

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 227**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015** **PCT/IB2015/059880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016** **WO16103176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015** **E 15830858 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3236983**

54 Título: **Péptido inhibidor de gamma PI3K novedoso para el tratamiento de enfermedades del sistema respiratorio**

30 Prioridad:

24.12.2014 IT TO20141105

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.01.2020

73 Titular/es:

KITHER BIOTECH S.R.L. (100.0%)

Via Nizza, 52

10126 Torino, IT

72 Inventor/es:

HIRSCH, EMILIO y

GHIGO, ALESSANDRA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 737 227 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido inhibidor de gamma PI3K novedoso para el tratamiento de enfermedades del sistema respiratorio

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a un inhibidor peptídico novedoso de PI3Ky para el tratamiento de patologías del aparato respiratorio.

Antecedentes de la invención

El asma es una enfermedad respiratoria crónica caracterizada por inflamación, hiperreactividad de las vías respiratorias (HRVR) y edema mucoso, que juntos dan lugar a broncoconstricción episódica y obstrucción de las vías respiratorias. La eficacia de los tratamientos anti-asmáticos actuales no es satisfactoria y el asma se mantiene como un problema global no resuelto.

El tono de la musculatura de las vías respiratorias se determina por un delicado equilibrio entre la activación de las rutas de señalización procontráctil y de pro-relajación en las células del músculo liso. La contracción se activa principalmente por la acetilcolina, el neurotransmisor parasimpático principal en las vías aéreas, que activa los receptores muscarínicos M3, dando lugar a la movilización de calcio (Ca^{2+}) intracelular y extracelular. Por el contrario, la relajación de las vías respiratorias se logra por la activación mediada por catecolamina de los receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR), que promueve la producción de AMP cíclico (AMPc) y la consecuente modulación de efectores clave de la homeostasia del Ca^{2+} . De acuerdo con la acción pro-relajante del AMPc, los agonistas de los β_2 -AR proporcionan alivio sintomático de los broncoespasmos en pacientes con asma. Sin embargo, su eficacia es limitada en el tiempo, principalmente debido a la desnaturalización de los β_2 -AR que se produce después de la exposición repetida a los agonistas. De forma similar, se ha ensayado clínicamente la inhibición de la degradación del AMPc por los inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), las enzimas principales responsables de la hidrólisis de AMPc en las vías respiratorias, pero muestra efectos secundarios inaceptables, tales como vómitos, náuseas, diarrea y pérdida de peso, debido a la inhibición no selectiva de PDE4 en el sistema nervioso central.

Por lo tanto, la identificación de nuevas enzimas que regulen la homeostasis del AMPc, así como estrategias novedosas para la manipulación de la ruta de transducción de señales β_2 -AR/AMPc en las células de músculo liso es deseable para tratar enfermedades respiratorias. Además, también podría usarse el mismo enfoque para fines terapéuticos en otros contextos patológicos, tales como fibrosis quística, donde es necesario aumentar los niveles de AMPc en las células epiteliales de las vías aéreas.

En el epitelio respiratorio, la producción de AMPc en corriente abajo de β_2 -AR es necesaria para asegurar la apertura del canal de cloruro dependiente de AMPc (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Las mutaciones en el gen que codifica para esta proteína son la causa principal de fibrosis quística (FQ). Entre estos, la delección de fenilalanina 508 (ΔF508) constituye la alteración más común en los pacientes de FQ y da lugar a defectos tanto en la expresión de membrana como en la apertura del canal. Se han desarrollado diversos fármacos correctores y potenciadores de CFTR, que rescatan la expresión de membrana y la apertura mediada por AMPc del canal, respectivamente, pero su eficacia es insatisfactoria. En particular, los potenciadores de CFTR requieren altas concentraciones de AMPc intracelular para ser eficaces. Por lo tanto, los fármacos que sean capaces de estimular los niveles de AMPc pueden constituir estrategias novedosas para aumentar la eficacia de los tratamientos actualmente disponibles o para corregir directamente los defectos funcionales del CFTR en la FQ.

Estudios previos han demostrado que la fosfoinositida 3-quinasa γ (PI3Ky) controla la compartimentalización del AMPc corriente abajo de β_2 -AR. En los cardiomiocitos, la PI3Ky actúa como una proteína de anclaje (AKAP) (1), que une la proteína quinasa A (PKA) a varias isoformas de PDE3 y PDE4. La PKA asociada a PI3Ky a su vez fosforila y promueve la activación de las PDE y la consecuente reducción de AMPc corriente abajo de los β_2 -AR, limitando en última instancia la liberación arritmogénica de Ca^{2+} (2). Aunque se han desarrollado varios inhibidores de la actividad quinasa de PI3Ky, actualmente no hay procedimientos para interferir selectivamente con la actividad de proteína adaptadora o de anclaje de PI3Ky.

Sumario de la invención

Teniendo en mente estas premisas, Hay por lo tanto una necesidad de soluciones mejoradas y más eficaces para tratar enfermedades del sistema respiratorio en comparación con las terapias conocidas.

De acuerdo con la invención, el objeto anteriormente mencionado se logra gracias a la solución específicamente mencionada en las reivindicaciones adjuntas, que constituyen una parte integral de la presente descripción.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a un péptido de fusión que comprende:

- i) una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 1 o un homólogo relacionado que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene la capacidad de la secuencia SEQ ID

NO: 1 de inhibir la función independiente de quinasas de PI3K γ y

ii) un péptido que tiene la capacidad de penetrar en una célula, para su uso como un medicamento, en particular para tratar enfermedades respiratorias.

Una realización diferente de la presente invención se refiere a un producto que comprende i) un péptido de fusión como se define anteriormente y ii) un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y/o un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), como una preparación combinada para su uso secuencial, simultáneo o separado para tratar enfermedades respiratorias, preferentemente fibrosis quística.

La presente descripción proporciona evidencia experimental *in vitro* e *in vivo* de la efectividad de tratar patologías del sistema respiratorio por medio de la administración de un péptido de fusión que comprende los restos 126-150 de la PI3K γ humana (SEQ ID NO: 1) o sus homólogos. El péptido de fusión de la presente descripción es, de hecho, capaz de inhibir la interacción entre PKA y PI3K γ y en consecuencia reducir la actividad de las PDE asociadas a PI3K γ , aumentar los niveles de AMPc y reducir la entrada de Ca²⁺ a través de canales de calcio accionados por voltaje (VOCC, del inglés *voltage-operated calcium channels*). Adicionalmente, el péptido de fusión descrito en el presente documento aumenta los niveles de AMPc *in vivo* en las vías respiratorias y funciona como un broncodilatador cuando se administra por vía intra-traqueal a ratones sanos y asmáticos. Por último, el péptido de fusión lleva a cabo la función de potenciador de CFTR, aumentando el AMPc y de esta manera mejorando la conductancia a cloruro (Cl⁻) de CFTR en las líneas de células epiteliales de los bronquios que expresan un CFTR de tipo silvestre o uno mutante $\Delta F508$, que es la mutación más frecuente en pacientes con fibrosis quística.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora en detalle, puramente a modo de ilustración y como ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- **Figura 1. Un péptido Troyano derivado de PI3K γ inhibe la actividad de PDE y mejora la señalización β_2 -AR/AMPc en células de músculo liso de las vías respiratorias.** A) Representación esquemática del péptido inhibidor de PI3K γ permeable a las membranas celulares. La región 126-150 de PI3K γ humana se fusionó a la secuencia de Penetratina 1 de *Antennapedia*. B) Localización intracelular del péptido Troyano inhibidor de PI3K γ . Las hBSMC se incubaron con el péptido marcado con fluoresceína (FITC, 50 μ M) y la fluorescencia intracelular se analizó después de 30 minutos desde el principio del tratamiento. Se presentan la tinción de actina filamentos (paneles izquierdos) y la fluorescencia FITC (paneles centrales) con respecto al aumento (paneles derechos). C) Actividad fosfodiesterasa precipitada por anticuerpos anti-PDE4B y anti-PDE4D en células de músculo liso de tráquea aisladas de animales PI3K $\gamma^{+/+}$ y PI3K $\gamma^{-/-}$ y tratadas con vehículo o bien el péptido Troyano inhibidor de PI3K γ (50 μ M, 30 minutos; $n \geq 4$ experimentos independientes). D) Las hBSMC se transfectaron con la sonda FRET para AMPc, ICUE3 y se pre-trataron con cualquiera de vehículo, péptido inhibidor de PI3K γ o péptido control Penetratina 1 (50 μ M, 30 minutos) antes de la activación de β_2 -AR con isoproterenol (ISO; 100 nM) y el antagonista selectivo de β_1 -AR, CGP-20712A (CGP, 100 nM). Se presentan trazas FRET representativas de $n \geq 3$ experimentos independientes. E) Cambio máximo en la señal FRET (%) de las curvas como se mide en D. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni.
- **Figura 2. El péptido Troyano inhibidor de PI3K γ inhibe la entrada de calcio a través del canal de tipo L en las células de músculo liso humanas de las vías respiratorias.** A) Trazas representativas de Ca²⁺ efímeras registradas en hBSMC pre-tratadas con vehículo. El péptido Troyano inhibidor de PI3K γ o el péptido control P1 (50 μ M, 30 minutos) antes de la estimulación con el agonista muscarínico carbacol (Carb, 10 μ M, panel superior) y una solución despolarizante (KCl 40 mM, panel inferior). B) Cambio máximo de la relación de fluorescencia del indicador INDO-1 (A) del Ca²⁺ efímero mostrado en A. C) Fosforilación dependiente de AMPc de la subunidad Ca_v1.2 (Ser-1928) del canal de calcio de tipo L (LTCC, del inglés *L-type calcium channel*) en hBSMC tratadas con el péptido Troyano inhibidor de PI3K γ o el péptido control P1 (50 μ M, 30 minutos). Se muestran imágenes representativas y la cuantificación relativa de $n \geq 3$ experimentos independientes de transferencia Western. **P < 0,01 y ***P < 0,001 por un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni.
- **Figura 3. El péptido Troyano inhibidor de PI3K γ aumenta los niveles de AMPc en las vías respiratorias *in vivo* y atenúa la hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones sanos y asmáticos.** A) El péptido Troyano inhibidor de PI3K γ se marcó con FITC y se administró a través de la vía intra-traqueal a ratones de la cepa BALB/c (1,5 μ g/ratón). La fluorescencia en el pulmón y la tráquea se analizó por microscopio confocal 30 minutos después del tratamiento. Los ratones control se instalaron con un volumen igual de solución usada para el marcaje FITC. Se presentan imágenes de fluorescencia FITC de secciones de tráquea, pulmones, cerebro y miocardio de animales tratados con vehículo (paneles superiores) o con el péptido Troyano inhibidor de PI3K γ (paneles inferiores). B) Niveles de AMPc en la tráquea entera (panel izquierdo) y los pulmones (panel derecho) de ratones tratados como se describe en A. *P < 0,05 y **P < 0,01 por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni. C) La hiperreactividad de las vías respiratorias se midió como resistencia promedio del pulmón en ratones sanos, anestesiados y ventilados, tratados con un pulverizador de vehículo, de péptido Troyano inhibidor de PI3K γ (1,5 μ g) o de péptido control P1 (cantidad equimolar) antes de la exposición a dosis en aumento de metacolina. *P < 0,05 y **P < 0,01 en comparación con el vehículo; #P < 0,05 frente a P1 por un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni. D) La hiperreactividad de las vías respiratorias se midió como un cambio

en el volumen corriente en ratones asmáticos, anestesiados y ventilados, en respuesta a metacolina (500 mg/kg, administrado intravenosamente). Los animales sensibilizados a ovoalbúmina se trataron con vehículo, el péptido Troyano inhibidor de PI3Ky (150 µg) o péptido control P1 (cantidad equimolar) durante 30 minutos antes de administrar metacolina. **P < 0,01 frente al vehículo y el péptido control; ####P < 0,001 frente al valor de referencia usando un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni.

