

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

**Sistemi per il rilascio controllato di farmaci
nella cura del glioblastoma multiforme**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Alessia Bosco

Data: 20 settembre 2022
A.A. 2021/2022

Firma laureanda

Firma relatore

Indice

Abstract	pagina 5
Introduzione	pagina 7
0.1 Anatomia del sistema nervoso centrale	pagina 7
0.2 Classificazione dei tumori nel SNC	pagina 9
Capitolo 1: Glioblastoma multiforme	pagina 11
1.1 Epidemiologia	pagina 11
1.2 Fattori di rischio	pagina 11
1.2.1 Fattori di rischio genetici	pagina 11
1.2.2 Fattori di rischio non genetici	pagina 12
1.3 Diagnostica	pagina 13
1.4 Anatomia patologica	pagina 14
1.5 Prognosi	pagina 15
Capitolo 2: Trattamenti attuali	pagina 17
2.1 Resezione chirurgica	pagina 18
2.2 Radioterapia	pagina 19
2.3 Chemioterapia	pagina 20
2.4 Immunoterapia	pagina 21
2.4.1 Vaccini	pagina 23
2.4.2 Blocco del Checkpoint Immunitario	pagina 24
2.4.3 Cellule T-CAR	pagina 25
2.4.4 Terapia virale oncolitica	pagina 26
2.5 Altri trattamenti	pagina 26
2.5.1 Terapie locoregionali: TTFields	pagina 26
2.5.2 Terapia mirata	pagina 27
2.5.3 Terapie di supporto	pagina 28
2.5.4 Terapia personalizzata: organoidi	pagina 29
Capitolo 3: Sistemi per il rilascio di farmaci antitumorali	pagina 31
3.1 Meccanismo alla base del rilascio controllato	pagina 33
3.1.1 Degradazione del biomateriale	pagina 33
3.1.2 Cinetica di rilascio del farmaco	pagina 35
3.2 Farmaci utilizzati	pagina 37
3.3 Biomateriali: requisiti ed esempi	pagina 38

3.3.1 p(CPP:SA)	pagina 38
3.3.2 PLGA	pagina 39
3.3.3 PCL	pagina 40
3.3.4 PEG	pagina 41
3.4 Confronto tra dispositivi per il rilascio controllato	pagina 42
3.4.1 Gliadel® wafer	pagina 42
3.4.2 Scaffold polimerici flessibili	pagina 43
3.4.3 Idrogel e nanoparticelle polimeriche	pagina 45
Capitolo 4: Applicazioni e prospettive	pagina 49
4.1 Sperimentazione preclinica	pagina 49
4.2 Sperimentazione clinica	pagina 50
4.3 Prospettive future	pagina 53
Conclusione	pagina 55
Bibliografia	pagina 57

Abstract

Il Glioblastoma Multiforme è il tumore cerebrale maligno più comune ed aggressivo, con una prognosi del tutto sfavorevole e un'aspettativa di vita, nel migliore dei casi, di massimo cinque anni dalla diagnosi.

Il trattamento attuale, detto protocollo Stupp, prevede di procedere chirurgicamente con la massima resezione del tessuto tumorale e sottoporre in seguito il paziente a radioterapia e chemioterapia con temozolomide. Tuttavia, lo standard di cura corrente non risulta del tutto efficace per cui sono state intraprese numerose ricerche e introdotti nuovi approcci terapeutici, basati ad esempio sul rilascio controllato di farmaci.

Questa tesi presenta una breve panoramica sugli attuali trattamenti e sulle prospettive future, focalizzandosi in particolare sui dispositivi impiantabili per il rilascio di farmaci citotossici per la cura del glioblastoma. Queste strutture di piccolissime dimensioni, realizzate con polimeri biodegradabili, sono in grado, una volta inserite nell'ambiente tumorale durante la neurochirurgia, di rilasciare le sostanze chemioterapiche gradualmente e localmente, andando così a ridurre il numero di cellule cancerose ancora presenti e/o prevenirne la ricrescita. Nella trattazione verranno presentati diversi sistemi che sfruttano il rilascio controllato del principio attivo, descrivendo nel dettaglio i diversi biomateriali utilizzati, i farmaci rilasciati, il meccanismo di rilascio alla base di questi dispositivi e infine i risultati ottenuti dalle loro sperimentazioni.

Introduzione

Il sistema nervoso umano, con l'attività dei suoi miliardi di neuroni e cellule gliali, costituisce il prodotto più complesso ed importante dell'evoluzione. Esso consente di captare stimoli esterni, interpretarli e rispondere adeguatamente permettendo così non solo di interagire con l'ambiente circostante ma anche di sviluppare ogni espressione della personalità, del comportamento, dell'esperienza e del pensiero.

L'alterazione funzionale e morfologica dei suoi componenti può comportare una serie di disturbi neurologici anche di notevole gravità, con effetti devastanti sull'organismo. Tra questi, in questo contesto ci si soffermerà sui tumori ed in particolare sul glioblastoma, del quale si approfondiranno le tecniche di trattamento.

Si ricorda che nel Sistema Nervoso Umano è possibile distinguere un sistema centrale (SNC) e un sistema periferico (SNP). Per meglio comprendere la tipologia di alterazione causata dal glioblastoma, è bene innanzitutto partire con uno sguardo sull'anatomia del Sistema Nervoso Centrale.

0.1 Anatomia del sistema nervoso centrale

Il SNC è contenuto all'interno di involucri ossei ed è sede delle funzioni di elaborazione delle informazioni in arrivo e produzione delle risposte. È formato da diversi tipi cellulari: i neuroni, specializzati nella generazione e conduzione di impulsi nervosi, e le cellule gliali, con funzione principale di supporto e di risposta immunitaria.

Ogni neurone è formato da un corpo cellulare (soma o pironoforo) contenente il nucleo e dal quale si diramano diversi prolungamenti, tra cui uno principale (assone, con il compito di trasmettere gli impulsi elettrici a distanza) e diversi di dimensioni minori (dendriti, che viceversa li ricevono). Alla terminazione dell'assone si trovano i terminali assonici, parte attiva della sinapsi e quindi della trasmissione dell'impulso in forma chimica o elettrica. Per proteggere questo delicato processo, l'assone è coperto dalla guaina mielinica formata da avvolgimenti degli oligodendrociti o cellule di Schwann [1, 2].

Le cellule della nevroglia sono invece divise in più classi: cellule della macroglia (astrociti e oligodendrociti), cellule della microglia e cellule ependimali. Tra questi gli **astrociti** hanno una notevole importanza perché non solo fungono da supporto, come le altre cellule della glia, ma sono anche a stretto contatto con i vasi cerebrali e quindi costituiscono parte della cosiddetta **barriera ematoencefalica**. Quest'ultima gioca un ruolo chiave nel controllo dello scambio di

sostanze essenziali per l'attività metabolica e funzionale del cervello. La sua integrità è quindi fondamentale per mantenere l'omeostasi del microambiente encefalico [3].

Le cellule summenzionate vanno a formare il sistema nervoso centrale distribuendosi in modo molto preciso: la sostanza grigia, formata prevalentemente dai corpi cellulari e dai dendriti, e la sostanza bianca, costituita da fasci assonici mielinici. L'unione di materia bianca e materia grigia compone le varie strutture del sistema nervoso centrale.

I macro-componenti del SNC sono invece: midollo spinale, tronco encefalico, cervelletto, diencefalo e telencefalo (Figura 0.1). Questi sono protetti da strutture ossee e avvolti da tre strati di tessuto connettivo, le meningi (dura madre, aracnoide, pia madre).

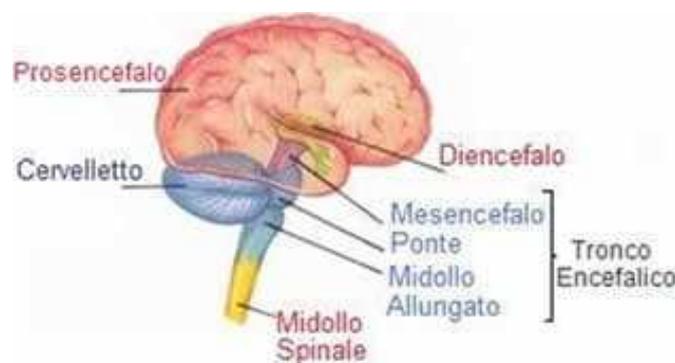


Figura 0.1: Struttura del sistema nervoso centrale con i suoi componenti principali.

Il **midollo spinale** è contenuto nel canale vertebrale e riceve stimoli provenienti dalla zona del collo, del tronco e degli arti che vengono poi coordinati e reindirizzati verso gli organi effettori e all'encefalo. La sezione trasversale è circolare e caratterizzata da un canale centrale principale circondato da materia grigia, con una tipica forma ad H, e materia bianca più all'esterno. L'interno del canale che percorre il midollo è occupato dal liquido cerebrospinale (o liquor) che si trova anche nelle cavità dell'encefalo e svolge funzione sia di protezione meccanica sia di scambi di nutrienti.

