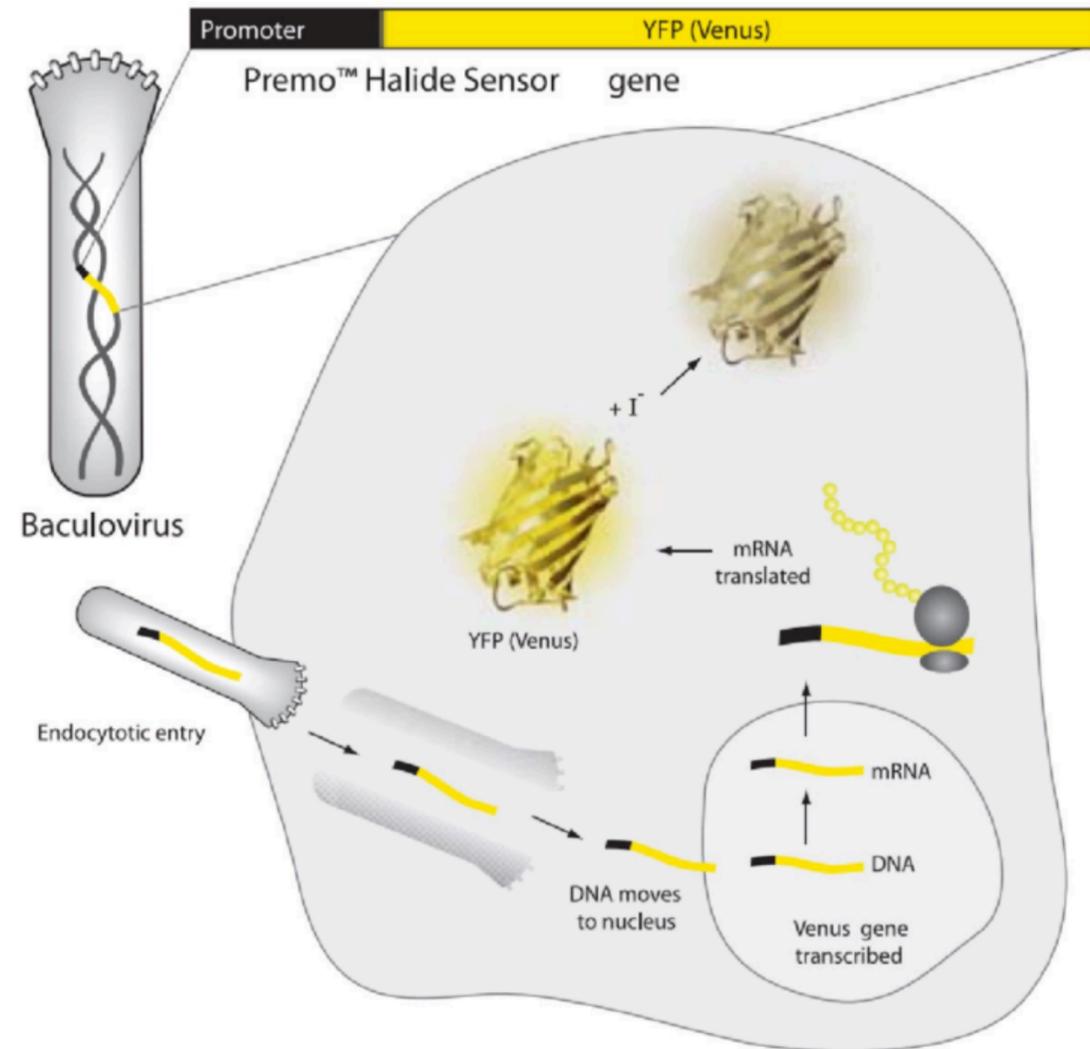
Le cellule 16HBE14o-/CFBE41o-

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