- **Figura 4. El péptido Troyano derivado de PI3Ky aumenta la fosforilación dependiente de AMPc y la conductancia a cloruro del CFTR de tipo silvestre.** A) Fosforilación mediada por AMPc de CFTR en células epiteliales de las vías respiratorias (NuLi-1) tratadas con vehículo (carril 1), péptido control P1 (25 µM, carril 2), péptido Troyano inhibidor de PI3Ky (25 µM, carril 3), inhibidor de PDE4 Rolipram solo (PDE4i; 10 µM, carril 4) o junto con el péptido Troyano inhibidor de PI3Ky (carril 5) durante 30 minutos. Se muestran imágenes representativas de detección por Transferencia Western de inmunoprecipitaciones y fosforilación por PKA de CFTR de n ≥ 3 experimentos independientes. B) Traza representativa de corrientes de CFTR medidas en cámaras de Ussing en cultivos de células NuLi-1. Los siguientes tratamientos se aplicaron en los tiempos indicados: amilorida (inhibidor del canal ENAC, 10 µM), péptido control P1 (30 µM), concentraciones en aumento del péptido Troyano derivado de PI3Ky (10 µM, 20 µM y 30 µM), inhibidor de PDE4 Rolipram (PDE4i; 10 µM), forskolina (FSK, 10 µM) e inhibidor 172 de CFTR (CFTRI; 20 µM).
- **Figura 5. El péptido Troyano derivado de PI3Ky aumenta la conductancia del CFTR en las células epiteliales de las vías respiratorias con la mutación ΔF508.** A) Traza representativa de corrientes de CFTR medidas en cámaras de Ussing en cultivos de células epiteliales de las vías respiratorias con la mutación ΔF508 (CuFi-1), tratadas con el corrector VX-809 (20 µM; 24 horas). Los siguientes tratamientos se aplicaron en los tiempos indicados: amilorida (inhibidor del canal ENAC, 10 µM), potenciador de CFTR VX-770 (10 µM), péptido control P1 (10 µM), péptido Troyano inhibidor de PI3Ky (10 µM), forskolina (FSK, 10 µM) e inhibidor 172 de CFTR (CFTRI; 20 µM). B) Variaciones de la corriente promedio en respuesta a los tratamientos indicados. **P < 0,01 por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni.
- **Figura 6. Secuencias de polipéptidos penetrantes adecuados para producir péptidos de fusión de la presente descripción.**
- **Figura 7. El péptido Troyano derivado de PI3Ky reduce la inflamación pulmonar en ratones asmáticos.** A) Imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina (imágenes superiores) y ácido peryódico-reactivo de Schiff (imágenes inferiores) de secciones de pulmón de ratones sin tratamiento previo con el péptido Troyano derivado de PI3Ky (25 µg/ratón/inyección) o con péptido control P1 (cantidades equimolares), antes de cada administración intranasal de ovoalbúmina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para analizar la morfología tisular y el nivel de inflamación y con ácido peryódico-reactivo de Schiff para determinar la presencia de células calcificiformes. B) Análisis semi-cuantitativo del grado de inflamación peribronquial en secciones de pulmón como se muestran en A). C) Porcentaje de células epiteliales positivas a la tinción con ácido peryódico-reactivo de Schiff en el epitelio de secciones de pulmón como se muestran en A). D-G) Número de neutrófilos (D), macrófagos (E), linfocitos (F) y eosinófilos (G) en el lavado broncoalveolar de ratones pre-tratados con el péptido Troyano derivado de PI3Ky o el péptido control P1 como se describe en A). *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni.

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora en detalle, puramente a modo de ilustración y como ejemplo no limitante, con referencia al dibujo único en el que se representa esquemáticamente un sistema de extracción usable a presión para los fines de implementar el procedimiento descrito en el presente documento.

En la siguiente descripción, se presentan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión exhaustiva de las realizaciones. Las realizaciones pueden implementarse en la práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran ni se describen estructuras, materiales u operaciones bien conocidas en detalle para evitar oscurecer ciertos aspectos de las realizaciones.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, la referencia a "una realización" o "realización" significa que un rasgo, estructura o característica específicos descritos en conexión con la realización se incluyen en al menos una realización. Por lo tanto, la aparición de las expresiones "en una determinada realización" o "en una realización" en diversos lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización. Adicionalmente, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los títulos usados en el presente documento sirven meramente por conveniencia y no interpretan el objeto o significado de las realizaciones.

Una realización preferida de la presente descripción se refiere a un péptido de fusión que comprende: i) una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 1 o un homólogo relacionado que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene la capacidad de la secuencia SEQ ID NO: 1 de inhibir la función independiente de quinasa de PI3Ky y ii) un péptido que tiene la capacidad de penetrar en una célula, para su uso como un medicamento, en particular para tratar enfermedades respiratorias.

Una realización diferente de la presente invención se refiere a un producto que comprende i) un péptido de fusión como se define anteriormente y ii) un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística y/o un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), como una preparación combinada para su uso secuencial, simultáneo o separado para tratar enfermedades respiratorias, preferentemente fibrosis quística.

El uso de un producto que comprende un péptido de fusión como se define anteriormente, un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) como una preparación para su uso secuencial, simultáneo o separado es particularmente adecuado para tratar pacientes con fibrosis quística que llevan la mutación $\Delta F508$ del CFTR.

La presente descripción se refiere a la producción y las aplicaciones terapéuticas de un péptido de fusión permeable a las membranas celulares, que inhibe la interacción entre PI3K γ y el activador de PDE, PKA. El péptido de fusión de la presente descripción reduce la actividad de PDE específica, mejorando la señalización de la ruta de transducción de señales β_2 -AR/AMPC y produciendo efectos pro-relajantes mediados por AMPC, tanto en células de músculo liso de las vías respiratorias como *in vivo*, en un modelo preclínico de asma alérgica. Adicionalmente, el péptido de fusión con actividad inhibitoria de PI3K γ mejora la misma ruta de transducción de señales en células epiteliales del tracto respiratorio y estimula la apertura dependiente de AMPC del canal de CFTR de tipo silvestre (cuyas secuencias de aminoácidos y nucleótidos están disponibles en la base de datos de secuencias de GenBank como números de referencia NM_000492.3 y NP_000483.3, respectivamente) y del CFTR con la mutación $\Delta F508$ (la secuencia de esta mutación está disponible en la base de datos de secuencias de GenBank como número de referencia S64640.1), que es la causa principal de la fibrosis quística.

En general, los resultados mostrados en el presente documento demuestran la posibilidad del uso del péptido de fusión u homólogos del mismo, que tiene la capacidad de inhibir PI3K γ , como una terapia local por inhalación, para tratar enfermedades respiratorias tales como asma alérgica y fibrosis quística.

Aunque en la última década se han desarrollado numerosos inhibidores de la actividad quinasa de PI3K γ , muchos de los cuales están actualmente en desarrollo clínico para tratar enfermedades neoplásicas, no hay procedimientos que permitan la interferencia selectiva con la actividad independiente de quinasa, o mejor dicho con la proteína de anclaje a PKA o AKAP, de la enzima.

Se ha mostrado previamente que un péptido que comprende el sitio de unión de PI3K γ a PKA, que consiste en los restos 126-150 de la PI3K γ humana, desplaza la interacción entre las dos proteínas y reduce la actividad de PDE unido a PI3K γ , PDE3B, en estudios de interacción *in vitro* (1).

La presente descripción muestra, de una manera completamente inesperada, que el péptido 126-150 PI3K γ (SEQ ID NO: 1 - KATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAF) conjugado a un péptido permeable a las membranas celulares, tales como, por ejemplo, la Penetratina 1 de *Antennapedia* (SEQ ID NO: 3) (3), puede usarse como un inhibidor de la función independiente de quinasa de PI3K γ *in vivo*. El péptido de fusión inhibitorio de PI3K γ penetra en las células de músculo liso de las vías respiratorias y mejora la ruta de señalización β_2 -AR/AMPC. En particular, los datos muestran que el péptido de fusión aumenta los niveles de AMPC y limita la hiperreactividad en un modelo preclínico de asma alérgica y que alcanza eficientemente el tracto respiratorio inferior cuando se administra localmente por la vía intra-traqueal. Estos datos por lo tanto demuestran el uso clínico de un péptido de fusión inhibitorio de PI3K γ en terapia de aerosol para tratar enfermedades respiratorias.

La terapia de inhalación actual para las enfermedades bronco-obstructivas se basa en el uso de agonistas de β_2 -AR, tales como salbutamol y formoterol y de inhibidores de PDE4, tales como Roflumilast, que se aprobó recientemente para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Aunque el tratamiento agudo con agonistas de β -AR produce evidentes beneficios clínicos, la exposición crónica o repetida a estos fármacos puede dar como resultado una reducción significativa y/o una pérdida completa de su eficacia en pacientes con asma, debido a la desensibilización dependiente de agonista de los β -AR de membrana.

La presente descripción proporciona una solución a este problema y propone el uso de un péptido inhibitorio que afecte a la actividad de la enzima PI3K γ y, como tal, no actúe directamente en la estimulación de β_2 -AR, sino que potencie la cascada de los eventos de señalización corriente abajo. De esta forma, un péptido inhibitorio de PI3K γ ofrece la única oportunidad de modular los dominios de β_2 -AR dependientes de AMPC, asegurando efectos bronco-relajantes similares a aquellos mediados por agonistas de β_2 -AR, sin inducir la inactivación del receptor.

Los datos proporcionados en el presente documento demuestran que la inhibición de la función de anclaje de PK de PI3K γ solamente reduce la actividad de PDE en células que expresan PI3K γ (PI3K $\gamma^{+/+}$), pero no en células que carecen de la enzima (PI3K $\gamma^{-/-}$), indicando de esta manera que el péptido de fusión de la presente descripción inhibe las PDE reguladas exclusivamente por PI3K γ .

El péptido inhibitorio de PI3K γ por lo tanto representa una herramienta única que asegura la inhibición selectiva de isoforma de las PDE y permite limitar los efectos secundarios mayores que están asociados a los inhibidores no selectivos de PDE4, tales como Roflumilast, que surgen principalmente de la inhibición de isoformas que no se

expresan en el sistema respiratorio.

Aunque los inhibidores de las células PDE4 se caracterizan por importantes efectos pro-relajantes en células aisladas, no son broncodilatadores óptimos *in vivo*, donde ejercen principalmente funciones antiinflamatorias.

5 Los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que el péptido de fusión con la capacidad de inhibir la función independiente de quinasa de PI3K γ , objeto de la presente descripción, tiene una fuerte función broncodilatadora *in vivo*, en animales sanos y en un modelo pre-clínico de asma alérgica. Estos efectos pueden explicarse por la capacidad del péptido de interferir con la actividad catalítica de múltiples isoformas de PDE, no incluyendo solamente PDE4, sino también PDE3.

10 De acuerdo con la presente invención, se ha demostrado que la inhibición de PDE3 y PDE4 puede ser aditiva o sinérgica. En particular, los inhibidores de PDE3 y PDE4 son ineficaces si se usan solos, pero actúan sinérgicamente inhibiendo la contracción del músculo liso. Por lo tanto, la inhibición de la actividad independiente de quinasa de PI3K γ proporciona una herramienta única para inhibir simultáneamente isoformas específicas de PDE3 y PDE4, en particular aquellas críticamente implicadas en la regulación de la contractilidad del músculo liso bronquial.

15 Ya que PDE3 y PDE4 no solamente se expresan en las vías respiratorias, sino también en el miocardio y el sistema nervioso central, la inhibición sistémica de isoenzimas seleccionadas cuidadosamente puede provocar efectos secundarios mayores. En particular, la inhibición de PDE3 y PDE4 *in vivo* puede tener efectos pro-arritmogénicos, pro-eméticos y pro-anorexigénicos.

20 La presente descripción muestra que el péptido de fusión que tiene la capacidad de inhibir la actividad independiente de quinasa de PI3K γ es terapéuticamente eficaz y que una formulación en aerosol del péptido inhibitorio de PI3K γ se distribuye eficientemente en el tracto respiratorio inferior. Adicionalmente, el uso de una molécula peptídica proporciona un perfil de efecto terapéutico/efecto secundario más amplio en comparación con moléculas pequeñas, tales como inhibidores de PDE, que pueden difundir rápidamente a otros tejidos fuera del sistema respiratorio.

25 Los datos proporcionados en el presente documento demuestran que una versión fluorescente del péptido inhibitorio de PI3K γ se acumula en la tráquea y los pulmones después de la administración intra-traqueal, sin alcanzar el miocardio y el cerebro.