La continuazione del midollo e delle sue funzioni nell'encefalo è data dalla presenza del **tronco encefalico** che può essere a sua volta diviso in bulbo, ponte e mesencefalo.

Dorsalmente a questo elemento è invece situato il **cervelletto** a cui si devono importanti funzioni del movimento come l'equilibrio, il tono muscolare, la postura e la coordinazione dei movimenti. Il cervelletto è la seconda struttura dell'encefalo per dimensioni e ha inoltre una struttura molto simile a quella del telencefalo con due emisferi, una superficie ripiegata con numerosi solchi, la materia grigia sulla zona superficiale a formare la corteccia cerebrale e la materia bianca all'interno.

Collegato a questa porzione del SNC e a stretto contatto con il telencefalo, vi è il **diencefalo** suddiviso in talamo, ipotalamo, subtalamo, metatalamo ed epitalamo. In questa zona risiedono le vie sensitive, la memoria recente, varie attività comportamentali come il tono affettivo e dell'umore, e diverse funzioni di regolazione legate soprattutto al ritmo del sonno-veglia, fame, sete, temperatura corporea, pressione arteriosa e frequenza cardiaca.

Rostralmente al diencefalo vi è infine il **telencefalo**, che costituisce la parte più evoluta e sviluppata del sistema nervoso centrale ed è qui che nella maggior parte dei casi si sviluppa il glioblastoma. Il telencefalo è formato da due emisferi separati da un profondo solco, collegati tra loro dal corpo calloso e dotati di una superficie molto estesa che per questo si ripiega su se stessa dando luogo a numerosi solchi secondari e giri cerebrali che ne determinano i lobi. Le regioni del telencefalo e quindi della corteccia cerebrale, la sua zona più superficiale costituita da materia grigia, possono essere classificate secondo criteri diversi come ad esempio la posizione dei lobi: frontale, parietale, temporale e occipitale. Un'altra classificazione è quella svolta da Korbinian Brodman nel 1909, tutt'ora utilizzata. In questo caso la corteccia viene divisa in cinquantadue aree ciascuna delle quali con struttura e funzioni specifiche ed identificate numericamente. Queste porzioni possono poi essere raggruppate in regioni più ampie in base alla loro funzione: le aree sensoriali a cui si attribuisce la sede degli stimoli sensitivi, le aree motorie che regolano e attivano i motoneuroni, e le aree associative nelle quali si ha l'interpretazione della realtà e dell'ambiente circostante attraverso lo sviluppo di linguaggio, memoria, autocoscienza eccetera [1,2,4].

Le cellule e le strutture anatomiche del Sistema Nervoso Centrale viste sopra possono essere interessate da sostanziali alterazioni, in particolare quelle di natura tumorale.

0.2 Classificazione dei tumori nel SNC

I tumori del sistema nervoso centrale sono dovuti alla proliferazione incontrollata delle cellule cancerose. Vengono classificati per lo più in base alla tipologia delle cellule e alle strutture anatomiche coinvolte, ed in base al grado, riferito alla capacità di tali cellule di crescere e diffondere.

Secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS, Report 2016 e 2021) i tumori cerebrali possono essere divisi in più tipologie come mostra la Figura 0.2. Queste classi possono essere raggruppate in due macro gruppi: i tumori neuroepiteliali e i tumori non-neuroepiteliali.

I primi comprendono i tumori astrocitari, tumori oligodendrogliali, tumori delle cellule ependimali, tumori neuronali e misti neuronali/gliali, tumori embrionali, tumori della ghiandola

pineale, tumori dei plessi coroidei e altri gliomi. I secondi invece comprendono i tumori della regione sellare, tumori dei nervi cranici e spinali, tumori ematopoietici e tumori delle meningi.

WHO grades of select CNS tumours			
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III		
Other astrocytic tumours		Tumours of the pineal region	
Pilocytic astrocytoma	I	Pineocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Pineoblastoma	IV
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Ependymal tumours		Embryonal tumours	
Subependymoma	I	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Ependymoma	II	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Anaplastic ependymoma	III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Other gliomas		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	
Angiocentric glioma	I	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Chordoid glioma of third ventricle	II	Schwannoma	I
Choroid plexus tumours		Neurofibroma	I
Choroid plexus papilloma	I	Perineurioma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Choroid plexus carcinoma	III	Meningiomas	
Neuronal and mixed neuronal-glioma tumours		Meningioma	I
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Atypical meningioma	II
Gangliocytoma	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Ganglioglioma	I	Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
Anaplastic ganglioglioma	III	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Haemangioblastoma	I
		Tumours of the sellar region	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituitaryoma	I
		Spindle cell oncocyoma	I

Figura 0.2: Classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale secondo l'OMS.

La classificazione appena descritta è quella più classica e maggiormente utilizzata, si deve notare però che si sta sviluppando una nuova classificazione che tiene conto anche dell'età del paziente, in particolare i gliomi vengono divisi anche tra tipo adulto e tipo pediatrico.

I tumori possono inoltre essere identificati come istologicamente benigni o maligni al variare della tipologia, dell'estensione e quindi della prognosi e viene loro anche assegnato un grado da 1 a 4 in base alla capacità delle cellule tumorali di crescere e diffondere. In particolare il **grado 4** fa riferimento ad un tumore particolarmente aggressivo con alte capacità di diffusione e generazione di metastasi. Un importante esempio di tumore maligno di grado molto elevato riguarda i tumori astrocitari diffusi e quindi i glioblastomi. Questi ultimi possono poi essere anche divisi in sottoclassi al variare dell'estensione, della morfologia e dei geni coinvolti nelle mutazioni. A livello istologico si può fare una classificazione basata sullo stato della mutazione dell'enzima isocitrato deidrogenasi (IDH), differenziando così tra i glioblastomi IDH-wild-type (detti anche primari) e i glioblastomi IDH-mutanti (detti anche secondari). I primi ricoprono circa il 90% dei casi, sono caratterizzati da una zona necrotica maggiormente estesa, si sviluppano de novo e sono più frequenti nei soggetti con età avanzata. I glioblastomi multiformi IDH-mutanti sono invece più rari, derivano tipicamente da un astrocitoma diffuso precursore e predominano nei pazienti più giovani con età media intono ai 45 anni [5-7].

Capitolo 1: Glioblastoma multiforme

Il Glioblastoma multiforme (GBM) è un tumore astrocitario diffuso maligno di quarto grado che si sviluppa prevalentemente nell'encefalo e può presentarsi con caratteristiche morfologiche molto eterogenee.

1.1 Epidemiologia

I gliomi in generale rappresentano l'81% dei tumori cerebrali nell'adulto e tra questi il glioblastoma ricopre il 45%, risultando così il tumore cerebrale maligno più comune. In termini assoluti, questo tumore è abbastanza raro, con un'incidenza di circa 3,21 per 100.000 abitanti, ma con una prognosi davvero sfavorevole per la gran parte dei pazienti. Nel migliore dei casi, solo per il 5% dei soggetti, si ha una prospettiva di vita di massimo cinque anni dalla diagnosi mentre in media è inferiore ai due.

L'incidenza varia con età, sesso, razza e numerosi altri fattori. L'età media alla diagnosi è di 65 anni ma si può notare un tasso più alto al crescere dell'età con un picco nella fascia 75-85 anni. Risulta inoltre più frequente (1,58 volte in più) negli uomini rispetto alle donne, con un'incidenza annuale di 4,00 rispetto a 2,53 per 100.000 abitanti rispettivamente.

Infine si evidenzia una notevole differenza a livello globale con incidenza maggiore nel Nord America, in Australia e nell'Europa settentrionale e occidentale [8, 9].

1.2 Fattori di rischio

Sono stati esaminati nel corso degli anni diversi fattori di rischio legati all'insorgenza del glioma: da quelli relativi ad aspetti genetici ereditari a quelli più generici come allergie, esposizioni chimiche, radiazioni ionizzanti e non.

1.2.1 Fattori di rischio genetici

Sin dagli anni '90 si è studiato il ruolo delle varianti ereditarie comuni nel determinare il rischio di glioma. Sindromi tumorali ereditarie a singolo gene come la sindrome di Li-Fraumeni¹, la

¹ La *sindrome di Li Fraumeni* è una rara condizione di origine ereditaria che predispone il paziente allo sviluppo di diversi tipi di tumori maligni.

neurofibromatosi², la sindrome di Lynch³, la malattia di Ollier⁴ e la sclerosi tuberosa⁵ favoriscono la formazione di una piccola percentuale di gliomi diffusi negli adulti, spesso dovuta a variazioni della mutazione IDH.