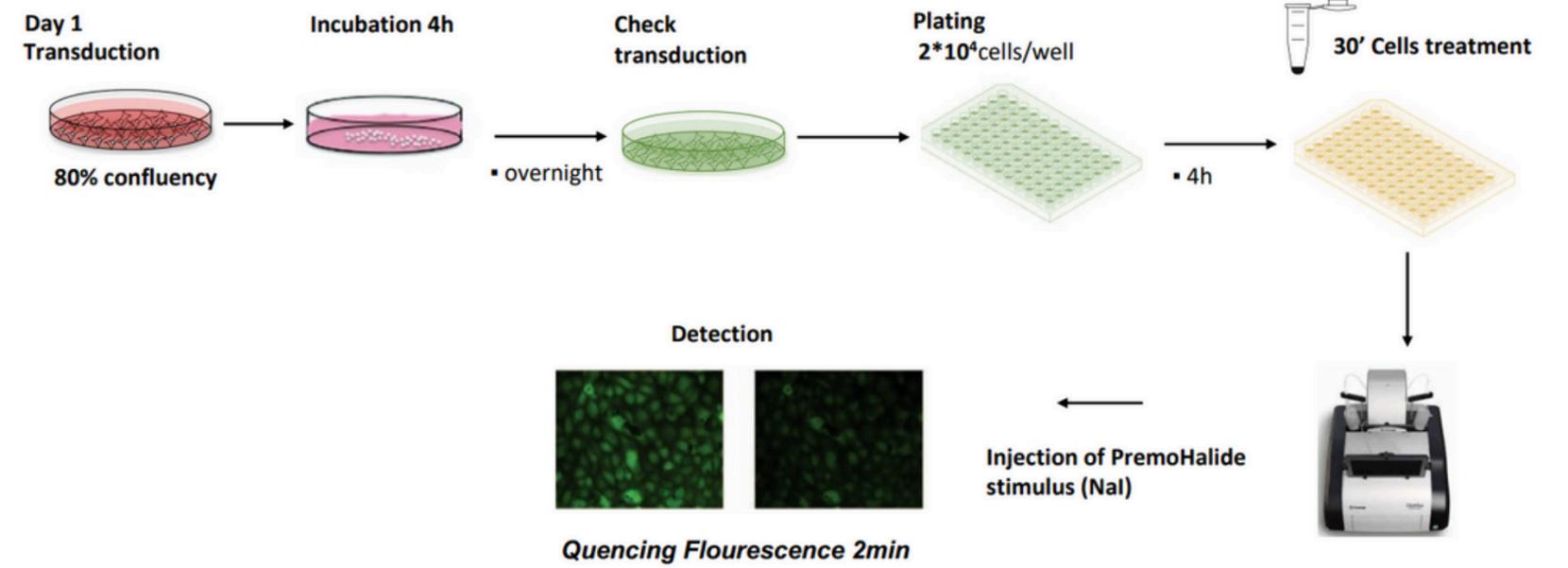
Le cellule respiratorie primarie

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