30 Basándose en estos datos, es por lo tanto posible concluir que una terapia de inhalación basada en un péptido, permeable a membranas celulares, que inhibe selectivamente la actividad independiente de quinasa de la enzima PI3K γ , es altamente eficaz. Este enfoque terapéutico puede usarse para tratar diferentes enfermedades respiratorias, desde asma hasta fibrosis quística, donde son necesarios agentes capaces de aumentar el AMPc intracelular corriente abajo de los β_2 -AR.

Los resultados presentados en el presente documento demuestran que el péptido inhibitorio de PI3K γ no solamente aumenta los niveles de AMPc en el músculo liso, sino también en el compartimento epitelial de las vías respiratorias, abriendo de esta manera la posibilidad de explotar este compuesto para estimular también la apertura mediada por AMPc del canal de CFTR, que es defectuoso en pacientes con fibrosis quística.

35 Los datos proporcionados en el presente documento también muestran que la inhibición de PI3K γ actúa sinérgicamente con un potenciador de CFTR conocido clínicamente avanzado, VX-770, aumentando la conductancia de una de las formas mutadas más comunes del CFTR en fibrosis quística. Estos datos demuestran, por primera vez, la capacidad de una molécula inhibitoria de PI3K γ de aumentar la actividad de un potenciador de CFTR conocido, VX-770, que se sabe que estimula la conductancia de diferentes formas mutantes de CFTR, con la excepción del mutante más común en la fibrosis quística, $\Delta F508$.

40 El péptido de fusión de la presente descripción puede usarse por lo tanto en combinación con un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y/o un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), como una preparación combinada para su uso secuencial, simultáneo o separado en el tratamiento de enfermedades respiratorias caracterizadas por una apertura mediada por AMPc defectuosa del CFTR, tales como en pacientes con fibrosis quística.

45 El uso combinado de un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), junto con el péptido de fusión de la presente descripción, es particularmente adecuado para el tratamiento de pacientes de fibrosis quística que llevan la mutación $\Delta F508$ de CFTR, a quienes la administración de un corrector de CFTR es necesaria para permitir la expresión del CFTR mutante en la membrana.

50 Los potenciadores del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), que pueden usarse ventajosamente en combinación con el péptido de fusión de la presente descripción son, por ejemplo: Ivacaftor o VX-770 (N-(2,4-Di-*terc*-butil-5-hidroxifenil)-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxamida) y VX-532 (4-Metil-2-(5-fenil-1H-pirazol-3-il)-fenol).

55 Los correctores del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), que pueden usarse

ventajosamente en combinación con el péptido de fusión de la presente descripción y con un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) son por ejemplo: VX-809 (ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclo-propancarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico) y VX-661 ((R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2 metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropancarboxamida).

En general, este estudio demuestra el potencial terapéutico de un péptido de fusión que inhibe selectivamente la actividad independiente de quinasa de PI3K γ .

La molécula puede usarse para tratar enfermedades respiratorias, incluyendo asma alérgica, donde los fármacos diseñados para aumentar niveles intracelulares de AMPc y para promover la relajación del músculo liso bronquial son altamente deseables.

Además, este compuesto puede aplicarse a pacientes con fibrosis quística donde los agentes que elevan las concentraciones de AMPc son herramientas clave para estimular la apertura mediada por AMPc del CFTR defectuoso.

Adicionalmente, la inhibición mediada por péptidos de PI3K γ puede aplicarse a todas las afecciones patológicas caracterizadas por un CFTR hipo-funcional, incluyendo EPOC, donde se ha demostrado que la exposición al humo de los cigarrillos altera la actividad del CFTR.

Por último, a través del bloqueo funcional de PDE4, el péptido de fusión de la presente descripción que tiene la capacidad de inhibir PI3K γ es capaz de ejercer importantes acciones antiinflamatorias. La evidencia experimental informada en el presente documento demuestra que de hecho el péptido limita la inflamación peribronquial asociada a asma alérgica. Es por lo tanto evidente que inhibir la actividad independiente de quinasa de PI3K γ puede proporcionar múltiples beneficios terapéuticos en el tratamiento de enfermedades respiratorias, actuando al mismo tiempo que un broncodilatador, un potenciador de CFTR y un agente antiinflamatorio.

A continuación, la invención se describirá en detalle, a modo de ejemplo no limitante, con referencia a un péptido de fusión que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "péptido Troyano derivado de PI3K γ "), que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y un péptido que penetra la célula que corresponde a la Penetratina 1 de *Antennapedia* (SEQ ID NO: 3, descrito en (3)).

Está claro que el ámbito de la presente descripción no está de ninguna manera limitado a la secuencia específica del péptido de fusión de SEQ ID NO: 2, ya que el péptido de fusión de la presente descripción puede comprender i) secuencias que tienen una homología con SEQ ID NO: 1 de al menos el 90 y que tiene la capacidad de SEQ ID NO: 1 de inhibir la función independiente de quinasa de PI3K γ y ii) secuencias de un péptido que penetra en la célula, por ejemplo, seleccionadas del polipéptido HIV-TAT, péptidos del homeodominio de *Antennapedia*, también conocidos como péptidos penetrantes o pAntp, péptido R7, péptido KALA, buforina 2, MAP, transportan, transportan 10, pVEC o péptido MPG. Las secuencias que corresponden a los polipéptidos que penetran las células mencionados anteriormente se muestran en la Figura 6 y se especifican en SEQ ID NO: 3 a 12.

Además, en la producción del péptido Troyano derivado de PI3K γ , el péptido que tiene la capacidad de penetrar en la célula se fusionó al N terminal de SEQ ID NO: 1. Es, sin embargo, posible producir un péptido de fusión que caiga dentro del ámbito de la presente descripción creando una fusión del péptido que tiene la capacidad de penetrar en la célula en el C terminal de la SEQ ID NO: 1.

Materiales y procedimientos

Determinación de la capacidad de un péptido homólogo a SEQ ID NO: 1 de inhibir la función independiente de quinasa de PI3K γ

Para determinar la capacidad de un péptido homólogo, que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, para inhibir la función de AKAP de PI3K γ , se usó un ensayo de competición previamente descrito (1). El péptido homólogo se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración final de 50 μ M o 250 μ M. Se transfectaron células HEK293 (Número ATCC: CRL-1573™), usando el procedimiento del fosfato cálcico, con una construcción fabricada del vector de expresión pcDNA3.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.; código de producto V790-20), en el cual se clonó ADNc de PI3K γ humana (SEQ ID NO: 13) usando las enzimas de restricción BamHI y XbaI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La construcción pcDNA3.1-PI3K γ está libremente disponible del Dr. Emilio Hirsch en la Universidad de Turin, Turin, ITALIA.

48 horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón de lisis frío que contenía 120 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), inhibidores de proteasa completos (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e inhibidores de fosfatasa (50 mmol/l de fluoruro sódico, 1 mmol/l de ortovanadato sódico y 10 mmol/l de pirofosfato sódico). Después de 30 min de incubación en hielo, los lisados se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se incubó con el péptido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la subunidad reguladora de la PKA (PKA RII) se inmunoprecipitó por incubación del extracto proteico con 30 μ l de una mezcla 1:1 de Proteína A y Sepharose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, RU) y un anticuerpo C20 anti-PKA RII (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, EE.UU.; código de producto: sc-908) durante 2 h a 4 °C, con

agitación. Los complejos inmunológicos se lavaron extensivamente con tampón de lisis y la asociación de PI3Ky con PKA RII se analizó por análisis de transferencia Western usando un anticuerpo anti-PI3Ky monoclonal (libremente disponible del Dr. Emilio Hirsch en la Universidad de Turin, Turin, Italia).

Animales

- 5 Se generaron ratones con genes inactivados para PI3Ky (PI3Ky^{-/-}) y ratones con inserción génica que expresan una forma catalíticamente inactiva de PI3Ky (PI3Ky^{KD/KD}) como se ha descrito previamente (4, 5). Los ratones mutantes se cruzaron con animales de un fondo genético C57Bl/6J durante 15 generaciones y se usaron ratones C57Bl/6J como controles (PI3Ky^{+/+}). Para estudios de la hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones asmáticos y sanos, se usaron ratones hembra BALB/C. Para todos los experimentos, se usaron animales entre las edades de 8 y 12 semanas. Los ratones se mantuvieron en grupos, con acceso libre a comida (dieta convencional) y agua, en un sistema controlado que proporciona un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se usaron de acuerdo con las directrices y las regulaciones institucionales del bienestar animal, aprobadas por el *Animal Ethics Committee* local.

Cultivo celular y transfección

- 15 Se obtuvieron células de músculo liso bronquial humano (hBSMC) de Lonza (CC-2576, Lonza Walkersville, Inc. EE.UU.), se hicieron crecer en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA) y se suplementaron con suero bovino fetal al 10 % (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) y penicilina/estreptomicina 5 mM (Gibco, Carlsbad, CA). Se usaron células hasta el pasaje 15 para los experimentos.

- 20 Las células de músculo liso bronquial humano (hBSMC) se transfectaron con un plásmido que codifica la sonda FRET para AMPc, ICUE3 (descrita en la patente de EE.UU. US 8236523 B2) (2), por electroporación con un dispositivo Nucleofector (AMAXA, Gaithersburg, MD), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, 1×10^6 células se resuspendieron en 100 μ l de solución de nucleofección (VPI-1004, AMAXA, Gaithersburg, MD), mezclada con 1 μ g de pcDNA3-ICUE3 (descrito en la patente de EE.UU. US 8236523 B2) y se sometió a electroporación en un aparato de nucleofección de Amaxa Biosystems (Programa A-033). Los experimentos de formación de imagen de células vivas se realizaron 24 horas después de la transfección.

- 25 Se obtuvieron las líneas de células epiteliales de las vías respiratorias humanas que expresan un CFTR de tipo silvestre (NuLi-1) o con la mutación $\Delta F508$ (CuFi-1) de ATCC (código de producto de NuLi-1: ATCC® CRL-4011™; código de producto de CuFi-1: ATCC® CRL-4013™). Las células se cultivaron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 30 μ g/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 300 μ g/ml de higromicina B (Gibco, Carlsbad, CA).

Extracción e inmunoprecipitación de proteínas

- 35 Para la extracción de proteínas de células de músculo liso traqueal murinas (mTSMC) y células de músculo liso bronquial humanas (hBSMC), las células se trataron con los fármacos/péptidos indicados e inmediatamente se lisaron en tampón de lisis frío que contiene 120 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), inhibidores de proteasa completos (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) e inhibidores de fosfatasa (50 mmol/l de fluoruro sódico, 1 mmol/l de ortovanadato sódico y 10 mmol/l de pirofosfato sódico). Después de 30 min de incubación en hielo, los lisados se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C y se usaron para transferencia Western o bien se sometieron a inmunoprecipitación y mediciones de actividad fosfodiesterasa.

- 40 Para ensayos de inmunoprecipitación, se pre-incubaron extractos de proteínas con 30 μ l de una mezcla 1:1 de proteína A o G y sepharose (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, RU) y posteriormente se incubaron con 20 μ l de una mezcla 1:1 de proteína A o G y sepharose y 1 mg de anticuerpo primario para cada mg de proteína, durante 2 horas a 4 °C. Los complejos inmunes se lavaron extensivamente con tampón de lisis y se usaron para transferencia Western o se sometieron a mediciones de actividad fosfodiesterasa.

Formación de imágenes y análisis FRET

- 45 Las mediciones de niveles de AMPc se realizaron en células de músculo liso bronquial humanas (hBSMC) que expresan la sonda FRET ICUE3, como se ha descrito previamente (2). En resumen, las células se mantuvieron en una solución K+-Ringer que contiene (en mmol/l) 121,6 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 4 NaHCO₃, 0,8 NaH₂PO₄, 5 D-glucosa, 5 piruvato sódico, 10 HEPES, a pH 7,4. Los registros FRET se llevaron a cabo antes y después de añadir 100 nmol/l de isoproterenol (Iso) y 100 nmol/l de CGP-20712A (CGP), usando un sistema SP5 Leica TCS (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EE.UU.) con un láser de argón y con una lente de inmersión 63x. Para excitar CFP e YFP, se usaron las longitudes de onda de 458 y 514 nm, respectivamente. Las imágenes se adquirieron cada 4 segundos sin ninguna línea media, a una velocidad de barrido de 400 MHz y a una resolución de 512 x 512 píxeles. La eficiencia FRET se calculó usando el "Procedimiento 3" proporcionado por la aplicación Leica wizard para formación de imágenes FRET y emisión sensibilizada, de acuerdo con lo que: $E_A(i) = B/A$, donde $E_A(i)$ es la eficiencia FRET aparente; A y B son las intensidades del canal CFP y FRET, respectivamente. Para la formación de imágenes en hBSMC tratadas con péptidos, las células que expresan el indicador FRET ICUE3 se pre-incubaron con 50 μ M del péptido Troyano derivado de PI3Ky (SEQ ID NO: 2 - RQIKIWFQNRRMKWKKGKATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAF)

o el péptido control P1 (SEQ ID NO: 3 - RQIKIWFQNRRMKWKK) durante 30 minutos antes del tratamiento con Iso y CGP.