Un'ulteriore correlazione è stata dimostrata per i pazienti con una storia familiare di glioma. I parenti di primo grado di pazienti con glioma hanno un rischio due volte maggiore di sviluppare un tumore rispetto ai parenti di persone che non hanno glioblastoma. Attualmente sono in corso numerose ricerche in questo campo per poter determinare con accuratezza a cosa ciò sia dovuto. Diversi studi hanno rilevato delle possibili cause nei cromosomi 6, 12, 15, 17 o 18. Altri dimostrano più nello specifico un notevole aumento di rischio di glioma collegato all'alterazione localizzata di uno tra sette specifici geni relativi allo sviluppo del tumore. Tra questi, ad esempio, una variazione del TERT può favorire anche di cinque volte lo sviluppo del glioma in quanto si occupa di regolare le proteine coinvolte nel mantenimento ed allungamento dei telomeri [9, 10].

1.2.2 Fattori di rischio non genetici

Sono numerosi i fattori di rischio non genetici che sono stati studiati negli ultimi decenni in correlazione alla crescita del glioblastoma, ma solo le radiazioni ionizzanti sono considerate un vero fattore di rischio. L'esposizione a radiazioni ionizzanti è infatti il fattore di rischio ambientale di maggior rilievo nello sviluppo di un glioma, effetto che viene intensificato se si tratta di soggetti in età infantile. In questo caso non si fa solo riferimento ai sopravvissuti alla bomba atomica o incidenti nucleari, ma anche a radiazioni terapeutiche o quelle utilizzate per le scansioni della TAC, se in dose molto elevata. Le radiazioni terapeutiche utilizzate nella cura del cancro possono infatti aumentare il rischio di glioma da 3 a 7 volte.

Ci sono numerosi studi che tuttavia analizzano l'influenza anche di elementi come allergie, condizioni atopiche, radiazioni non ionizzanti, esposizioni a pesticidi, obesità, eccetera. Tra questi la presenza di allergie o condizioni atopiche quali eczema, febbre da fieno o asma possono ridurre il rischio di glioma mentre le radiazioni non ionizzanti, come campi elettrici a

² La *neurofibromatosi* è una malattia genetica ereditaria, che altera i normali processi di crescita e sviluppo delle cellule del sistema nervoso.

³ La *sindrome di Lynch* è una patologia ereditaria caratterizzata dall'aumentato rischio di sviluppare il carcinoma coloretale, il tumore dell'endometrio (utero) ed altri tipi di cancro.

⁴ La *malattia di Ollier* è una condizione rara, probabilmente non ereditaria, caratterizzata dalla presenza di molteplici tumori benigni definiti encondromi e da aree di cartilagine displasica.

⁵ La *sclerosi tuberosa* è una malattia genetica caratterizzata principalmente dallo sviluppo di numerosi tumori benigni in organi differenti, in particolare la pelle, il cervello e i reni.

radiofrequenza dei telefoni cellulari, sono associate a un aumento di rischio sebbene i risultati di questi studi non siano stati ancora pienamente confermati [9,10].

1.3 Diagnostica

I sintomi d'esordio più comuni, relativi a tutti i gliomi e ai tumori astrocitari infiltranti in generale, sono dati da crisi epilettiche, cefalea, disturbi cognitivi e deficit neurologici focali [11]. In caso si verificano, è importante effettuare opportuni esami per ottenere una diagnosi precoce e affidabile.

Le tecniche diagnostiche attualmente utilizzate non risultano però ottimali in quanto si basano su **test neurologici** e metodi di **neuroimaging**, come la risonanza magnetica (Figura 1.1), che possono evidenziare la malattia solo quando è già in fase avanzata. Qualche informazione in più si può ottenere dalla PET, che evidenzia la progressione del danno sui tessuti circostanti [12].

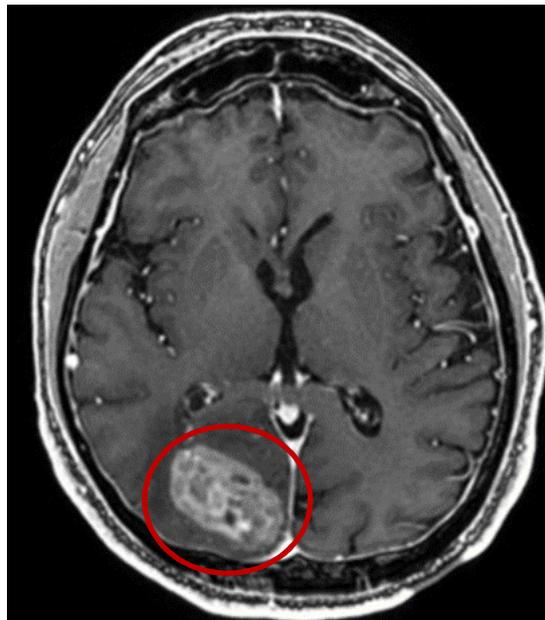


Figura 1.1 Immagine MRI del glioblastoma multiforme, evidenziato.

Unite a queste, per una diagnosi più accurata, si utilizzano quindi anche tecniche basate sul rilevamento di biomarcatori tumorali sia tissutali che circolanti e la valutazione di parametri genetici nei campioni di biopsia del paziente. La **biopsia tissutale** tradizionale comporta però una procedura altamente invasiva che può potenzialmente recare danni al paziente, come gonfiore intracranico o influenzare le funzioni neurologiche. In aggiunta, questa tecnica permette di catturare solo un'istantanea statica del tumore in continua evoluzione e di prelevare solo una sua piccola porzione di materiale, che non risulta sufficiente per uno studio accurato

data l'eterogeneità della sua struttura. Si sta quindi sempre più favorendo un approccio meno invasivo e basato sull'analisi di **biomarcatori circolanti**.

Un'importante analisi è quella effettuata con spettrometria di massa intraoperatoria o in campioni prelevati tramite biopsia liquida di fluidi biologici (sangue, liquido cerebrospinale o urina) che permettono lo studio di biomarcatori come proteine derivate dal tumore e acidi nucleici. Per quanto riguarda i tumori intracranici, come il caso dei glioblastomi, è quindi fortemente preferibile utilizzare quest'ultimo approccio unito a tecniche di neuroimaging (MRI) e a test neurologici tradizionali [13, 14].

1.4 Anatomia patologica

Contrariamente a quello che si riteneva in passato, i gliomi non derivano dalle corrispettive cellule mature specifiche (astrociti nel caso del glioblastoma), ma è stato dimostrato che hanno origine da una cellula progenitrice che si differenzia lungo una delle linee cellulari. Queste cellule progenitrici sono **cellule staminali tumorali (CSC) autorigeneranti** che contribuiscono alla formazione iniziale del tumore e alla sua resistenza terapeutica.

Clinicamente il glioblastoma è caratterizzato da un aspetto molto eterogeneo con abbondante necrosi, pleomorfismo e vascolarizzazione (Figura 1.2). In esso si trovano regioni molto diversificate: alcune sono dure e di colore biancastro, altre molli e giallastre (conseguenza della necrosi tissutale), altre ancora mostrano degenerazione cistica ed emorragia. Spesso la necrosi si sviluppa nelle zone di ipercellularità e lungo i bordi di queste regioni si raccolgono le cellule tumorali.

Questo tumore è particolarmente aggressivo e considerato di grado quarto perché dotato di infiltrazione diffusa. Le cellule cancerose infatti migrano nei tessuti lungo i tratti nervosi, le meningi e i vasi sanguigni, non lasciando quasi mai il sistema nervoso centrale ma comunque permettendo una veloce diffusione anche molto estesa nelle aree cerebrali. Dal punto di vista macroscopico il tumore appare perciò mal definito [11,15].

Lo sviluppo del glioblastoma si verifica nello spazio trans-barriera della barriera ematoencefalica (BBB). Questa funge da limite di permeabilità alla diffusione di sostanze nel sistema nervoso centrale, impedendo il trasporto di particolari componenti dal flusso sanguigno verso il cervello. Ha quindi una funzione chiave di protezione ma limita allo stesso tempo anche la somministrazione di molti agenti terapeutici. Le cellule cancerose metastatiche riescono quindi ad aderire al tessuto cerebrale e, venendo protette da questa barriera, proliferano. La rapida crescita delle cellule del glioblastoma crea aree di ipossia locale che innescano a sua volta il processo di angiogenesi. I vasi ora prodotti dagli **astrociti maligni** hanno una struttura

anormale, in particolare sono privi della funzione specifica di protezione e questo comporta una perdita di integrità della barriera ematoencefalica cerebrale e quindi un aumento di permeabilità che favorisce la crescita del cancro [13, 16].

