

## Progressi nella terapia locale per il glioblastoma nella lotta contro il tumore.

Thomas S. van Solinge<sup>1,2</sup>, Lisa Nieland<sup>1,2</sup>, E. Antonio Chiocca<sup>3</sup>,  
MARIKE L. D. BROEKMAN<sup>1,2,4</sup>

**Sommario** Nonostante i progressi in neurochirurgia, chemioterapia e radioterapia, il glioblastoma rimane uno dei tumori maligni del sistema nervoso centrale più resistenti al trattamento, e il tumore inevitabilmente si ripresenta. La maggior parte delle recidive appare all'interno o vicino alla cavità di resezione, di solito nell'area che ha ricevuto la più alta dose di radiazioni. Ci sono molte nuove terapie che si concentrano sulla lotta contro queste recidive locali attuando trattamenti direttamente nel letto del tumore o nelle sue vicinanze. In questa rassegna, discutiamo gli ultimi sviluppi nella terapia locale per il glioblastoma, concentrandoci sui recenti studi pre-clinici e clinici. Gli approcci che discutiamo includono nuove tecniche intraoperatorie, vari trattamenti della cavità chirurgica, iniezioni stereotassiche direttamente nel tumore e nuovi sviluppi nella somministrazione di farmaci potenziata da convezione e trattamenti intrarteriosi.

**Introduzione** Il glioblastoma rimane uno dei tumori maligni neurologici più letali, nonostante decenni di sforzi incessanti da parte della comunità medica e di ricerca per combattere questa malattia. Poche nuove terapie hanno mostrato efficacia per la mitigazione del glioblastoma dopo l'introduzione del temozolomide come parte del protocollo Stupp standard di cura nel 2005 (rif.<sup>1</sup>). Prima dell'introduzione del protocollo Stupp, la sopravvivenza mediana era di circa 12 mesi, che da allora è aumentata a 16 mesi grazie a vari miglioramenti nel trattamento, tra cui l'ottimizzazione dello stesso protocollo Stupp, i progressi nella diagnostica per immagini e nella radioterapia e la resezione totale macroscopica controllata da mappatura intraoperatoria<sup>2,3</sup>. Inoltre, la terapia dei tumori con campi elettrici (TTFields), in cui la mitosi viene ostacolata dall'applicazione di campi elettrici alternati, ha prodotto miglioramenti nella sopravvivenza globale a lungo termine (OS) in pazienti con

glioblastoma primario o ricorrente<sup>4,5</sup>. Anche se questi miglioramenti sono incoraggianti, le prospettive a lungo termine per i pazienti con glioblastoma rimangono estremamente scarse. L'assenza di nuove modalità di trattamento per il glioblastoma non si deve certo alla mancanza di sforzi: attualmente, nella categoria "glioblastoma" su ClinicalTrials.gov appaiono 1593 studi registrati. La resistenza del glioblastoma ai trattamenti è ampiamente nota e può essere spiegata considerando diverse caratteristiche distintive del tumore. Il glioblastoma è notoriamente eterogeneo, con un'abbondanza di vie di segnalazione anche all'interno della stessa massa tumorale, limitando così le opzioni per terapie mirate<sup>6,7</sup>. Il microambiente tumorale rafforza la resistenza del glioblastoma alle radiazioni e alla chemioterapia<sup>8</sup>, e la bassa immunogenicità del glioblastoma ostacola una forte risposta immunologica<sup>9</sup>. Inoltre, l'infiltrazione di cellule glioma (staminali) in profondità nel cervello esclude un tratta-

<sup>1</sup>Departments of Neurology and Radiology, Massachusetts General Hospital, and NeuroDiscovery Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands.

<sup>3</sup>Harvey Cushing Neuro-Oncology Laboratories, Department of Neurosurgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

<sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Haaglanden Medical Center, The Hague, Netherlands.

e-mail: tsvarsolinge@gmail.com

## Punti chiave

- Il glioblastoma si ripresenta quasi sempre in corrispondenza o in prossimità della cavità di resezione, all'interno della zona di applicazione della radioterapia.
- La terapia locale offre un'opportunità unica di somministrazione di alte dosi di farmaci nell'area con la più alta concentrazione di cellule di glioblastoma, con limitati eventi avversi sistemici.
- Molti studi di fase I e II che sperimentano varie forme di terapia locale sono stati — e vengono tuttora — condotti sul glioblastoma, e tanti di essi mostrano un grande potenziale di miglioramento della sopravvivenza, sia libera da progressione sia complessiva.
- Gli ampi studi randomizzati di fase III che confrontano le terapie locali con lo standard di cura sono stati ostacolati dagli alti costi, dall'intensità del lavoro e dalle difficoltà nel reclutamento dei pazienti.
- È necessaria una stretta collaborazione tra clinici, ricercatori, aziende e istituzioni governative per facilitare la transizione dal laboratorio agli studi di fase I e II, e a studi controllati randomizzati su larga scala.

mento efficace con la sola resezione<sup>10</sup>. Per di più, la barriera emato-encefalica (*blood brain barrier*, BBB) impedisce a molti chemioterapici somministrati per via sistemica di raggiungere concentrazioni sufficienti nel cervello senza provocare gravi eventi avversi. Attualmente, trovare una cura per il glioblastoma rimane una prospettiva lontana, e gli sforzi si stanno invece concentrando sul ritardare l'arrivo della recidiva. Circa l'80% delle recidive del glioblastoma insorgono all'interno o al margine del campo di radiazione, e questa recidiva locale è associata a una sopravvivenza libera da progressione (*progression free survival*, PFS) sostanzialmente ridotta<sup>11</sup>. Inoltre, l'estensione della resezione è una variabile cruciale: i pazienti che sono stati sottoposti a resezioni totali macroscopiche hanno una OS significativamente più lunga rispetto ai pazienti con resezioni subtotali<sup>12</sup>. Alcuni centri di cura hanno dimostrato ulteriori miglioramenti nei risultati dopo resezioni sopratotali<sup>13</sup>, ma sono necessarie ulteriori prove per confermare queste affermazioni<sup>14</sup>. Insieme, questi risultati suggeriscono che la cavità di resezione è un luogo importante per prevenire la recidiva tumorale precoce. Inoltre, l'isolamento del cervello dalla BBB crea un'opportunità unica per fornire un trattamento aggressivo a livello locale con un rischio limitato di tossicità sistemica.

In questa rassegna, discutiamo le terapie locali attuali e future per il glioblastoma, esaminando il trattamento della cavità tumorale (Fig. 1) e altri approcci diretti contro il tumore (Fig. 2). Evidenziamo gli studi di riferimento per fornire una panoramica delle terapie locali che sono state — o sono attualmente — esplorate nei pazienti con glioblastoma.

## Modalità di trattamento intraoperatorio

Nel corso degli anni, sono stati introdotti molti strumenti per aiutare il chirurgo nella resezione delle lesioni nel cervello. Invenzioni come i microscopi chirurgici, l'imaging ad alta risoluzione, la chirurgia guidata dalla fluorescenza e la neuronavigazione sono ampiamente utilizzate in neurochirurgia, ma una loro rassegna completa va oltre lo scopo di questa rassegna. In questa sezione, descriviamo i nuovi trattamenti intraoperatori che aiutano la distruzione diretta del tessuto maligno nel momento dell'intervento, che possono interrompere la BBB e migliorare la risposta immunitaria dopo l'intervento.

### Terapia termica localizzata

La terapia termica si basa sulla capacità del calore di indurre apoptosi e necrosi nel cervello<sup>15</sup>.

Sia studi in vitro sia su animali hanno dimostrato che le cellule di glioma sono particolarmente vulnerabili al calore<sup>16</sup>, un effetto che viene probabilmente potenziato nei pazienti dalla neovascolatura relativamente fragile e dal microambiente ipossico dei glioblastomi<sup>17</sup>.

Oltre all'apoptosi e alla necrosi diretta, l'ipertermia può sensibilizzare le cellule di glioma alla radioterapia<sup>18</sup> e alla chemioterapia<sup>19</sup>, innescare una risposta immunitaria<sup>20</sup> e fornire una rottura transitoria della BBB<sup>15</sup>. Attualmente, tre metodi — terapia termica interstiziale laser (LITT), ipertermia magnetica e ultrasuoni focalizzati (FUS) — sono in varie fasi di approvazione normativa per il trattamento locale del glioblastoma.

**Terapia termica interstiziale laser.**

Nella LITT (*Laser interstitial thermal therapy*), una fibra ottica viene inserita stereotassicamente nel tumore attraverso un foro (Fig. 1a). Il tessuto viene quindi riscaldato con luce laser (a una lunghezza d'onda di 1064 nm o 980 nm, a seconda del sistema utilizzato)<sup>21</sup> a 42,5-45,5 °C per diversi minuti, mentre viene impiegata termometria a MRI per monitorare in tempo reale la temperatura nella lesione<sup>22</sup>. Il monitoraggio costante è vitale, poiché le proprietà ottiche dei tessuti variano, specialmente nei tumori. LITT è stata sviluppata dai primi anni Novanta e vari studi hanno valutato la sua sicurezza ed efficacia per il trattamento del glioblastoma<sup>22</sup>. Anche se la sicurezza e il targeting sono migliorati con l'introduzione della termometria intraoperatoria a MRI, non sono disponibili studi clinici randomizzati di LITT per il glioblastoma. Un'analisi retrospettiva ha confrontato 24 pazienti trattati con LITT per il glioblastoma primario con campione (coorte) di controllo, abbinato per sesso, età, dimensioni e sede del tumore, che era stato sottoposto solo a biopsia<sup>23</sup> (Tabella 1). Non sono state osservate differenze nella PFS (*progression-free survival*) o nella OS, ma quattro dei 24 pazienti trattati con LITT hanno sperimentato un peggioramento permanente dei loro sintomi neurologici. Allo stesso modo, in 54 pazienti trattati con LITT per il glioblastoma primario o ricorrente, il 15,5% ha sviluppato gravi eventi avversi, come edema cerebrale, convulsioni e idrocefalo, con due pazienti morti entro 30 giorni dall'intervento, e la OS non è migliorata<sup>24</sup> (Tabella 1).

Bilanciare l'efficacia del trattamento con gli eventi avversi è una delle sfide poste dalla LITT. L'estensione dell'ablazione sembra costituire un importante fattore determinante per l'efficacia: l'ablazione quasi totale è stata correlata a migliori PFS e OS in singoli studi<sup>23,25</sup> e in una rassegna della letteratura disponibile<sup>21</sup>. La maggiore aggressività del trattamento è probabile che aumenti il rischio di eventi avversi, con tassi di complicazione

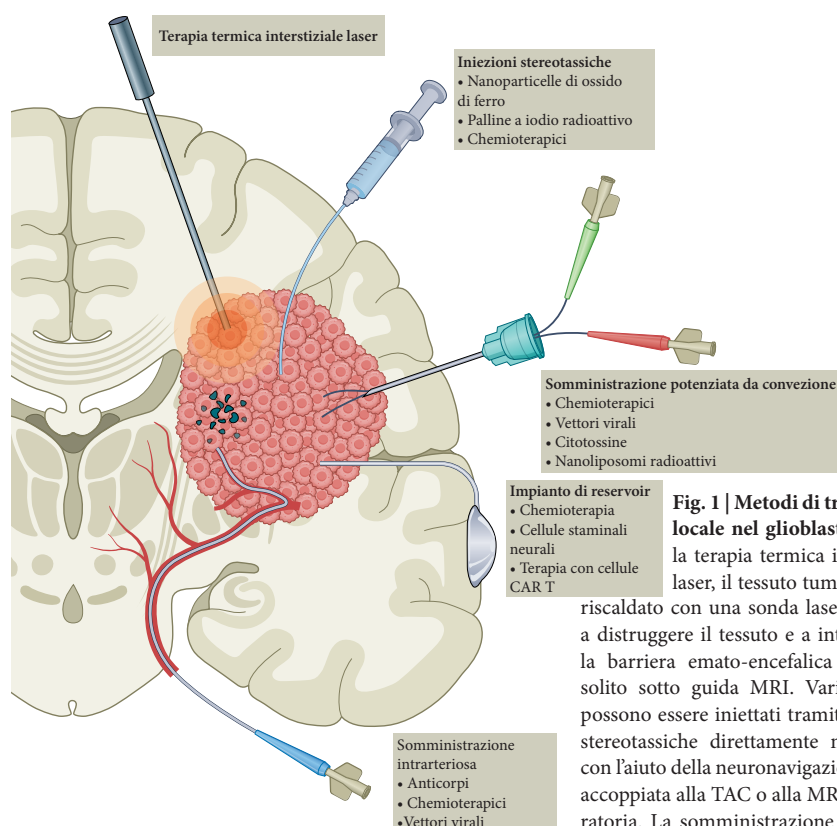
fino al 33%, come evidenziato in una rassegna incentrata sul glioblastoma da poco diagnosticato<sup>26</sup>. Attualmente, la LITT potrebbe avvantaggiare i pazienti con tumori inoperabili a causa della localizzazione o dello scarso stato funzionale, e potrebbe anche presentare vantaggi in termini di costo-efficacia in gruppi di pazienti selezionati<sup>27,28</sup>. Tuttavia, sono necessari studi ben progettati per valutare la reale efficacia della LITT, auspicabilmente in combinazione con altri trattamenti. Diversi studi sono in corso o sono stati recentemente completati, in cui si è studiata la LITT in combinazione con la terapia antiPD1 (ClinicalTrials.gov NCT03341806 e NCT03277638), la radioterapia (NCT04181684), la lomustina (NCT03022578) o il protocollo Stupp (NCT02970448).

**Ipertermia magnetica.** L'ipertermia magnetica è una tecnica in cui il calore viene generato stimolando nanoparticelle magnetiche all'interno del tumore o della cavità di resezione tramite l'applicazione di un campo magnetico alternato esterno (Figg. 1b,2a). Cicli ripetuti di termoterapia possono essere somministrati senza ulteriori interventi chirurgici, e il trattamento ha il potenziale di sinergizzare con radioterapia o chemioterapia. Uno studio prospettico di fase II ha esaminato la fattibilità dell'ipertermia magnetica in 59 pazienti con glioblastoma ricorrente<sup>29</sup>. Le nanoparticelle di ossido di ferro sono state iniettate nel tumore utilizzando una struttura stereotassica e sei sessioni di termoterapia di 1 ora a cadenza bisettimanale sono state combinate con la radioterapia stereotassica per un totale di 30 Gy (Tabella 1). Sono stati riscontrati possibili miglioramenti nella sopravvivenza, anche se alcuni pazienti hanno sperimentato eventi avversi, come convulsioni durante il trattamento o peggioramento dei disturbi motori dopo il trattamento<sup>29</sup>.