Ensayo de actividad fosfodiesterasa

La actividad fosfodiesterasa en los inmunoprecipitados se midió de acuerdo con el procedimiento en dos etapas de Thompson y Appleman, como se ha descrito previamente (2), con modificaciones menores. En resumen, los inmunoprecipitados se ensayaron en un volumen total de 200 μ l de mezcla de reacción que contiene 40 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l de $MgCl_2$, 1,4 mmol/l de 2-mercapto-etanol y 0,1 pCi de AMPc [3H] (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, RU) durante 40 min a 33 °C. Para detener la reacción, las muestras se hirvieron a 95 °C durante 3 min. El producto de reacción 5'-AMP se hidrolizó después por incubación de la mezcla con 50 μ g de veneno de serpiente de *Crotalus atrox* durante 15 min a 37 °C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La adenosina resultante se separó por cromatografía de intercambio aniónico con 400 μ l de una suspensión de resina Dowex AG1-X8 (Bio-Rad, Segrate, Milán, Italia), agua y etanol al 100 % en partes iguales. La cantidad de adenosina radiomarcada en el sobrenadante se cuantificó por recuento de centelleos (Ultima Gold liquid scintillation de Perkin Elmer, Waltham, MA).

Aislamiento de células de músculo liso traqueal de ratón

Las células de músculo liso traqueal de ratón se cultivaron a partir de explantes de tráquea usando procedimientos previamente descritos con modificaciones. La tráquea entera entre la laringe y los bronquios se retiró y se colocó en una placa Petri estéril que contenía solución salina equilibrada de Hanks a temperatura ambiente y una concentración 2x de antibiótico-antimicótico (Gibco, Carlsbad, CA, código de producto: 15240-062). Usando un microscopio de disección, se retiró el tejido circundante adicional, el segmento traqueal se dividió longitudinalmente y se cortó en cuadrados de 2-3 mm de tamaño. Todos los segmentos de una única tráquea se colocaron después con la cara interna hacia el fondo de una placa de cultivo de células estéril de 60 mm. Después de la adherencia de los explantes a la placa, se añadieron 2,5 ml de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA), suplementado con suero bovino fetal al 20 % para cubrir los explantes. Los explantes se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 95 % de aire y 5 % de CO_2 . Tres días después de colocar en placa, las concentraciones de FBS y antibiótico-antimicótico se redujeron al 10 % y 1x, respectivamente. Los segmentos traqueales se retiraron cuando las células se volvieron localmente confluentes. Una vez que la placa de 60 mm se volvió confluyente, las células se despegaron por tripsinización y se transfirieron a una placa única de 60 mm. Las células de músculo liso traqueal se subdividieron además durante varios pasajes en una relación 1:2. Más del 90 % de estas células eran células de músculo liso, como se determinó por inmunofluorescencia realizada con un anticuerpo específico para actina de músculo liso. Todos los experimentos se realizaron en células confluentes en pasaje 3.

Mediciones de calcio efímero

Las hBSMC se cargaron con el indicador de calcio Indo-1-AM (2 μ M, Invitrogen, Carlsbad, California) a 37 °C durante 40 minutos en presencia del péptido control P1, el péptido Troyano derivado de PI3K γ o vehículo. Las células se lavaron con una solución de Tyrode que contiene (en mmol/l): 5 HEPES, 154 NaCl, 4 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5,5 D-glucosa, a pH 7,35 y se colocaron en un microscopio invertido. Las células se mantuvieron en solución de Tyrode y se trataron con una solución despolarizadora de KCl que contiene (en mmol/l): 5 HEPES, 118 NaCl, 40 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 5,5 D-glucosa, a pH 7,35. El calcio efímero se analizó como la relación de señales de fluorescencia medida a 400 nm y 490 nm después de la excitación de células cargadas Indo-1-AM a 350 nm. Los experimentos se registraron y se analizaron con Igor® Software, usando las funciones añadidas por Jason Rothman (Neuromatic, www.thinkrandom.com).

Mediciones de corrientes de cloruro en la cámara de Ussing

Para medir las corrientes de cloruro en células epiteliales bronquiales humanas normales y primarias $\Delta F508$, las células se cultivaron en insertos Snapwell de 1,12 cm^2 . Los filtros se montaron en cámaras de Ussing y se aplicó un gradiente de cloruro incubando las células en un tampón alto en cloruro basolateral que contiene (en mmol/l): 140 NaCl, 5 KCl, 0,36 K_2HPO_4 , 0,44 KH_2PO_4 , 1,3 $CaCl_2$, 0,5 $MgCl_2$, 4,2 $NaHCO_3$, 10 HEPES y 10 glucosa, a pH 7,4 y un tampón bajo en cloruro apical que contiene (en mmol/l): 133,3 Na-gluconato, 5 K-gluconato, 2,5 NaCl, 0,36 K_2HPO_4 , 0,44 KH_2PO_4 , 5,7 $CaCl_2$, 0,5 $MgCl_2$, 4,2 $NaHCO_3$, 10 HEPES y 10 manitol, a pH 7,4. Los tampones se airearon con una mezcla de O_2 al 95 % y CO_2 al 5 % y la temperatura se mantuvo a 37 °C durante el experimento. Los cultivos se mantuvieron a un voltaje de 0 mV usando un EVC4000 MultiChannel V/I Clamp (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE.UU.). Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, se añadieron fármacos a tiempos específicos, mientras la corriente se registró continuamente.

Extracción y cuantificación de AMPc

Los pulmones y la tráquea se explantaron de animales después de la eutanasia, se pulverizaron en nitrógeno líquido y se usaron para extracción en frío de AMPc con ácido tricloroacético al 6 %. Las muestras se sometieron a ultrasonidos durante 10 segundos y se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Los sobrenadantes se lavaron cuatro veces con cinco volúmenes de éter dietílico saturado con agua y se liofilizaron. El contenido de AMPc se detectó con un Amersham cAMP BioTrak Enzymeimmunoassay System (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, EE.UU., código de producto: RPN225), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis de la eficiencia de transducción del péptido Troyano derivado de PI3K γ in vivo

Las hBSMC se incubaron con el péptido Troyano derivado de PI3K γ (SEQ ID NO: 2) conjugado a fluoresceína (50 μ M) o vehículo durante 30 minutos, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA) durante 10 minutos y se permeabilizaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) + Triton al 0,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron después con PBS que contenía seroalbúmina bovina al 3 % (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y faloidina-Alexa 488 (1: 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) durante 30 minutos y se montó en portaobjetos de microscopio con Reactivo ProLong® Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las imágenes de fluorescencia roja (actina) y FITC (péptido) se adquirieron con un Zeiss Observer-ZI, equipado con un módulo Apotome (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Los ratones BALB/C de tipo silvestre se inyectaron por la vía intra-traqueal con 1,5 μ g del péptido Troyano derivado de PI3K γ conjugado a fluoresceína o vehículo, en un volumen final de 70 μ l de PBS. Después de 30 minutos, los animales se anestesiaron, la tráquea y los pulmones se insuflaron con PBS, se extrajeron y se congelaron en OCT. Se obtuvieron criosecciones de 10 micrómetros con un Leica CM1850 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y la fluorescencia se adquirió con un Zeiss Observer-ZI, equipado con un módulo Apotome (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Inmunización con ovoalbúmina

Se administró ovoalbúmina (100 μ g) (OVA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), complejada con sulfato de potasio y aluminio (1 mg, alumbre) intraperitonealmente (i.p.) los días 1 y 14 e intra-nasalmente (i.n.) (50 μ g de OVA en 50 μ l de PBS) los días 14, 25, 26 y 27. Los ratones control recibieron inyecciones i.p. de alumbre e inyecciones i.n. de PBS solamente. La hiperreactividad de las vías respiratorias inducidas por metacolina inhalada se midió 24 horas después de la dosis final de OVA (Día 28).

Medición de la reactividad de las vías respiratorias

Procedimiento 1. Los ratones sensibilizados a ovoalbúmina se anestesiaron (pentobarbital sódico, 70-90 mg/kg, i.p.), se traqueotomizaron y se conectaron a un ventilador FlexiVent para animales pequeños (SCIREQ, Montreal, Quebec, Canadá). Para inducir la constricción de las vías aéreas, los ratones se expusieron a concentraciones en aumento de metacolina aerosolizada (10^{-9} a 10^{-4} M, concentración final).

Procedimiento 2: Los ratones sensibilizados a ovoalbúmina se trataron, por instilación intra-traqueal, con 70 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene vehículo o 150 μ g del péptido Troyano derivado de PI3K γ o cantidades equimolares de péptido control P1. La hiperreactividad de las vías respiratorias se valuó 30 minutos después del tratamiento de acuerdo con un protocolo previamente publicado (6). En resumen, los ratones se anestesiaron (pentobarbital sódico, 70-90 mg/kg, i.p.), se traqueotomizaron y se ventilaron con una presión inspiratoria final positiva de 10 cm de H₂O, una presión expiratoria final positiva (PEEP, por sus siglas en inglés) de 3 cm de H₂O, una velocidad respiratoria de 90 respiraciones/min en aire ambiental. La presión de apertura de las vías respiratorias (Pao), próxima al tubo endotraqueal, y la presión dentro de la cámara se midieron con transductores de presión (Special Instruments, Digima Clic; Nordlingen, Alemania). El flujo de gas se midió con un neumotacógrafo (Special Instruments, Digima Clic; Nordlingen, Alemania). El volumen tidal se calculó como la integral de la señal de flujo. Las variables de la ventilación mecánica se registraron usando el software ICU-Lab (KleisTEK Advanced Electronic Systems, Bari, Italia). La hiperreactividad de las vías respiratorias se evaluó como un cambio en el volumen tidal después del tratamiento con 500 mg/kg de metacolina administrada intravenosamente.

Análisis de la inflamación de las vías aéreas en ratones asmáticos

Se trataron ratones BALB/C de tipo silvestre, por instilación intra-traqueal, con 25 μ g del péptido Troyano derivado de PI3K γ o cantidades equimolares de péptido control P1, en un volumen final de 70 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS), antes de cada administración intra-nasal de ovoalbúmina (días 14, 25, 26 y 27 del protocolo de inmunización con ovoalbúmina). 24 horas después de la inyección final (día 28), los ratones se anestesiaron (pentobarbital sódico, 70-90 mg/kg, i.p.) y se hicieron incisiones en las tráqueas y se canularon. Las vías aéreas se lavaron con 2,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El número total de células en el lavado broncoalveolar (BAL) se determinó con un hemocitómetro Neubauer. Se centrifugó un volumen de 50 μ l de BAL se centrifugó sobre portaobjetos de vidrio de citocentrífuga a 400 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se tiñó con un sistema Diff-Quick (LabAids, Ronkonkoma, EE.UU.). Se contaron un total de 100 células por portaobjetos y se clasificaron como neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos a base del criterio morfológico. Los eritrocitos y las células epiteliales se ignoraron y los resultados se expresaron como células/ml.

Para evaluar la inflamación peribronquial, los pulmones de un grupo de animales que no se habían sometido a lavado broncoalveolar se explantaron, se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 24 horas a 4 °C y se embebieron en parafina. Los cortes que tenían 5 μ m de espesor, se desparafinaron, se tiñeron con una solución de hematoxilina eosina (Bio-Optica, Milano, Italia), se deshidrataron y se montaron con cubreobjetos de vidrio. El grado de inflamación peribronquial se clasificó como sigue: 0 - normal; 1 - pocas células inflamatorias; 3 - un anillo espeso de células inflamatorias.

Para evaluar la presencia de células caliciformes, se tiñeron cortes de pulmón con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) (Bio-Optica, Milano, Italia) y el porcentaje de células positivas PAS se calculó contando el número de células epiteliales positivas PAS y células epiteliales totales.

