



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000086815
Data Deposito	22/12/2015
Data Pubblicazione	22/06/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	6I	K	3I	7048

Titolo

TRATTAMENTO DEL TUMORE CEREBRALE

TRATTAMENTO DEL TUMORE CEREBRALE

SETTORE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne l'uso dell'oleandrina per il trattamento e/o la prevenzione di un
5 tumore cerebrale. In particolare, l'oleandrina è usata per il trattamento e/o la prevenzione del
glioma, preferibilmente il glioblastoma, preferibilmente in combinazione con un altro trattamento
anti-tumorale e terapeutico. La presente invenzione concerne anche una composizione
farmaceutica comprendente l'oleandrina per il trattamento e/o la prevenzione di un tumore
cerebrale.

10

TECNICA ANTERIORE

Il glioblastoma (GBM) è la più diffusa e aggressiva neoplasia del sistema nervoso centrale (SNC),
caratterizzato da un alto livello di invasione e proliferazione delle cellule tumorali, e da un alto
livello di infiammazione e necrosi del tessuto nervoso. Nonostante i continui progressi della
15 neurochirurgia e nella formulazione di nuovi farmaci, allo stato attuale non ci sono terapie efficaci
per contrastare la crescita di questo tumore cerebrale, e il decesso del paziente avviene entro circa
dodici mesi dalla diagnosi della patologia.

La maggior parte delle nuove terapie utilizzate per ridurre la progressione del glioblastoma si
sono focalizzate sull'uso di farmaci antineoplastici, come il Temozolomide che tramite la
20 metilazione di una guanina impedisce la replicazione cellulare, oppure nel contrastare
l'angiogenesi, ovvero il meccanismo patogenico responsabile della creazione di nuovi vasi
sanguigni a supporto della crescita tumorale, come il Bevacizumab. Tuttavia negli ultimi anni è
emerso che il microambiente tumorale, costituito da cellule non tumorali come le cellule
staminali mesenchimali, le endoteliali, quelle del sistema immunitario e le cellule microgliali,
25 contribuisce allo sviluppo del GBM, alla sua proliferazione, invasività, e angiogenesi e pertanto
la ricerca sta iniziando a porre grande enfasi al contributo del microambiente nella progressione
del tumore.

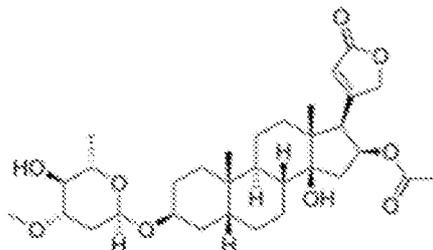
L'oleandrina è un glucoside cardiotonico che viene prodotto dal *Neriumoleander*. Insieme alla
neandrina è l'agente responsabile della velenosità della linfa dell'oleandro.

30 L'oleandrina agisce come bloccante selettivo per l'isoforma 3 della sub-unità alfa della pompa
sodio-potassio che fisiologicamente è espressa nel SNC dai neuroni, ma anche nelle cellule
tumorali di tumori della prostata, del seno e di diversi linfomi, nelle quali l'oleandrina è in grado
di indurre la morte cellulare (Nasu et al., 2002; Raghavendra et al., 2007). Dati recenti dimostrano
inoltre che in un modello *in vitro* di ischemia cerebrale, la somministrazione di oleandrina

determina una riduzione della morte neuronale con un meccanismo mediato dall'azione del un fattore neurotrofico, il BDNF (Van Kanegan et al., 2014).

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

- 5 L'oleandrina è il bioagente vegetale estratto dalla pianta *Nerium Oleander* con formula molecolare $C_{32}H_{48}O_9$:



- 10 Nella presente invenzione è stato sorprendentemente osservato che l'oleandrina è un farmaco volto a contrastare la crescita del GBM attraverso un duplice meccanismo: da un lato con un'azione diretta sulle cellule tumorali (inducendone la morte cellulare senza interferire con la vita delle altre cellule del parenchima cerebrale), dall'altro attraverso un'azione indiretta che modifica il microambiente tumorale con conseguente riduzione della progressione del tumore.

- 15 L'oleandrina è pertanto un farmaco specifico e aggressivo solo verso le cellule di glioblastoma che non ha effetti tossici nei confronti delle cellule sane del parenchima cerebrale. Di conseguenza è possibile sviluppare un chemioterapico che non indebolisca l'organismo ma al contempo riduca drasticamente la crescita della massa tumorale, e che non rappresenti quindi un agente esterno potenzialmente dannoso per il sistema nervoso centrale.

- 20 Pertanto, la presente invenzione fornisce l'oleandrina per uso nel trattamento e/o la prevenzione di un tumore cerebrale. Preferibilmente il tumore cerebrale è un glioma.

Preferibilmente il glioma è scelto nel gruppo consistente in: glioblastoma, astrocitoma anaplastico, astrocitoma diffuso, astrocitoma pilocitico, oligodendroglioma, ependimoma.

Preferibilmente il tumore cerebrale è medulloblastoma o meningioma.

- 25 Più preferibilmente il tumore cerebrale è primario. Ancora preferibilmente il tumore cerebrale è primario o secondario. Per tumori secondari si intendono tumori sviluppati come metastasi cerebrali di tumori come tumore al seno, polmone, melanoma,....

Nelle presente invenzione preferibilmente l'oleandrina è usata in combinazione con un ulteriore trattamento antitumorale e/o terapeutico.

Preferibilmente il trattamento anti-tumorale è scelto nel gruppo consistente in: radioterapia, chemioterapia.

Preferibilmente la chemioterapia è scelta nel gruppo consistente in: agenti alchilanti, antimetaboliti, antibiotici citotossici e correlati, antimitotici di origine naturale, terapie mirate, ormoni e antagonisti ormonali, modificatori biologici di risposta e agenti vari.