Un approccio alternativo consiste nel rivestire dopo la resezione la cavità di resezione con nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro. In uno studio di fase I in sei pazienti

con glioblastoma recidivato, un impasto contenente queste particelle è stato depositato nella cavità di resezione dopo la rimozione del tumore<sup>30</sup> (Tabella 1). I partecipanti hanno anche ricevuto 60 Gy di radioterapia stereotassica. Nessun effetto avverso degno di nota è stato osservato immediatamente dopo sei cicli di trattamento, ma tra i 2 e i 5 mesi dopo, tutti i pazienti avevano sviluppato una reazione di *tumor flare* con edema prominente intorno alle nanoparticelle. Di conseguenza, tutti i pazienti hanno richiesto corticosteroidi ad alte dosi e quattro dei sei sono stati sottoposti a una craniotomia ripetuta per rimuovere le particelle. La chirurgia ha alleviato i sintomi acuti, ma la maggior parte dei pazienti ha richiesto corticosteroidi a lungo termine per sopprimere completamente l'edema. Analisi istologica e citometria a flusso del tessuto acquisito durante la rimozione delle particelle ha mostrato un aumento dell'infiltrazione di cellu-

leCD8<sup>+</sup> T, cellule CD4<sup>+</sup> T e macrofagi CD63<sup>+</sup> nelle aree contenenti un gran numero di nanoparticelle, indicando che si era innescata una risposta immunitaria<sup>30</sup>. Come per la LITT, l'ipertermia magnetica è ancora a un primo stadio. Gli eventi avversi sono comuni, possono essere gravi e sono poco conosciuti, e l'efficacia non è stata ancora dimostrata in modo convincente. L'ipertermia magnetica intracavitaria sembra indurre una potente risposta infiammatoria e, poiché i glioblastomi sono noti per essere tumori immunologicamente "freddi", questa terapia potrebbe contribuire a migliorare la risposta immunitaria e/o l'efficacia di terapie immunitarie<sup>31</sup>. Attualmente, tuttavia, i meccanismi e le strategie di trattamento ottimali devono ancora essere completamente chiariti. Un nuovo studio di fase I è attualmente in via di sviluppo per identificare la temperatura ottimale (45 °C, 50 °C o 55 °C) per il trattamento intracavitario nel glioblastoma ricorrente<sup>30</sup>.



**Fig. 1 | Metodi di trattamento locale nel glioblastoma.**

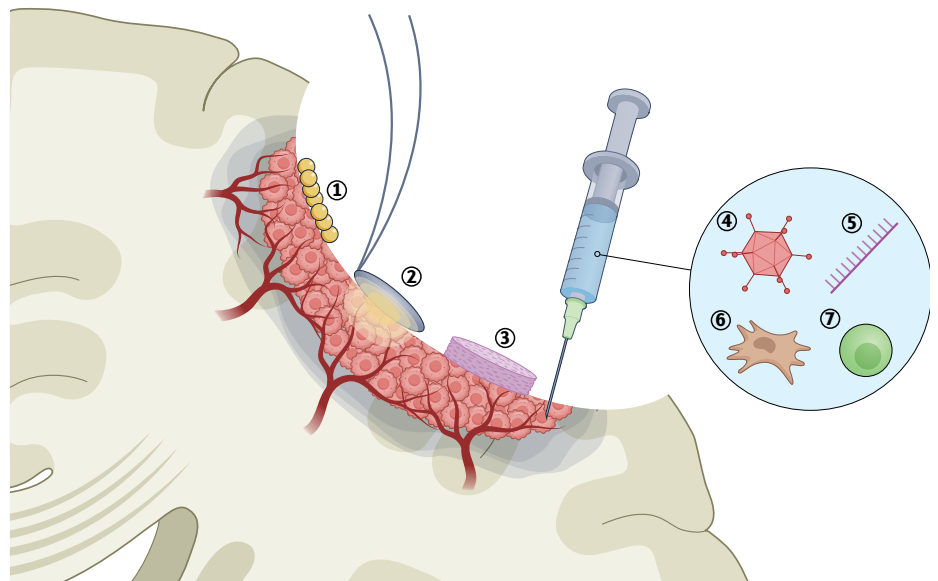
Nella terapia termica interstiziale laser, il tessuto tumorale viene riscaldato con una sonda laser, andando a distruggere il tessuto e a interrompere la barriera emato-encefalica (BBB), di solito sotto guida MRI. Vari composti possono essere iniettati tramite iniezioni stereotassiche direttamente nel tumore con l'aiuto della neuronavigazione, spesso accoppiata alla TAC o alla MRI intraoperatoria. La somministrazione potenziata

da convezione comporta l'iniezione continua di vari composti sfruttando un gradiente di pressione per migliorarne la distribuzione. Possono essere impiantati reservoir Ommaya o Rickham, che consentono iniezioni intermittenti di terapia per un periodo di tempo esteso. I cateteri possono essere posizionati nel tumore, o nella cavità di resezione o nei ventricoli cerebrali. Per la somministrazione intrarteriosa, i cateteri possono essere posizionati direttamente nelle arterie di alimentazione, permettendo la somministrazione locale di terapie ad alte dosi. Questa tecnica può essere combinata con la rottura della BBB. CAR, recettore dell'antigene chimerico.

**Ultrasuoni focalizzati.** La FUS (*focused ultrasound*) sta rapidamente emergendo come un nuovo strumento entusiasmante per il trattamento di una vasta gamma di malattie neurologiche<sup>32</sup>. Nel caso del glioblastoma, gli sforzi si concentrano principalmente sull'utilizzo di FUS per interrompere transitoriamente la BBB, migliorando così la somministrazione dei chemioterapici che normalmente mostrano scarsa diffusione nella BBB<sup>33</sup>. La FUS può anche essere usata per la termoblazione ed è stata approvata dalla FDA per la talamotomia in pazienti con tremore essenziale<sup>34</sup>. Ad oggi, solo uno studio sperimentale, pubblicato nel 1991, ha valutato la FUS nel glioblastoma<sup>35</sup>. Questo studio ha valutato l'uso e le impostazioni ottimali di un trasduttore a elemento singolo, che è stato posizionato all'interno del tumore attraverso una craniotomia, in

15 pazienti con glioblastoma. I metodi utilizzati in questo studio sono diventati obsoleti da tempo, e lo studio offre una visione clinica limitata per il trattamento moderno del glioblastoma.

Tuttavia, i moderni sviluppi nelle tecniche FUS, compresa la flessibilità e la precisione notevolmente migliorate, potrebbero scoprire nuove possibilità per il trattamento del glioblastoma. Gli studi in corso (per esempio, NCT03712293 e NCT03551249) stanno valutando se la rottura della BBB con la FUS può migliorare gli effetti della chemioterapia sistemica. Uno studio mira a combinare la FUS con la sensibilizzazione mediante acido 5-aminolevulinico (5-ALA; NCT04845919), mentre un altro sta esplorando la possibile sinergia con la radioterapia (NCT04988750) (Tabella supplementare 1).



**Fig. 2 | Trattamenti della cavità tumorale per il glioblastoma.** L'iniezione di nanoparticelle di ossido di ferro (1) permette l'ipertermia magnetica. Nella terapia fotodinamica (2), vengono applicati alla cavità degli agenti fotosensibilizzanti che vengono attivati dalla luce ad una lunghezza d'onda specifica per generare specie reattive dell'ossigeno. Impianto di wafer (3) progettati per rilasciare la chemioterapia. Iniezione di vettori virali (4), oligodeossinucleotidi immunostimolanti (5), cellule staminali neurali ingegnerizzate (6) o cellule T del recettore dell'antigene chimerico (CAR) (7) nella parete della cavità.

### Terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica (*photodynamic therapy*, PDT) utilizza agenti fotosensibilizzanti che, dopo l'attivazione con la luce a una certa lunghezza d'onda, generano specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS)<sup>36</sup> (Fig. 1b). Le ROS interagiscono con il DNA, le proteine, i lipidi e altre macromolecole per interrompere vari

*pathway* cellulari, compresi i danni estesi al DNA, ottenendo l'apoptosi della cellula<sup>37</sup>. Inoltre, la PDT danneggia le cellule endoteliali vascolari, portando alla trombosi locale, alla costrizione dei vasi e, infine, alla distruzione della microvascolatura<sup>38</sup>. Insieme, questi eventi inducono anche una forte risposta immunitaria anti-glioma, come dimostrato in modelli



murini<sup>39</sup>. Sono stati studiati principalmente due agenti fotosensibilizzanti nel glioblastoma: Photofrin, che è approvato dalla FDA per il trattamento del cancro all'esofago<sup>40</sup>, e 5-ALA, che è approvato per la visualizzazione delle cellule di glioblastoma durante la chirurgia<sup>41</sup>.

È stato pubblicato uno studio di fase III che ha coinvolto Photofrin nel trattamento del glioblastoma<sup>42</sup>. I pazienti che hanno ricevuto cinque sessioni giornaliere di PDT tramite un laser impiantato nella cavità di resezione hanno mostrato una migliore sopravvivenza rispetto ai pazienti che non hanno ricevuto PDT (Tabella 1). Una delle principali variabili di confondimento consiste nel fatto che coloro che hanno ricevuto questa terapia sono stati anche sottoposti a resezione guidata dalla fluorescenza, che di per sé migliora i risultati<sup>41</sup>. Solo il 15% dei pazienti di entrambi i gruppi ha ricevuto temozolomide, limitando così la generalizzabilità dei risultati.

Uno studio di fase I ha studiato la PDT intraoperatoria, utilizzando 5-ALA, in 20 pazienti con glioblasto-

ma ricorrente<sup>43</sup> (Tabella 1). La resezione guidata dal 5-ALA è stata seguita dall'inserimento di uno o quattro diffusori laser cilindrici nella cavità di resezione. La PDT è stata quindi somministrata con il paziente in anestesia generale per 60 minuti. La risonanza magnetica postoperatoria ha mostrato un edema citotossico lungo il margine della cavità di resezione con aumento del contrasto osservato in alcuni pazienti, che alla fine è regredito o scomparso dopo 4-5 mesi. La PFS mediana era di 6 mesi, che è paragonabile a quella ottenuta con le cure standard nel glioblastoma ricorrente<sup>44</sup>.

Uno dei principali inconvenienti della PDT è che la luce laser deve raggiungere le cellule che contengono gli agenti sensibilizzanti. Con i laser comunemente usati con una gamma di lunghezza d'onda di 630-690 nm, nella maggior parte dei tessuti la penetrazione supera raramente i 5mm<sup>45</sup>. Gli effetti della PDT potrebbero ottenere una maggiore penetrabilità, con la risonanza magnetica che mostra una penetrazione media di 9,1mm (rif.<sup>43</sup>)

**Tabella 1 | Studi clinici nel glioma di grado elevato: modalità di trattamento intraoperatorio**

Studio	Trattamento	Tipo di studio	Campione (coorte) dei pazienti	Risultati	Eventi avversi (numero dei pazienti)
<b>Termoterapia localizzata</b>					
Kamath et al. (2019) <sup>24</sup>	LITT seguita da chemioterapia standard	Coorte retrospettiva	Glioblastoma primario o ricorrente (n=54)	OS mediana: 11,5 mesi; PFS mediana: 6,6 mesi	Edema cerebrale (3), convulsioni (3), idrocefalo (1), infezione postoperatoria con conseguente morte (1)
Mohammadi et al. (2019) <sup>23</sup>	LITT seguita da chemioterapia standard o sola chemioterapia standard	Coorte retrospettiva, con abbinamenti	Glioblastoma primario (n=48)	OS mediana: 14,4 mesi nel gruppo LITT, 15,8 in quelli di controllo; PFS mediana: 4,3 e 5,9 mesi	Peggioramento transitorio di deficit neurologici (6), deficit permanente (2)
Maier-Hauff et al. (2011) <sup>29</sup>	Iniezione stereotassica di particelle magnetiche + 30 Gy di radioterapia	Fase II	Glioblastoma primario (n=7) o ricorrente (n=59)	OS mediana: 13 mesi; PFS mediana: 8 mesi	Convulsioni (15), peggioramento transitorio di deficit neurologici (14)
Grauer et al. (2019) <sup>30</sup>	Particelle intracavità superparamagnetiche di ossido di ferro + 60 Gy di radioterapia	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=6)	OS mediana: 8,3 mesi; PFS mediana: 6,25 mesi	Infiammazione ed edemache hanno richiesto trattamento (6), rimozione di particelle a causa dell'effetto massa (4)

PDT					
Schipmann et al. (2020) <sup>43</sup>	PDT peroperatoria della cavità di resezione In pazienti trattati con acido 5-aminolevulinico	Fase I	Glioma di alto grado ricorrente (n=20)	OS mediana non ottenuta, 75% vivi dopo 6 mesi; PFS mediana: 6,0 mesi; 75% con tumori recidivi al sito della PDT	Infezione del sito chirurgico (1)
Eljamel et al. (2008) <sup>42</sup>	Resezione guidata da fluorescenza seguita da 5 sessioni di PDT + radioterapia o resezione guidata non da fluorescenza + radioterapia	Fase III	Glioblastoma primario (n=27)	OS mediana: 12,2 mesi nel gruppo PDT, 5,6 in quelli di controllo; PFS mediana: 8,6 e 4,8 mesi	Trombosi venosa profonda (3)

e l'analisi istopatologica post-mortem che indica una penetrazione fino a 12,7mm (rif.<sup>46</sup>). Tuttavia, le cellule maligne più profonde saranno ancora del tutto inalterate. Inoltre, uno studio ha dimostrato che il 75% delle recidive tumorali si è verificato all'interno dell'area della PDT<sup>43</sup>, mettendo in dubbio gli effetti a lungo termine anche nella cavità di resezione stessa. Tuttavia, vista la disponibilità clinica del 5-ALA e la natura a basso rischio di questa terapia, si spera in ulteriori studi sulla sua applicabilità al glioblastoma<sup>47</sup>. I dati preliminari dello studio INDYGO di fase I hanno dimostrato la sicurezza e la fattibilità della PDT a base di 5-ALA nel glioblastoma primario<sup>47</sup>. Altri due studi forniranno ulteriori dati sulla PDT stereotassica nel glioblastoma primario (NCT03897491) e ricorrente (NCT04469699) (Tabella supplementare 1).