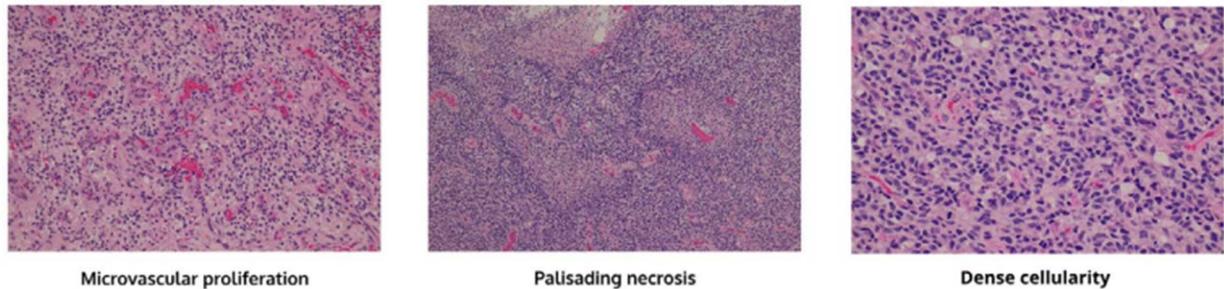


Figura 1.2 Caratteristiche istologiche del glioblastoma: proliferazione vascolare, necrosi, elevata densità cellulare.

1.5 Prognosi

Data la diffusione e l'eterogeneità di questo tumore, la sua resezione chirurgica risulta molto complessa e spesso incompleta. Allo stesso modo, data la presenza della barriera ematoencefalica, l'utilizzo di radio- e chemioterapia risulta poco efficace per la cura di questo tumore. La prognosi dei pazienti è quindi molto sfavorevole, sebbene ci siano stati molti miglioramenti negli attuali trattamenti. La maggior parte dei soggetti malati, se non trattati opportunamente, muore entro i due anni dalla data di diagnosi e il tempo di sopravvivenza globale è inferiore a un anno. Nuovi farmaci e approcci hanno aumentato il tempo di sopravvivenza che risulta comunque molto limitato e pari a circa un paio di anni o poco di più [17].

La probabilità di sopravvivenza è molto diversificata e dipende per lo più da fattori quali età, cure applicate e caratteristiche fisiche del tumore. A titolo di esempio, nella Figura 1.3 è schematizzata la prognosi prevista per i glioblastomi classificati in base alla mutazione IDH paragonati con quella di altri gliomi [10].

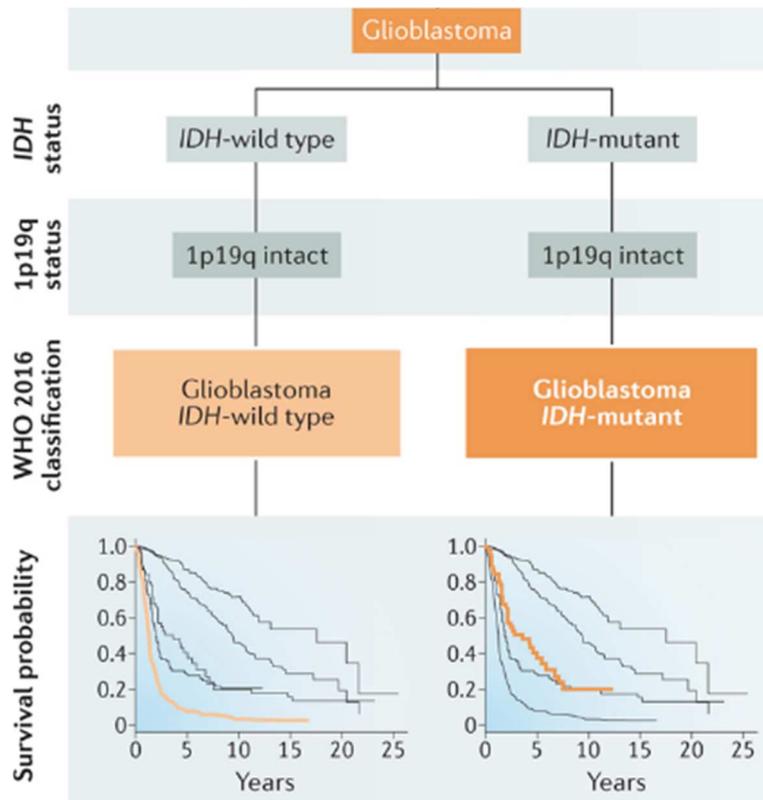


Figura 1.3 Tasso di -sopravvivenza secondo mutazione IDH evidenziato in arancione.

Capitolo 2: Trattamenti attuali

Il trattamento del glioblastoma richiede un approccio multidisciplinare. L'attuale standard di cura comprende la massima resezione chirurgica seguita da radiazioni e chemioterapia. In particolare, dal 2005, in seguito alla pubblicazione di un importante studio clinico, è stato definito il "protocollo Stupp", secondo il quale la resezione chirurgica è seguita da radioterapia (60 Gray in 6 settimane) e concomitante terapia con temozolomide giornaliera (da 6 a 12 cicli). Il percorso di cura scelto dagli oncologi varia in base alla tipologia e alle caratteristiche del tumore, studiate opportunamente attraverso esami diagnostici dettagliati.

Data la complessità di questo tumore e la sua difficile terapia, nonostante la massima resezione e la terapia multimodale, circa il 70% dei pazienti con glioblastoma sperimenterà una ricaduta della malattia. È proprio la recidiva a causare la morte di gran parte dei pazienti dopo pochi mesi dalla data della nuova diagnosi. Tuttavia non è ancora stato approvato uno standard di cura per il glioblastoma ricorrente, attualmente è presente solo quello per il glioblastoma di prima diagnosi.

Per limitare la progressione del tumore, combattere le cellule cancerose già presenti e diminuire il rischio di recidiva della malattia sono quindi stati sviluppati molti approcci (Figura 2.1) che ora verranno trattati nel dettaglio [8,18].

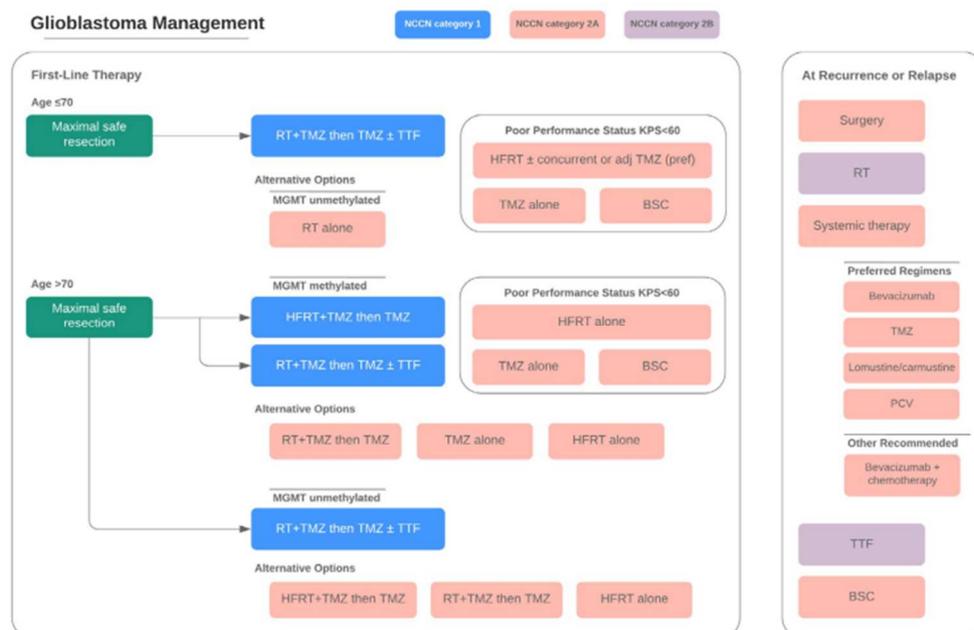


Figura 2.1 Algoritmo di trattamento per il glioblastoma. \pm Indica con o senza; adj, coadiuvante; BSC, migliore terapia di supporto; HFRT, radioterapia iperfrazionata; KPS, Stato delle prestazioni di Karnofsky; NCCN, National Comprehensive Cancer Network; pref, preferito; REGIME di PCV, procarbazine, lomustina e vincristina; RT, radioterapia; TMZ, temozolomide; TTF, campi di trattamento dei tumori [8].

2.1 Resezione chirurgica

Con resezione chirurgica applicata ai tumori non si fa solo riferimento alla citoreduzione (resezione del tumore o *debulking*) ma anche all'intervento di biopsia tissutale. Verrà qui approfondito il primo come trattamento terapeutico.

Il primo step nel trattamento del glioblastoma è l'esecuzione della massima resezione in sicurezza, che è ovviamente caso-specifica in base alle dimensioni del tumore, alla forma e alla posizione dei vasi sanguigni e regioni sensibili.

La resezione chirurgica è generalmente classificata come resezione totale lorda (GTR) o resezione subtotale (STR), quando la rimozione del tumore non è soddisfatta completamente. Viene favorita e raccomandata la prima che assicura una migliore sopravvivenza. Nello specifico, la sopravvivenza a un anno è molto più alta per i pazienti con più del 90% di resezione tumorale rispetto a quelli con meno del 90% di resezione tumorale.