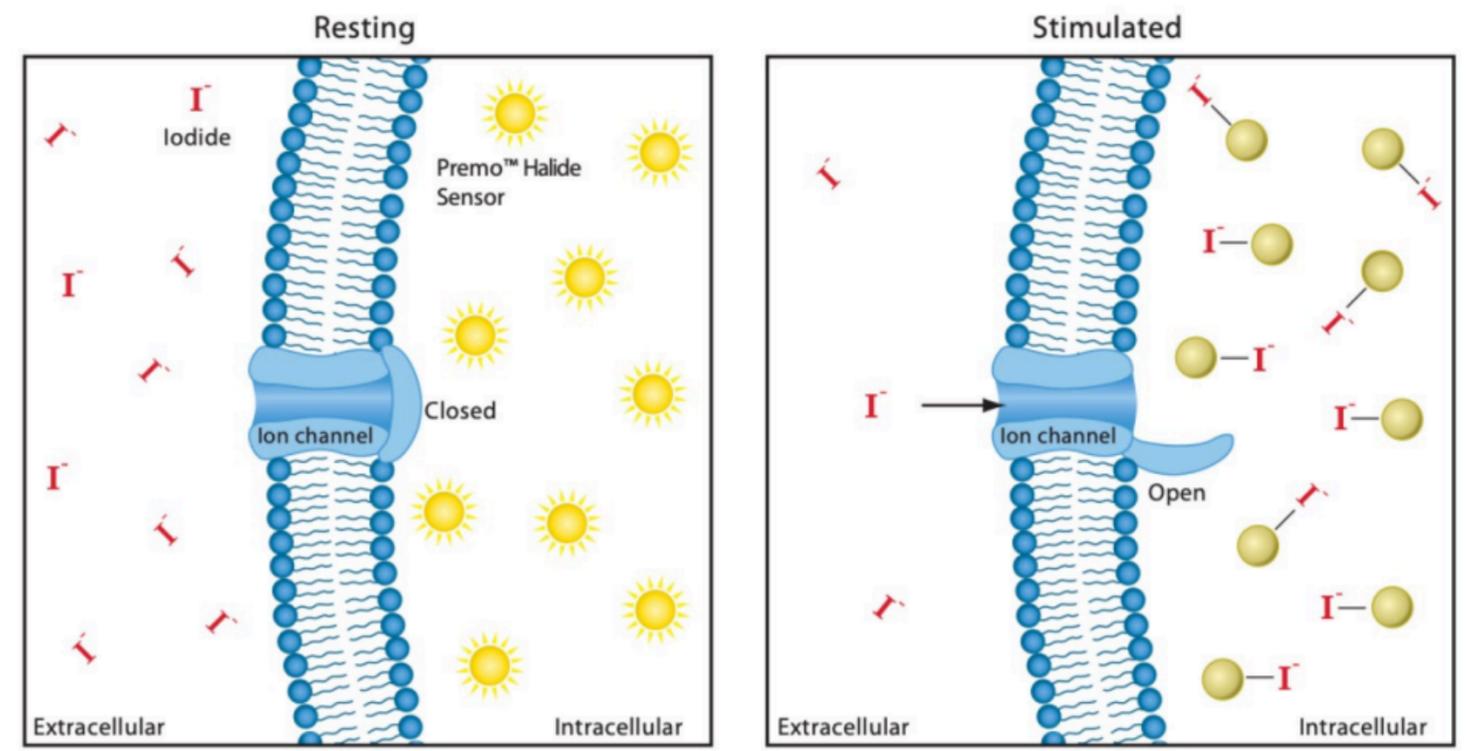
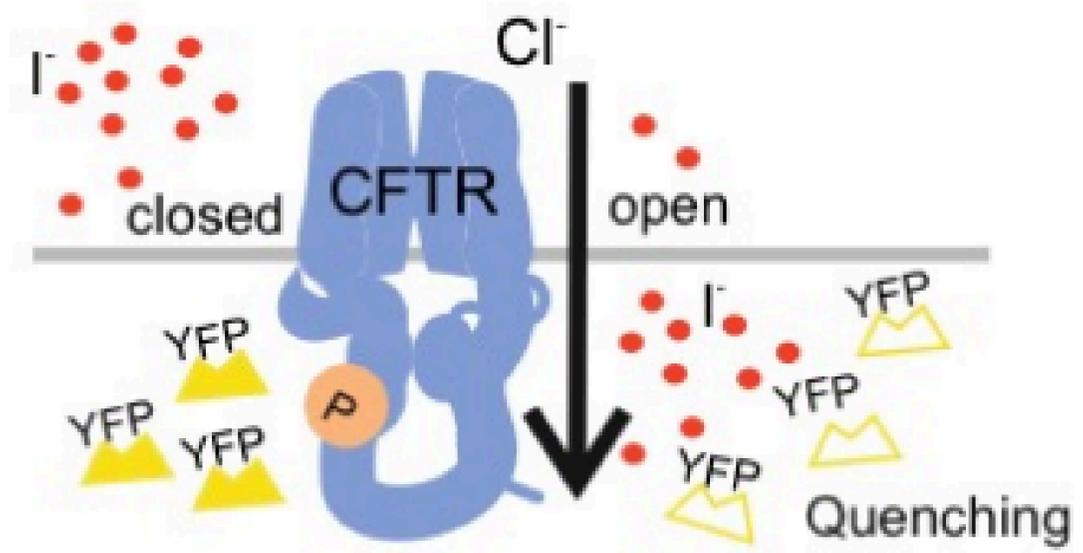
# YFP