**Somministrazione locale della chemioterapia**  
**Somministrazione potenziata da convezione**

La somministrazione potenziata da convezione (*convection-enhanced delivery*, CED) (Fig. 1c) è un metodo di somministrazione più che una terapia a sé. I composti iniettati direttamente nel parenchima cerebrale o nel tessuto del tumore di solito si diffondono poco; per esempio, un'immunoglobulina può impiegare fino a 3 giorni per diffondersi a 1 mm da un sito di iniezione nel cervello<sup>48</sup>. La CED stabilisce un gradiente di pressione positiva e può essere lasciato in situ per un lungo periodo di tempo. Questo approc-

cio migliora la distribuzione spaziale, perché per trattare una zona di area simile richiede concentrazioni inferiori di composti. La CED funziona indipendentemente dal peso molecolare o dalla diffusività di un agente<sup>49</sup>. Sebbene la CED abbia avuto successo in laboratorio, la traduzione in clinica si è dimostrata difficile, e sono stati identificati diversi ostacoli che devono essere superati per migliorare l'uso della CED nei pazienti<sup>49</sup>. Il posizionamento accurato della cannula è una di esse, con uno studio importante (PRECISE, discusso in dettaglio più avanti) che ha registrato come meno del 70% delle cannule fossero state posizionate secondo le linee guida del protocollo<sup>50</sup>. L'analisi post-hoc ha poi suggerito che il corretto posizionamento del catetere era correlato a un aumento della sopravvivenza. Anche se i neurochirurghi in questo studio erano stati addestrati e un comitato direttivo monitorava il posizionamento del catetere, la curva di apprendimento rimane lenta. Gli studi CED dovrebbero idealmente essere limitati a centri con un'adeguata esperienza in questa procedura. La distribuzione dell'infusione attraverso il tumore è un altro fattore importante. Il glioblastoma è di natura eterogenea, con diversi gradi di necrosi, angiogenesi e tassi di metabolismo anche all'interno dello stesso tumore, il che porta a diversi tassi di *clearance*<sup>51,52</sup>. Si stanno sviluppando metodi per monitorare l'infusione e visualizzare la diffusione attraverso il tumore e oltre. Composti a base di gadolinio sono stati usati in modelli animali<sup>53,54</sup>, e vari case reports<sup>55,56</sup> in-

**Tabella 2 | Studi clinici nel glioma di alto grado: somministrazione locale di agenti chemioterapici**

Studio	Trattamento	Tipo di studio	Campione (coorte) dei pazienti	Risultati	Eventi avversi (numero dei pazienti)
<b>Somministrazione potenziata da convezione</b>					
Saito et al. (2020) <sup>57</sup>	Dose singola di ACNU tramite somministrazione potenziata da convezione	Fase I, a scalaggio di dose	Glioma pontino intrinseco diffuso o glioblastoma ricorrente del tronco encefalico (n=16)	Diminuzione del volume del tumore in quattro dei sei pazienti alla dose più alta	Peggioramento transitorio dei deficit neurologici (11)
<b>Modalità di impianto e iniezione</b>					
Westpahl et al. (2003) <sup>60</sup>	Wafer biodegradabili di carmustina o placebo impiantate dopo la chirurgia, seguite da radioterapia	Fase III	Glioma di alto grado primario o metastasi (n=240)	OS mediana (con solo glioblastoma): 13,5 mesi nel gruppo carmustina e 11,4 mesi in quelli di controllo PFS mediana (con solo glioblastoma): 5,9 mesi per entrambi i gruppi	Maggiore incidenza di ipertensione intracranica e perdite di liquido cerebrospinale
De Bonis et al. (2012) <sup>62</sup>	Wafer di carmustina nella cavità di resezione + temozolomide e radioterapia in confronto a temozolomide + sola radioterapia	Analisi retrospettiva	Glioblastoma primario o ricorrente (n=165)	OS mediana (con solo glioblastoma): 14 mesi nel gruppo carmustina e 11 mesi in quelli di controllo; PFS mediana (glioblastoma ricorrente): 8 mesi e 9 mesi	Aumento degli eventi avversi nei pazienti che hanno ricevuto otto wafer
Yang et al. (2018) <sup>64</sup>	ACNU nella cavità di resezione tramite <i>reservoir</i> Ommaya con interruzione transitoria della BBB in confronto a sola chemioterapia standard	Fase II	Glioblastoma primario o ricorrente (n=71)	OS mediana: 18,5 mesi nel gruppo ACNU e 16 mesi in quelli di controllo; PFS mediana 8,8 mesi e 7 mesi	Nessun aumento degli eventi avversi
<b>Somministrazione intrarteriosa</b>					
Boockvar et al. (2011) <sup>68</sup>	Dose singola di bevacizumab intrarteriosa con rottura osmotica della BBB	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=30)	Riduzione radiografica dell'adimensione del tumore nella maggior parte dei pazienti, più pronunciata nei pazienti che non avevano ricevuto bevacizumab in precedenza (riduzione dell'aumento del tumore alla MRI, 34,7% e 15,2% nel gruppo trattato in precedenza)	Convulsioni (2), rottura peroperatoria dell'arteria cerebrale anteriore destra con conseguente emorragia subaracnoidea ed emiparesi sinistra (1)
Chakraborty et al. (2016) <sup>71</sup>	Dose singola di cetuximab intrarteriosa con rottura osmotica della BBB	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=15)	Ben tollerato fino a 250 mg/m <sup>2</sup>	Anafilassi (1), convulsioni (1), edema cerebrale con convulsioni (1)
Fortin et al. (2014) <sup>72</sup>	Iniezione intracarotidea ripetuta di carboplatino ogni 4 settimane	Fase II	Glioblastoma ricorrente (n=51)	3 risposte complete, 22 risposte parziali, 14 con malattia stabile	Spasmi carotidei transitori (3)



dicano che questo approccio è fattibile e sicuro. In uno studio di fase I, la nimustina cloridrato (ACNU) è stata somministrata con 1 mM di acido gadolinio-tetraazacyclododecanetetracetico (GdDOTA) tramite CED a pazienti con glioma pontino intrinseco diffuso ricorrente (*diffuse intrinsic pontine glioma*, DIPG) o glioblastoma ricorrente situato nel tronco encefalico<sup>57</sup> (Tabella 2). Il volume di infusione era strettamente correlato al segnale sulla risonanza magnetica, ma ha smesso di aumentare dopo diverse ore nonostante la somministrazione continua di GdDOTA. Gli autori hanno concluso che la ritenzione di GdDOTA dopo l'infusione locale era insufficiente, ostacolando così il monitoraggio preciso per periodi più lunghi. I risultati sono stati variabili, dove quattro dei sei pazienti che hanno ricevuto le dosi più alte di ACNU hanno mostrato regressione del volume del tumore e uno ha mostrato remissione completa. Un peggioramento transitorio dei sintomi si è verificato in 11 dei 16 pazienti, ed è persistito in tre di questi individui.

Poiché i glioblastomi sono altamente infiltranti, i composti devono non solo penetrare profondamente nel tessuto, ma anche distinguere tra tessuto maligno e normale per evitare gravi eventi avversi. Pertanto, molte sperimentazioni stanno studiando la CED di composti *tumour-targeting*, come citochine, virus, terapie geniche e anticorpi. Questi approcci sono discussi più in dettaglio qui di seguito.

I progressi nella CED sono in corso, con continui miglioramenti nel design della cannula, nei programmi di trattamento e nella modellazione dell'erogazione ottimale<sup>49,58,59</sup>. Diversi studi di fase I per analizzare e migliorare la CED—compresi approcci guidati dalle immagini—per la somministrazione di agenti come l'irinotecan liposomiale (NCT03086616 e NCT02022644) e MTX110 (NCT03566199) in persone con DIPG o glioblastoma sono stati recentemente completati, o è in atto il reclutamento dei pazienti (Tabella 2 supplementare), e si aspettano i dati.

### Modalità di impianto e iniezione

Sono stati sviluppati wafer biodegradabili di carmustina per somministrare chemioterapia ad alte dosi all'interno della cavità di resezione (Fig. 2c). Uno studio controllato randomizzato su pazienti con glioblastoma primario sottoposti a chirurgia e radioterapia ha indicato che questi wafer hanno aumentato la sopravvivenza mediana da 11,4 mesi a 13,5 mesi<sup>60</sup> (Tabella 2). La diagnosi è stata fatta solo dopo l'impianto dei wafer, quindi lo studio ha incluso anche pazienti con altri tipi di tumore, come oligodendroglioma e metastasi cerebrali. Poiché l'analisi in potenza non ha tenuto conto di ciò, i risultati per i pazienti con glioblastoma non erano adeguatamente strutturati per trarre conclusioni definitive.

Una metanalisi dei dati raccolti dopo l'introduzione del protocollo Stupp ha mostrato che le wafer di carmustina hanno limitato i benefici aggiuntivi in termini di OS e hanno aumentato in modo sostanziale il rischio di eventi avversi nei pazienti trattati con temozolomide<sup>61</sup> (Tabella 2). Da notare che in un'importante analisi retrospettiva che ha confrontato i wafer di carmustina più il protocollo Stupp con il solo protocollo Stupp in 165 pazienti con glioblastoma primario o ricorrente, l'impianto di otto wafer di carmustina (27 pazienti) — ma non di sette wafer o meno (20 pazienti) — è stato associato a un maggior rischio di eventi avversi<sup>62</sup>. Questo studio ha notato una tendenza verso un allungamento di OS nei pazienti con glioblastoma primario che hanno ricevuto wafer, ma non era sufficientemente strutturato per trarre conclusioni definitive. Tuttavia, questi risultati sollevano la possibilità che una dose ottimale, con livelli accettabili di tossicità, possa essere individuata per i wafer di carmustina in combinazione con il protocollo Stupp. Uno studio (NCT03234595) sta valutando la somministrazione mediata da wafer di n-butilideneftalide, dimostratasi promettente in modelli pre-clinici<sup>63</sup>, in pazienti con glioblastoma ricorrente (Tabella 2 supplementare).

Il posizionamento di un *reservoir* (serbatoio) Ommaya o Rickham collegato alla cavità di resezione o ventricoli cerebrali consente la somministrazione di chemioterapia ad alta dose al tumore per periodi di tempo prolungati (Fig. 1d). Il *reservoir* viene impiantato sotto la pelle e può essere accessibile in modo intermittente, consentendo una maggiore flessibilità per il paziente e il medico nel corso del trattamento. Uno studio ha somministrato ACNU nella cavità di resezione tramite un *reservoir* Ommaya durante il trattamento con temozolomide e la radioterapia in 71 pazienti con glioblastoma<sup>64</sup> (Tabella 2). Ogni iniezione è stata combinata con interruzione transitoria della BBB tramite mannitolo e desametasone. Non sono stati osservati eventi avversi gravi; tuttavia, il miglioramento della OS (mediana 18,5 mesi rispetto ai 16,0 mesi della terapia standard) e della PFS (8,8 mesi rispetto a 7,0 mesi) è stato minimo<sup>64</sup>. Inoltre, l'interpretazione dei risultati è stata limitata da diversi fattori: lo studio non era randomizzato in quanto i pazienti potevano scegliere il trattamento e dovevano potersi permettere il trattamento extra; i dati di imaging non erano disponibili e il gruppo trattato con ACNU ha ricevuto anche mannitolo e desametasone per l'interruzione della BBB.

Uno studio randomizzato più robusto potrebbe fare più luce sull'efficacia di questo approccio.

In generale, wafer e *reservoir* possono consentire la somministrazione sul lungo periodo dei composti chemioterapici. La letteratura attuale è critica nei confronti dei wafer impiantabili di carmustina, ma gli aggiustamenti dei composti, della dose e delle tecniche di impianto potrebbero migliorare la loro efficacia e sicurezza<sup>61</sup>. Il CED sembra essere più efficace nel diffondere i composti direttamente nel tessuto tumorale, ma è anche più invasivo. L'impianto di *reservoir* potrebbe avere una funzione specifica nel trattamento della cavità di resezione o nella somministrazione ai ventricoli cerebrali per periodi di tempo prolungati, ma non hanno ancora trovato

un ruolo definito nel trattamento del glioblastoma.

### **Somministrazione intrarteriosa**

La somministrazione intrarteriosa di chemioterapici (Fig. 1e) è stata considerata come un trattamento promettente nei primi tempi delle cure contro il glioblastoma, quando erano disponibili poche altre modalità<sup>65</sup>. Con l'avvento della temozolomide, della radioterapia e di migliori tecniche neurochirurgiche, alla fine degli anni Novanta l'interesse per la somministrazione intrarteriosa è diminuito a causa delle preoccupazioni per la neurotossicità e altri eventi avversi. Tuttavia, i recenti miglioramenti in angiografia hanno portato a un rinnovato interesse, come osservato nel 2020 da D'Amico et al.<sup>66</sup>. In questa sezione, evidenziamo brevemente gli sviluppi più notevoli.

Alti dosaggi di farmaci terapeutici possono essere somministrati direttamente al letto tumorale tramite cateteri intrarteriosi. Di solito, questa tecnica è combinata con l'interruzione transitoria della BBB per massimizzare il passaggio del composto attraverso la BBB. Questa interruzione può essere ottenuta con farmaci come il mannitolo o con FUS<sup>67</sup>. Sfumature e considerazioni dettagliate sull'interruzione della BBB esulano dagli scopi di questa rassegna e sono state trattate altrove<sup>67</sup>. Diversi studi di fase I hanno studiato la somministrazione intrarteriosa di bevacizumab in pazienti con glioblastoma, e hanno mostrato un profilo di sicurezza accettabile con risposte variabili al trattamento<sup>68-70</sup> (Tabella 2). Diversi studi di fase I e II per il glioblastoma primario e ricorrente sono attualmente in corso (per esempio, NCT01269853, NCT02285959 e NCT01811498), ma al momento non sono previsti studi di fase III (Tabella 2 supplementare). Anche la somministrazione intrarteriosa di cetuximab, un inibitore del recettore del fattore di crescita epidermico, è in corso di studio (NCT02800486 e NCT02861898), dopo che uno studio di fase I ha dimostrato che la sua somministrazione è ben tollerata, anche a dosi elevate<sup>71</sup>

(Tabella 2). Per quanto riguarda i chemioterapici, la somministrazione intrarteriosa di carboplatino senza interruzione della BBB sembra essere sicura nei soggetti con glioblastoma ricorrente, con eventi avversi ematologici minori e nessuna complicazione neurologica osservata<sup>72</sup>. Su 51 pazienti in questo studio, 25 hanno mostrato una risposta completa o parziale. Uno studio di fase II (NCT03672721) è ora in corso (Tabella 2 supplementare). Nel complesso, la somministrazione intrarteriosa selettiva, combinata con l'interruzione della BBB, si rivela assai promettente, sia come terapia di salvataggio in pazienti inoperabili o in combinazione con l'attuale standard di cura. L'esperienza acquisita da altri trattamenti cerebrali intrarteriosi, come *coiling* trombectomia, ha migliorato la disponibilità e la sicurezza di queste tecniche, e molti composti sono ora disponibili per essere testati. La selezione del farmaco è importante, e devono essere attentamente considerati<sup>66</sup> fattori come la tossicità locale e sistemica, la facilità di assorbimento al primo passaggio e la ritenzione dei tessuti. Inoltre, i fattori idrodinamici differiscono tra i vari tumori, e anche all'interno dello stesso tumore, che può influenzare la somministrazione e, di conseguenza, l'efficacia dei composti<sup>73-75</sup>. Si pensa che i tumori con un basso flusso sanguigno rispondano meglio alla chemioterapia intrarteriosa<sup>75</sup>, quindi si stanno sviluppando tecniche per diminuire o arrestare transitoriamente il flusso sanguigno quando viene somministrata la terapia<sup>76,77</sup>. Tutto questo campo trarrebbe beneficio da metodi e protocolli di trattamento standardizzati, che consentirebbero il confronto tra diversi composti e dosi. Si attendono con urgenza studi randomizzati di fase III per esplorare il potenziale della somministrazione intrarteriosa nel glioblastoma.

