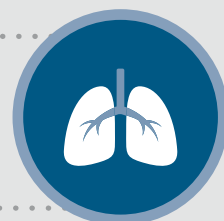




Fondazione per la Ricerca  
sulla Fibrosi Cistica - ETS  
fibrosicisticaricerca.it

AREA 4

## Terapie dell'infiammazione polmonare



### Progetto FFC#17/2020

## Piattaforme di veicolazione orale e polmonare per il riposizionamento di anakinra nella fibrosi cistica



#### Chi ha condotto la ricerca:

Responsabile: **Stefano Giovagnoli**  
(Università degli Studi di Perugia, Dip. di Scienze Farmaceutiche)



Ricercatori coinvolti: 6



Qual è la durata dello studio: 2 anni

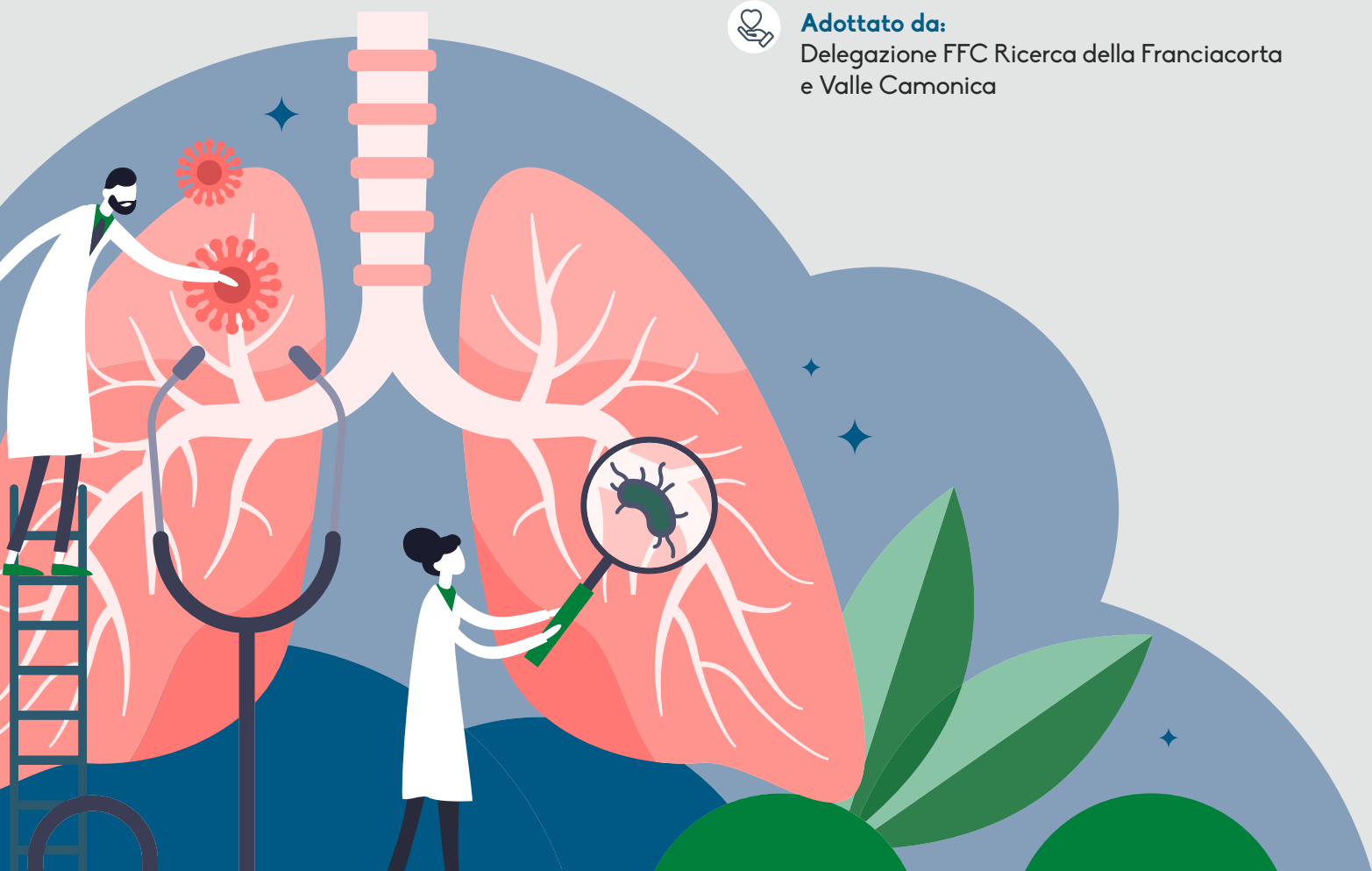


Finanziamento: € 85.000



#### Adottato da:

Delegazione FFC Ricerca della Franciacorta e Valle Camonica





## Perché è importante

L'eccessiva infiammazione contribuisce a infezioni respiratorie e patologia in soggetti con fibrosi cistica (FC). Terapie antinfiammatorie potrebbero portare a un sostanziale miglioramento della patologia e della qualità di vita delle persone con FC. Anakinra (nome commerciale Kineret) è un farmaco potenzialmente utile in tal senso, già in uso clinico, che però mostra caratteristiche sfavorevoli a un impiego in fibrosi cistica. Perciò è necessario individuare nuove piattaforme di veicolazione che permettano un impiego di anakinra nella FC.



## Che cosa hanno usato i ricercatori

Sono state prodotte polveri secche di anakinra inalabile e una formulazione orale con elevata conservabilità e stabilità in ambiente gastrico orale.



## Che cosa hanno fatto i ricercatori

Le due formulazioni sono state testate *in vitro* su cellule per verificarne l'attività dopo preparazione e stoccaggio. Inoltre, è stata valutata l'efficacia *in vivo* in modelli di topi sano e con FC con infezioni da *Aspergillus fumigatus* o *Pseudomonas aeruginosa*. I dati raccolti sono stati confrontati con quelli dopo somministrazione di Kineret.



## Che cosa hanno ottenuto

La singola somministrazione della polvere secca inalabile di anakinra nei topi è più efficace rispetto alla somministrazione giornaliera di Kineret. Inoltre, anakinra somministrata per via polmonare è risultata più sicura non provocando alcuni effetti collaterali del trattamento con Kineret.

Studi nei medesimi modelli animali della formulazione orale hanno confermato l'attività della proteina; sono ancora in corso gli studi di efficacia per confermare tali osservazioni.