La struttura del glioblastoma è molto articolata, per cui non sempre si riesce ad eseguire una GTR. Per migliorare le prestazioni chirurgiche e anche ridurre il rischio di deficit neurologici postoperatori, si stanno sviluppando nuove tecnologie in grado di evidenziare i tessuti cancerosi e facilitarne la rimozione. Un esempio è la colorazione fluorescente con sostanze come l'acido 5-aminolevulinico (ALA), l'imaging intraoperatorio o la stimolazione motoria e linguistica intraoperatoria con paziente sveglio [18-20]. L'utilizzo di queste tecniche migliora notevolmente il risultato. La **guida fluorescente ALA** permette infatti di raggiungere la resezione completa nel 65% dei casi contro un 36% dei casi senza il suo intervento e la sola presenza della microchirurgia a luce bianca. Le limitazioni legate a questa tecnica sono per lo più dovute alla strumentazione necessaria, molto costosa e all'avanguardia e quindi presente in pochi centri ospedalieri. L'**imaging intraoperatorio** comprende invece più approcci, basati sia su ultrasuoni che su risonanza magnetica. In entrambi i casi si ottengono buoni risultati permettendo di rilevare e classificare la presenza del glioblastoma e cellule cancerose lungo i bordi tumorali con un errore circa del 17%. Per questa tecnica, così come per la **stimolazione intraoperatoria**, non sono stati svolti abbastanza studi per poter affermare con certezza un loro forte contributo sulla resezione completa e quindi sulla sopravvivenza del paziente.

Come già accennato, questo tumore ha una prognosi molto sfavorevole e questo in molti casi è legato alla recidiva del glioblastoma. Sebbene molti studi dimostrino un beneficio nella craniotomia ripetuta per curare la recidiva di questo tumore, per non sottoporre il paziente a numerosi interventi spesso si preferisce intraprendere nuove vie e trattamenti limitando così la resezione chirurgica a un singolo intervento iniziale [21].

2.2 Radioterapia

La radioterapia viene comunemente usata come trattamento per il glioblastoma quando la resezione chirurgica non risulta completa, quindi non si è stati in grado di eseguire una GTR. In tal caso, dopo la resezione chirurgica ottimale, il paziente attende fino a quattro settimane affinché la ferita guarisca prima di iniziare la terapia.

Viene usata la radioterapia combinata con la chirurgia per questa cura sin dal 1979, quando uno studio dimostrò la dipendenza tra livelli di radiazioni crescenti applicati al tumore e aumento del tasso di sopravvivenza medio. Da quel momento sono stati fatti numerosi progressi ma la tecnica usata resta sempre la stessa.

La radioterapia si basa sulla morte delle cellule cancerose presenti nel tessuto colpito, in particolare è in grado di indurre seri danni al DNA, direttamente o indirettamente attraverso la generazione di radicali liberi, causando così apoptosi. La terapia standard comprende sei settimane di radioterapia localizzata cinque volte a settimana erogando 60 Gy in frazioni di 1.8-2Gy (40 Sievert per 30 cicli; per confronto una TAC irradia circa 4-7 mSv e l'esposizione naturale è approssimativamente di 3 mSv). Si tratta quindi di una dose molto elevata per cui è importante che il fascio esterno di radiazioni sia fortemente localizzato nella zona tumorale in modo da non colpire il tessuto sano circostante e recare danni all'organismo. A partire dai primi anni '80 si è passati infatti dall'uso di una radioterapia dell'intero cervello a un trattamento più localizzato e quindi con meno complicanze a lungo termine [19, 22].

Nello standard di cura attuale viene utilizzata la **radioterapia a fasci esterni** eseguita dopo una apposita TAC di centraggio in modo da selezionare il volume tumorale da colpire. Nelle procedure più all'avanguardia si parla invece di *gamma knife radiation* per fare riferimento a fasci altamente focalizzati. Oltre a essere più fortemente localizzati rispetto a quelli della tecnica precedente, vengono utilizzati in radiochirurgia stereotassica permettendo di eseguire delle procedure operatorie minimamente invasive. Questi non risultano però vantaggiosi nella radioterapia di tumori molto voluminosi ma aumenta la precisione e quindi il risultato se l'oggetto è un glioblastoma di piccole dimensioni. Alla recidiva, la re-irradiazione è un'opzione appropriata solo in circostanze selezionate, tuttavia nella maggior parte dei casi viene consigliato questo approccio con radiochirurgia stereotassica [23].

Sebbene questa terapia dia ottimi risultati per altri tipi di cancro, nel caso del glioblastoma è in grado di aumentare la sopravvivenza del paziente ma non sempre di salvarlo dalla malattia. Per migliorare la prognosi viene infatti unita la radioterapia ad altri trattamenti, come la chemioterapia, ma il tumore risulta particolarmente resistente anche a queste tecniche. A indurre una forte resistenza è la barriera ematoencefalica e una delle principali cause è l'ipossia

da essa generata (per ipossia si fa riferimento a una pressione parziale di ossigeno inferiore a 10 mmHg, la condizione normale è di circa 40 mmHg). Nei vasi sanguigni che caratterizzano questo tumore si possono generare trombi e occlusioni che ostacolano il trasporto di ossigeno, determinando la formazione di regioni ipossiche. L'ossigeno è però necessario per rompere i filamenti di DNA e quindi causare la morte cellulare, principio alla base della radioterapia. Le cellule in queste zone diventano più resistenti a questo trattamento, la dose di radiazioni necessaria per ottenere lo stesso effetto è infatti circa tre volte superiore in assenza di ossigeno rispetto ai livelli fisiologici [24].

Numerosi studi stanno cercando di migliorare questa tecnica di cura del glioblastoma considerando di aumentare la dose di radiazioni ionizzanti o di utilizzare nanoparticelle in modo da rendere la terapia più mirata. L'attuale standard di cura ha comunque permesso di ottenere dei buoni risultati soprattutto se applicato con concomitante chemioterapia di temozolomide. Nella Figura 2.2 si evidenzia la probabilità di sopravvivenza senza progressione tumorale dopo applicazione di radioterapia con o senza chemioterapia concomitante [25, 26].

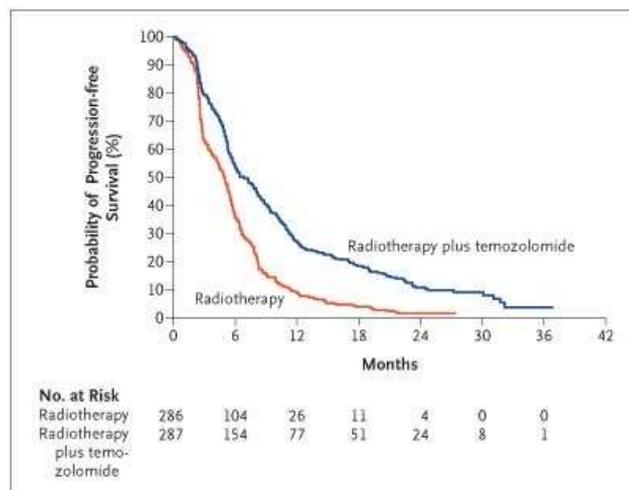


Figura 2.2 Probabilità di sopravvivenza senza progressione tumorale dopo applicazione di radioterapia con o senza chemioterapia concomitante

2.3 Chemioterapia

L'attuale standard per la chemioterapia per il glioblastoma multiforme è il **temozolomide (TMZ)**. Durante la radioterapia vengono somministrati al paziente 75 mg/m² quotidianamente e in seguito viene sottoposto ad altri 6 cicli di TMZ ma in dose diversa, 150-200 mg/m² per i primi cinque giorni di un ciclo di 28 giorni. Questi cicli possono poi variare di durata a seconda del caso specifico. Molti medici continuano i cicli di TMZ per 12-18 mesi con buoni risultati,

sebbene non ci siano ancora studi ufficiali che ne dimostrino un effetto sulla sopravvivenza [27].

Il temozolomide è un agente alchilante orale penetrante nel cervello che, una volta attraversata la barriera emato-encefalica, aggiunge un gruppo metilico alle purine del DNA con conseguente danno alle cellule e infine apoptosi. La sua attività antitumorale è stata scoperta per la prima volta nel 1987 e viene applicato come agente chemioterapico per il trattamento del glioblastoma dal 2005. Tuttavia, circa il 55% dei pazienti con glioblastoma è resistente a questo farmaco a causa del loro sistema di riparazione del DNA, dato dall'enzima O⁶-metilguanina metiltransferasi (MGMT) in grado di contrastare gli effetti citotossici del temozolomide. I pazienti con silenziamento genico di questo enzima hanno mostrato tassi di sopravvivenza di 21,5 rispetto a 15,3 mesi nei pazienti con MGMT attivo [28].