Ancora preferibilmente la chemioterapia è la temozolomide.

Preferibilmente il trattamento terapeutico è scelto nel gruppo consistente in: agente antiinfiammatorio, agente antidolorifico, agente antiemetico.

La presente invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica comprendente oleandrina per uso nel trattamento e/o la prevenzione di un tumore cerebrale.

Preferibilmente la composizione comprendente ulteriormente un agente antitumorale e/o terapeutico.

Nella presente invenzione per oleandrina si intende sia la forma pura che un estratto contenente almeno 1 % di oleandrina, preferibilmente almeno 2%, 5%, 10 %, 15 %, 20 %, 25%, 30 %, 35 %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%.

Nella presente invenzione un agente anti-tumorale può essere: **Agenti alchilanti:** Mostarde azotate (ciclofosfamide, clorambucile, estramustina, bendamustina, prednimustina, ifosfamide, mecloretamina, melphalan, trifosfamide), Sali metallici (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino), Nitrosuree (carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, nimustina, tallimustina, fotemustina), Alchilsulfunati (busulfano, treosulfano, mannosulfano), Derivati dell'etilenimina (tiotepa, triazichinone), Composti del triazene (dacarbazina, temozolomide), Epossidi (etoglucide) Altri (mitobronitolo, pipobromano, altretamina); **Antimetaboliti:** Analoghi del folato (metotrexato, pemetrexed, raltitrexed, trimetrexato, pralatrexato, plevitrexed, nolatrexed), Analoghi delle purine (cladribina, fludarabina, mercaptopurina, clofarabina, nelarabina, pentostatina, tioguanina), Analoghi delle pirimidine (fluorouracile, tegafur, carmofur, gemcitabina, azacitidina, capecitabina, citarabina, decitabina, floxuridina); **Antibiotici citotossici e correlati:** Antracicline (daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrone, valrubicina, aclarubicina, zorubicina, pirarubicina, amrubicina, pixantrone), Actinomicine (dactinomicina) Altri (bleomicina, plicamicina, mitomicina, ixabepilone, amsacrina), **Antimitotici di origine naturale:** Alcaloidi della vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, vinflunina, vintafolide), Alcaloidi del Colchico, derivati della colchicina (demecolcina), Derivati della combrestatina (combretastatina A-4, ombrabulina), Stabilizzatori dei microtubuli: taxani (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel), Inibitori della topoisomerasi I: camptotecine (topotecan, irinotecan), Inibitori della topoisomerasi II: (etoposide, teniposide),

Alcaloidi di origine marina (trabectedina, lurbinectedina, PM00104), **Terapie mirate:** Inibitori del recettore tirosinchinasico (RTK) (imatinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, dasatinib, sorafenib, sunitinib, semaxanib, pazopanib, nilotinib, vandetanib, afatinib, bosutinib, vemurafenib, crizotinib, axitinib, ruxolitinib, regorafenib, masitinib, dabrafenib, ponatinib, trametinib),

5 Anticorpi monoclonali (rituximab, trastuzumab, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, alemtuzumab, gemtuzumabozogamicin, ibritumomabtiuxetan, tositumomab, edrecolomab, catumaxomab, ofatumumab, ipilimumab, brentuximabvedotin, pertuzumab, obinutuzumab), Inibitori di mTOR (temsirolimus, everolimus, ridaforolimus), Inibitori del proteasoma (bortezomib, carfilzomib), Anti-VEGF (afibercept), Agonisti del recettore dell'acido retinoico

10 (RAR) (tretinoina, bexarotene), Tossina legante il recettore di IL2 (denileuchinadiftitox), **Ormoni e antagonisti ormonali:** Androgeni (fluoximesterone), Antiandrogeni (bicalutamide, flutamide, nilutamide), Inibitori dell'aromatasi (amminoglutetimide, anastrozolo, letrozolo, exemestane, vorozolo, fadrozolo), Corticosteroidi (desametasone, prednisone), Estrogeni (dietilstilbestrolo, poliestradiolo fosfato, etinilestadiolo, fosfestrolo, gestonorone),

15 Antiestrogeni (SERM) (tamoxifene, raloxifene, toremifene, fulvestrant), Agonisti dell'LHRH (goserelina, leuprolide, triptorelina, buserelina), Soppressori del rilascio di ormoni proteici (octreotide), Progestinici (megestolo acetato, medrossiprogesterone acetato), Ormoni tiroidei (levotiroxina, liotironina), Altri antagonisti ormonali (abiraterone), **Modificatori biologici di risposta (BRM):** Interferoni (IFN α -2a, IFN α -2b), Interleuchine (IL2, oprelvechina, denileuchinadiftitox), Fattori di crescita mieloidi ed eritroidi (eritropoietina, filgrastim, sargramostim), **Agenti vari:** Soppressori adrenocorticali (mitotane), Bifosfonati (acido pamidronico, acido zoledronico), Citoprotettori (amifostina, mesna, dexrazoxane), Derivati della metilidrazina (procarbazine), FANS (acido acetilsalicilico, celecoxib), Agenti fotosensibilizzanti ed usati in radioterapia (porfimer sodico, metilaminolevulinato, acido 5-aminolevulinico,

20 temoporfina, efaproxiral), Agenti riducenti le piastrine (anagrelide), Sali (triossido di arsenico), Derivati dell'urea (N-idrossiurea o idrossicarbamide), Antagonisti delle poliammine (mitoguazone o MGBG), Inibitori delle deacetilasi istoniche (vorinostat, panobinostat, romidepsina), Enzimi (asparaginasi, pegaspargasi), Terapia genica mediata da adenovirus (sitimagenecceradenovec), Altri (lonidamina, miltefosina, masoprocol, oblimersen,

30 omacetaxinamapesuccinato, eribulinamesilato, vismodegib).