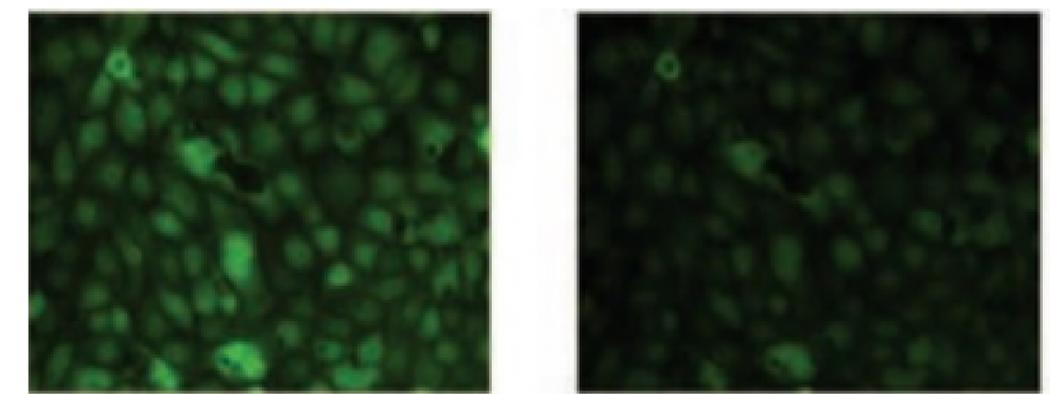
## WORKFLOW



## Premo™ Halide Sensor

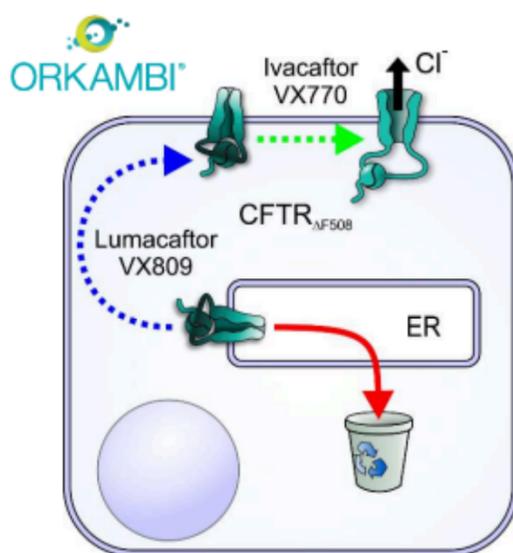
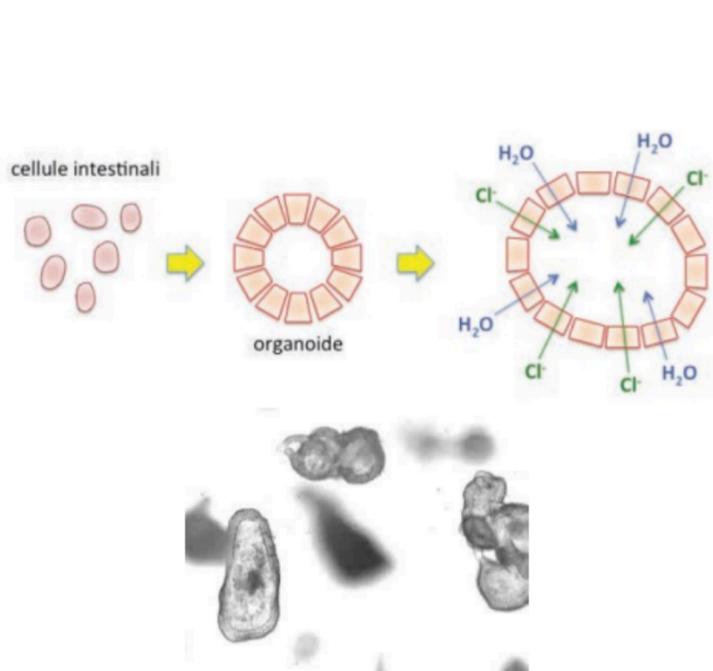