Per aumentare l'effetto del TMZ e contrastare quello di MGMT, sono stati condotti molti studi. Diversi utilizzano ad esempio i TTFields, ossia dei campi elettrici alternati a bassa intensità e frequenza intermedia applicati attraverso dei trasduttori direttamente al cuoio capelluto, che dovrebbero migliorare l'effetto del TMZ aumentando il tasso di sopravvivenza. Altri studi invece combinano la somministrazione di TMZ a immunoterapia, ad altri agenti chemioterapici come carmustina e lomustina o a farmaci anti-angiogenici come bevacizumab ma questi non hanno portato a risultati molto migliori. Altri studi infine si basano su variazioni della dose o della durata della terapia ma gli effetti collaterali e il deterioramento del tessuto sano risultano troppo pesanti. Il principale rischio dell'uso di questo farmaco è infatti il danno al DNA causato anche alle cellule sane che comporta altri notevoli rischi di complicanze ematologiche, di affaticamento e infezioni [29, 30].

Questo attuale standard di cura con concomitante TMZ e radioterapia ha comunque migliorato la prognosi e la probabilità di sopravvivenza. I pazienti che hanno ricevuto temozolomide più RT hanno avuto una sopravvivenza mediana di 14,6 mesi rispetto a 12,1 mesi con sola radioterapia (vedi Figura 2.2). Ciononostante, lo stile di vita assicurato ai pazienti e i rischi associati a questo trattamento impongono di ricercare nuovi approcci chemioterapeutici [19, 22].

2.4 Immunoterapia

Con il termine immunoterapia si fa riferimento ad una tipologia di terapia biologica che usa sostanze per stimolare o sopprimere il sistema immunitario per aiutare il corpo a combattere il cancro o altre malattie. Può essere divisa principalmente in due classi: **immunoterapia attiva** o **passiva**. Con la prima vengono iniettati al paziente antigeni esterni in modo da permettergli

di sviluppare le difese immunitarie, principio alla base dei vaccini. Nella seconda vengono invece iniettati al paziente direttamente immunomodulanti, come gli anticorpi, in modo da non attivare l'intero sistema immunitario ma dare già le difese necessarie specifiche per il tumore. Attualmente questa tecnica è stata introdotta con successo nelle terapie per il trattamento di tumori come il melanoma, il carcinoma polmonare e altri tumori meno aggressivi. Tuttavia, nessuno degli approcci immunoterapeutici è stato ancora approvato per uso clinico per il trattamento del glioblastoma multiforme. Questo tumore risulta essere infatti un forte immunosoppressore, è caratterizzato da pochi linfociti T infiltranti nel microambiente tumorale e da una forte evasione immunitaria favorita dall'eterogeneità del glioblastoma e dalla barriera ematoencefalica [31,32].

Il Sistema Nervoso Centrale è generalmente classificato come uno spazio immunitario privilegiato in quanto dotato di una particolare vascolarizzazione e della barriera ematoencefalica che, bloccando il flusso di grandi molecole, limita non solo il trasporto intracranico di farmaci ma anche la presenza di cellule del sistema immunitario. Queste ultime sono anche limitate dalla presenza di specifiche proteine tumorali che possono indurre l'apoptosi e quindi ridurre il numero. Un importante esempio è quello del ligando PD-1 che inibisce l'attivazione delle cellule T e ne induce l'apoptosi [33].

I trattamenti immunoterapeutici che si stanno sviluppando hanno come obiettivo proprio quello di intensificare la risposta immunitaria e ovviare i sistemi di protezione tipici del sistema nervoso centrale e del microambiente tumorale appena descritti (Figura 2.3).

Le modalità di immunoterapia che sono state studiate nel glioblastoma sono principalmente le terapie vaccinali, il blocco del checkpoint immunitario, terapie con cellule T-CAR e terapie virali oncolitiche [8, 32].

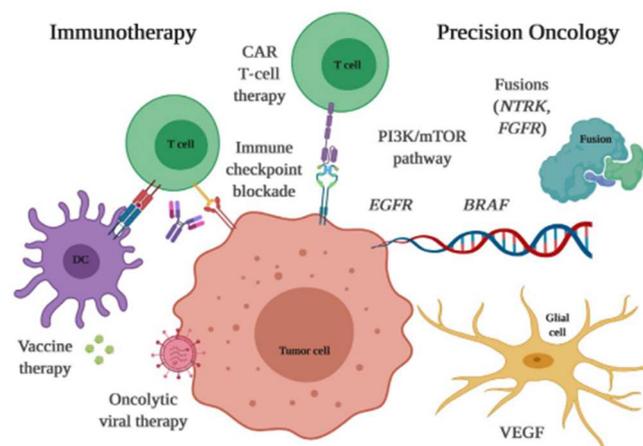


Figura 2.3 Nuovi bersagli terapeutici per il glioblastoma. CAR indica il recettore dell'antigene chimerico; DC, cellula dendritica; EGFR, recettore del fattore di crescita epidermico; FGFR, recettore del fattore di crescita dei fibroblasti; mTOR, bersaglio mammifero della rapamicina; VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare [8].

2.4.1 Vaccini

La vaccinazione è il metodo principale di immunoterapia e si basa sulla stimolazione della risposta immunitaria specifica per quel tumore mediante l'iniezione di antigeni estranei. Questa non è quindi una terapia preventiva ma piuttosto progettata per indurre una naturale risposta immunitaria e permettere all'organismo di combattere il tumore.

Gli antigeni utilizzati possono essere di diversa natura e al variare di essa i vaccini possono venire classificati in vaccini peptidici o a base cellulare [34,35].

I **vaccini peptidici** comportano l'iniezione di antigeni tumore specifici, ossia componenti spesso proteici codificati da geni mutanti nel tumore e usati come bersaglio per l'immunoterapia. Un esempio è EGFRvIII (mutazione del recettore del fattore di crescita epidermico di tipo III), presente in circa il 30% dei pazienti e con un ruolo chiave dato che promuove la proliferazione delle cellule cancerose e ne inibisce l'apoptosi [36]. Altri vaccini peptidici sono quelli con proteine da shock termico (*heatshock*), note anche come proteine *chaperone*, una famiglia di composti presenti nelle cellule in grado di rispondere a cambiamenti di temperatura ma anche di concentrazioni di ossigeno e ioni. I tumori sono ricchi di queste proteine da cui deriva la proliferazione, differenziazione, invasione e metastasi delle cellule tumorali [37]. Spesso per aumentare l'efficacia, i pazienti vengono sottoposti anche a terapie farmacologiche con uso ad esempio di temozolomide o bevacizumab.

I **vaccini a base cellulare** invece comportano l'utilizzo principalmente di cellule dendritiche o cellule tumorali. Nello specifico sono cellule autologhe del paziente prelevate e poi re-iniettate nel corpo dopo opportune modifiche in vitro in modo da innescare risposte immunitarie specifiche per un effetto citotossico mirato.

Le cellule dendritiche (DC) sono quelle più utilizzate, sono generate da cellule staminali ematopoietiche e svolgono importanti ruoli nella risposta immunitaria, nella differenziazione e prestazione dei linfociti. Vengono isolate dal corpo del paziente, caricate dall'antigene tumorale specifico, maturate in vitro e poi reinserite nell'organismo. Con lo stesso principio alla base, numerosi studi si focalizzano sulle cellule tumorali, utilizzate direttamente come bersaglio dell'immunoterapia come degli antigeni.

Nuovi studi stanno anche analizzando altri vaccini basati su nuove tecniche con ad esempio la mutazione IDH come bersaglio o l'utilizzo di più peptidi in un unico vaccino in modo da renderlo più efficace e mirato. Nel dettaglio, i **vaccini multi-peptidici** sono stati da poco progettati per suscitare una forte risposta delle cellule T del sistema immunitario a più antigeni tumorali in modo da colpire un maggior numero di cellule cancerose.

Tutte queste terapie sono ancora ferme allo stadio sperimentale, vengono provate sui pazienti con glioblastoma dopo il protocollo Stupp, attuale standard di cura, e mostrano notevoli miglioramenti nel tasso di sopravvivenza sebbene la tecnica debba ancora essere perfezionata [33, 35].

2.4.2 Blocco del checkpoint immunitario

Per blocco del checkpoint immunitario si fa riferimento all'inibizione di quei componenti che regolano processi chiave del sistema immunitario e, in questo caso, sfavoriscono l'efficacia delle terapie e della cura del glioblastoma. Gli studi basati su questo trattamento sono mirati prevalentemente a **PD-1/PD-L1** e/o **CTLA-4**, tutte proteine note come mediatori dell'immunosoppressione del glioblastoma opponendosi all'azione immunitaria delle cellule T (Figura 2.4).

Considerando che questo approccio immunoterapeutico ha cambiato drasticamente il trattamento del carcinoma polmonare, il cancro renale, il cancro gastrico, il melanoma e altre patologie tumorali, sono state condotte numerose ricerche per la sua applicazione contro il glioblastoma. Il lavoro preclinico è stato promettente mettendo a punto farmaci come ad esempio il nivolumab (inibitore di PD-1) e l'ipilimumab (inibitore di CTLA-4).