Nella presente invenzione un agente terapeutico può essere: agente antiinfiammatorio, agente antidolorifico, agente antiemetico.

Nella presente invenzione, la composizione farmaceutica può essere scelta sulla base del trattamento richiesto. Tali composizioni sono preparate per miscelamento e sono opportunamente

adattate alla somministrazione orale o parenterale, e come tali possono quindi essere somministrate in forma di compresse, capsule, preparazioni orali, polveri, granuli, pillole, iniettabili, soluzioni liquide per infusione, sospensioni, supposte, preparazioni per inalazione.

5 Compresse e capsule per somministrazione orale sono normalmente presentate in dosaggio unitario e contengono eccipienti convenzionali come leganti, riempitivi (inclusi cellulosa, mannitolo, lattosio), diluenti, agenti adiuvanti della compressione, lubrificanti (compresi stearato di magnesio), detergenti, disgreganti (ad esempio polivinilpirrolidone e derivati di amido, come amido glicolato di sodio), coloranti, aromatizzanti e agenti bagnanti (per esempio sodio lauril solfato).

10 Le composizioni orali solide possono essere preparate tramite metodi convenzionali di miscelamento, riempimento o compressione. L'operazione di miscelamento può essere ripetuta per distribuire il principio attivo attraverso composizioni contenenti grandi quantità di riempitivi. Queste operazioni sono convenzionali.

15 Preparazioni liquide orali possono essere, per esempio, in forma di sospensioni acquose o oleose, soluzioni, emulsioni, sciroppi o elisir, o possono essere presentate come prodotti secchi da ricostituire con acqua o un opportuno veicolo prima dell'uso. Queste preparazioni liquide possono contenere additivi convenzionali come agenti sospendenti, per esempio sorbitolo, sciroppo, metilcellulosa, gelatina, idrossietil cellulosa, carbossimetil cellulosa, gel di stearato di alluminio, o grassi idrogenati commestibili; agenti emulsionanti, come lecitina, monooleato di
20 sorbitano, o di acacia; veicoli non acquosi (che possono includere oli commestibili) quali olio di mandorle, olio di cocco frazionato, esteri oleosi quali esteri di glicerina, glicole propilenico, o alcool etilico; conservanti, come p-idrossibenzoato di metile o propile, o acido sorbico, e se desiderato, aromatizzanti o coloranti convenzionali. Le formulazioni orali includono anche formulazioni a lento rilascio convenzionali come compresse o granuli a rivestimento enterico.

25 Preparazioni farmaceutiche per somministrazione inalatoria possono essere somministrate da un insufflatore o da nebulizzatore pressurizzato.

Per la somministrazione parenterale dosaggi fluidi unitari possono essere preparati, contenuti l'oleandrina ed un veicolo sterile. L'oleandrina può essere sia sospeso sia disciolto, a seconda del veicolo e della concentrazione. Le soluzioni parenterali sono normalmente preparate sciogliendo l'oleandrina in un veicolo, sterilizzando per filtrazione, riempiendo appropriate fiale e sigillando. Vantaggiosamente, adiuvanti quali anestetici locali, conservanti e agenti tampone
30 possono essere sciolti nel veicolo. Per aumentare la stabilità, la composizione può essere congelata dopo aver riempito le fiale e rimosso l'acqua sotto vuoto. Le sospensioni parenterali sono preparate sostanzialmente nella stessa maniera, tranne che l'oleandrina può essere sospeso

nel veicolo invece che esservi dissolto, e sterilizzato tramite esposizione all'ossido di etilene prima di sospenderlo nel veicolo sterile. Vantaggiosamente, un tensioattivo o un agente bagnante può essere incluso nella composizione per facilitare la distribuzione uniforme del composto dell'invenzione.

- 5 Per somministrazione buccale o sublinguale le composizioni possono essere tavolette, pasticche, pastiglie o gel.

I composti possono essere farmaceuticamente formulati come supposte o clisteri di ritenzione, ad esempio supposte contenenti basi convenzionali come burro di cacao, polietilenglicole, o altri gliceridi, per una somministrazione rettale.

- 10 Un altro mezzo di somministrazione del composto oggetto d'invenzione riguarda il trattamento topico. Le formulazioni topiche possono contenere ad esempio pomate, creme, lozioni, gel, soluzioni, paste e/o possono contenere liposomi, micelle e/o microsfele. Esempi di unguenti comprendono unguenti oleosi quali oli vegetali, grassi animali, idrocarburi semisolidi, unguenti emulsionabili come idrossistearin solfato, lanolina anidra, vasellina idrofila, alcool cetilico, 15 glicerolo monostearato, acido stearico, unguenti idrosolubili contenenti glicoli di polietilene di vario peso molecolare. Le creme, come noto agli esperti di formulazione, sono liquidi viscosi o emulsioni semisolide, e contengono una fase oleosa, un emulsionante e una fase acquosa. La fase oleosa contiene generalmente vasellina e un alcol come l'alcool cetilico o stearico. Le formulazioni adatte per la somministrazione topica per l'occhio includono anche collirio, in cui il principio 20 attivo viene disciolto o sospeso in un adatto veicolo, in particolare un solvente acquoso per l'ingrediente attivo.

Preferibilmente l'oleandrina è somministrata direttamente nel cervello.

- Un ulteriore metodo di somministrazione dei composti dell'invenzione prevede il rilascio transdermico. Le tipiche formulazioni transdermiche comprendono vettori acquosi o non acquosi 25 convenzionali, come creme, olii, lozioni o paste o possono essere in forma di membrane o cerotti medicati.

Una recensione delle formulazioni è presente nel libro di Remington.