## Che cosa succederà ora

Entrambi gli approcci mostrano un elevato potenziale. Tuttavia, i risultati dovranno essere confermati su modelli più evoluti di patologia. Da sottolineare che le preparazioni sono state progettate per essere trasferibili a livello industriale in modo da favorire un rapido processo di sviluppo.

I risultati ottenuti per la formulazione inalatoria sono stati oggetto di una domanda di brevetto.

## Per saperne di più



### Obiettivi

#### **Meglio per via orale o aerosolica che sottocutanea: trovare nuove formulazioni e nuovi modi per somministrare l'antinfiammatorio anakinra in fibrosi cistica**

L'infiammazione sregolata è caratteristica sfavorevole della malattia polmonare FC e nuove terapie mirate a ridurla potrebbero portare a un sostanziale miglioramento della patologia. Anakinra (nome commerciale Kineret), un farmaco somministrabile per via sottocutanea, è già impiegato in patologie infiammatorie umane (artrite reumatoide); inoltre, con il contributo di vari progetti di FFC Ricerca, ha superato le tappe della ricerca preclinica anche in campo FC e attualmente è in sperimentazione in persone con fibrosi cistica attraverso un trial clinico di fase II, sempre con somministrazione per via sottocutanea. La possibilità di somministrare anakinra per altra via (orale o aerosolica) favorirebbe una maggior accettazione del farmaco da parte di malati con FC già gravati da molte altre terapie croniche. Quindi, i ricercatori di questo progetto si propongono di sviluppare formulazioni di anakinra da somministrare per via orale o aerosolica. Prepareranno sia microparticelle da assumere per via orale che polveri secche inalabili di anakinra e ne valuteranno l'attività su cellule bronchiali primarie FC e su modelli di topo FC. La prospettiva è che queste nuove formulazioni possano rapidamente essere trasferite nell'uso clinico facilitando così il riposizionamento (l'uso in patologie diverse di un farmaco già sperimentato e approvato per determinate malattie) di anakinra in fibrosi cistica.



### Risultati

#### **I prodotti inalatorio e orale ottenuti mostrano caratteristiche promettenti suggerendo un notevole potenziale dell'antinfiammatorio anakinra in fibrosi cistica**

Il progetto ha riguardato lo sviluppo di formulazioni inalabile e orale di anakinra per il trattamento dell'infiammazione nella fibrosi cistica (FC).