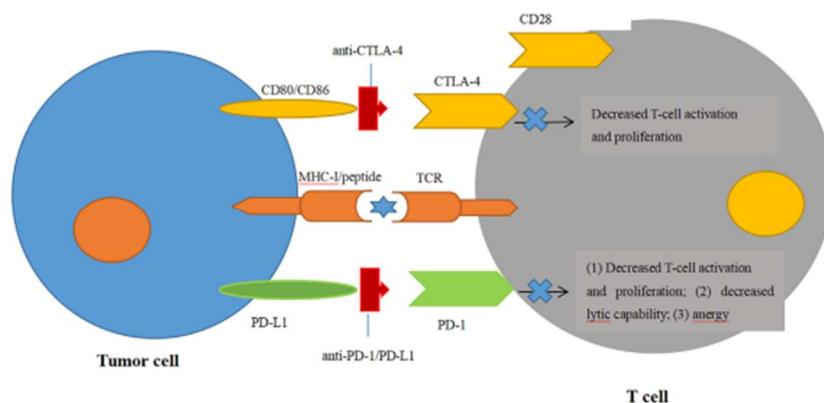


Figura 2.4 Meccanismo alla base del blocco del checkpoint immunitario con inibitore di PD-1/PD-L1 e CTLA-4.

Tuttavia, gli studi clinici non hanno mostrato notevoli miglioramenti nella cura dei pazienti e nella loro sopravvivenza rispetto allo standard di cura attuale con temozolomide e radioterapia. Questa resistenza alla terapia è probabilmente dovuta all'eterogeneità del glioblastoma e alla scarsa presenza di cellule T infiltranti nel microambiente tumorale, che quindi non è in grado di opporsi al gran numero di cellule mieloidi immunosoppressive.

Attualmente, molti studi clinici sono in corso per valutare la sicurezza, la tossicità e l'efficacia degli inibitori del checkpoint immunitario combinandoli anche con anticorpi mirati, vaccini, radioterapia o altri farmaci come temozolomide o bevacizumab per migliorare l'esito di questa terapia [38,39].

2.4.3 *Cellule T-CAR*

Lo scopo di questa terapia cellulare altamente personalizzata è quello di migliorare l'attività antitumorale delle cellule T. Queste vengono raccolte dal sangue periferico del paziente, amplificate in vitro e rimodellate geneticamente dotandole di un recettore dell'antigene chimerico (CAR) che migliori la loro capacità di riconoscere e combattere le cellule cancerose. Le cellule ingegnerizzate vengono quindi somministrate nuovamente al paziente [40].

Le cellule T-CAR sono costituite da un dominio cellulare, proprio dei linfociti T del sistema immunitario, e da un dominio di riconoscimento dell'antigene extracellulare, proprio del recettore CAR, collegati tra loro da un dominio transmembrana. Si possono poi classificare le cellule ingegnerizzate in più generazioni a seconda della presenza e della tipologia di un dominio stimolante extracellulare in grado di amplificare l'induzione della produzione di cellule T e l'uccisione delle cellule tumorali. Data l'eterogeneità di questo tumore, numerosi studi stanno cercando di caratterizzare le cellule T-CAR con più domini stimolanti specifici per il glioblastoma o integrando le cellule T-CAR con le cellule NK specifiche per l'apoptosi e, sebbene ancora all'inizio del trial clinico, stanno mostrando risultati promettenti [31].

Questo nuovo approccio terapeutico è stato rivoluzionario nel trattamento di tumori ematologici, come la leucemia linfoblastica acuta, e per questo si sta cercando di progettare una sua versione che venga approvata contro il glioblastoma multifforme.

Nonostante il successo dell'ingegnerizzazione potente e mirata delle cellule, rimangono presenti numerosi ostacoli nell'efficacia di questa terapia per il glioblastoma quali gli effetti fuori bersaglio, la scarsa infiltrazione di cellule T e il microambiente tumorale altamente immunosoppressivo ed eterogeneo. Il principale problema rimane comunque la barriera emato-encefalica che limita il passaggio delle cellule nella zona interessata. La radioterapia, la chemioterapia e la chirurgia tendono a danneggiare la BBB in una certa misura e quindi favorire l'azione delle cellule T-CAR. L'esito di questo approccio immunoterapeutico, come nei casi precedenti, è perciò favorito dalla presenza di altri trattamenti contro il glioblastoma in modo da limitare i problemi di eterogeneità e immunosoppressione [40,41].

2.4.4 *Terapia virale oncolitica*

I virus oncolitici sono definiti come virus geneticamente modificati o presenti in natura che disgregano per lisi le cellule tumorali e si diffondono nelle cellule maligne adiacenti per ripetere il processo senza danneggiare i tessuti sani circostanti. La loro azione si basa su due processi: il primo è quello litico, che provoca la morte cellulare, e il secondo è quello relativo alle risposte infiammatoria ed immunitaria, avviate da componenti specifici rilasciati dalle cellule tumorali morenti. Di notevole importanza è la risposta immunitaria che viene generata, in quanto si tratta di un'immunità sistemica specifica per il tumore che favorisce l'ingresso delle cellule T nel microambiente tumorale, amplifica l'azione di apoptosi e svolge un ruolo chiave nel prolungare la sopravvivenza dei pazienti.

Attualmente un'ampia varietà di virus oncolitici è in fase di sviluppo clinico in tutto il mondo. I più importanti che vanno citati sono: **PVSPIRO** ossia un poliovirus modificato geneticamente, **G47Δ** e **T-Vec** dei virus Herpes Simplex di tipo 1 modificati geneticamente. Per molti virus è probabile che si abbiano già gli anticorpi circolanti o sia stato fatto un precedente trattamento o vaccinazione, in tal caso l'effetto antitumorale della somministrazione endovenosa potrebbe essere limitato e per questo diversi studi suggeriscono una iniezione intratumorale.

A causa della presenza della barriera ematoencefalica, le concentrazioni di farmaci nel microambiente tumorale possono essere inferiori anche al 20% della loro concentrazione nel plasma, se somministrati per via endovenosa. Per aumentare quindi l'effetto del virus senza aumentarne la dose si promuove l'utilizzo di altre immunoterapie concomitanti o di altri immunostimolanti [42-44].

2.5 **Altri trattamenti**

Le terapie sopra descritte sono quelle maggiormente utilizzate nella cura del glioblastoma. In seguito verranno trattate terapie innovative e di supporto, finalizzate a migliorare il periodo di sopravvivenza e lo standard di vita del paziente. Più precisamente, verranno approfondite: terapie locoregionali, terapie mirate, terapie di supporto e terapie personalizzate.

2.5.1 *Terapie Locoregionali: TTFields*

Le terapie locoregionali mirano a svolgere l'azione antitumorale direttamente nella zona interessata, in modo poco invasivo e senza coinvolgere l'intero organismo.

I campi di trattamento dei tumori, denominati TTFields, rappresentano una modalità terapeutica antitumorale localizzata non invasiva. Questo trattamento prevede la somministrazione

transcutanea di **campi elettrici alternati** a bassa intensità (1-3V/cm) e a frequenza intermedia (100-300 kHz). I campi elettrici vengono erogati attraverso 2 coppie di array di trasduttori ortogonali, posizionali più vicino possibile al tumore e con una opportuna orientazione in modo da massimizzare l'effetto terapeutico grazie all'aiuto di un apposito software. La testa del paziente deve essere rasata per consentire un contatto ottimale e i dischi ceramici degli array vengono rivestiti con idrogel per aumentare la conduttività con la pelle. All'erogazione del campo elettrico, i TTFIELDS esercitano specifiche forze nel microambiente tumorale in esame, con conseguenze a livello molecolare non ancora completamente comprese. Tuttavia, data la ricca presenza di molecole cariche e polarizzabili nelle cellule, non stupisce che si riesca a perturbare meccanismi biologici tra cui la riparazione del DNA, l'autofagia, la migrazione cellulare, la permeabilità e le risposte del sistema immunitario. L'effetto terapeutico principale è quello antimitotico, i TTFIELDS si oppongono infatti alla rapida divisione delle cellule tumorali interferendo nella mitosi e andando a comportare dei cambiamenti morfologici nella membrana cellulare che ne favoriscono l'apoptosi.

Gli studi preclinici e clinici evidenziano nei TTFIELDS un grande potenziale sia a breve che a lungo termine, soprattutto se usati come integrazione del protocollo Stupp, attuale standard di cura. Un particolare successo è stato ottenuto per terapia con TTFIELDS e concomitante temozolomide (Figura 2.5), menzionata nel paragrafo 2.3 [45,46].