## Detection

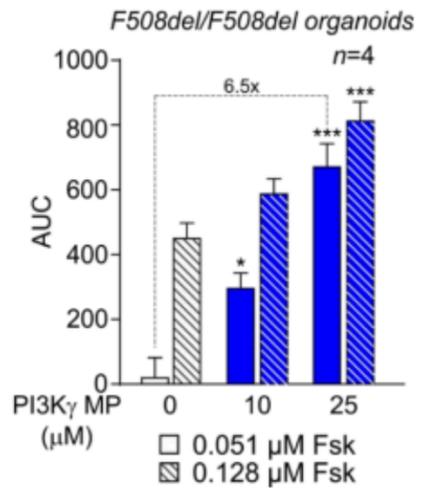
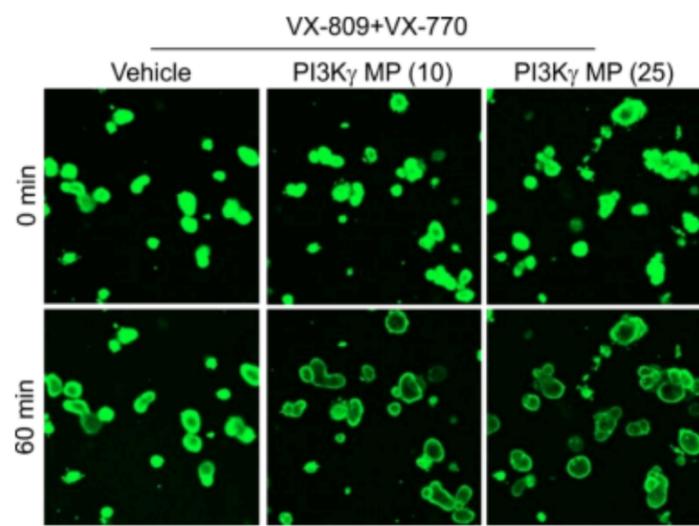
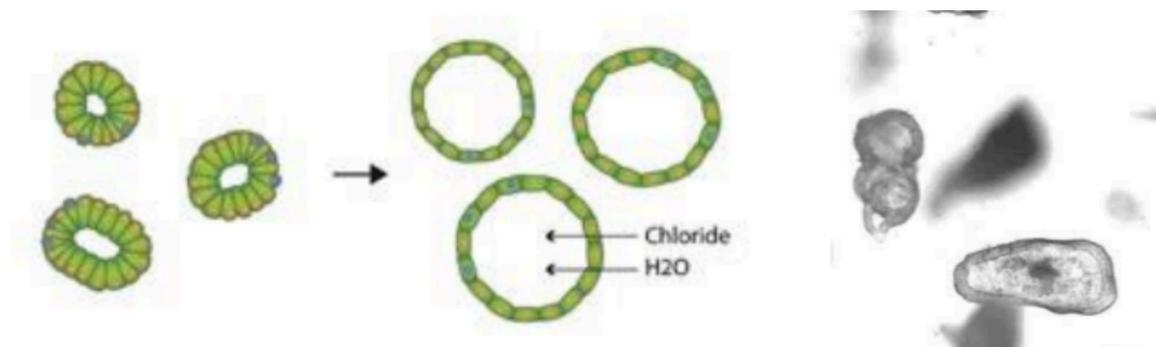


**Quenching Fluorescence 2min**

# Il PI3K $\gamma$ MP potenzia l'effetto dei modulatori del CFTR



Approved by FDA in 2015 despite limited efficacy (<4% lung function improvement)