Anticuerpos, reactivos y plásmidos

- 5 PDE4B y PDE4D se inmunoprecipitaron como se ha descrito previamente (2), usando anticuerpos de conejo policlonales libremente disponibles del Dr. Marco Conti en la Universidad de California San Francisco, San Francisco, CA, EE.UU. Los anticuerpos comerciales específicos para PDE4B y PDE4D pueden obtenerse de Abcam (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.): código de producto de anti-PDE4B: ab14611; código de producto de anti-PDE4D: ab14614. Los anticuerpos policlonales de conejo contra Ca_v1.2 y fosfo-Ca_v1.2 están libremente disponibles del Dr. William A. Catterall en la Universidad de Washington, Seattle, WA, EE.UU.

El anticuerpo que reconoce sustratos fosforilados por PKA (sustrato P-PKA) se obtuvo de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.; código de producto: n.º 9621) y el anticuerpo contra el clon M3A7 de CFTR de Millipore (Billerica, MA, EE.UU.; código de producto: 05-583).

ICUE3-pcDNA3 se describió previamente (2).

- 15 Isoproterenol, CGP-20712A, carbachol, Rolipram, amilorida y forskolina se obtuvieron todos de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El corrector de CFTR VX-809, el potenciador de CFTR VX-770 y el inhibidor de CFTR 172 se obtuvieron de Selleckchem (Houston, TX, EE.UU.).

- El péptido control P1 (SEQ ID NO: 3 - RQIKIWFQNRRMKWKK) y el péptido Troyano derivado de PI3Ky (SEQ ID NO: 2 - RQIKIWFQNRRMKWKKGKATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAF) se sintetizaron por GenScript (Gen-Script, Piscataway, NJ, EE.UU.) y Chinapeptides (Chinapeptides Co. Ltd., Shanghai, China).

Análisis estadístico

- Se usó el software Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.) para el análisis estadístico. Los valores P se calcularon usando la prueba de la t de Student, un ANOVA de una vía o de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni, según sea apropiado. En todas las figuras, los gráficos representan el valor medio $\pm$ error estándar de al menos 3 experimentos independientes.

Resultados

Un péptido Troyano derivado de PI3Ky mejora la señalización de β_2 -AR/AMPC en células de músculo liso bronquial

- Las estrategias para aumentar los niveles de AMPc corriente abajo de los β_2 -AR en el músculo liso bronquial son de gran interés para tratar enfermedades respiratorias. Para explorar el potencial terapéutico de la inhibición de la señalización de β_2 -AR-AMPC dependiente de PI3Ky, se diseñó un inhibidor peptídico de la actividad independiente de quinasa de PI3Ky, la secuencia del cual se muestra en SEQ ID NO: 2. Un estudio previo indica que un péptido que comprende los restos 126-150 de la PI3Ky humana (SEQ ID NO: 1) inhibe el anclaje de PKA y disminuye la actividad de fosfodiesterasa 3B unida a PI3Ky *in vitro* (1). Para inhibir la actividad de anclaje de PKA de PI3Ky *in vitro*, se obtuvo un péptido de fusión inhibitorio permeable a membranas celulares uniendo el dominio 126-150 de la PI3Ky humana (SEQ ID NO: 1) con el péptido Troyano de *Antennapedia* Penetratina 1 (SEQ ID NO: 3 - Figura 1A). Una versión del péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky marcado con fluoresceína (FITC) se acumuló en el citoplasma de células de músculo liso bronquial humanas (hBSMC) 30 minutos después de la incubación, mostrando que el inhibidor se transduce eficientemente *in vivo* en células aisladas (Figura 1B). Además, el péptido inhibitorio de PI3Ky redujo significativamente la actividad catalítica de PDE4B y PDE4D en células de músculo liso traqueal de ratones de tipo silvestre (PI3Ky^{+/+}), pero no de animales desprovistos de la enzima (PI3Ky^{-/-}) (Figura 1C), demostrando la capacidad del péptido de interferir selectivamente con el anclaje de PKA dependiente de PI3Ky. De acuerdo con estos datos, el pre-tratamiento de hBSMC con el péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky aumentó la acumulación de AMPc en un 35 % después de la estimulación de los β_2 -AR, mientras que los niveles de AMPc no cambiaron en células tratadas con péptido control P1 (Figuras 1D y E).

- Ya que el AMPc se sabe que induce una disminución de los niveles intracelulares de Ca²⁺ y, como consecuencia, promueve la relajación del músculo liso, se analizó la capacidad del péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky para modificar las concentraciones de Ca²⁺ en hBSMC. El pico máximo de Ca²⁺ efímero inducido por el agonista muscarínico carbachol fue significativamente menor en hBSMC pre-tratadas con el inhibidor de PI3Ky en comparación con las células expuestas al vehículo o al péptido control P1 (Figura 2A-B). El mecanismo primario por el que los nucleótidos cíclicos limitan el Ca²⁺ intracelular en células de músculo liso es la inhibición de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VOCC). Además, se ha demostrado previamente que PI3Ky es un regulador clave de AMPc en la vecindad de estos canales de Ca²⁺ (2). Para verificar si la inhibición de la actividad de anclaje de PI3Ky deteriora el flujo de Ca²⁺ a través de los VOCC, las hBSMC se expusieron a una solución que contiene KCl, capaz de despolarizar la membrana y, por lo tanto, de activar VOCC. El flujo de Ca²⁺ inducido por KCl se abolió completamente por el péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky, mientras que no cambió en hBSMC tratadas con péptido control P1 o vehículo (Figura 2A-B).

Para soportar además estos resultados, la fosforilación mediada por AMPc de la subunidad formadora de poros del canal de Ca^{2+} , $\text{Ca}_v1.2$, se descubrió ser significativamente más alta en hBSMC tratadas con el inhibidor de PI3Ky en comparación con las células control tratadas con vehículo o con el péptido P1 (Figura 2C).

- 5 En general, estos datos indican que un péptido Troyano que inhibe la función de anclaje a PKA de PI3Ky constituye un procedimiento novedoso para inhibir PDE seleccionadas y potenciar la señalización de AMPc corriente abajo de los β_2 -AR, en las células de músculo liso.

Un péptido Troyano derivado de PI3Ky limita la hiperreactividad de las vías respiratorias en ratones sanos y asmáticos

- 10 Para determinar la eficiencia de transducción del péptido inhibitorio de PI3Ky *in vivo* en las vías respiratorias, se instiló una forma del péptido marcada con fluoresceína (FITC) por la vía intra-traqueal en ratones de tipo silvestre BALB/C. La fluorescencia FITC se detectó en la tráquea y los pulmones, pero no en el cerebro o en el miocardio, 30 minutos después de la administración (Figura 3A); esto demuestra que el péptido se distribuye eficientemente en el tracto respiratorio de los animales. Además, los niveles de AMPc fueron un 30 % más altos en la tráquea y los pulmones de ratones inyectados con el péptido Troyano derivado de PI3Ky en comparación con animales control tratados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o péptido control P1 (Figura 3B). De acuerdo con una acumulación de AMPc mejorada en el tracto respiratorio, la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por el agonista muscarínico metacolina se atenuó significativamente por el péptido inhibitorio de PI3Ky, pero no por el péptido control P1, en ratones sanos (Figura 5C). Para verificar si la administración intra-traqueal del péptido troyano derivado de PI3Ky suprime la hiperreactividad de las vías respiratorias asociada a asma alérgica, se generó un modelo pre-clínico de asma inducida por ovoalbúmina (OVA). La reducción del volumen tidal inducido por metacolina se atenuó significativamente en animales tratados con el péptido inhibitorio de PI3Ky en comparación con ratones control, que recibieron PBS o el péptido control P1 (Figura 3D).

Tomados en conjunto, estos datos demuestran la capacidad del péptido Troyano derivado de PI3Ky de aumentar los niveles de AMPc *in vivo* en las vías respiratorias como un broncodilatador.

- 25 **Un péptido Troyano derivado de PI3Ky aumenta los niveles de AMPc y mejora la conductancia de CFTR en las células epiteliales bronquiales que expresan CFTR de tipo silvestre o un mutante $\Delta F508$**

- Posteriormente, se examinó la capacidad del péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky para aumentar los niveles de AMPc no solamente en las células de músculo liso, sino también en las células epiteliales de las vías respiratorias. Para este fin, los presentes inventores analizaron la fosforilación mediada por AMPc del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), el canal de cloruro (Cl^-) principal en el epitelio del tracto respiratorio, la activación del cual es dependiente de AMPc. La fosforilación del CFTR fue significativamente más alta en células epiteliales bronquiales humanas normales (Nuli-1) tratadas con el péptido Troyano derivado de PI3Ky, en comparación con células control expuestas a vehículo o al péptido control P1 (Figura 4A). En particular, la inhibición de la función de anclaje de PI3Ky mejoró además la fosforilación de CFTR dependiente de AMPc inducida por un inhibidor conocido de PDE4 (Figura 4B), sugiriendo que el péptido inhibitorio de PI3Ky no solamente inhibe PDE4, sino también otras isoformas de PDE conocidas por asociarse a PI3Ky, tales como PDE3 (2).

- Para examinar si la fosforilación de CFTR aumentada se correlaciona con conductancia de Cl^- más alta, las mediciones de corrientes de Cl^- se realizaron en cámaras de Ussing en células NuLi-1 que expresan CFTR de tipo silvestre. Las corrientes dependientes de CFTR aumentaron significativamente después de la aplicación del péptido Troyano derivado de PI3Ky, mientras que el péptido control P1 no cambió la conductancia (Figura 4C). Estos datos revelan de esta manera un nuevo papel para el péptido inhibitorio de PI3Ky como un potenciador de CFTR.

- Las moléculas con actividad potenciadora de CFTR se requieren para estimular la apertura del CFTR defectuoso en el tratamiento de fibrosis quística (FQ). Para determinar si el péptido Troyano derivado de PI3Ky es capaz de corregir la conductancia de Cl^- defectuosa el CFTR mutante, se midieron las corrientes dependientes de CFTR en las células epiteliales bronquiales que expresan el mutante CFTR $\Delta F508$ -CFTR (CuFi-1). La inhibición de PI3Ky aumentó sinérgicamente la actividad del potenciador de CFTR conocido, VX-770, dando como resultado un aumento de las corrientes de CFTR aproximadamente 5 veces más que la actividad basal (Figuras 4A y B). Por el contrario, el péptido control P1 no cambió la actividad CFTR en presencia de VX-770 (Figuras 4A y B).

- En general, estos datos revelan una función novedosa para el péptido inhibitorio de PI3Ky como un potenciador de CFTR, que promueve la apertura dependiente de AMPc del canal de tipo silvestre y el mutante CFTR ($\Delta F508$ -CFTR).

Un péptido Troyano derivado de PI3Ky limita la inflamación pulmonar en ratones asmáticos

- Es bien conocido que un aumento de AMPc en leucocitos promueve una respuesta antiinflamatoria. Por lo tanto, se evaluó la capacidad del péptido Troyano derivado de PI3Ky para aumentar las concentraciones de AMPc en este tipo celular y, por lo tanto, de limitar la inflamación asociada a enfermedades respiratorias crónicas. Los ratones pre-tratados con el péptido control P1 antes de cada inyección intranasal de ovoalbúmina mostraron un aumento en la inflamación peribronquial (Figuras 7A y B) y en el número de células caliciformes, que contienen mucus y positivas a la tinción de ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) (Figuras 7A y C), en comparación con animales control no

sensibilizados a ovoalbúmina (sin tratamiento previo). El péptido Troyano derivado de PI3Ky redujo significativamente tanto el infiltrado inflamatorio peribronquial (Figuras 7A y B) como el número de células caliciformes (Figuras 7A y C). De acuerdo con estos resultados, el número de neutrófilos presentes en el lavado broncoalveolar fue significativamente menor en los animales tratados con el péptido Troyano inhibitorio de PI3Ky en comparación con los controles que recibieron el péptido P1 (Figura 7D). Por el contrario, otras poblaciones de leucocitos tales como macrófagos, linfocitos y eosinófilos no cambiaron (Figura 7E-F-G).

En general, esta evidencia experimental demuestra la capacidad del péptido Troyano derivado de PI3Ky de inhibir selectivamente la neutrofilia asociada a enfermedades respiratorias crónicas y, por lo tanto, de funcionar como un fármaco antiinflamatorio.