- I composti della presente invenzione possono essere impiegati per uso come agenti antibatterici da soli come monoterapia o in combinazione con altri agenti terapeutici sia tramite 30 somministrazione separata, o includendo due o più principi attivi nella stessa formulazione farmaceutica. I composti possono essere somministrati simultaneamente o in sequenza.

La combinazione può essere somministrata come composizione separata (simultanea sequenziale) dei singoli componenti del trattamento o come forma a singolo dosaggio contenente entrambi gli agenti. Quando i composti di questa invenzione sono in combinazione con altri

principi attivi, i principi attivi possono essere formulati separatamente in preparazioni singole scelte tra una delle forme summenzionate e poi fornito come preparazioni combinate, che sono date allo stesso tempo o a tempi diversi, o può essere formulata insieme in una preparazione a due o più componenti.

- 5 L'oleandrina può essere somministrata ai pazienti con una dose giornaliera totale di, per esempio da 0,001 a 1000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Le composizioni a unità di dosaggio possono contenere tali quantità o loro sottomultipli fino ad arrivare alla dose giornaliera. La determinazione del dosaggio ottimale per un particolare paziente è ben conosciuta dagli esperti del settore. Come è prassi comune, le composizioni sono normalmente accompagnate da
- 10 istruzioni scritte o stampate per l'uso nel trattamento in questione.

La presente invenzione verrà descritta in esempi non limitativi, facendo riferimento alle seguenti figure:

FIGURA 1: Espressione delle isoforme $\alpha 1$ e $\alpha 3$ della pompa sodio potassio nelle cellule umane U87MG, ed effetti del trattamento con oleandrina sulla vitalità e migrazione cellulare.

- 15 **A**, analisi mediante PCR semi-quantitativa, dell'espressione degli mRNA delle subunità $\alpha 1$ e $\alpha 3$ della pompa sodio potassio; **B**, istogramma relativo al numero di cellule U87MG vitali a tempi diversi di somministrazione di dosi crescenti di oleandrina (Ole), rispetto al controllo (cellule non trattate C) n=4; **C**, istogramma relativo all'indice chemotattico delle U87MG, in risposta a stimolazione con CXCL12 (50ng/ml) ed EGF (100 ng/ml), in presenza o meno di dosi crescenti
- 20 di oleandrina (n=4). I dati sono espressi come media \pm S.E.M. Analisi statistica One-Way ANOVA * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$.

FIGURA 2: Analisi dei volumi tumorali in topi impiantati con cellule U87MG, o GL261, trattati o meno con oleandrina. **A**, istogramma dei volumi tumorali misurati in topi SCID, inoculati con

25 cellule di glioblastoma umano U87MG, non trattati (V, n=4) o trattati con oleandrina 0.03 (n= 4) o 0.3 mg/kg (n=4). **B**, pannello di sinistra, istogramma dei volumi tumorali in topi normali, "wild-type" (wt) inoculati con cellule di glioblastoma murino GL261 non trattati (V, n=5) o trattati con oleandrina 0.03 (n= 5) o 0.3 mg/kg (n=9); pannello di destra, curva di sopravvivenza espressa in giorni, dei topi wt inoculati con le GL261 trattati o meno con oleandrina(0.3 milligrammi/Kg). I

30 dati sono espressi come media \pm S.E.M. Analisi statistica: Student T-test , * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (A, B); Kaplan-Meier test ** $p \leq 0.01$.

FIGURA 3: Espressione delle isoforme $\alpha 1$ e $\alpha 3$ della pompa sodio potassio nelle cellule murine GL261, ed effetti del trattamento con oleandrina sulla vitalità e migrazione cellulare.

A, analisi mediante PCR semiquantitativa, dell'espressione gli mRNA delle subunità $\alpha 1$ e $\alpha 3$ della pompa sodio potassio; **B**, istogramma relativo al numero di cellule di glioblastoma GL261 vitali a tempi diversi di somministrazione di dosi crescenti di oleandrina (Ole) $n=4$; **C**, istogramma relativo all'indice chemotattico delle GL261, in risposta a stimolazione con CXCL12 (50ng/ml) ed EGF (100 ng/ml), in presenza o meno di dosi crescenti di oleandrina ($n= 4$). I dati sono espressi come media \pm S.E.M. Analisi statistica One-Way ANOVA * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

FIGURA 4: Espressione della proteina BDNF. Analisi mediante ELISA dell'espressione di BDNF nell'emisfero controlaterale (C) e ipsilaterale (I) di topi wt non trattati(C) ($n= 6$) o trattati con Oleandrina ($n= 4$) dopo 17 giorni dall'inoculo delle GL261. I dati sono espressi come media \pm S.E.M. Analisi statistica mediante One Way ANOVA * $p < 0.05$.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

MATERIALI E METODI

15 **Analisi dell'espressione degli mRNA mediante PCR**

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule in coltura (in DMEM, GIBCO # 10566-016) di GBM umano, U87MG (ATCC, #HTB-14), e murine GL261 (DCTD TUMOR REPOSITORY, NCI, Maryland) 500 nanogrammi di questo RNA sono stati retrotrascritti in cDNA, che è stato poi usato per l'amplificazione mediante tecnica di r PCR dei trascritti specifici per la sub unità $\alpha 1$, $\alpha 3$ della pompa sodio-potassio umana e murina.. La reazione di PCR è la seguente: il DNA è denaturato per 2 minuti a 94°C e le sequenze vengono amplificate per 35 cicli a 60°C per 55 secondi, seguito da una fase di estensione finale a 72°C per 10 minuti. Il prodotto amplificato è fatto correre per elettroforesi su un gel di agarosio alla concentrazione di 2%.