# 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

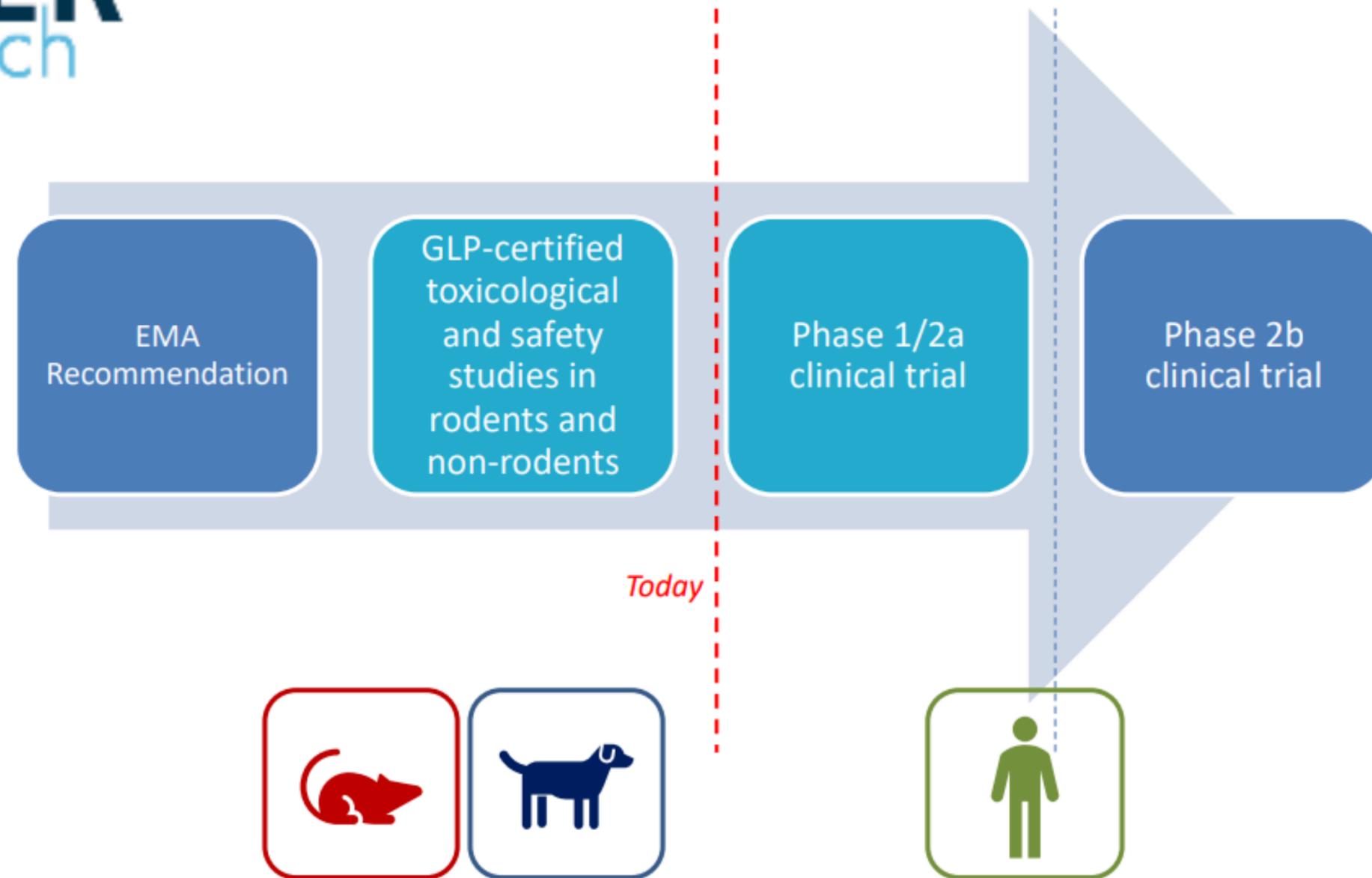
- "Scientific Advice" obtained from EMA for preclinical development (Oct. 2018)