In una prima fase è stata ottenuta una polvere secca di anakinra respirabile che ha dimostrato *in vitro* proprietà ottimali in termini di preservazione dell'attività della proteina e stabilità nel tempo a temperatura ambiente. Studi *in vivo* su topi sani e FC, infettati con tipici agenti patogeni, come *Aspergillus fumigatus* o *Pseudomonas aeruginosa*, hanno dimostrato come la singola somministrazione della polvere secca inalabile di anakinra, nell'arco di una settimana di trattamento, sia più efficace rispetto alla somministrazione giornaliera di Kineret (nome commerciale di anakinra) o lo standard di anakinra, fino a concentrazioni quattro volte inferiori rispetto alla dose sistemica. Inoltre, anakinra somministrata per via polmonare è risultata più sicura non provocando neutropenia periferica, un noto effetto collaterale del trattamento con Kineret, che invece è evidente dopo somministrazione sistemica ripetuta. Studi di farmacocinetica hanno mostrato come questo effetto sia anche il risultato di una minore concentrazione ematica della proteina quando veicolata nei polmoni.

Nella seconda fase del progetto è stata ottenuta una formulazione orale di anakinra con elevata conservabilità e stabilità in ambiente gastrico. Studi *in vivo* nei medesimi modelli animali hanno confermato l'attività della proteina veicolata attraverso la via orale. Studi di efficacia sono ancora in corso per confermare tali osservazioni.

## Per saperne di più



Quindi, entrambi gli approcci mostrano un elevato potenziale. Tuttavia, tali risultati dovranno essere confermati su modelli più evoluti di patologia. Da sottolineare che le preparazioni sono state progettate per essere trasferibili a livello industriale in modo da favorire un rapido processo di sviluppo.

## Pubblicazioni



***Pulmonary drug delivery technology enables anakinra repurposing in cystic fibrosis***  
Journal of Controlled Release, 2023







ELSEVIER

Journal of Controlled Release

Volume 353, January 2023, Pages 1023-1036



# Pulmonary drug delivery technology enables anakinra repurposing in cystic fibrosis

Matteo Puccetti<sup>a 1</sup>  , Marilena Pariano<sup>b 1</sup>, Claudia Stincardini<sup>b</sup>, Paulina Wojtylo<sup>a</sup>,  
Aurelie Schoubben<sup>a</sup>, Emilia Nunzi<sup>b</sup>, Maurizio Ricci<sup>a</sup>, Luigina Romani<sup>b</sup>,  
Stefano Giovagnoli<sup>a</sup>  

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, via del Liceo 1, 06123 Perugia, Italy

<sup>b</sup> Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, piazzale Lucio Severi 1, 06132 Perugia, Italy

Received 8 August 2022, Revised 20 November 2022, Accepted 23 November 2022, Available online 21 December 2022, Version of Record 21 December 2022.

### Acknowledgements

This work was supported by the **Grant FFC17#/2020** awarded to Stefano Giovagnoli by the Italian Cystic Fibrosis Foundation....

## Publicazioni



### Tackling Immune Pathogenesis of COVID-19 through Molecular Pharmaceutics Pharmaceutics, 2021



pharmaceutics



Perspective

#### Tackling Immune Pathogenesis of COVID-19 through Molecular Pharmaceutics

Matteo Puccetti <sup>1,\*</sup>, Claudio Costantini <sup>2</sup>, Maurizio Ricci <sup>1</sup> and Stefano Giovagnoli <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, University of Perugia, 06132 Perugia, Italy; maurizio.ricci@unipg.it

<sup>2</sup> Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, 06132 Perugia, Italy; costacl04@gmail.com

\* Correspondence: matteo.puccetti@gmail.com (M.P.); stefano.giovagnoli@unipg.it (S.G.);  
Tel.: +39-075-5855162 (M.P.); +39-0755855123 (S.G.)

**Abstract:** An increasing number of clinical studies worldwide are investigating the repurposing of antiviral, immune-modulatory, and anti-inflammatory agents to face the coronavirus disease-19 (COVID-19) pandemic. Nevertheless, few effective therapies exist to prevent or treat COVID-19, which demands increased drug discovery and repurposing efforts. In fact, many currently tested drugs show unknown efficacy and unpredictable drug interactions, such that interventions are needed to guarantee access to effective and safe medicines. Anti-inflammatory therapy has proven to be effective in preventing further injury in COVID-19 patients, but the benefit comes at a cost, as targeting inflammatory pathways can imply an increased risk of infection. Thus, optimization of the risk/benefit ratio is required in the anti-inflammatory strategy against COVID-19, which accounts for drug formulations and delivery towards regionalization and personalization of treatment approaches. In this perspective, we discuss how better knowledge of endogenous immunomodulatory pathways may optimize the clinical use of novel and repurposed drugs against COVID-19 in inpatient, outpatient, and home settings through innovative drug discovery, appropriate drug delivery systems and dedicated molecular pharmaceutics.