25 **Analisi di sopravvivenza *in vitro***

Per verificare la vitalità delle cellule di glioblastoma umane U87MG e murine GL261 esposte a Oleandrina (Sigma #06069), le cellule sono state piastrate (12×10^4) su un apposito supporto in piastre per colture cellulari in terreno di coltura DMEM contenente o meno dosi diverse di oleandrina (0.3, 3 e $30 \mu\text{M}$). Dopo 3, 8, 20 e 40 ore le cellule vive sono state contate all'emocitometro. Nelle figure, i dati sono espressi come % di cellule sopravvissute, prendendo come 100% in numero di cellule vitali nei campioni non trattati con oleandrina.

Chemiotassi

Per verificare se l'oleandrina riduce la migrazione delle cellule tumorali umane e/o murine in risposta a specifici stimoli chemiotattici, le cellule sono state piastrate (10×10^3 U87MG, 40×10^3 GL261) in una cameretta su una membrana con pori larghi 8 μm , in terreno DMEM. Nello compartimento inferiore della cameretta viene aggiunta la CXCL12 (50ng/ml, Peprotech, #300-28) o l'EGF (100 ng/ml, Gibco #PHC7074) o solamente la soluzione salina come controllo. Le cellule sono lasciate migrare per 3-24 h ore attraverso i pori della membrana. Al termine del tempo, le cellule che non hanno migrato vengono lavate via, mentre quelle che hanno migrato sono colorate con uno specifico colorante blu e contate al microscopio (almeno 20 campi con ingrandimento 20x).

10

Inoculo intracranico di cellule di glioblastoma umane (U87MG) e murine (GL261)

In topi maschi di 8 settimane, dal peso di circa 22 gr (topi SCID per inoculo di U87MG, e topi C57BL/6 per inoculo di GL261, Charles River Laboratory), sono state inoculate intracerebralmente nello striato una sospensione cellulare di cellule di glioblastoma (U87MG 5×10^4 ; GL261 100×10^3) con una siringa (Hamilton) ad un flusso di 1 μl al minuto, a 3 mm di profondità. L'oleandrina è stata somministrata dopo 10 giorni dall'inoculo, alle dosi di 0.03 o 0.3 mg/kg con iniezioni intraperitoneali (i.p.), giornalmente, per 7 giorni al termine dei quali i topi sono stati sacrificati e analizzati. Come gruppo di controllo sono stati utilizzati maschi che hanno la stessa età e che subiscono le stesse procedure chirurgiche, ma trattati unicamente con il solvente (PBS GIBCO # 10010023) in cui è disciolta l'oleandrina.

20

Valutazione del volume tumorale

Per valutare l'estensione della massa tumorale, dopo 17 giorni dall'inoculo delle cellule tumorali U87MG o GL261, i topi trattati con oleandrina o con il solo veicolo (controllo), sono stati sacrificati, il loro cervello rimosso e trattato per ottenere delle fettine seriali di 20 micron di spessore, che vengono collezionate ad intervalli di 100 micron, e sottoposte a colorazione istologica con i coloranti ematossilina ed eosina. La massa tumorale presenta una colorazione viola rispetto al tessuto sano, che risulta invece di colore rosa chiaro. La determinazione della massa del tumore viene calcolata via software (Image Tool Software) attraverso l'integrazione delle aree tumorali.

30

Analisi di sopravvivenza *in vivo*

Dopo l'inoculo intra-striatale delle cellule di glioma murine GL261, i topi sono monitorati giornalmente. Il punto finale è stato definito dalla perdita di attività fisica o dalla morte. La probabilità di sopravvivenza è stata calcolata usando il metodo Kaplan-Meier.

5 Misurazione di BDNF

Al diciassettesimo giorno dopo l'inoculo delle cellule tumorali murine GL261, e quindi al settimo giorno di trattamento con oleandrina (0.3 mg/kg), sono state estratte le proteine dall'emisfero ipsilaterale (tumorale) e contro laterale (primo di tumore) dei topi e il livello di BDNF è stato misurato mediante tecniche ELISA, utilizzando un kit ELISA (Promega # G7610) specifico per il BDNF.

RISULTATI

La Fig. 1A mostra che le cellule di glioblastoma umano, in particolare la linea cellulare U87MG, sovraesprimono l'isoforma alfa 3 della pompa sodio-potassio, a cui si lega selettivamente l'oleandrina, rispetto all'isoforma alfa1, che non lega l'oleandrina (Fig. 1A).

Per valutare l'effetto dell'oleandrina sulla vitalità delle cellule U87MG, cellule in coltura sono state trattate per tempi diversi con diverse dosi di oleandrina (0.03-3-30uM). Dopo il trattamento si è valutata la vitalità delle U87MG mediante colorazione con un colorante specifico che rende blu solo i nuclei delle cellule vive: i dati ottenuti dimostrano che l'oleandrina riduce drasticamente la vitalità delle U87MG (Fig. 1B). Inoltre è stata analizzata la capacità delle cellule di migrare in risposta ad uno stimolo chemotattico (CXCL12 o EGF e si è evidenziato che l'oleandrina è in grado di inibire il movimento di queste cellule con un effetto dose dipendente, Fig. 1C).

Per verificare l'effetto *in vivo* dell'oleandrina sulle cellule di glioblastoma, cellule di glioblastoma umano U87MG, sono state impiantate, , mediante iniezione intracranica, nello striato di topi maschi di 8 settimane, dal peso di circa 20-25 gr (ceppo animali immunodeficienti SCID). Ad alcuni topi l'oleandrina è stata somministrata cronicamente, con quotidiane iniezioni intraperitoneali, a partir e dal decimo giorno successivo all'impianto delle cellule tumorali, per un totale di 7 giorni di trattamento. Si è scelto di iniziare il trattamento dopo 10 giorni dall'impianto delle cellule tumorali, per mimare quanto avviene nei pazienti, in cui i trattamenti farmacologici iniziano dopo che il tumore è stato diagnosticato. Il giorno dopo l'ultima somministrazione di oleandrina, i topi sono stati sacrificati, il loro cervello rimosso e trattato per ottenere delle fettine seriali di 20 micron di spessore collezionate ad intervalli di 100 micron. La determinazione del volume tumorale è stata fatta mediante colorazione istologica (ematossilina

ed eosina) delle fettine di cervello: la massa tumorale risulta di una colorazione più scura rispetto al restante tessuto sano. Il volume tumorale viene calcolato via software.