Scientific Advice  
from EMA



# Prospettive future



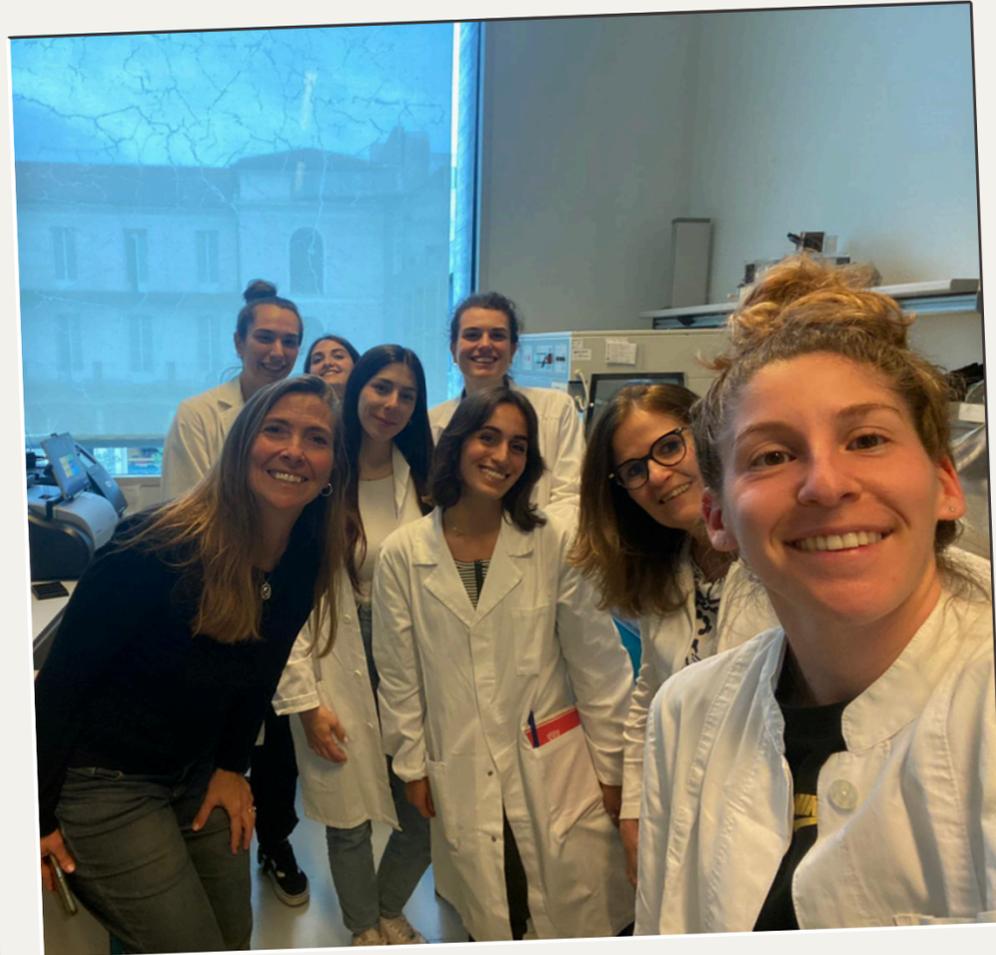
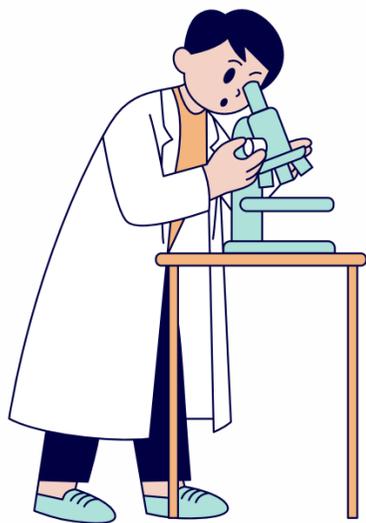
# Ma la ricerca non si ferma...

---



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!**