### Immunoterapia localizzata

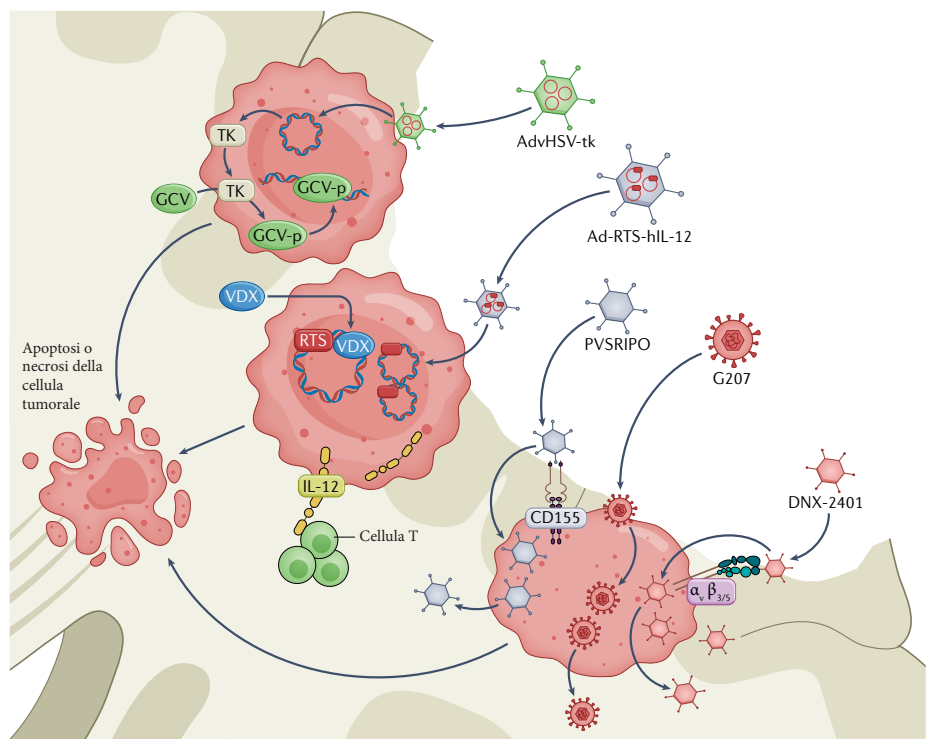
L'immunoterapia è tra i nuovi trattamenti per il glioblastoma più studiati. La bassa immunogenicità del glioblastoma unita a un microambiente

tumorale immunosoppressivo aiuta il tumore a eludere una risposta immunitaria antitumorale<sup>8,9,78</sup>. Di conseguenza, sono state progettate molte nuove terapie sistemiche e locali per potenziare il sistema immunitario e, di fatto, rivolgerlo contro il glioblastoma. Diversi articoli di rassegna hanno ampiamente discusso l'immunoterapia per il glioblastoma<sup>79,80</sup>; qui ci concentriamo sugli approcci terapeutici locali che si sono dimostrati promettenti negli studi clinici.

### Terapia virale

La terapia virale può essere usata in vari modi per combattere il glioblastoma. Nel caso della terapia genica, i virus con difetti di replicazione possono funzionare come veicolo di somministrazione di un transgene e dirottare una cellula tumorale per produrre il composto terapeutico. Al contrario, i virus oncolitici sono spesso competenti nella replicazione e sono progettati per indurre selettivamente nelle cellule tumorali la citotossicità<sup>81</sup>. Entrambi questi approcci mirano a innescare una risposta immunitaria, stimolando così l'immunità antitumorale<sup>82</sup>. La veicolazione locale dei virus aumenta l'efficienza e limita la diffusione sistemica della carica virale. Sono state studiate molte terapie virali in pazienti con glioblastoma e sono state ampiamente descritte altrove<sup>81,83</sup>. Qui, discutiamo le terapie virali somministrate localmente che sono state testate negli studi clinici dall'inizio dell'era della temozolomide.

**Terapia genica.** Per il trattamento del glioblastoma ci sono diverse terapie geniche virali in via sviluppo. Uno dei virus più studiati è un vettore adenovirale non replicabile, noto come AdvHSV-tk, che trasporta il gene della timidina chinasi del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1)<sup>84</sup>. Quando in seguito viene somministrato un profarmaco antivirale come il ganciclovir, la timidina chinasi fosforila questo profarmaco, facendolo legare al DNA durante la riparazione della rottura del doppio filamento (Fig. 3). Questo processo alla fine interrompe



**Fig. 3 | Meccanismi delle terapie virali locali in sviluppo per il glioblastoma.** AdvHSV-tk è un vettore adenovirale incapace di replicarsi che trasporta la timidina chinasi (TK) del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1). Il transgene viene introdotto nella cellula e la TK viene prodotta. La TK fosforila il ganciclovir (GCV) somministrato per via sistemica per generare GCV-p, che interferisce con la riparazione e la replicazione del DNA, portando infine all'apoptosi o alla necrosi delle cellule tumorali. Ad-RTS-hIL-12 è un vettore adenovirale non replicabile che codifica IL-12 umano preceduto da un sistema terapeutico RheoSwitch (RTS). Il costrutto di DNA viene introdotto nella cellula, ma può essere trascritto solo in presenza di veledimex (VDX). Quando il VDX viene somministrato per via sistemica, viene prodotto IL-12. IL-12 attiva le cellule T e genera un microambiente antitumorale. PVSRIPO è un chimera di polio-rhinovirus oncolitico compatibile con la replicazione. PVSRIPO entra nella cellula attraverso CD155, che è abbondantemente espresso nella maggior parte dei glioblastomi. Il virus si replica poi nella cellula tumorale, portando così all'apoptosi e alla diffusione del virus. G207 è un virus oncolitico HSV-1 compatibile con la replicazione e progettato per replicarsi nelle cellule tumorali, per andare a causare apoptosi e diffusione del virus. DNX-2401 è un adenovirus compatibile con la replicazione. Il virus entra nella cellula attraverso le integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , che sono presenti sulle cellule staminali del glioma, e non può replicarsi in presenza di un pathway funzionale del retinoblastoma. Poiché questo pathway è spesso inattivato nelle cellule tumorali, il virus può causare apoptosi o necrosi selettiva di queste cellule.

la mitosi e i meccanismi di riparazione del DNA, portando all'apoptosi e alla necrosi delle cellule, e aumenta la sensibilità alla chemioradioterapia<sup>85,86</sup>. L'aggiunta di questo trattamento alla terapia standard si è dimostrato promettente nel glioblastoma ricorrente e primario, e un trial di fase III è attualmente in fase di sviluppo<sup>87,88</sup> (Tabella 3). La somministrazione intrarteriosa ripetuta di AdvHSV-tk e ganciclovir si è dimostrata sicura e fattibile e potrebbe migliorare ulteriormente l'efficacia di questo trattamento<sup>88</sup> (Tabella 3).

Un altro approccio di terapia genica utilizza il vettore adenovirale difettoso di replicazione Ad-RTS-hIL-12, che codifica un transgene umano *IL12* sotto il controllo di un interruttore di espressione ligandinducibile<sup>89</sup> (Fig. 3).

Il vettore viene iniettato nel sito del tumore dopo la resezione, e il ligando attivatore, veledimex, viene somministrato per via orale. Si pensa che IL-12 abbia un forte potenziale antitumorale attraverso la stimolazione delle cellule T a produrre IFN $\gamma$ , creando così un microambiente tumorale più infiammatorio<sup>90</sup>. Tuttavia, la somministrazione sistemica di IL-12 o l'iniezione locale diretta di linfociti produttori di IL-12 causa gravi eventi avversi<sup>91,92</sup>. Il metodo *switch* permette di regolare la trascrizione e l'espressione di IL-12 e i livelli di questo fattore diminuiscono rapidamente quando cessa la somministrazione di veledimex, permettendo così una rapida correzione se si verificano eventi avversi<sup>93</sup>. Uno studio di fase I di scalaggio della dose ha dimostrato la sicurezza di questo

approccio, con un aumento dell'infiammazione e dell'infiltrazione di cellule CD8<sup>+</sup>-T che esprimono PD1 alla resezione<sup>89</sup> (Tabella 3). Questo risultato, combinato con una migliore OS dopo la terapia con IL-12, ha portato all'avvio di nuovi studi di fase I (NCT03636477 e NCT04006119), che stanno studiando la terapia virale con IL-12 in combinazione con inibitori del checkpoint immunitario (nivolumab o cemiplimab) nel tentativo di migliorarne ulteriormente l'efficacia generale (Tabella 3 supplementare). Toca 511 è una terapia retrovirale pro-

gettata per indurre l'espressione della citosina deaminasi nelle cellule tumorali attraverso un vettore replicante retrovirale. Questo enzima converte il profarmaco 5-fluorocitosina in 5-fluorouracile, un potente chemioterapico che ha mostrato efficacia contro il glioma<sup>94</sup>. Uno studio di fase I ha mostrato risposte promettenti in 45 pazienti con glioblastoma ricorrente<sup>95</sup>, ma un successivo studio di fase III (NCT02414165) è stato interrotto dall'azienda per non aver mostrato alcun miglioramento rispetto alla cura standard.

**Tabella 2 | Studi clinici nel glioma di alto grado: somministrazione locale di agenti chemioterapici**

Studio	Trattamento	Tipo di studio	Campione (coorte) dei pazienti	Risultati	Eventi avversi (numero dei pazienti)
<b>Terapia virale</b>					
Wheeler et al. (2016) <sup>87</sup>	Iniezione di AdvHSV-tk nella parete della cavità di resezione + ganciclovir con standard di cura	Fase II, con controlli storici	Glioblastoma primario (n=48)	3×10 <sup>11</sup> particelle ben tollerate; sopravvivenza mediana: 17,1 mesi vs 13,5 mesi nei controllistorici; OS mediana dopo resezione totale macroscopica: 25,0 vs 16,9 mesi	Peggioramento dell'emiparesi esistente (1)
Jiet al. (2016) <sup>88</sup>	Dosaggio ripetuto di AdvHSV-tk intrarterioso con interruzione della BBB e cure standard in confronto alle sole cure standard	Fase II	WHO ricorrente di III grado o glioma di IV (n=53)	OS mediana: 10,4 mesi nel gruppo AdvHSV-tk vs 3,3 mesi nei controlli; PFS mediana: 6,8 vs 1,9 mesi; trattamento dei controlli (chirurgia, chemioterapia o cure palliative) non dichiarato	Nessun aumento del rischio di eventi avversi
Chiocca et al. (2019) <sup>89</sup>	Ad-RTS-hIL-12 nella parete della cavità di resezione + veledimex sistemico	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=31)	Dose massima tollerata di veledimex: 20 mg; sopravvivenza mediana: 12 mesi	Sindrome da rilascio reversibile di citochine (10 con grado 2, 6 con grado 3), edema cerebrale (1), confusione (1), meningite asettica (1)
Desjardinet al. (2018) <sup>96</sup>	Dose singola di PVSRIPO tramite CED	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=61)	OS mediana: 12,5 mesi vs. 11,3 mesi nei controlli storici	Emorragia conseguente emiparesi (1), infiammazione peritumorale che ha richiesto bevacizumab (32), o un intervento chirurgico (4)
Lang et al. (2018) <sup>98</sup>	DNX-2401 nella parete della cavità di resezione	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=37)	Il 20% dei pazienti è sopravvissuto >3 anni, tre hanno mostrato una riduzione del tumore >95%; OS: 13,0 mesi	Febbre transitoria, mal di testa e malessere (2)



Markert et al. (2014) <sup>102</sup>	Singola iniezione stereotassica di G207 combinata con la radioterapia	Fase I	Glioblastoma ricorrente (n=9)	Sei pazienti hanno mostrato stabilizzazione della malattia o risposta parziale; OS mediana: 7,5 mesi; PFS mediana: 2,5 mesi	Convulsioni ed emiparesi (numero di pazienti non chiaro)
Friedman et al. (2021) <sup>104</sup>	Singola iniezione stereotassica di G207 combinata con la radioterapia	Fase I	Glioma pediatrico di alto grado ricorrente (n=12)	Risposta radiologica e/o clinica in 11 pazienti; OS mediana: 12,2 mesi	Nessun effetto avverso limitante la dose
<b>Terapia con citochine e anticorpi</b>					
Kunwaret al. (2010) <sup>50</sup>	Iniezione singola di IL13-Pe38QQR tramite CED in confronto a wafer di carmustina	Fase III	Glioblastoma ricorrente (n=296)	OS mediana: 9,1 mesi nel gruppo IL13-Pe38QQR vs 8,8 mesi nei controlli	Maggiore incidenza di embolia polmonare nel gruppo IL13-Pe38QQR (16 vs 2 pazienti)
<b>Oligodeossinucleotidi immunostimolanti</b>					
Carpentier et al. (2011) <sup>111</sup>	Singola iniezione stereotassica di CpG-ODN	Fase II	Glioblastoma ricorrente (n=31)	Una risposta parziale e tre risposte minori; OS mediana: 6,4 mesi; PFS mediana: 2,1 mesi	Peggioramento transitorio dei deficit neurologici (22), morte per emorragia (1)
Ursu et al. (2017) <sup>112</sup>	CpG-ODN iniettato nella parete della cavità di resezione seguito da standard di cura in confronto alle sole cure standard	Fase II	Glioblastoma primario (n=81)	OS mediana: 17 mesi nel gruppo CpG-ODN vs 18 mesi nei controlli; PFS mediana: 9 mesi in entrambi i gruppi	Maggiore incidenza di febbre ed emorragia postoperatoria

**Terapia oncolitica.** PVSRIPO è un chimaera di polio-rhinovirus oncolitico ricombinante e competente per la replicazione che è stato testato nel glioblastoma ricorrente<sup>96</sup>. L'infezione con PVSRIPO richiede l'espressione di CD155, che è abbondante sul glioblastoma e, in misura minore, sulle cellule che presentano l'antigene (Fig. 3). L'infezione PVSRIPO delle cellule tumorali arresta la sintesi proteica e induce oncolisi, mentre l'infezione delle cellule presentanti l'antigene non tumorali porta all'attivazione interferondominante del microambiente tumorale e a una risposta potenziata delle cellule T<sup>97</sup>. Dopo che i pazienti hanno ricevuto PVSRIPO tramite CED, è stata osservata una forte risposta infiammatoria, che ha reso necessario un intervento chirurgico in 4 dei 61 individui<sup>96</sup> (Tabella 3). Più avanti nello studio, l'aggiunta di lomustina sembrava essere vantaggiosa nel trattamento delle recidive: circa un terzo dei pazienti che hanno ricevuto anche questo farmaco ha mostrato segni radiografici di degradazione cistica del tumore e un rapido declino del volume del tumore. Non si è osservato

miglioramento della OS rispetto ai controlli. Uno studio di fase II in pazienti con glioblastoma recidivante è ora in corso (NCT02986178), e l'uso di PVSRIPO è stato esplorato anche in pazienti pediatrici con glioma ricorrente di alto grado (NCT03043391) (Tabella supplementare 3).