I dati sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione intraperitoneale di oleandrina alla concentrazione di 0.3 milligrammi/kg è in grado di ridurre significativamente il volume del glioblastoma (di circa il 70%), rispetto al volume misurato nei topi in cui è stato somministrato solo la soluzione salina (Fig. 2A).

Dal momento che le cellule del sistema immunitario contribuiscono alla determinazione del microambiente tumorale che facilita la progressione e lo sviluppo del glioblastoma, sono stati effettuati esperimenti in topi normali C57BL6 (provvisi del sistema immunitario), impiantati con una linea di glioblastoma murino, cellule GL261, e trattati con oleandrina. Anche in questi topi il trattamento con oleandrina ha ridotto significativamente il volume tumorale, rispetto a quello misurato nei topi non trattati (Fig. 2B, pannello di sinistra). Inoltre sono stati fatti esperimenti per valutare la curva di sopravvivenza degli animali a seguito dello sviluppo del glioblastoma, e come riportato in Fig. 2B (pannello di destra), i risultati dimostrano che vi è un aumento significativo ($p=0.006$) del tempo di sopravvivenza in topi trattati con oleandrina (34 ± 3 giorni) rispetto ai topi di controllo (23 ± 1 giorni).

La Fig. 3A mostra che nelle cellule murine GL261 non vi è la sovra-espressione dell'isoforma alfa3 della pompa sodio-potassio rispetto l'isoforma alfa1, (contrariamente a quanto avviene nelle cellule umane U87MG). Inoltre, le cellule GL261 non muoiono né riducono la loro capacità migratoria quando trattate con oleandrina (Fig. 3B, C)

Da questi dati, è possibile ipotizzare che gli effetti protettivi dell'oleandrina in questo modello sperimentale verosimilmente passano per una modulazione del microambiente tumorale.

Inoltre, è stato dimostrato che la sovra-produzione di BDNF può avere effetti sul microambiente tumorale contribuendo alla riduzione dello sviluppo del GBM (Garofalo et al. 2015). Pertanto nella presente invenzione sono stati misurati i livelli di espressione di BDNF nel cervello dei topi impiantati con GL261 e trattati o meno con oleandrina. Come riportato in Fig. 4, nei topi trattati con oleandrina vi è una sovra-produzione di BDNF rispetto a quelli non trattati.

BIBLIOGRAFIA

30 Nasu S., Milas L, Kawabe S, Raju U, Newman R. (2002) Enhancement of radiotherapy by oleandrin is a caspase-3 dependent process. *Cancer Lett.* 185(2):145-51.

Raghavendra PB, Sreenivasan Y, Manna SK. (2007) Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol*.44(9):2292-302

- 5 Van Kanegan MJ1, He DN, Dunn DE, Yang P, Newman RA, West AE, Lo DC.(2014) BDNF mediates neuroprotection against oxygen-glucose deprivation by the cardiac glycoside oleandrin. *JNeurosci*. 34(3):963-8.

- 10 Garofalo S, D'Alessandro G, Chece G, Brau F, Maggi L, Rosa A, Porzia A, Mainiero F, Esposito V, Lauro C, Benigni G, Bernardini G, Santoni A, Limatola C. (2015). Enriched environment reduces glioma growth through immune and non-immune mechanisms in mice. *NatCommun*. 6:6623.

Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*", Lippincott Williams & Wilkins, 2000).

RIVENDICAZIONI

- 1- Oleandrina per uso nel trattamento e/o la prevenzione di un tumore cerebrale.
- 2- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 1 in cui il tumore cerebrale è un glioma.
- 3- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 2 in cui il glioma è scelto nel gruppo
5 consistente in: glioblastoma, astrocitoma anaplastico, astrocitoma diffuso, astrocitomapilocitico, oligodendroglioma, ependimoma.
- 4- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 1 in cui il tumore cerebrale è medulloblastoma o meningioma.
- 5- Oleandrina per uso secondo una qualsiasi rivendicazione da 1 a 4 in cui il tumore cerebrale
10 è primario o secondario.
- 6- Oleandrina per uso secondo una qualsiasi rivendicazione da 1 a 5 in cui il tumore cerebrale è primario.
- 7- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione da 1 a 6 in combinazione con un ulteriore trattamento antitumorale e/o terapeutico.
- 8- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 7 in cui il trattamento anti-tumorale è scelto
15 nel gruppo consistente in: radioterapia, chemioterapia.
- 9- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 8 in cui la chemioterapia è scelta nel gruppo consistente in: agenti alchilanti, antimetaboliti, antibiotici citotossici e correlati, antimitotici di origine naturale, terapie mirate, ormoni e antagonisti ormonali,
20 modificatori biologici di risposta e agenti vari.
- 10- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 9 in cui la chemioterapia è la temozolomide.
- 11- Oleandrina per uso secondo la rivendicazione 9 in cui il trattamento terapeutico è scelto nel gruppo consistente in: agente antiinfiammatorio, agente antidolorifico, agente antiemetico.
- 25 12- Composizione farmaceutica comprendente oleandrina per uso nel trattamento e/o la prevenzione di un tumore cerebrale.
- 13- Composizione per uso secondo la rivendicazione 12 comprendente ulteriormente un agente antitumorale e/o terapeutico.