**Citation:** Puccetti, M.; Costantini, C.; Ricci, M.; Giovagnoli, S. Tackling Immune Pathogenesis of COVID-19 through Molecular Pharmaceutics. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 494. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040494>

**Keywords:** COVID-19; tryptophan metabolites; anakinra; molecular pharmaceutics

#### 1. Introduction

Coronavirus disease-19 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), a potentially fatal clinical syndrome that involves the lower

**Funding:** This research was funded by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation, Research Project number FFC#17/2020 to S.G., M.P. gratefully acknowledged a fellowship from the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation.

## Publicazioni



### *Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy*

Journal Of Clinical Investigation, 2022

The Journal of Clinical Investigation

RESEARCH ARTICLE

## Anakinra restores cellular proteostasis by coupling mitochondrial redox balance to autophagy

Frank L. van de Veerdonk,<sup>1</sup> Giorgia Renga,<sup>2</sup> Marilena Pariano,<sup>2</sup> Marina M. Bellet,<sup>2</sup> Giuseppe Servillo,<sup>2</sup> Francesca Fallarino,<sup>2</sup> Antonella De Luca,<sup>2</sup> Rossana G. Iannitti,<sup>2</sup> Danilo Piobbico,<sup>2</sup> Marco Gargaro,<sup>2</sup> Giorgia Manni,<sup>2</sup> Fiorella D'Onofrio,<sup>2</sup> Claudia Stincardini,<sup>2</sup> Luigi Sforza,<sup>2</sup> Monica Borghi,<sup>2</sup> Marilena Castelli,<sup>2</sup> Stefania Pieroni,<sup>2</sup> Vasileios Oikonomou,<sup>2</sup> Valeria R. Vilella,<sup>3</sup> Matteo Puccetti,<sup>4</sup> Stefano Giovagnoli,<sup>4</sup> Roberta Galarini,<sup>5</sup> Carolina Barola,<sup>5</sup> Luigi Maiuri,<sup>3,6</sup> Maria Agnese Della Fazio,<sup>2</sup> Barbara Cellini,<sup>2</sup> Vincenzo Nicola Talesa,<sup>2</sup> Charles A. Dinarello,<sup>7</sup> Claudio Costantini,<sup>2</sup> and Luigina Romani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, Radboud University Medical Center, Nijmegen, Netherlands. <sup>2</sup>Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Perugia, Italy. <sup>3</sup>European Institute for Research in Cystic Fibrosis, Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy. <sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy. <sup>5</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" Perugia, Italy. <sup>6</sup>Department of Health Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy. <sup>7</sup>Department of Medicine, University of Colorado, Aurora, Colorado, USA.

### Acknowledgments

This study was supported by grants funded by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (research projects FFC22/2014 and FFC17/2020 to SG and LR). FLVDV was supported by a VIDI grant from NWO ZonMw, Netherlands. CAD is supported by NIH grant AI 15614. M. Pariano, CS, GR, and M. Puccetti gratefully acknowledge a fellowship from the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation. We thank the primary cell culture service offered from the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation for kindly providing us with the HBE cells. We thank B. Scholte, Erasmus Medical Center Rotterdam, Netherlands, who provided *Cftr*<sup>tm1JHE</sup> mice (F508del mice, European Economic Community European Coordination Action for Research in Cystic Fibrosis program EU FP6 SHMCT-2005-018932). We thank Cristina Massi-Benedetti for superb editorial assistance.

## Publicazioni



### **Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis** Vaccines (Basel), 2021



Article

#### **Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis**

Marilena Pariano <sup>1</sup>, Claudio Costantini <sup>1</sup>, Ilaria Santarelli <sup>1</sup>, Matteo Puccetti <sup>2</sup>, Stefano Giovagnoli <sup>2</sup>, Vincenzo N. Talesa <sup>1</sup>, Luigina Romani <sup>1</sup> and Cinzia Antognelli <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, 06132 Perugia, Italy; marilena.pariano@gmail.com (M.P.); claudio.costantini@unipg.it (C.C.); ilasanta@libero.it (I.S.); vincenzo.talesa@unipg.it (V.N.T.); luigina.romani@unipg.it (L.R.)

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Science, University of Perugia, 06132 Perugia, Italy; matteo.puccetti@gmail.com (M.P.); stefano.giovagnoli@unipg.it (S.G.)