Un altro adenovirus oncolitico compatibile con la replicazione è DNX2401 (rif.<sup>98</sup>). Questo vettore è progettato per entrare nelle cellule che esprimono alti livelli di integrine  $\alpha\beta 3$  e  $\alpha\beta 5$ , come le cellule staminali del glioma, ma non può replicarsi quando è presente un *pathway* funzionale del retinoblastoma (Rb). Il *pathway* del Rb regola il checkpoint G1 del ciclo cellulare, e questo *pathway* è spesso inattivato nei tumori, compresi i gliomi<sup>99,100</sup>. Di conseguenza, la replicazione del DNX2401 è limitata alle cellule tumorali<sup>100</sup> (Fig. 3). Il DNX-2401 uccide le cellule tumorali mediante oncolisi diretta, che induce anche una risposta infiammatoria. Uno studio di fase I ha dimostrato che l'iniezione stereotassica di DNX-2401 nel tumore o nella parete della cavità di resezione è sicura<sup>98</sup> (Tabella 3). La

riduzione del tumore è stata osservata nel 72% dei pazienti, con una OS mediana di 13,0 mesi. Tre pazienti hanno mostrato più del 95% di riduzione del tumore dopo l'iniezione ed erano vivi 3 anni dopo l'inizio del trattamento. Attualmente si attendono i dati di un recentestudio che ha completato la fase II, combinando DNX-2401 con l'anticorpo monoclonale anti-PD1 pembrolizumab (NCT02798406). Lo stesso gruppo sta anche studiando l'iniezione intrarteriosa di cellule staminali mesenchimali (MSC) caricate con DNX-2401 prima e dopo l'intervento in pazienti con glioblastoma ricorrente (NCT03896568) (Tabella supplementare 3).

G207 è un vettore oncolitico HSV-1 compatibile con la replicazione. La delezione del gene diploide  $\gamma_1$ 34.5 della neurovirulenza e l'inattivazione della ribonucleotide reduttasi virale tramite inserimento di *Escherichia coli* lacZ impedisce l'infezione delle cellule normali, mentre permette la replicazione nelle cellule tumorali<sup>101</sup> (Fig. 3). Uno studio di fase I in pazienti con glioblastoma ricorrente ha dimostrato che quando viene somministrato nel letto di resezione, G207 è sicuro, può essere combinato con la radioterapia e induce una risposta nella maggior parte dei pazienti<sup>102</sup> (Tabella 3). Poiché gli studi di xenotrapianto hanno indicato che i tumori gliali pediatrici hanno una sensibilità marcatamente aumentata a G207, probabilmente a causa di una maggiore espressione di CD111 (nectina 1)<sup>103</sup>, uno studio di fase I ha valutato la sicurezza di questo vettore in una coorte di pazienti pediatrici con glioma di alto grado<sup>104</sup> (Tabella 3). Non sono stati riscontrati eventi avversi gravi e una risposta è stata osservata in 11 dei 12 pazienti. La sopravvivenza mediana è stata di 12,2 mesi, che è notevole per i pazienti pediatrici con glioma di alto grado ricorrente. La combinazione con la radioterapia è stata ben tollerata e questo approccio sarà studiato ulteriormente in un prossimo studio di fase II (NCT04482933) (Tabella 3 supplementare).

**Riassunto.** La terapia virale nel glioblastoma ha generato notevole interesse ed entusiasmo. Alcuni pazienti hanno mostrato risposte notevoli a queste terapie, con sopravvivenze a lungo termine in diversi studi<sup>96,98,104</sup>. Tuttavia, non tutti i pazienti beneficiano di questi trattamenti, e sono necessari ulteriori studi e analisi dei fattori che influenzano la risposta<sup>81</sup> (Box 1). Un potenziale fattore confondente è che la maggior parte dei pazienti che rispondono a lungo termine sembra avere fattori prognostici favorevoli come piccole dimensioni del tumore, giovane età, mutazioni dell'isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1) e IDH2, metilazione del promotore della 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) e un buon performance status<sup>81</sup>. Queste osservazioni indicano un problema generale quando si studia il glioblastoma ricorrente: la popolazione di pazienti è di solito eterogenea per quanto riguarda età, performance status, sottotipo molecolare, terapia precedente ed eventuale uso di desametasone. Inoltre, i pazienti che vengono selezionati per questi studi sperimentali sono probabilmente individui ben motivati con un alto status socioeconomico — fattori che contribuiscono a migliorare i risultati in generale<sup>105</sup>.

La letteratura sulle terapie virali per il glioblastoma attualmente consiste in gran parte di studi di fase I e II<sup>106</sup>, e gli studi di fase III in grandi coorti di pazienti saranno essenziali per determinare il vero valore di queste terapie. Al momento, tuttavia, non ci sono studi di questo tipo registrati su ClinicalTrials.gov (Tabella 3 supplementare).

### **Terapia con citochine**

Le citochine somministrate per via sistemica possono indurre una risposta immunitaria contro il cancro, ma comportano anche un grande rischio di tossicità ed eventi avversi<sup>92</sup>. Di conseguenza, si stanno sviluppando strategie per localizzare il rilascio di citochine per indurre l'infiammazione locale evitando però la risposta sistemica.

## Box 1 | Bias di selezione negli studi clinici di fase iniziale

Questa rassegna discute molti studi di fase I e II di terapia locale per il glioblastoma che dimostrano una qualche forma di risposta al trattamento o di efficacia. Tuttavia, la traduzione di questi risultati promettenti in studi randomizzati di fase III di successo è stata finora carente. Esistono diversi fattori che potrebbero aver contribuito a questa apparente discrepanza.

I pazienti selezionati per gli studi di fase I e II sono di solito un sottoinsieme di individui con un buon performance status, nessuna comorbidità, un'età relativamente giovane e un'alta motivazione a sottoporsi a ulteriori trattamenti. Uno studio svedese ha mostrato che solo una minoranza di pazienti con glioblastoma soddisfa gli attuali criteri di inclusione dello studio, e questo gruppo ha già una sopravvivenza globale mediana significativamente migliorata — 16,4 mesi rispetto a 7,7 mesi per i pazienti che non soddisfano i criteri — indipendentemente dalla somministrazione di una terapia aggiuntiva<sup>118</sup>. Confrontando questi pazienti con i gruppi di controllo storici o con i non partecipanti, i dati saranno quindi distorti verso esiti favorevoli per la coorte di studio.

Allo stesso modo, in diversi studi di fase I e II, alcuni pazienti hanno mostrato una notevole sopravvivenza a lungo termine dopo il trattamento<sup>81</sup>. Tuttavia, nello studio svedese, l'8,6% dei pazienti ritenuti idonei all'essere inclusi nello studio al momento della diagnosi ha avuto una sopravvivenza complessiva di più di 5 anni<sup>118</sup>. Un'analisi retrospettiva di pazienti con glioblastoma in Australia ha inoltre osservato che la partecipazione a uno studio clinico era associata a una migliore sopravvivenza, indipendentemente dall'assegnazione o meno al trattamento e indipendentemente dal performance status, dall'età e dalla localizzazione del tumore<sup>117</sup>.

Sembra quindi che i pazienti potrebbero trarre beneficio dalla partecipazione a studi clinici perché hanno accesso a cure migliori, compresa una frequenza maggiore di controlli, esami di imaging e contatti con i medici. Di conseguenza, la progressione della malattia e le complicanze sono monitorate più attentamente e potenzialmente trattate prima rispetto a quelle dei pazienti che non partecipano agli studi clinici. Anche fattori come lo status socioeconomico e l'origine etnica potrebbero influenzare la partecipazione agli studi e i risultati sulla sopravvivenza, sebbene attualmente manchino dati precisi<sup>105,148</sup>. Inoltre, gli studi di fase I e II nel glioblastoma ricorrente includono spesso pazienti con un'ampia gamma di progressione della malattia, dimensioni del tumore, trattamenti precedenti e uso di desametasone, tutti fattori che possono influenzare la sopravvivenza e la risposta al trattamento<sup>149,150</sup>. Pertanto, trarre conclusioni generali da questo gruppo di pazienti è complesso e dovrebbe essere fatto con la massima cautela.

Per migliorare la generalizzabilità e l'applicabilità, sono necessari grandi studi clinici randomizzati e multicentrici. Dati i notevoli ostacoli finanziari e normativi, tuttavia, questo approccio non è fattibile nelle prime fasi di sviluppo del trattamento. Per permettere di valutare la generalizzabilità degli studi più piccoli, questi studi devono includere ampi dati sulle caratteristiche dei pazienti, tra cui non solo le dimensioni del tumore, la posizione, l'uso di steroidi e i trattamenti precedenti, ma anche il background socioeconomico, l'origine etnica e il livello di istruzione. Il profilo immunitario e genetico dei tumori sta diventando più accessibile e, quando possibile, dovrebbe essere incluso nei dati dei pazienti e nelle analisi dei risultati.

Lo studio PRECISE ha utilizzato l'espressione di IL-13 dalle cellule di glioblastoma per facilitare l'ingresso dell'esotossina A, una citotossina derivata da *Pseudomonas aeruginosa*<sup>50</sup>. Fondendo IL-13 con questa esotossina, i ricercatori hanno creato una citotossina ricombinante chimerica nota come IL13-PE38QQR, che inibisce la sintesi proteica e induce apoptosi<sup>107</sup>. Uno studio randomizzato di fase III è stato eseguito su 296 pazienti con glioblastoma ricorrente<sup>50</sup>. Dopo la resezione totale macroscopica del tumore, i partecipanti sono stati assegnati in modo casuale a ricevere IL13-PE38QQR tramite CED o l'im-

pianto di wafer di carmustina. Non è stata riscontrata alcuna differenza nella OS, ma l'incidenza di embolia polmonare è stata significativamente più alta in quelli trattati con IL13-PE38QQR, forse a causa della prolungata degenza ospedaliera e dell'intervento chirurgico supplementare (Tabella 3). Come discusso in precedenza, il posizionamento appropriato dei cateteri è stato impegnativo, con meno del 70% dei cateteri posizionati adeguatamente. Nonostante gli sforzi per ottimizzare l'erogazione di IL13-PE38QQR, questi risultati sono stati deludenti e non sono attualmente previsti nuovi studi con questa citotossina.

Ad oggi, l'iniezione locale di citochine si è rivelata poco promettente. L'ascesa delle terapie geniche come Ad-RTS-hIL-12 con veledimex<sup>89</sup>, che possono regolare la somministrazione di citochine nel tempo senza la necessità di CED o di un intervento chirurgico ripetuto, potrebbe limitare il ruolo dell'iniezione diretta di citochine nel tumore. Tuttavia, le nuove terapie geniche richiedono un'attenta progettazione e sperimentazione, con un percorso di sviluppo molto lungo per raggiungere la fase clinica. L'iniezione diretta potrebbe servire come metodo di prima linea per valutare la funzionalità della citochina, prima di sviluppare metodi di somministrazione più adatti. Attualmente, CED di varie citochine e anticorpi è in fase di test in studi di fase I, tra cui <sup>124</sup>I-omburtamab (NCT01502917), anti-CD26 (NCT04608812), anti-CD40 (NCT04547777) e proteina morfogenetica ossea 4 (NCT02869243) (Tabella supplementare 3).

### Oligodeossinucleotidi immunostimolatori

Per migliorare la risposta immunitaria alle cellule tumorali, sono stati sviluppati oligodeossinucleotidi immunostimolatori contenenti pattern di citosina-guanosina non metilata (CpG-ODN) per attivare il recettore Toll-like 9 (TLR9)<sup>108</sup>. Poiché TLR9 è espresso principalmente da cellule presentanti l'antigene, come le cellule dendritiche plasmacitoidi e del-

la microglia<sup>109</sup>, si pensa di iniettare dei CpG-ODN nei glioblastoma per aumentare la presentazione dell'antigene e, di conseguenza, migliorare la risposta immunitaria. Risposte promettenti ai CpG-ODN sono state osservate nei topi<sup>110</sup>. Tuttavia, due studi di fase II in cui questi CpG-ODN sono stati iniettati nella parete della cavità tumorale dopo la resezione del glioblastoma primario o ricorrente non hanno mostrato miglioramenti nei risultati quando combinati con la chemioterapia standard<sup>111,112</sup> (Tabella 3). Una possibile spiegazione è che gli antigeni presentati dalle cellule della microglia o dalle cellule dendritiche non riescono a indurre una risposta immunitaria se questi antigeni non sono riconosciuti dalle cellule T come estranei. Uno dei tratti distintivi del glioblastoma è l'immunosoppressione, con una limitata infiltrazione di cellule T nel tumore<sup>113</sup>. Questa immunosoppressione è ulteriormente aggravata dall'uso di desametasone, e nello studio di fase II nel glioblastoma ricorrente, solo quattro dei 34 pazienti non ricevevano questo farmaco<sup>111</sup>. La minimizzazione dell'uso di steroidi e/o la combinazione con l'inibizione del checkpoint immunitario potrebbe rivelarsi vantaggiosa per queste terapie. Al momento non ci sono studi sui CpG-ODN nel glioblastoma.

### Radioterapia localizzata

La radioterapia è stata per molti anni un punto fondamentale nel trattamento del glioblastoma. Sono stati fatti continui miglioramenti per ridurre al minimo i danni ai tessuti sani, massimizzando la dose somministrata sull'area del tumore. L'attuale standard di cura prevede la radioterapia stereotassica con una dose totale di 60 Gy, somministrata in 30 frazioni di 2 Gy in 6 settimane<sup>114</sup>. La radioterapia viene direzionata sulla cavità chirurgica, spesso includendo il margine in cui l'edema peritumorale è visibile sulle sequenze di MRI a recupero di inversione attenuato di fluido. Oltre l'80% delle recidive di glioblastoma si verificano all'interno di queste aree trattate con radioterapia<sup>11</sup>. Nel tenta-

tivo di aumentare la dose ricevuta dal letto tumorale minimizzando i danni ai tessuti circostanti, varie forme di brachiterapia— un tipo di radioterapia in cui una sorgente di radiazioni viene impiantata nel, o vicino al tumore — sono stati studiati, con vari gradi di successo<sup>115</sup>. In questa sezione, ne discutiamo gli ultimi sviluppi.