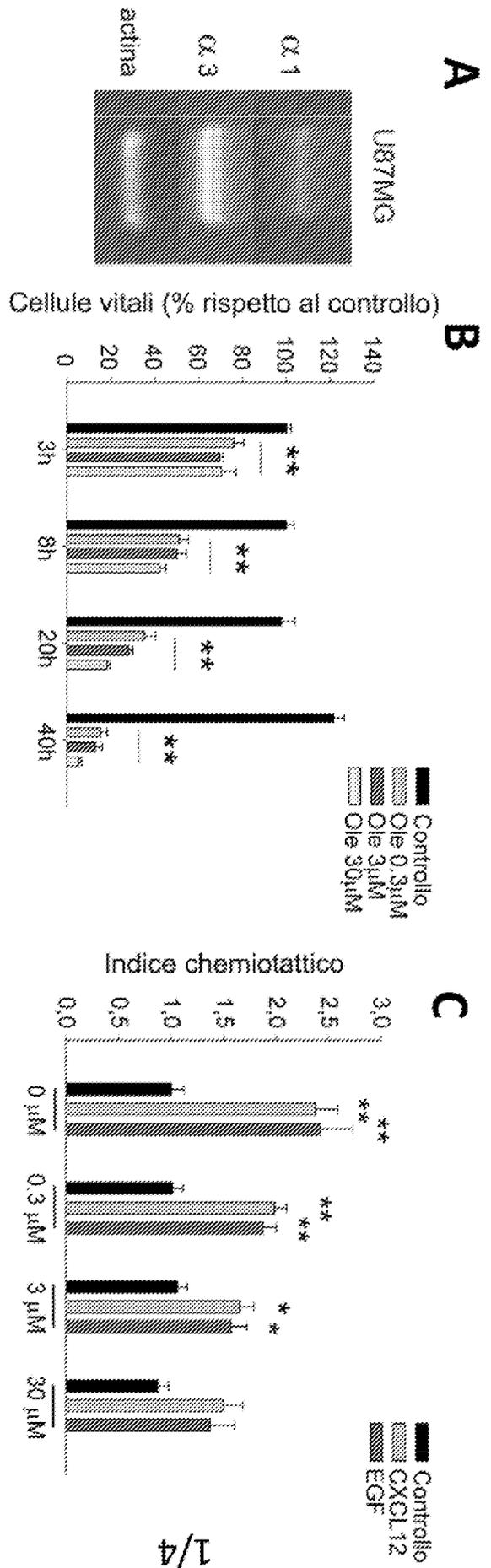


Fig. 1

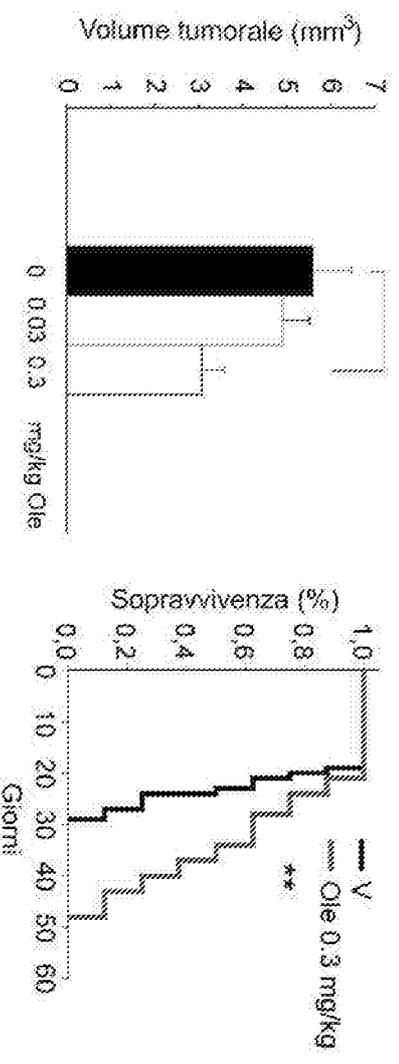
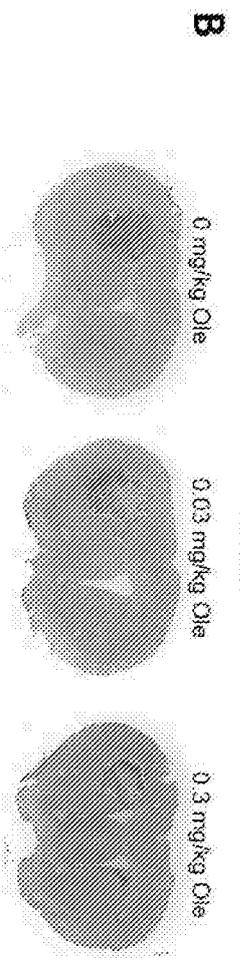
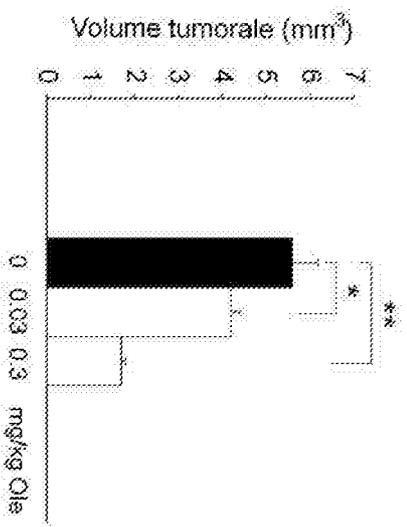
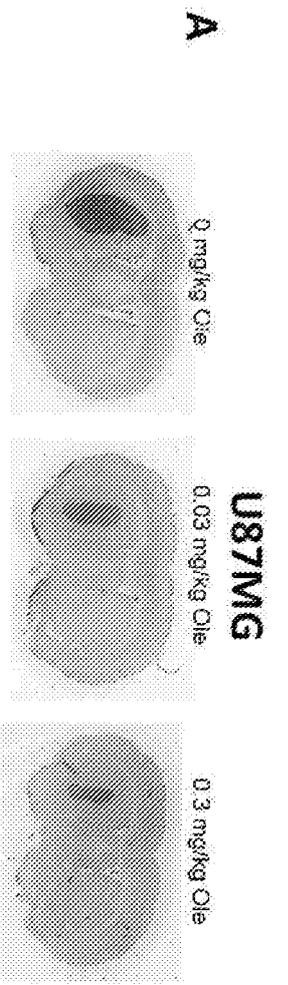