Referencias

1. A. Perino y col., Mol Cell 42, 84 (Abr 8, 2011).
2. A. Ghigo y col., Circulation 126, 2073 (23 Oct, 2012).
3. M. Della Peruta, C. Giagulli, C. Laudanna, A. Scarpa, C. Sorio, Mol Cancer 9, 61 (2010).
4. E. Hirsch y col., Science 287, 1049 (11 Feb, 2000).
5. E. Patrucco y col., Cell 118, 375 (6 Ago, 2004).
6. V. Fanelli y col., Intensive Care Med 36, 1935 (Nov, 2010).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Università degli Studi di Torino

<120> Péptido inhibidor de gamma PI3K novedoso para el tratamiento de enfermedades del sistema respiratorio

<130> BWO17341-CF

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Ala Thr His Arg Ser Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg His
1 5 10 15

Pro Pro Ser Glu Glu Ser Gln Ala Phe
20 25

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido de fusión que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3

<400> 2

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Gly Lys Ala Thr His Arg Ser Pro Gly Gln Ile His Leu Val Gln Arg
20 25 30

His Pro Pro Ser Glu Glu Ser Gln Ala Phe
35 40

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> penetratina 1 de Antennapedia
 <400> 3
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> péptido HIV TAT
 15 <400> 4
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> péptido R7
 <400> 5
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> péptido KALA
 30 <400> 6
 Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
 1 5 10 15
 Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
 20 25 30
 <210> 7
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> artificial
 35 <220>

ES 2 737 227 T3

<223> Buforina 2

<400> 7

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> MAP

<400> 8

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido Transportan

<400> 9

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido Transportan 10

<400> 10

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
20

<210> 11

<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> pVEC
<400> 11

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
1 5 10 15

Ser Lys

10 <210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido MPG

<400> 12

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20

15

20 <210> 13
<211> 3321
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> ADNc de PI3Kgamma humana

<400> 13

ES 2 737 227 T3

ggatccatgg agctggagaa ctataaacag cccgtggtgc tgagagagga caactgccga	60
agggcgccgga ggatgaagcc gcgcagtgtc gcggccagcc tgtcctccat ggagctcatc	120
cccatcgagt tcgtgctgcc caccagccag cgcaaagtca agagccccga aacggcgctg	180
ctgcacgtgg ccggccacgg caacgtggag cagatgaagg cccaggtgtg gctgcgagcg	240
ctggagacca gcgtggcggc ggacttctac caccggctgg gaccgcatca cttcctcctg	300
ctctatcaga agaaggggca gtggtacgag atctacgaca agtaccaggt ggtgcagact	360
ctggactgcc tgcgtactg gaaggccacg caccggagcc cgggccagat ccacctggtg	420
cagcggcacc cgccctccga ggagtcccaa gccttcacgc gccagctcac ggcgctgatt	480
ggctatgacg tcactgacgt cagcaacgtg cagcagcatg agctggagtt cacgcgccgt	540
ggcttgggtga ccccgcgcat ggcggaggtg gccagccgcg accccaagct ctacgccatg	600
cacccgtggg tgacgtccaa gccctcccg gactacctgt ggaagaagat tgccaacaac	660
tgcattctca tcgtcattca ccgcagcacc accagccaga ccattaaggt ctccccgac	720
gacacccccg gcgccatcct gcagagcttc ttcaccaaga tggccaagaa gaaatctctg	780

atggatattc ccgaaagcca aagcgaacag gattttgtgc tgcgcgtctg tggccgggat	840
gagtacctgg tgggcgaaac gcccatcaaa aacttccagt ggggtgaggca ctgcctcaag	900
aacggagaag agattcacgt ggtactggac acgcctccag acccggccct agacgaggtg	960
aggaaggaag agtggccact ggtggatgac tgcacgggag tcaccggcta ccatgagcag	1020
cttaccatcc acggcaagga ccacgagagt gtgttcaccg tgtccctgtg ggactgcgac	1080
cgcaagttca gggtaagat cagaggcatt gatatccccg tcctgcctcg gaacaccgac	1140
ctcacagttt ttgtagaggc aaacatccag catgggcaac aagtcctttg ccaaaggaga	1200
accagcccca aacccttcac agaggaggtg ctgtggaatg tgtggcttga gttcagtatc	1260
aaaatcaaag acttgcccaa aggggctcta ctgaacctcc agatctactg cggtaaagct	1320
ccagcactgt ccagcaaggc ctctgcagag tccccagtt ctgagtccaa gggcaaagtt	1380
cagcttctct attatgtgaa cctgctgctg atagaccacc gtttcctcct gcgccgtgga	1440
gaatacgtcc tccacatgtg gcagatatct ggggaaggag aagaccaagg aagcttcaat	1500
gctgacaaac tcacgtctgc aactaaccga gacaaggaga actcaatgtc catctccatt	1560
cttctggaca attactgcca cccgatagcc ctgcctaagc atcagcccac ccctgaccgc	1620
gaaggggacc gggttcgagc agaaatgcc aaccagcttc gcaagcaatt ggaggcgatc	1680
atagccactg atccacttaa ccctctcaca gcagaggaca aagaattgct ctggcatttt	1740
agatacgaaa gccttaagca cccaaaagca tatcctaagc tatttagttc agtgaaatgg	1800
ggacagcaag aaattgtggc caaaacatac caattgttgg ccagaaggga agtctgggat	1860
caaagtgctt tggatgttgg gttaacaatg cagctcctgg actgcaactt ctgagatgaa	1920
aatgtaagag ccattgcagt tcagaaactg gagagcttgg aggacgatga tgttctgcat	1980
taccttctac aattggtcca ggctgtgaaa tttgaaccat accatgatag cgcccttgcc	2040
agatttctgc tgaagcgtgg tttaagaaac aaaagaattg gtcacttttt gttttggttc	2100
ttgagaagtg agatagccca gtccagacac tatcagcaga ggttcgctgt gattctggaa	2160
gcctatctga ggggctgtgg cacagccatg ctgcacgact ttaccaaca agtccaagta	2220
atcgagatgt tacaaaaagt cacccttgat attaaatcgc tctctgctga aaagtatgac	2280
gtcagttccc aagttatttc acaacttaaa caaaagcttg aaaacctgca gaattctcaa	2340
ctccccgaaa gcttttagagt tccatatgat cctggactga aagcaggagc gctggcaatt	2400
gaaaaatgta aagtaatggc ctccaagaaa aaaccactat ggcttgagtt taaatgtgcc	2460
gatactacag ccctatcaaa tgaaacaatt ggaattatct ttaaacaagg tgatgatctg	2520
cgccaagaca tgcttatttt acagattcta cgaatcatgg agtctatttg ggagactgaa	2580
tctttggatc tatgcctcct gccatatggt tgcatttcaa ctggtgacaa aataggaatg	2640

ES 2 737 227 T3

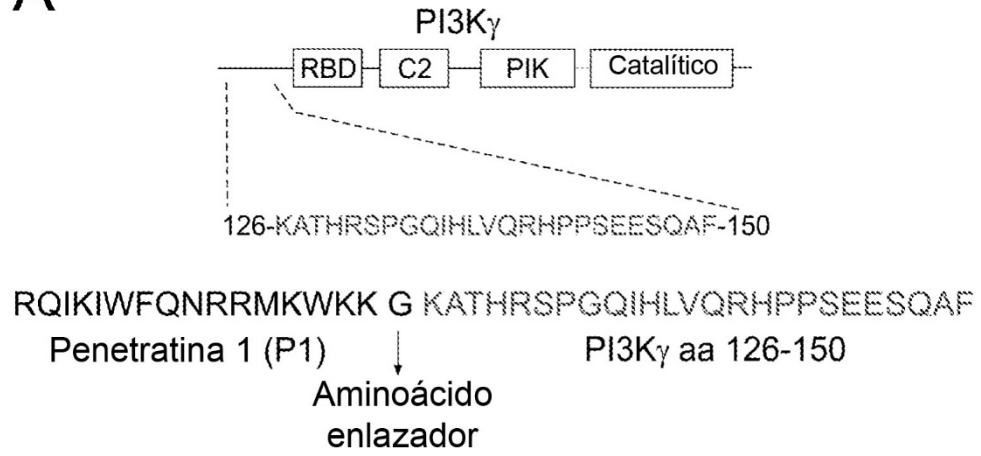
atcgagattg tgaaagacgc cacgacaatt gccaaaattc agcaaagcac agtgggcaac	2700
acgggagcat ttaaagatga agtcctgaat cactggctca aagaaaaatc ccctactgaa	2760
gaaaagtttc aggcagcagt ggagagattt gtttattcct gtgcaggcta ctgtgtggca	2820
acctttgttc ttggaatagg cgacagacac aatgacaata ttatgatcac cgagacagga	2880
aacctatttc atattgactt cgggcacatt cttgggaatt acaaaagttt cctgggcatt	2940
aataaagaga gagtgccatt tgtgctaacc cctgacttcc tctttgtgat gggaacttct	3000
ggaaagaaga caagcccaca cttccagaaa ttccaggaca tctgtgttaa ggcttatcta	3060
gcccttcgtc atcacacaaa cctactgac atcctgttct ccatgatgct gatgacagga	3120
atgccccagt taacaagcaa agaagacatt gaatatatcc gggatgccct cacagtgggg	3180
aaaaatgagg aggatgctaa aaagtatttt cttgatcaga tcgaagtttg cagagacaaa	3240
ggatggactg tgcagtttaa ttggtttcta catcttgttc ttggcatcaa acaaggagag	3300
aaacattcag cctaattctag a	3321

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de fusión que comprende:
 - i) una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 1 o un homólogo relacionado que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y que tiene la capacidad de la secuencia SEQ ID NO: 1 de inhibir la función independiente de quinasa de PI3K γ , y
 - ii) un péptido que tiene la capacidad de penetrar en una célula.
2. Péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido que tiene la capacidad de penetrar en una célula se selecciona de las secuencias especificadas en SEQ ID NO: 3 a 12.
3. Péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el péptido que tiene la capacidad de penetrar en una célula se conjuga al C terminal o al N terminal de SEQ ID NO: 1 o sus homólogos.
4. Péptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como un medicamento.
5. Péptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias, preferentemente enfermedades bronco-obstructivas.
6. El péptido de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las enfermedades respiratorias se seleccionan de asma alérgica, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
7. El péptido de fusión para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el péptido de fusión es adecuado para la administración por inhalación.
8. Un producto que comprende:
 - i) un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y
 - ii) un potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y/o un corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) como una preparación combinada para su uso secuencial, simultáneo o separado en el tratamiento de enfermedades respiratorias, preferentemente enfermedades bronco-obstructivas, más preferentemente fibrosis quística.
9. Producto de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el potenciador del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) se selecciona de VX-770 (N-(2,4-Di-*terc*-butil-5-hidroxifenil)-1,4-dihidro-4-oxoquinolin-3-carboxamida) y VX-532 (4-Metil-2-(5-fenil-1H-pirazol-3-il)-fenol).
10. Producto de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el corrector del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) se selecciona de VX-809 (ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclo-propancarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico) y VX-661 ((R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclo-propancarboxamida).
11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