Uno studio del 2019 basato sul database "Surveillance, Epidemiology and End Results" ha concluso che l'OS migliora nei pazienti che hanno ricevuto una qualche forma di brachiterapia per il glioblastoma<sup>116</sup>. Lo studio ha incluso un totale di 60.456 pazienti con diagnosi di glioblastoma primario tra il 1975 e il 2015, 362 dei quali hanno ricevuto la brachiterapia. Un'analisi di regressione di Cox multivariata che includeva età, dimensioni del tumore, localizzazione del tumore, estensione della resezione e trattamento chemioterapico e/o radioterapico ha mostrato che la brachiterapia era un predittore indipendente di un esito migliore (come tutte le altre variabili incluse). Tuttavia, questo studio presentava molteplici limitazioni. La maggior parte dei pazienti era stata trattata prima dell'introduzione del protocollo Stupp, i pazienti arruolati in studi clinici avevano quindi una probabilità di avere un esito migliore indipendentemente dall'assegnazione del gruppo di trattamento<sup>117,118</sup>, e non erano disponibili dati relativi alle mutazioni *IDH* o *MGMT* in questi gruppi. Pertanto, da questi dati non si possono trarre conclusioni definitive. Due studi hanno valutato la brachiterapia a basso dosaggio con l'impianto stereotassico di *seeds* di <sup>125</sup>I in pazienti con glioblastoma inoperabile (prevalentemente ricorrente)<sup>119,120</sup> (Tabella 4). Questi studi hanno dimostrato la sicurezza della procedura, con eventi avversi gestibili legati all'edema postoperatorio. Tuttavia, in nessuno dei due studi sono state trovate prove di miglioramenti nei risultati dei pazienti. Schwartz et al.<sup>119</sup> hanno osservato che tutti i casi di progressione del tumore si sono verificati in prossimità dell'area trattata, gettando ulteriori dubbi sull'utilità della brachiterapia a



basse dosi nel glioblastoma. Un trial clinico sta attualmente valutando la dose, la sicurezza e l'efficacia dei nanoliposomi <sup>186</sup>Re somministrati tramite CED nel glioblastoma ricorrente (NCT01906385). Questi nanoliposomi hanno mostrato segnali promettenti in modelli preclinici<sup>121</sup>, ma se questi si tradurranno in una risposta clinica rimane ancora da sapere. Un'altra tecnica in fase di sviluppo è la radioterapia intraoperatoria (IORT), che si è rivelata promettente nel cancro al seno e al colon<sup>122</sup>. Un'analisi retrospettiva ha raccolto dati sull'esito e sulla tossicità di 51 pazienti con glioblastoma primario trattati con IORT in aggiunta al protocollo di Stupp<sup>123</sup>

(Tabella 4). La maggior parte dei pazienti ha ricevuto IORT di 10 Gy tramite un applicatore sferico nella cavità di resezione. Le tossicità erano limitate alla necrosi da radiazione in 13 pazienti, e gli esiti erano positivi (Tabella 4). Di particolare interesse è la constatazione che la progressione del tumore fosse iniziata localmente solo nel 35,5% dei pazienti, rispetto al solito 80% nel glioblastoma<sup>11</sup>. Un grande studio multicentrico di fase III sta cercando di reclutare 314 pazienti per valutare se la IORT aggiunta al trattamento di prima linea può migliorare gli esiti nel glioblastoma (NCT02685605) (Tabella 4 supplementare).

Tabella 4 | Studi clinici nel glioma di alto grado: radioterapia localizzata

Studio	Trattamento	Tipo di studio	Campione (coorte) dei pazienti	Risultati	Eventi avversi (numero dei pazienti)
Schwartz et al. (2015) <sup>119</sup>	Impianto stereotassico di palline di <sup>125</sup> I	Coorte retrospettiva	Gliomadi alto grado ricorrente (n=68)	OS mediana: 41,8 mesi; PFS mediana: 8,3 mesi; fallimento del trattamento osservato in 57 pazienti	Revisione chirurgica delle palline (1),edema che ha richiesto steroidi e bevacizumab (6)
Kickingereder et al. (2014) <sup>120</sup>	Impianto stereotassico di palline di <sup>125</sup> I in confronto alle sole cure standard	Coorte retrospettiva	Glioblastoma primario inoperabile oricorrente (n=201)	OS mediana: 11,1 mesi; PFS mediana: 6,2 mesi	Edema transitorio trattato concorticosteroidi (7), persistentedeficit neurologici dovuti all'edema (3), cisti che hanno richiesto evacuazione stereotassica (1), ascesso che ha richiesto drenaggio stereotassico (1)
Sarria et al. (2020) <sup>123</sup>	Radioterapia intraoperatoria + cure standard	Coorte retrospettiva	Glioblastoma primario (n=51)	OS mediana: 18,0 mesi; PFS mediana: 11,4 mesi	Necrosi da radiazione, nessun interventorichiesto (12)

Cellule staminali e cellule T ingegnerizzate

Le MSC e le cellule staminali neurali (*neural stem cells*, NSC), note per migrare verso i tessuti danneggiati e i tumori, sono in grado di rilasciare molecole bioattive e possono indurre effetti immunomodulatori positivi<sup>124</sup>. Diversi studi sui topi hanno dimostrato il potenziale delle MSC e delle NSC modificate, iniettate per via endovenosa o intracranica, di migrare verso i tumori gliali e di rilasciare i chemioterapici, come il paclitaxel<sup>125</sup>, o di convertire un profarmaco in un composto tossico<sup>124</sup>. Quest'ultima tecnica è

stata studiata in uno studio di fase I in pazienti con glioblastoma ricorrente<sup>126</sup> (Tabella 5). Una linea umana di NSC, HB1.F3, è stata trasdotta retroviralmente per esprimere la citosina deaminasi, che converte la 5-fluorocitosina, un composto non tossico che attraversa la BBB, in 5-fluorouracile, un agente citotossico. Le NSC sono state iniettate nella parete della cavità di resezione o nel tessuto tumorale rimasto dopo la resezione, e la 5-fluorocitosina è stata somministrata per via orale. Sono state testate tre diverse dosi di NSC, e i sei pazienti che hanno ricevuto la dose più alta (5×10<sup>7</sup> NSC)



hanno avuto una OS mediana di 15,4 mesi, rispetto ai 2,9 mesi dei pazienti che hanno ricevuto dosi inferiori. La valutazione patologica post-mortem in due pazienti ha trovato le NSC iniettate nel tessuto tumorale, ma ha anche mostrato la migrazione delle NSC in siti distanti dal tumore, in un paziente al di là del corpo calloso. Data l'infiltrazione profonda delle cellule del glioblastoma in tutto il cervello, la diffusione profonda delle NSC è una scoperta importante e incoraggiante. Una limitazione teorica è la possibilità per le NSC di diventare tumorigeniche, tramite espressione di MYC127,

ma questo fenomeno non è stato osservato nel presente studio<sup>126</sup>. Inoltre, non tutti i pazienti sono in grado di ricevere questa terapia perché alcuni esprimono anticorpi contro HLA di classe I o II (3 su 18 in questo studio). Un nuovo studio sta esplorando la combinazione di NSC allogeniche che esprimono carbossisterasi con irinotecan cloridrato in pazienti con glioblastoma ricorrente (NCT02192359) (Tabella supplementare 5). Un interessante studio pilota ha dimostrato la possibilità di veicolare un adenovirus oncolitico (CRAd-S-pk7) tramite NSCs in pazienti con gliobla-

Tabella 5 | Studi clinici nel glioma di alto grado: terapia con cellule staminalineurali

Studio	Trattamento	Tipo di studio	Campione (coorte) dei pazienti	Risultati	Eventi avversi (numero dei pazienti)
Portnow et al. (2017) <sup>126</sup>	Cellule staminali neurali che esprimono la citosina deaminasi nella parete della cavità di resezione	Fase I	Gliomadi alto grado ricorrente (n=15)	OS mediana: 8,4 mesi; PFS mediana: 1,0 mese; dosaggio più alto correlato a sopravvivenza più lunga	Morte per emorragia(1), tossicità epatica di grado 3che ha reso necessaria l'interruzione del trattamento (1)
Fareset al. (2021) <sup>128</sup>	Cellule staminali neurali che rilasciano adenovirus oncolitico nella parete della cavità di resezione	Fase I	Glioma di alto grado primario (n=12)	OS mediana: 18,4 mesi; PFS mediana: 9,1 mesi	Meningite dovuta all'iniezione nel ventricolo cerebrale (1)

stoma primario<sup>128</sup> (Tabella 5). Questo metodo combina le caratteristiche tumorali delle NSC con le capacità oncolitiche di un virus compatibile con la replicazione e ha prodotto risultati positivi in modelli animali<sup>129</sup>. L'iniezione di queste NSC nella parete della cavità dopo la resezione ha indotto un afflusso di cellule CD8<sup>+</sup> T nel sito del tumore, e i pazienti che hanno ricevuto il trattamento hanno avuto una OS mediana di 18,4 mesi. Nessuna traccia di NSC o di vettori adenovirali è stata trovata alla resezione o all'autopsia a 4-24 mesi dopo l'iniezione. Uno studio di fase II (NCT03072134) è stato recentemente completato, con risultati attesi a breve (Tabella supplementare 5). La terapia con cellule T con recettore dell'antigene chimerico (CAR) ha mostrato risultati impressionanti nei tumori delle cellule B ed è attualmente in fase di sviluppo per vari tumori solidi. Una panoramica completa dello stato attuale della terapia con cel-

lule CAR T nel glioblastoma è fornita altrove<sup>130</sup>. La possibilità di veicolare queste cellule T localmente sul tumore ha attirato negli ultimi anni grande attenzione. Attualmente, uno studio di fase I sta reclutando pazienti per ricevere cellule CAR T attraverso un catetere Rickham (NCT02208362) (Tabella supplementare 5). In questo studio, le cellule CAR T che hanno come bersaglio IL-13Rα2 sono generate attraverso la trasduzione lentivirale di cellule T di memoria centrale arricchite, e vengono iniettate nella cavità tumorale su base settimanale. Un paziente di questo studio, che aveva un glioblastoma ricorrente e lesioni multiple nel cervello e nel midollo spinale, ha mostrato una risposta notevole, sebbene le lesioni si siano ripresentate dopo 8 mesi<sup>131</sup>. Molti studi stanno attualmente testando varie forme di terapia con cellule CAR T, alcune in combinazione con l'inibizione del checkpoint (NCT04003649) o temozolomide (NCT04165941)

(Tabella supplementare 5).

Le cellule staminali e le cellule T ingegnerizzate sono ancora nelle prime fasi di sviluppo per il trattamento del glioblastoma. Le capacità tumorali delle NSC e delle cellule T sono molto importanti nel glioblastoma, che spesso si è infiltrato in profondità nel cervello al momento della diagnosi<sup>132-134</sup>. La somministrazione locale assicura che la maggior parte delle cellule arrivi nell'area con il maggior numero di cellule tumorali, ma questo approccio potrebbe non essere adatto a dosaggi ripetuti. La presenza di NSC mesi dopo la somministrazione è stata notata in uno studio<sup>126</sup> ma non in un altro<sup>128</sup>. Rimangono aperte alcune domande riguardanti la trasformazione maligna delle NSC, e la dinamica e il ciclo di vita delle NSC richiedono ulteriori studi, ma data la natura aggressiva del glioblastoma, gli eventi avversi a lungo termine potrebbero essere meno rilevanti che in certi altri tumori. Un fattore importante che complica la terapia con cellule CAR T nel glioblastoma è che le cellule T sono modificate per attaccare le cellule tumorali che esprimono antigeni specifici. Tuttavia, il glioblastoma è notoriamente eterogeneo e i profili di espressione possono cambiare drasticamente in risposta al trattamento, il che potrebbe limitare l'efficacia a lungo termine<sup>135,136</sup>. Il microambiente tumorale immunosoppressivo e l'esaurimento delle cellule T frequentemente osservato nel glioblastoma costituiscono ulteriori sfide per questa terapia<sup>113,137</sup>. Per affrontare questi problemi sono necessarie ulteriori ricerche in ambito clinico e pre-clinico. Inoltre, la terapia con cellule CAR T è attualmente assai laboriosa per i medici, e finanziariamente proibitiva per molti pazienti. Sebbene questo campo si stia sviluppando rapidamente, non sono ancora stati pianificati studi di fase III (Tabella supplementare 5).

### Conclusioni e prospettive future

Nel glioblastoma, la maggior parte delle recidive si verifica nella — o vicino alla — cavità di resezione<sup>11</sup>. Indirizzare la terapia alla cavità tumorale

potrebbe, quindi, migliorare l'efficacia del trattamento. Le terapie locali per il glioblastoma rappresentano una prospettiva allettante; tuttavia, la maggior parte dei nuovi approcci sono ancora in fase di sviluppo. La terapia genica locale e le terapie virali oncolitiche sono promettenti e sono in attesa di ulteriori studi di fase II e III. Uno dei principali punti di forza della terapia locale consiste nel ridurre al minimo gli eventi avversi sistemici e le interazioni, permettendo così approcci combinatori con le terapie sistemiche. Molti studi clinici attualmente in corso stanno valutando combinazioni di terapia locale e sistemica (Tabelle supplementari 1-5). Il monitoraggio dei livelli sistemici degli agenti somministrati localmente ha dimostrato che l'attraversamento della BBB è solitamente minimo<sup>104,126</sup>, e la maggior parte degli studi indica che gli eventi avversi sistemici si verificano raramente. Pertanto, la combinazione di terapia locale e sistemica potrebbe essere sicura, almeno in certi casi; tuttavia, rimane la necessità di effettuare più studi.

Anche se il trattamento della cavità chirurgica potrebbe migliorare il controllo locale del tumore, non va ad attaccare le cellule di glioblastoma infiltrate in profondità. Solo le NSC e le cellule CAR T hanno dimostrato di migrare in tutto il cervello e di riuscire ad attaccare focolai distanti di cellule tumorali<sup>126,131</sup>. Per puntare a curare il glioblastoma, una terapia deve avere il potenziale di penetrare profondamente nel tessuto sano per uccidere selettivamente le cellule del glioma. Una comprensione più profonda della terapia con NSC e cellule CAR T e dell'infiltrazione del glioblastoma stesso è necessaria per aumentare il potenziale di questi trattamenti. Il glioblastoma è un tumore immunologicamente “freddo” a causa della bassa infiltrazione di cellule T, e ha mostrato una scarsa risposta alle immunoterapie<sup>78</sup>. Oltre agli effetti antitumorali diretti, la terapia locale potrebbe indurre e potenziare una risposta immunitaria locale. Cloughesy et al. hanno dimostrato che la terapia

neoadiuvante anti-PD1 combinata con la chirurgia ha migliorato i risultati di sopravvivenza<sup>138</sup>. La terapia locale può migliorare e prolungare ulteriormente la risposta infiammatoria dopo la chirurgia, come si è visto con termoterapia magnetica<sup>30</sup>, PDT<sup>43</sup>, terapia adenovirale con IL12<sup>89</sup> e terapia G207<sup>104</sup>. La combinazione di questi approcci con le terapie sistemiche di inibizione del checkpoint potrebbe produrre effetti sinergici — una possibilità che viene studiata in molti studi di fase I e II in corso (Tabelle supplementari 1-5).

La terapia locale potrebbe fornire un'opzione di trattamento di prima linea nei pazienti con possibilità chirurgiche limitate. LITT e CED di chemioterapici e terapie virali potrebbero rappresentare un'alternativa alla chirurgia, anche se è necessaria un'ulteriore ottimizzazione dell'attuale alto rischio di eventi avversi e di peggioramento dei sintomi, sebbene spesso transitori. A dosi standard, la brachiterapia non sembra fornire ulteriori benefici, e anche se dosaggi più elevati potrebbero essere fattibili, gli studi hanno dimostrato un aumento inaccettabile della tossicità e degli eventi avversi<sup>139</sup>, con miglioramenti nei risultati<sup>140</sup>, quando vengono somministrate alte dosi locali.