Fig. 2

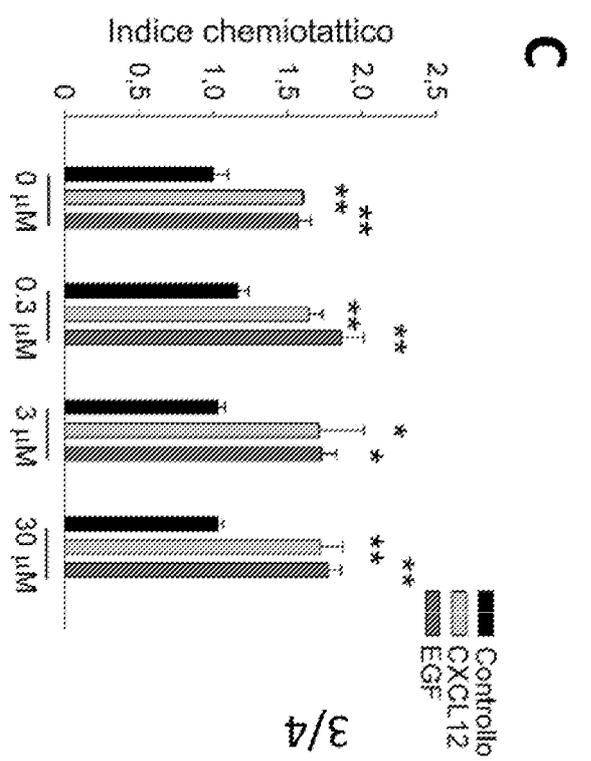
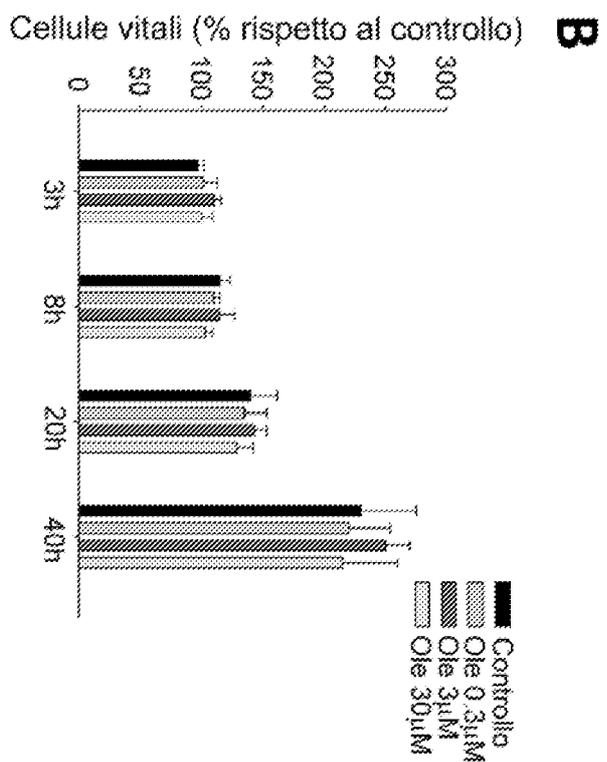
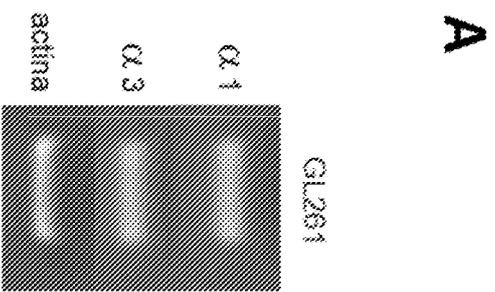


Fig. 3

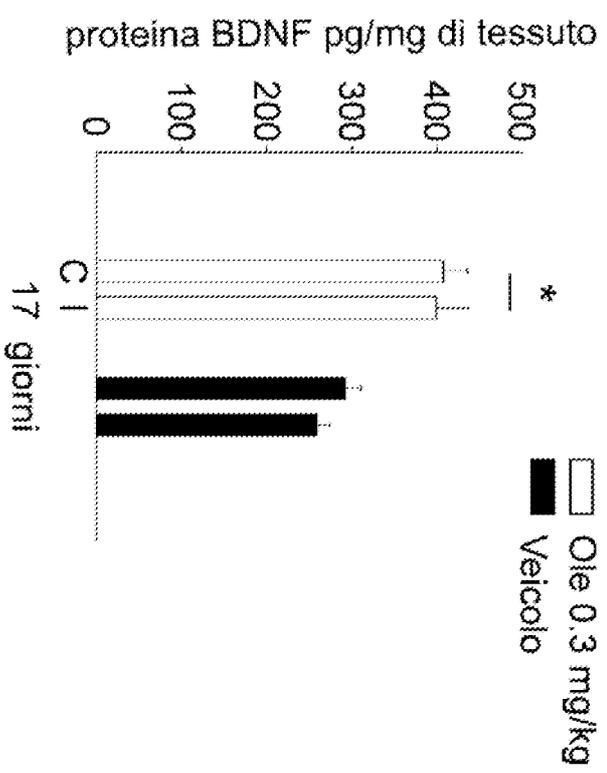


Fig. 4