A



B

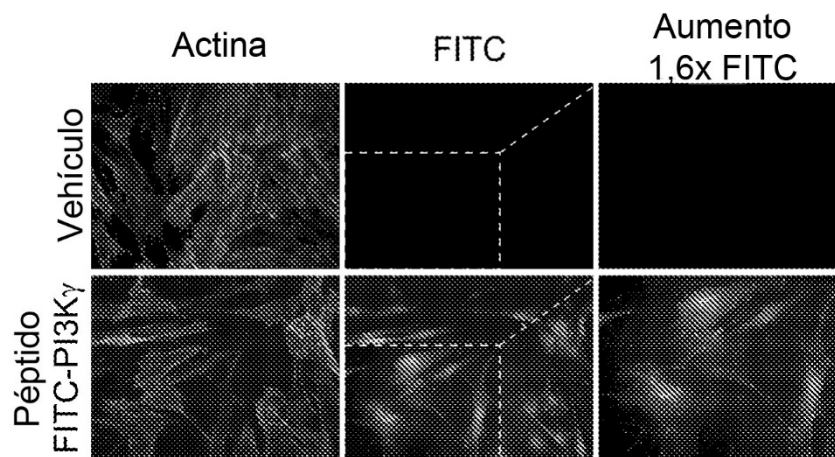
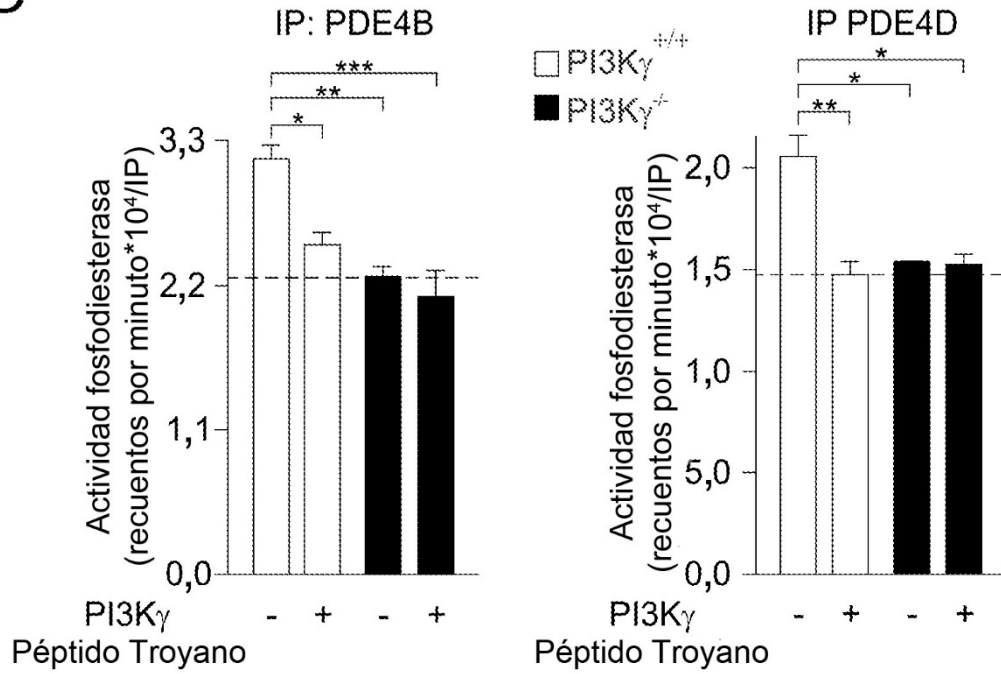
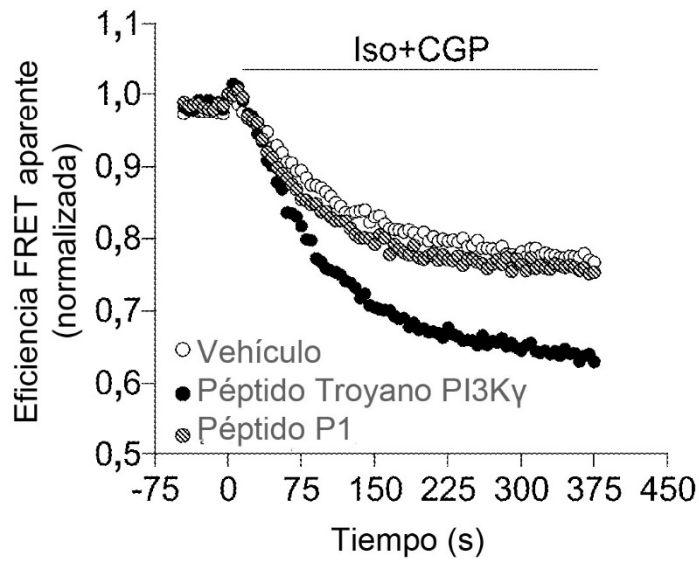


Figura 1_cont

C



D



E

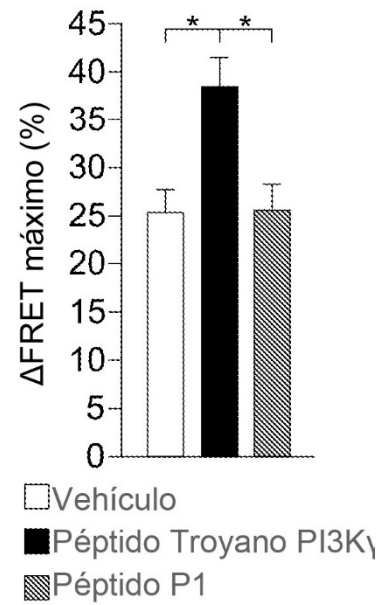
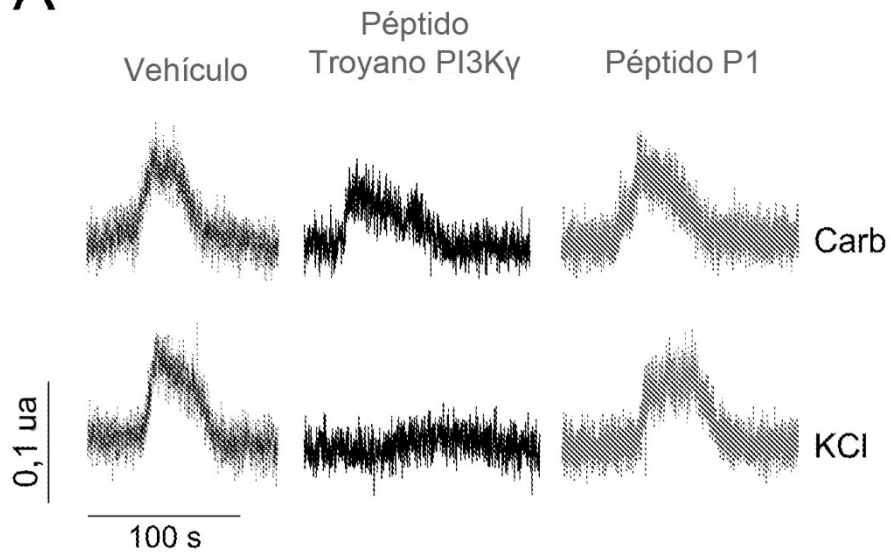


Figura 2

A



B

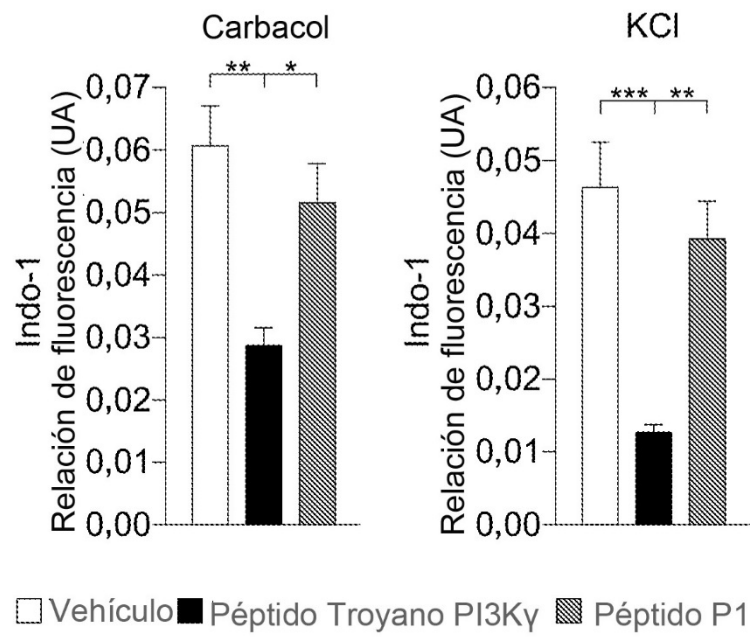


Figura 2_cont C

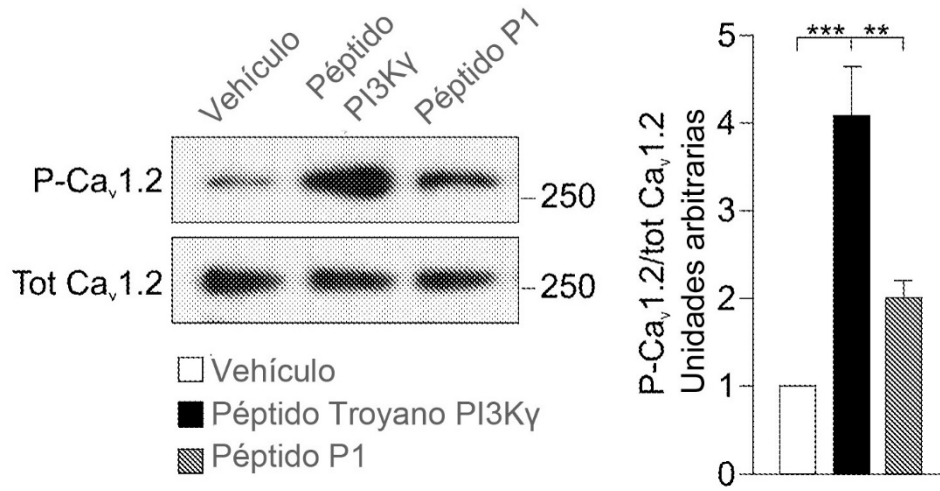
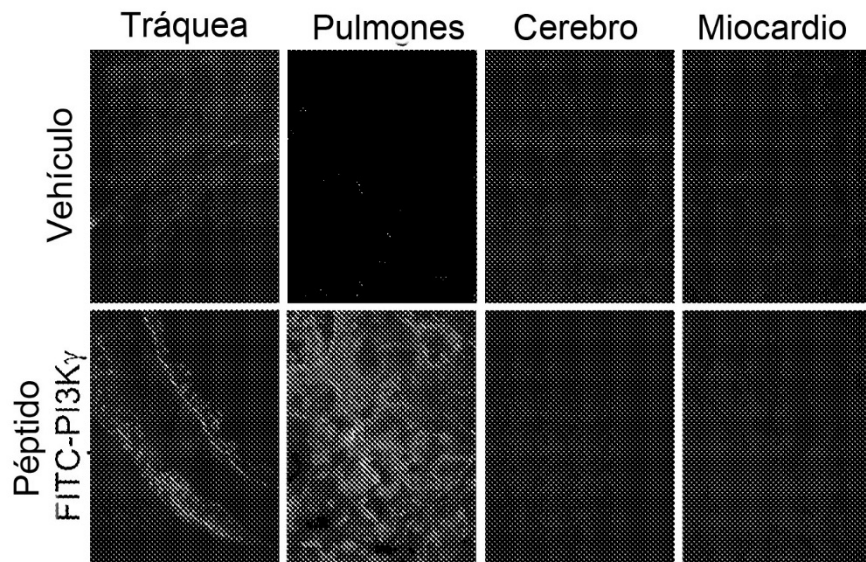


Figura 3

A



B

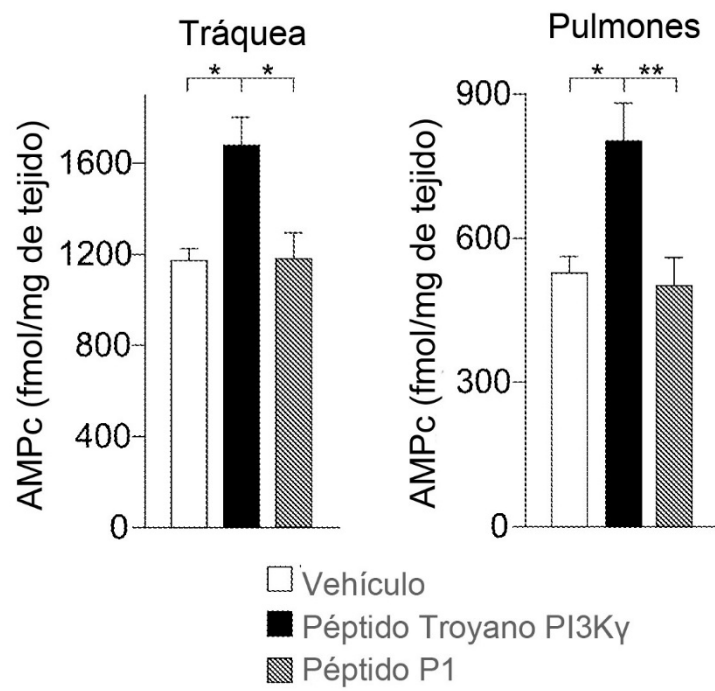
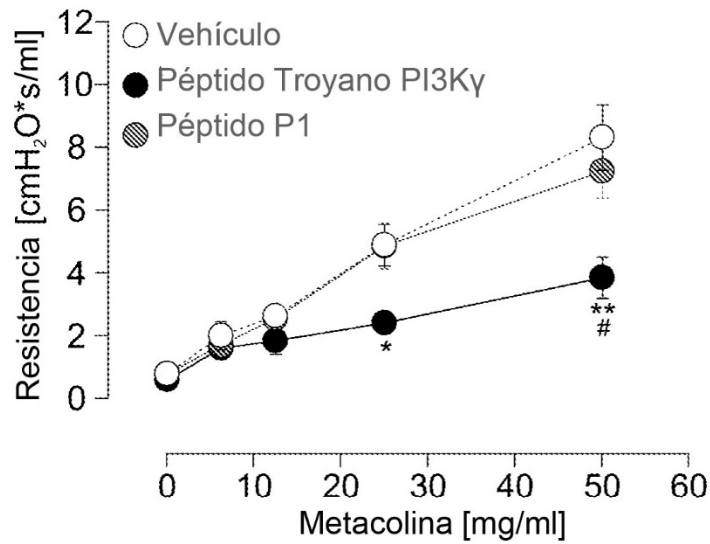