La somministrazione locale potrebbe anche migliorare l'efficacia di terapie come il bevacizumab, che hanno mostrato benefici limitati quando somministrate per via sistemica<sup>66</sup>. Anche l'efficacia di terapie attuali come la temozolomide può essere migliorata se somministrata localmente, e uno studio clinico di somministrazione intrarteriosa di questo farmaco (NCT01180816) ha terminato recentemente l'arruolamento dei pazienti.

In laboratorio, si stanno sviluppando varie nuove tecniche e terapie. Nuovi metodi di somministrazione come quelli tramite idrogeli<sup>141</sup>, packaging nanoliposomiale<sup>142</sup>, microsfere polimeriche<sup>143</sup>, o microparticelle di cannabinoidi<sup>144</sup>, hanno tutti dimostrato di essere promettenti. Anche l'arsenale terapeutico si sta espandendo. I vettori batterici<sup>145</sup>, le terapie di inter-

ferenza dell'RNA<sup>146</sup> e l'elettroporazione irreversibile ad alta frequenza<sup>147</sup> sono stati testati in modelli pre-clinici e sono in attesa di essere realizzati in fase clinica.

Si spera che i successi preliminari della terapia locale nei pazienti incoraggino lo sviluppo di nuove tecniche e terapie. Neurochirurghi, neurologi, oncologi e altri specialisti dovrebbero essere coinvolti nello sviluppo di nuove terapie il più presto possibile, per migliorarne l'applicabilità ai pazienti con glioblastoma, la trasposizione alla fase clinica e la progettazione di studi di fase I e II. Anche se molti studi innovativi di fase I e II sono già stati condotti, sono poche le terapie che sono state confrontate con lo standard di cura in studi randomizzati di fase III. Attualmente, solo uno studio di terapia locale, che sta valutando IORT più lo standard di cura (NCT02685605), sta arruolando pazienti. Il reclutamento di un numero sufficiente di pazienti per popolare uno studio di fase III rimane uno sforzo lungo e impegnativo. La collaborazione tra istituzioni governative, ospedali e nazioni diverse dovrebbe essere incoraggiata e stabilita nelle prime fasi di sviluppo del trattamento, per agevolare la transizione verso coorti più grandi e facilitare la rapida espansione verso studi di fase III.

Il glioblastoma rimane difficile da trattare e molte terapie locali sono attualmente in fase di sviluppo. Il futuro del trattamento del glioblastoma non risiede probabilmente in un approccio unico, ma nella combinazione di trattamenti locali e sistemici messi a punto su misura per il paziente per combattere questa malattia fatale.

**Pubblicato online:** 11 marzo 2022

# REVIEWS

1. Stupp, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996 (2005).
2. Zhu, P., Du, X. L., Lu, G. & Zhu, J. J. Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: a population-based study. *Oncotarget* 8, 44015–44031 (2017).
3. Stupp, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466 (2009).
4. Stupp, R. et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 314, 2535–2543 (2015).
5. Mittal, S. et al. Alternating electric tumor treating fields for treatment of glioblastoma: rationale, preclinical, and clinical studies. *J. Neurosurg.* 128, 414–421 (2018).
6. Patel, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396–1401 (2014).
7. Brennan, C. W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 157, 753 (2014).
8. Broekman, M. L. et al. Multidimensional communication in the microenvironment of glioblastoma. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 482–495 (2018).
9. Antunes, A. R. P. et al. Understanding the glioblastoma immune microenvironment as a basis for the development of new immunotherapeutic strategies. *eLife* 9, e52176 (2020).
10. Jackson, M., Hassiotou, F. & Nowak, A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 36, 177–185 (2014).
11. Brandes, A. A. et al. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *J. Clin. Oncol.* 27, 1275–1279 (2009).
12. McGirt, M. J. et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma: clinical article. *J. Neurosurg.* 110, 156–162 (2009).
13. Duffau, H. Long-term outcomes after supratotal resection of diffuse low-grade gliomas: a consecutive series with 11-year follow-up. *Acta Neurochir.* 158, 51–58 (2016).
14. De Leeuw, C. N. & Vogelbaum, M. A. Supratotal resection in glioma: a systematic review. *Neuro Oncol.* 21, 179–188 (2019).
15. Titusworth, W. L., Murad, G. J. A., Hoh, B. L. & Rahman, M. Fighting fire with fire: the revival of radiotherapy for gliomas. *Anticancer. Res.* 34, 565–574 (2014).
16. Watanabe, M., Tanaka, R., Hondo, H. & Kuroki, M. Effects of antineoplastic agents and hyperthermia on cytotoxicity toward chronically hypoxic glioma cells. *Int. J. Hyperthermia* 8, 131–138 (1992).
17. Menovsky, T., Beek, J. F., Van Gemert, M. J. C., Roux, F. X. & Bown, S. G. Interstitial laser thermotherapy in neurosurgery: a review. *Acta Neurochir.* 138, 1019–1026 (1996).
18. Man, J. et al. Hyperthermia sensitizes glioma stem-like cells to radiation by inhibiting AKT signaling. *Cancer Res.* 75, 1760–1769 (2015).
19. Schildkopf, P. et al. Biological rationales and clinical applications of temperature controlled hyperthermia – implications for multimodal cancer treatments. *Curr. Med. Chem.* 17, 3045–3057 (2010).
20. Frey, B. et al. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system. *Int. J. Hyperthermia* 28, 528–542 (2012).
21. Lee, I., Kalkanis, S. & Hadjippanayis, C. G. Stereotactic laser interstitial thermal therapy for recurrent high-grade gliomas. *Clin. Neurosurg.* 79, S24–S34 (2016).
22. Holste, K. G. & Orringer, D. A. Laser interstitial thermal therapy. *Neurooncol Adv.* 2, vdz035 (2020).
23. Mohammadi, A. M. et al. Upfront magnetic resonance imaging-guided stereotactic laser ablation in newly diagnosed glioblastoma: a multicenter review of survival outcomes compared to a matched cohort of biopsy-only patients. *Clin. Neurosurg.* 85, 762–772 (2019).
24. Kamath, A. A. et al. Glioblastoma treated with magnetic resonance imaging-guided laser interstitial thermal therapy: safety, efficacy, and outcomes. *Clin. Neurosurg.* 84, 836–843 (2019).
25. Mohammadi, A. M. et al. The role of laser interstitial thermal therapy in enhancing progression-free survival of difficult-to-access high-grade gliomas: a multicenter study. *Cancer Med.* 3, 971–979 (2014).
26. Viozzi, I., Guberinic, A., Overduin, C. G., Rovers, M. M. & ter Laan, M. Laser interstitial thermal therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: a systematic review. *J. Clin. Med.* 10, 355 (2021).
27. Leuthardt, E. C., Voigt, J., Kim, A. H. & Sylvester, P. A single-center cost analysis of treating primary and metastatic brain cancers with either brain laser interstitial thermal therapy (LITT) or craniotomy. *Pharmacoecon. Open* 1, 53–63 (2017).
28. Barnett, G. H., Voigt, J. D. & Alhuwalia, M. S. A systematic review and meta-analysis of studies examining the use of brain laser interstitial thermal therapy versus craniotomy for the treatment of high-grade tumors in or near areas of eloquence: an examination of the extent of resection and major complication rates associated with each type of surgery. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 94, 164–173 (2016).
29. Maier-Hauff, K. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 103, 317–324 (2011).
30. Grauer et al. Combined intracavitary thermotherapy with iron oxide nanoparticles and radiotherapy as a local treatment modality in recurrent glioblastoma patients. *J. Neurooncol.* 141, 83–94 (2019).
31. Brown, N. F., Carter, T. J., Ottaviani, D. & Mulholland, P. Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br. J. Cancer* 119, 1171–1181 (2018).
32. Meng, Y., Hynynen, K. & Lipsman, N. Applications of focused ultrasound in the brain: from thermablation to drug delivery. *Nat. Rev. Neurol.* 17, 7–22 (2021).
33. Bunevicius, A., McDannold, N. J. & Golby, A. J. Focused ultrasound strategies for brain tumor therapy. *Oper. Neurosurg.* 19, 9–18 (2020).
34. Elias, W. J. et al. A randomized trial of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *N. Engl. J. Med.* 375, 730–739 (2016).
35. Guthkelch, A. N. et al. Treatment of malignant brain tumors with focused ultrasound hyperthermia and radiation: results of a phase I trial. *J. Neurooncol.* 10, 271–284 (1991).
36. Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279–293 (2004).
37. Castano, A. P., Demidova, T. N. & Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2, 1–23 (2005).
38. Fingar, V. H. Vascular effects of photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14, 323–328 (1996).
39. Li, F. et al. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J. Cell. Biochem.* 112, 3035–3043 (2011).
40. Bellnier, D. A. et al. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg. Med.* 38, 439–444 (2006).
41. Stummer, W. et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7, 392–401 (2006).
42. Eljamel, M. S., Goodman, C. & Moseley, H. ALA and Photofrin® fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre phase III randomised controlled trial. *Lasers Med. Sci.* 23, 361–367 (2008).
43. Schipmann, S. et al. Combination of ALA-induced fluorescence-guided resection and intraoperative open photodynamic therapy for recurrent glioblastoma: case series on a promising dual strategy for local tumor control. *J. Neurosurg.* 134, 426–436 (2020).
44. Linde, M. E. Van et al. Treatment outcome of patients with recurrent glioblastoma multiforme: a retrospective multicenter analysis. *J. Neurooncol.* 135, 183–192 (2017).
45. Wang, H.-W. et al. Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. *J. Biomed. Opt.* 10, 014004 (2005).
46. Akimoto, J. et al. First autopsy analysis of the efficacy of intra-operative additional photodynamic therapy for patients with glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 36, 144–151 (2019).
47. Vermandel, M. et al. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J. Neurooncol.* 152, 501–514 (2021).
48. Jain, R. K. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 570–576 (1989).
49. Jahangiri, A. et al. Convection-enhanced delivery in glioblastoma: a review of preclinical and clinical studies. *J. Neurosurg.* 126, 191–200 (2017).
50. Kunwar, S. et al. Phase III randomized trial of



- CED of IL13-PE38QQR vs Gliadelwafers for recurrent glioblastoma. *Neuro. Oncol.* 12, 871–881 (2010).
51. Jain, R. K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 253–266 (1990).
52. Smith, J. H. & Humphrey, J. A. C. Interstitial transport and transvascular fluid exchange during infusion into brain and tumor tissue. *Microvasc. Res.* 73, 58–73 (2007).
53. Gimenez, F. et al. Image-guided convection-enhanced delivery of GDNF protein into monkey putamen. *Neuroimage* 54 (Suppl. 1), 189–195 (2011).
54. Astarý, G. W., Kantorovich, S., Carney, P. R., Mareci, T. H. & Sarntinoranont, M. Regional convection-enhanced delivery of gadolinium-labeled albumin in the rat hippocampus in vivo. *J. Neurosci. Methods* 187, 129–137 (2010).
55. Sampson, J. H. et al. Colocalization of gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid with high-molecular-weight molecules after intracerebral convection-enhanced delivery in humans. *Neurosurgery* 69, 668–676 (2011).
56. Saito, R. et al. Regression of recurrent glioblastoma infiltrating the brain stem after convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride: case report. *J. Neurosurg. Pediatr.* 7, 522–526 (2011).
57. Saito, R. et al. Phase I trial of convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride (ACNU) for brain stem recurrent glioma. *Neurooncol. Adv.* 2, vdaa033 (2020).
58. Haar, P. J. et al. Modelling convection-enhanced delivery in normal and oedematous brain. *J. Med. Eng. Technol.* 38, 76–84 (2014).
59. White, E. et al. An evaluation of the relationships between catheter design and tissue mechanics in achieving high-flow convection-enhanced delivery. *J. Neurosci. Methods* 199, 87–97 (2011).
60. Westphal, M. et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro. Oncol.* 5, 79–88 (2003).
61. Bregy, A. et al. The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 13, 1453–1461 (2013).
62. De Bonis, P. et al. Safety and efficacy of Gliadel wafers for newly diagnosed and recurrent glioblastoma. *Acta Neurochir.* 154, 1371–1378 (2012).
63. Tsai, N. M. et al. The natural compound n-butylidenephthalide derived from *Angelica sinensis* inhibits malignant brain tumor growth in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 99, 1251–1262 (2006).
64. Yang, D.-Y. et al. Enhanced antitumor effects of radiotherapy combined with local nimustine delivery rendezvousing with oral temozolomide chemotherapy in glioblastoma patients. *J. Cancer Res. Ther.* 14, 78 (2018).
65. Wilson, C. B. Chemotherapy of brain tumors by continuous arterial infusion. *Surgery* 55, 640–653 (1964).
66. D'Amico, R. S. et al. Super selective intra-arterial cerebral infusion of modern chemotherapeutics after blood–brain barrier disruption: where are we now, and where are we going. *J. Neurooncol.* 147, 261–278 (2020).
67. Karmur, B. S. et al. Blood–brain barrier disruption in neuro-oncology: strategies, failures, and challenges to overcome. *Front. Oncol.* 10, 563840 (2020).
68. Boockvar, J. A. et al. Safety and maximum tolerated dose of superselective intra-arterial cerebral infusion of bevacizumab after osmotic blood–brain barrier disruption for recurrent malignant glioma: clinical article. *J. Neurosurg.* 114, 624–632 (2011).
69. Galla, N. et al. Apparent diffusion coefficient changes predict survival after intra-arterial bevacizumab treatment in recurrent glioblastoma. *Neuroradiology* 59, 499–505 (2017).
70. Shin, B. J., Burkhardt, J.-K., Riina, H. A. & Boockvar, J. A. Superselective intra-arterial cerebral infusion of novel agents after blood–brain disruption for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: a technical case series. *Neurosurg. Clin.* 23, 323–329 (2012).
71. Chakraborty, S. et al. Superselective intra-arterial cerebral infusion of cetuximab after osmotic blood/brain barrier disruption for recurrent malignant glioma: phase I study. *J. Neurooncol.* 128, 405–415 (2016).
72. Fortin, D., Morin, P. A., Belzile, F., Mathieu, D. & Paré, F. M. Intra-arterial carboplatin as a salvage strategy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 119, 397–403 (2014).
73. Petr, J. et al. Early and late effects of radiochemotherapy on cerebral blood flow in glioblastoma patients measured with non-invasive perfusion MRI. *Radiother. Oncol.* 118, 24–28 (2016).
74. Svensson, S. F. et al. MR elastography-based tissue stiffness in glioblastoma is associated with reduced cerebral blood flow. *Preprint at medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.06.11.21258742> (2021).
75. Chow, K. L. et al. Prognostic factors in recurrent glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma treated with selective intra-arterial chemotherapy. *Am. J. Neuroradiol.* 21, 471–478 (2000).
76. Joshi, S. et al. Transient cerebral hypoperfusion assisted in intra-arterial cationic liposome delivery to brain tissue. *J. Neurooncol.* 118, 73–82 (2014).
77. Riina, H. A. et al. Balloon-assisted superselective intra-arterial cerebral infusion of bevacizumab for malignant brain stem glioma: a technical note. *Interv. Neuroradiol.* 16, 71–76 (2010).
78. Jackson, C. M., Choi, J. & Lim, M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nat. Immunol.* 20, 1100–1109 (2019).
79. McGranahan, T., Therkelsen, K. E., Ahmad, S. & Nagpal, S. Current state of immunotherapy for treatment of glioblastoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* 20, 24 (2019).
80. Weller, M. & Le Rhun, E. Immunotherapy for glioblastoma: quo vadis? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 405–406 (2019).
81. Chiocca, E. A., Nassiri, F., Wang, J., Peruzzi, P. & Zadeh, G. Viral and other therapies for recurrent glioblastoma: is a 24-month durable response unusual? *Neuro. Oncol.* 21, 14–25 (2019).
82. Auffinger, B., Ahmed, A. U. & Lesniak, M. S. Oncolytic virotherapy for malignant glioma: translating laboratory insights into clinical practice. *Front. Oncol.* 3, 32 (2013).
83. Martikainen, M. & Essand, M. Virus-based immunotherapy of glioblastoma. *Cancers* 11, 186 (2019).
84. Harsh, G. R. et al. Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study. *J. Neurosurg.* 92, 804–811 (2000).
85. Rainov, N. G. et al. Temozolomide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma. *Cancer Gene Ther.* 8, 662–668 (2001).
86. Nestler, U. et al. The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J. Neurooncol.* 67, 177–188 (2004).
87. Wheeler, L. A. et al. Phase II multicenter study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgical resection for newly diagnosed malignant glioma. *Neuro. Oncol.* 18, 1137–1145 (2016).
88. Ji, N. et al. Adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase administration improves outcome of recurrent high-grade glioma. *Oncotarget* 7, 4369–4378 (2016).
89. Chiocca, E. A. et al. Regulatable interleukin-12 gene therapy in patients with recurrent high-grade glioma: results of a phase 1 trial. *Sci. Transl. Med.* 11, eaaw5680 (2019).
90. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133–146 (2003).
91. Zhang, L. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 2278–2288 (2015).
92. Car, B. D., Eng, V. M., Lipman, J. M. & Anderson, T. D. The toxicology of interleukin-12: a review. *Toxicol. Pathol.* 27, 58–63 (1999).
93. Cai, H. et al. Plasma pharmacokinetics of veledimex, a small-molecule activator ligand for a proprietary gene therapy promoter system, in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 6, 246–257 (2017).
94. Ostertag, D. et al. Brain tumor eradication and prolonged survival from intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil using a nonlytic retroviral replicating vector. *Neuro. Oncol.* 14, 145–159 (2012).
95. Cloughesy, T. F. et al. Phase 1 trial of vocimagene amiretrorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma. *Sci. Transl. Med.* 8, 341ra75 (2016).
96. Desjardins, A. et al. Recurrent glioblastoma treated with recombinant poliovirus. *N. Engl. J. Med.* 379, 150–161 (2018).
97. Brown, M. C. et al. Cancer immunotherapy with recombinant poliovirus induces IFN-dominant activation of dendritic cells and tumor antigen-specific CTLs. *Sci. Transl. Med.* 9, eaan4220 (2017).
98. Lang, F. F. et al. Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J. Clin. Oncol.* 36, 1419–1427 (2018).
99. Maher, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15, 1311–1333 (2001).
100. Fueyo, J. et al. Preclinical characterization of the anti-glioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 652–660 (2003).