\* Correspondence: cinzia.antognelli@unipg.it; Tel.: +39-075-585-8354

**Abstract:** Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder that affects multiple organs, although a decline in respiratory function represents the major cause of morbidity and mortality. The airways of CF patients are characterized by a chronic inflammatory state to which the receptor for advanced glycation end-products greatly contributes. Glyoxalase 1 (GLO1) is the major enzyme metabolizing methylglyoxal, a potent precursor of advanced glycation end-products. Its role in CF has never been investigated. We herein resorted to murine and human preclinical models of CF to define the contribution of GLO1 to inflammatory pathology. We found that the expression and activity of GLO1, measured by real-time PCR and Western blot or a specific spectrophotometric assay, respectively, are defective in mice and human bronchial cells from CF patients exposed to *Aspergillus fumigatus*, a common pathogen in CF, but could be restored upon blockade of interleukin-1 receptor signaling by anakinra in mice. This study suggests that GLO1 contributes to pathology in CF and may be potentially targeted to mitigate inflammation.

**Keywords:** glyoxalase 1; cystic fibrosis; anakinra



**Citation:** Pariano, M.; Costantini, C.; Santarelli, I.; Puccetti, M.; Giovagnoli, S.; Talesa, V.N.; Romani, L.; Antognelli, C. Defective Glyoxalase 1 Contributes to Pathogenic Inflammation in Cystic Fibrosis. *Vaccines* **2021**, *9*, 1311. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111311>

**Author Contributions:** Conceptualization, V.N.T., L.R., C.A.; investigation, M.P. (Marilena Pariano), C.C., I.S., M.P. (Matteo Puccetti), S.G., C.A.; writing—original draft preparation, L.R.; writing—review and editing, L.R., C.A.; supervision, L.R., C.A.; funding acquisition, S.G., L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (Research Projects number FFC#22/2014 to L.R. and FFC#17/2020 to S.G.). Marilena Pariano gratefully acknowledges a fellowship from the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation.

**Institutional Review Board Statement:** Mouse experiments were performed according to Italian Approved Animal Welfare Authorization 360/2015-PR and Legislative Decree 26/2014 regarding the animal license obtained by the Italian Ministry of Health lasting for 5 years (2015–2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.



## Brevetti



Numero domanda di brevetto 102022000007844, presentata il 21/4/22:

- **Titolo:** *Composizione farmaceutica inalabile comprendente la proteina anakinra per il trattamento dell'infiammazione nella fibrosi cistica*
- **Contitolari:** Università degli Studi di Perugia e FFC Ricerca

The screenshot shows the website of the University of Perugia (unipg). The main content area displays the following information:

- Titolo brevetto:** Composizione farmaceutica inalabile comprendente la proteina anakinra per il trattamento dell'infiammazione nella fibrosi cistica
- Stato:** Disponibile
- Numero domanda di priorità:** 102022000007844
- Data di priorità:** 13-10-2020
- Fase:** Nazionale (ITA, PCT)
- Dipartimento:** Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
- Autori:** Stefano Giovagnoli, Mariela Parlano, Matteo Puccetti, Maurizio Ricci
- Co-titolari:** Università degli Studi di Perugia (50%), FONDAZIONE PER LA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA - ONLUS (50%)
- Descrizione:** Uso di una polvere secca inalabile di Anakinra per il trattamento della Fibrosi Cistica
- Contatto:** ufficio.fo@unipg.it

## Abstract presentati a congressi scientifici



- **M. Puccetti, M. Pariano, C. Stincardini, I. Polidori, P. Wojtylo, C. Costantini, A. Schoubben, M. Ricci and S. Giovagnoli. Anakinra repurposing in Cystic Fibrosis through inhalation drug delivery technology**  
Eufeps Annual Meeting 2022, 1-3 June 2022, Leiden, The Netherlands
- **M. Puccetti, M. Pariano, C. Stincardini, I. Polidori, P. Wojtylo, C. Costantini, A. Schoubben, M. Ricci and S. Giovagnoli. Anakinra repurposing in Cystic Fibrosis through inhalation drug delivery technology**  
61st AFI Symposium, June 8-10, 2022, Rimini, Italy

## Rendiconto economico



### AREA 4

#### Terapie dell'infiammazione polmonare

#### Progetto FFC#17/2020

#### Piattaforme di veicolazione orale e polmonare per il riposizionamento di anakinra nella fibrosi cistica



**Responsabile:**

**Stefano Giovagnoli**

(Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche)



**Periodo:**

01/09/2020-31/08/2022



**Grant assegnato:**

€ 85.000



**Usato per:**

- Materiale di consumo € 42.232,14
- Spese viaggio/convegni € 1.045,64
- Borse di studio € 38.900,00
- Spedizioni € 679,18
- Pubblicazioni scientifiche € 1.500,45
- Consulenze € 642,59

€ 85.000



**Saldo (usato per altri progetti):**

€ 0