Figura 3_cont

C



D

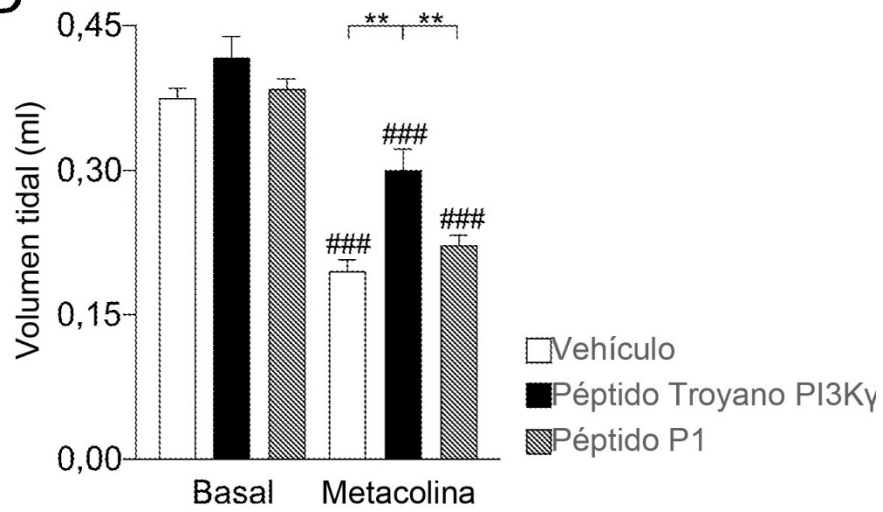
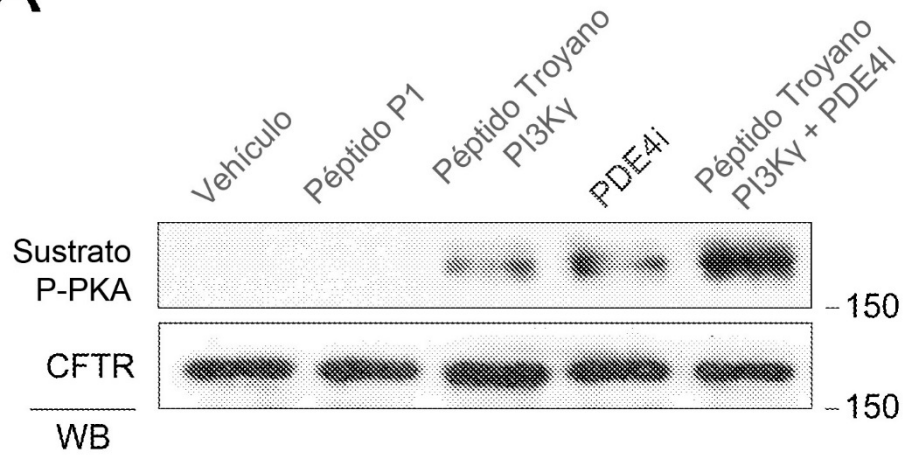


Figura 4

A



B

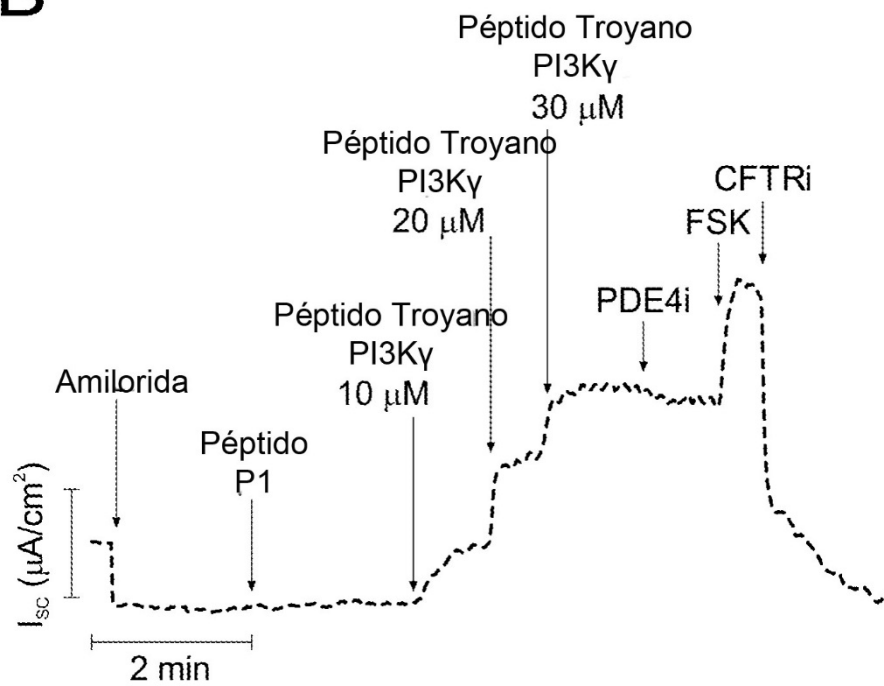
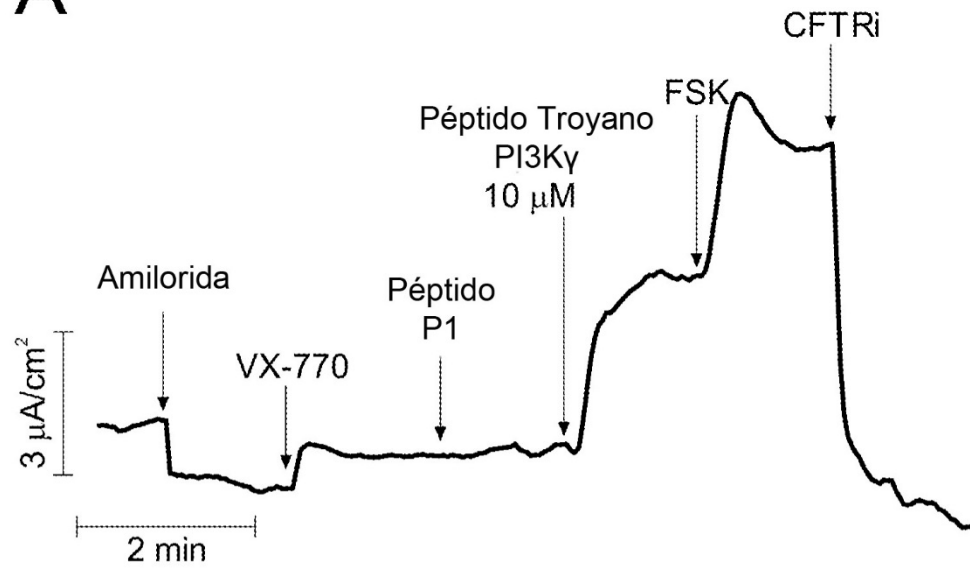


Figura 5
A



B

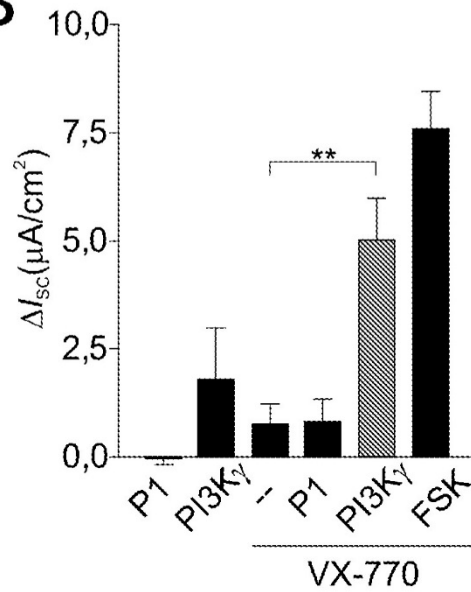
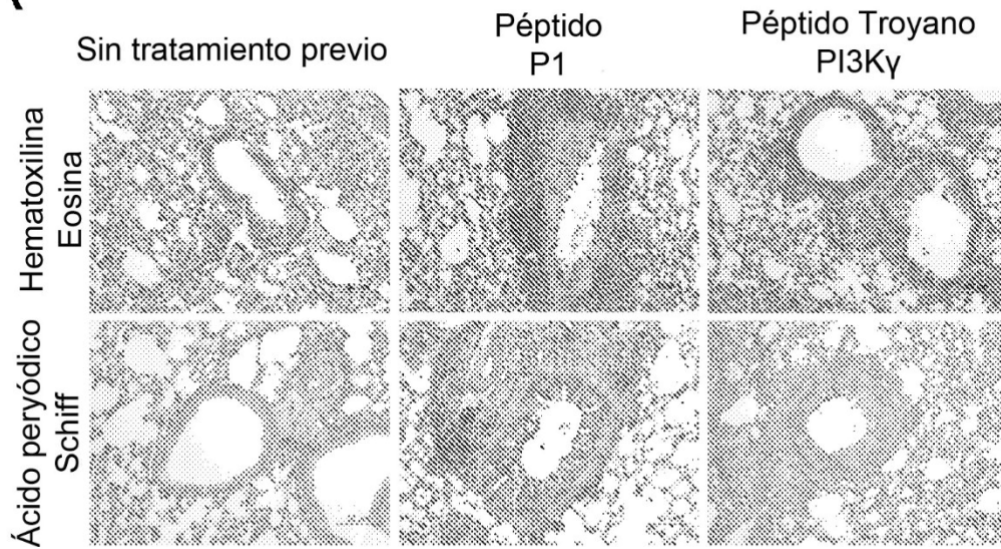


Figura6

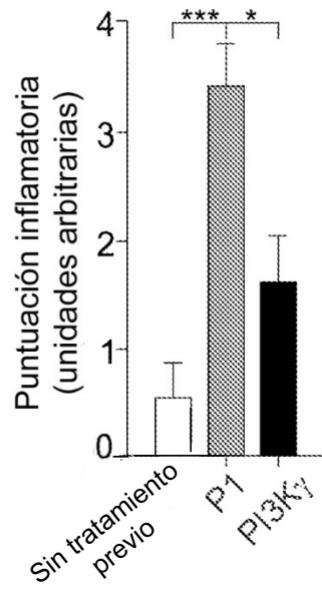
Polipéptidos que penetran en la célula	Secuencia	SEQ ID NO:
Penetratina (pAntp)	RQIKIWFQNRRMKWKK	3
péptido HIV TAT	YGRKKRRQRRR	4
péptido R7	RRRRRRR	5
péptido KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	6
Buforina 2	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	7
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA-amide	8
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide	9
Transportan 10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-amide	10
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK-amide	11
péptido MFG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV-amide	12

Figura 7

A



B



C

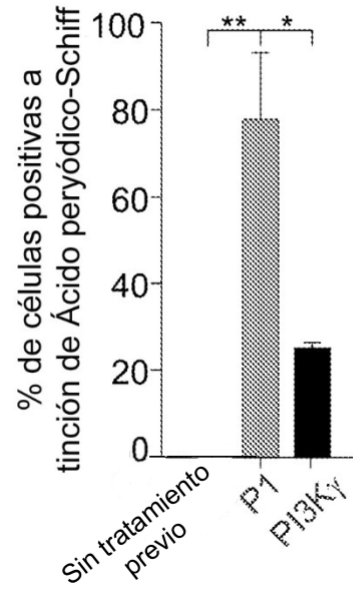


Figura 7_cont