# REVIEWS

101. Mineta, T., Rabkin, S. D., Yazaki, T., Hunter, W. D. & Martuza, R. L. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat. Med.* 1, 938–943 (1995).
102. Markert, J. M. et al. A phase 1 trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrated safety and radiographic responses. *Mol. Ther.* 22, 1048–1055 (2014).
103. Friedman, G. K. et al. Enhanced sensitivity of patient-derived pediatric high-grade brain tumor xenografts to oncolytic HSV-1 virotherapy correlates with nectin-1 expression. *Sci. Rep.* 8, 13930 (2018).
104. Friedman, G. K. et al. Oncolytic HSV-1 G207 immunovirotherapy for pediatric high-grade gliomas. *N. Engl. J. Med.* 384, 1613–1622 (2021).
105. Liu, E. K., Yu, S., Sulman, E. P. & Kurz, S. C. Racial and socioeconomic disparities differentially affect overall and cause-specific survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 149, 55–64 (2020).
106. Rainov, N. G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum. Gene Ther.* 11, 2389–2401 (2000).
107. Kawakami, M., Kawakami, K. & Puri, R. K. Intratumoral administration of interleukin 13 receptor-targeted cytotoxin induces apoptosis of tumor cells in human malignant glioma tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 1, 999–1007 (2002).
108. Krieg, A. M. Antitumor applications of stimulating Toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr. Oncol. Rep.* 6, 88–95 (2004).
109. Meng, Y. et al. Expression of TLR9 within human glioblastoma. *J. Neurooncol.* 88, 19–25 (2008).
110. Andaloussi, S. E. L., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347–357 (2013).
111. Carpentier, A. et al. Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: a phase II study. *Neuro. Oncol.* 12, 401–408 (2010).
112. Ursu, R. et al. Intracerebral injection of CpG oligonucleotide for patients with de novo glioblastoma—a phase II multicentric, randomised study. *Eur. J. Cancer* 73, 30–37 (2017).
113. Nduom, E. K., Weller, M. & Heimerlberger, A. B. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 17 (Suppl. 7), vii9–vii14 (2015).
114. Mann, J., Ramakrishna, R., Magge, R. & Wernicke, A. G. Advances in radiotherapy for glioblastoma. *Front. Neurol.* 8, 748 (2018).
115. Barbarite, E. et al. The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurg. Rev.* 40, 195–211 (2017).
116. Bartek, J. et al. Receipt of brachytherapy is an independent predictor of survival in glioblastoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J. Neurooncol.* 145, 75–83 (2019).
117. Field, K. M. et al. Clinical trial participation and outcome for patients with glioblastoma: multivariate analysis from a comprehensive dataset. *J. Clin. Neurosci.* 20, 783–789 (2013).
118. Skaga, E. et al. Real-world validity of randomized controlled phase III trials in newly diagnosed glioblastoma: to whom do the results of the trials apply? *Neurooncol. Adv.* 3, vdab008 (2021).
119. Schwartz, C. et al. Outcome and toxicity profile of salvage low-dose-rate iodine-125 stereotactic brachytherapy in recurrent high-grade gliomas. *Acta Neurochir.* 157, 1757–1764 (2015).
120. Kickingeder, P. et al. Low-dose rate stereotactic iodine-125 brachytherapy for the treatment of inoperable primary and recurrent glioblastoma: single-center experience with 201 cases. *J. Neurooncol.* 120, 615–623 (2014).
121. Phillips, W. T. et al. Rhenium-186 liposome-associated convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma. *Neuro. Oncol.* 14, 416–425 (2012).
122. Pilar, A., Gupta, M., Ghosh Laskar, S. & Laskar, S. Intraoperative radiotherapy: review of techniques and results. *Ecancer medical science* 11, 750 (2017).
123. Sarria, G. R. et al. Intraoperative radiotherapy for glioblastoma: an international pooled analysis. *Radiother. Oncol.* 142, 162–167 (2020).
124. Aboody, K. S. et al. Neural stem cell-mediated enzyme/prodrug therapy for glioma: preclinical studies. *Sci. Transl. Med.* 5, 184ra59 (2013).
125. Pacioni, S. et al. Human mesenchymal stromal cells inhibit tumor growth in orthotopic glioblastoma xenografts. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 53 (2017).
126. Portnow, J. et al. Neural stem cell-based anticancer gene therapy: a first-in-human study in recurrent high-grade glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 23, 2951–2960 (2017).
127. Kim, S. U. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology* 24, 159–171 (2004).
128. Fares, J. et al. Neural stem cell delivery of an oncolytic adenovirus in newly diagnosed malignant glioma: a first-in-human, phase I, dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 22, 1103–1114 (2021).
129. Ahmed, A. U. et al. A preclinical evaluation of neural stem cell-based cell carrier for targeted anti-glioma oncolytic virotherapy. *J. Natl Cancer Inst.* 105, 968–977 (2013).
130. Salinas, R. D., Durgin, J. S. & O'Rourke, D. M. Potential of glioblastoma-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *CNS Drugs* 34, 127–145 (2020).
131. Brown, C. E. et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 375, 2561–2569 (2016).
132. Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. & Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 15, 730–738 (2008).
133. Choi, S. H. et al. Tumor resection recruits effector T cells and boosts therapeutic efficacy of encapsulated stem cells expressing IFN $\beta$  in glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* 23, 7047–7058 (2017).
134. Alayo, Q. A. et al. Glioblastoma infiltration of both tumor- and virus-antigen specific cytotoxic T cells correlates with experimental virotherapy responses. *Sci. Rep.* 10, 5095 (2020).
135. Nefel, C. et al. An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell* 178, 835–849.e21 (2019).
136. Felsberg, J. et al. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 6846–6855 (2017).
137. Chongsathidkiet, P. et al. Sequestration of T cell in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nat. Med.* 24, 1459–1468 (2018).
138. Cloughesy, T. F. et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat. Med.* 25, 477–486 (2019).
139. Chen, A. M. et al. Phase I trial of gross total resection, permanent iodine-125 brachytherapy, and hyperfractionated radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69, 825–830 (2007).
140. Cabrera, A. R. et al. Radiation therapy for glioblastoma: executive summary of an American Society for Radiation Oncology evidence-based clinical practice guideline. *Pract. Radiat. Oncol.* 6, 217–225 (2016).
141. Puente, P. de la et al. Injectable hydrogels for localized chemotherapy and radiotherapy in brain tumors. *J. Pharm. Sci.* 107, 922–933 (2018).
142. Chen, P. Y. et al. Comparing routes of delivery for nanoliposomal irinotecan shows superior anti-tumor activity of local administration in treating intracranial glioblastoma xenografts. *Neuro. Oncol.* 15, 189–197 (2013).
143. Floyd, J. A., Galperin, A. & Ratner, B. D. Drug-encapsulated polymeric microspheres for intracranial tumor therapy: a review of the literature. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 91, 23–37 (2015).
144. Hernán Pérez de la Ossa, D. et al. Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibit tumor growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme. *PLoS ONE* 8, 2–9 (2013).
145. Mehta, N. et al. Bacterial carriers for glioblastoma therapy. *Mol. Ther. Oncolytics* 4, 1–17 (2017).
146. Cohen, Z. R. et al. Localized RNAi therapeutics of chemoresistant grade IV glioma using hyaluronan-grafted lipid-based nanoparticles. *ACS Nano* 9, 1581–1591 (2015).
147. Sharabi, S. et al. The application of point source electroporation and chemotherapy for the treatment of glioma: a randomized controlled rat study. *Sci. Rep.* 10, 2178 (2020).
148. Giuliano, A. R. et al. Participation of minorities in cancer research: the influence of structural, cultural, and linguistic factors. *Ann. Epidemiol.* 10, S22–S34 (2000).
149. Pitter, K. L. et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma. *Brain* 139, 1458–1471 (2016).
150. Gorlia, T. et al. New prognostic factors and calculators for outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma: a pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase I and II clinical trials. *Eur. J. Cancer* 48, 1176–1184 (2012).

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano M. E. Haeflich per la correzione di errori tipografici e grammaticali delle bozze di questo manoscritto; l'assistenza editoriale qualificata di S. McDavitt; e i suggerimenti di X. Breakefield. M.L.D.B. è sostenuto dai fondi NIH NCI R35 CA232103. T.S.v.S. è sostenuto dai fondi della BontiusStichting, dal Fondo Nijbakker-Morra, della Fondazione Vrijvrouwe van Renswoude e dal Fondo Bekker-la Bastide. T.S.v.S. e E.A.C. sono sostenuti dai fondi NIH P01 CA069246.

## Contributi dei vari autori

T.S.v.S. ha ricercato i dati per l'articolo. Tutti gli autori hanno contribuito in maniera sostanziale alla produzione del contenuto. T.S.v.S. e M.L.D.B. hanno scritto l'articolo. Tutti gli autori hanno rivisto e/o modificato il manoscritto prima dell'invio.

## Conflitti di interesse

E.A.C. è attualmente consulente di Advantagene, Alcyone Biosciences, Insightec, DNAtrix, ImmunomicTherapeutics, Seneca Therapeutics, GlaxoSmithKline e VoyagerTherapeutics e ha partecipazioni in DNAtrix, ImmunomicTherapeutics e Seneca Therapeutics; è stato inoltre consulente di Oncorus, Merck, Tocagen, Ziopharm, Stemgen, NanoTx, ZiopharmOncology, CerebralTherapeutics, Genenta, Merck, Janssen, Karcinolysis, Shanghai Biotech e SangamoTherapeutics. Ha ricevuto sostegni alla ricerca da NIH, Dipartimento della Difesa degli Stati Uniti, American Brain Tumor Association, National Brain Tumor Society, Alliance for Cancer Gene Therapy, NeurosurgicalResearchEducation Foundation, Advantagene, NewLink Genetics e Amgen. È anche un inventore nominato su brevetti relativi aHSV-1 oncolitico e a RNA non codificanti. Gli altri autori non dichiarano conflitti di interesse.

## Informazioni sulla peer-review (revisione tra pari)

*Nature Reviews Neurology* ringrazia C. Herold-Mende e gli altri revisori,

anonimi, per il loro contributo alla revisione di questo lavoro.

## Nota dell'editore

Springer Nature rimane neutrale per quanto riguarda le rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e le affiliazioni istituzionali.

## Criteri applicati per questa rassegna

Nel dicembre 2020, abbiamo cercato su PubMed ed Embase studi che utilizzassero qualsiasi forma di terapia locale nel glioblastoma. Parole chiave, termini Mesh e termini Emtree tra cui "glioblastoma", "glioma", "localtherapy", "localizedtherapy", "convectionenhanced delivery", "thermotherapy", "wafer", "brachytherapy", "photodynamictherapy" e i loro sinonimi sono stati combinati per formare la nostra ricerca. I titoli e i sommari sono stati vagliati alla ricerca di articoli e studi pertinenti. Le bibliografie in calce ad articoli a testo completo sono state controllate per ulteriori studi. Gli articoli dovevano essere scritti in inglese e pubblicati negli ultimi 20 anni. Gli studi eseguiti prima dell'implementazione del protocollo Stupp sono stati esclusi, a meno che non fossero ritenuti rilevanti per gli studi attuali o per la cura dei pazienti. Sono stati esclusi anche i case report. Gli autori hanno poi raccomandato ulteriori articoli. Per gli studi clinici in corso, abbiamo cercato su ClinicalTrials.gov le malattie "glioblastoma" e "glioma", e tutti gli studi con lo stato 'notyetrecruiting', 'recruiting', 'enrolling by invitation', 'active, notrecruiting', o 'available'.

## Informazioni supplementari

La versione online contiene materiale supplementare disponibile su <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00621-0>.

© Springer Nature Limited 2022