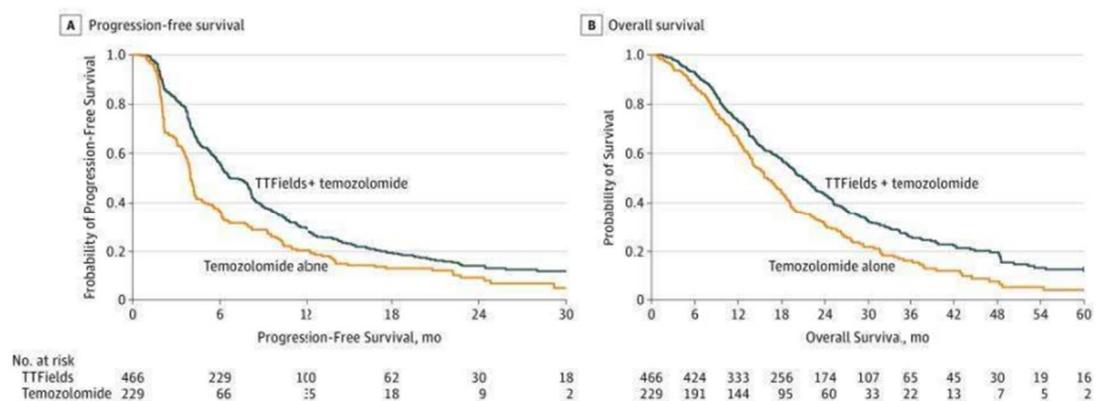


Figura 2.5 Probabilità di sopravvivenza dopo applicazione di TMZ con o senza TTFIELDS.

2.5.2 Terapia mirata

La terapia mirata e l'oncologia di precisione si basano sull'utilizzo di **biomarcatori** e sostanze specifiche per identificare il tessuto tumorale e iniziare un'azione citotossica. Nello specifico, le terapie mirate agiscono direttamente sulle cellule staminali cancerose, sulla proliferazione

cellulare, sul ciclo cellulare e sull'angiogenesi. Questo trattamento riconosce ad esempio proteine transmembrana o specifiche mutazioni di DNA o RNA e applica dei meccanismi anti-tumorali. Tra i più importanti ci sono i **trattamenti a bersaglio molecolare** che identificano particolari molecole come l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), i recettori tirosin-chinasici e VEGF (Vascular-Endothelial Growth Factor). A colpire questi componenti sono per lo più farmaci in grado di inibire i meccanismi ad essi correlati. Molti di questi sono già stati approvati, altri sono ancora oggetto di studi clinici. La terapia mirata può migliorare nettamente lo standard di cura del glioblastoma ma sono ancora necessarie numerose ricerche in questo ambito per comprendere al meglio i percorsi molecolari alla base di questa malattia e poter mettere a punto farmaci biologici con target specifici [47,48].

2.5.3 *Terapie di supporto*

Per terapie di supporto si fa riferimento a trattamenti, per lo più farmacologici, finalizzati al miglioramento della qualità di vita del paziente o al risultato della sua cura.

I pazienti con glioblastoma manifestano frequentemente sintomi neurologici e fisici progressivi durante il decorso della malattia, sia a causa del tumore stesso sia a causa della tossicità della terapia. I pazienti sperimentano un declino delle loro capacità mostrando sintomi come ansia, depressione, nausea, perdita di appetito, stitichezza, affaticamento, dolore e insonnia. In aggiunta, le convulsioni possono manifestarsi nel 80% dei pazienti in un qualche momento durante il decorso della malattia. Tutto questo ha un notevole effetto sulle attività di tutti i giorni andando a limitare le loro capacità di lavorare ed essere indipendenti. I pazienti necessitano infatti di costante assistenza da parte di professionisti, come infermieri, e dei loro parenti, che spesso hanno bisogno di assistenza psicologica a loro volta a causa del forte stress a cui sono sottoposti. [49]

Per controllare le convulsioni, se non si tratta di episodi isolati, ai pazienti viene suggerita una terapia antiepilettica con farmaci come Levetiracetam [8].

Altri farmaci usati in gran parte dei trattamenti antitumorali sono i corticosteroidi, di cui il principale è il desametasone (DEX). Vengono prescritti principalmente per combattere l'edema cerebrale in quanto sono in grado di ripristinare l'integrità della barriera ematoencefalica andando a sopprimere l'infiammazione. L'utilizzo di questi farmaci è correlato a diversi effetti collaterali e molti studi sostengono sia anche legato a un calo di sopravvivenza per cui si raccomanda l'uso di una dose limitata e per il minor tempo possibile [50].

Altri effetti collaterali della tossicità della terapia riguardano, ad esempio, il rischio elevato di tromboembolia venosa, per la quale la profilassi prevede la somministrazione di eparina a basso

peso molecolare, e la linfopenia, per la quale si raccomanda la profilassi antibiotica della polmonite [8].

Numerosi altri farmaci vengono utilizzati con queste finalità e attualmente molti studi si stanno focalizzando sulle proprietà antitumorali dei cannabinoidi. Il loro effetto terapeutico non solo si basa sull'attenuazione del dolore fisico dei pazienti ma anche sul loro ruolo citotossico. I cannabinoidi sono in grado di ridurre la crescita tumorale influenzando la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione delle cellule cancerose e inibendo l'angiogenesi. Tuttavia questa ricerca è ancora a livello sperimentale e diversi studi hanno ottenuto risultati contrastanti, è necessario quindi approfondire l'argomento per ottenere altri risultati anche a livello clinico per poter assicurare la loro efficacia [51].

2.5.4 Terapia personalizzata: organoidi

La terapia personalizzata è la nuova frontiera della medicina moderna. Data la forte eterogeneità del glioblastoma e le sostanziali differenze nella struttura del tumore tra un paziente e l'altro, la terapia personalizzata ricopre un ruolo chiave nella cura completa di questa malattia.

Gli organoidi sono **strutture tridimensionali derivate da cellule staminali del paziente**, che hanno capacità di auto-organizzazione e possono simulare struttura e funzione degli organi umani. Sono uno dei modelli più promettenti per la ricerca sul glioblastoma perché permettono non solo di mantenere le caratteristiche fisiche e chimiche del tumore, ma di riprodurlo anche in 3D.

Si possono ottenere prelevando o cellule staminali generiche dal paziente e poi modificarle geneticamente o utilizzare le cellule tumorali direttamente e poi, attraverso l'uso di bioreattori, farle crescere in laboratorio. Di recente è stato scoperto che il microambiente tumorale include delle **cellule staminali del glioblastoma (GSC)**; grazie a queste, si sono ottenuti in laboratorio dei modelli di organoidi del glioma molto specifici e affidabili, su cui si stanno svolgendo importanti ricerche. Nello specifico, data la presenza di cellule staminali del paziente, si è stati in grado di ricreare i tumori specifici dei pazienti in cura permettendo così la ricerca in laboratorio di trattamenti più mirati e personalizzati andando ad esempio a sviluppare farmaci o immunoterapie incentrate sulle caratteristiche del singolo soggetto.

Questi modelli permettono perciò di testare ex vivo l'effetto, ad esempio di un farmaco, non solo sul tessuto tumorale ma anche su quello sano circostante e soprattutto di adattare la terapia all'eterogeneità e alla struttura del singolo tumore del paziente in esame, creando così una terapia personalizzata progettata per massimizzare la cura del singolo soggetto (Figura 2.6) [52,53].

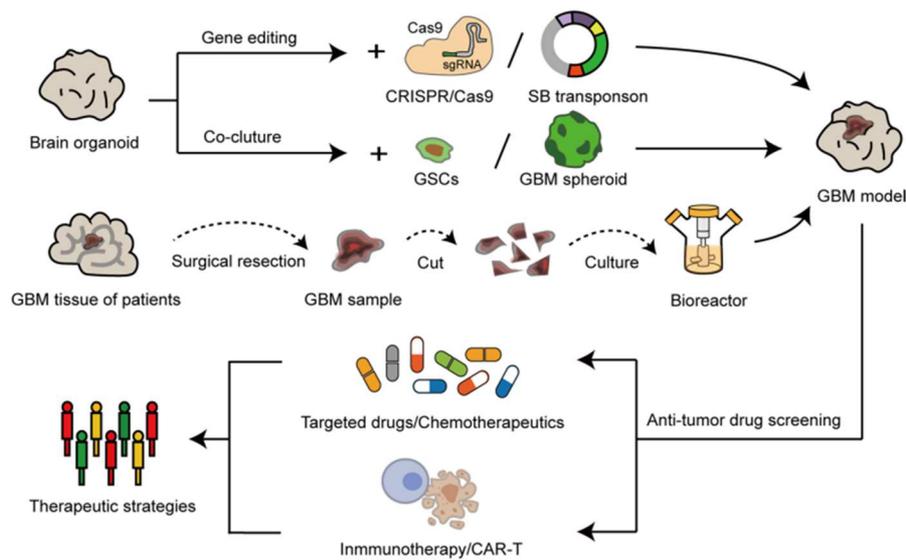


Figura 2.6 Le applicazioni degli organoidi nella terapia del glioblastoma.

Sebbene i trattamenti attualmente disponibili per la cura del glioblastoma siano numerosi, la prognosi resta molto sfavorevole. Come accennato nei paragrafi precedenti, il successo scarso delle terapie è per lo più legato all'eterogeneità del microambiente tumorale e alla presenza della barriera ematoencefalica, che limitano il passaggio di farmaci e cellule del sistema immunitario.

Per ovviare a questi problemi sono stati avviati diversi studi che si focalizzano sulla progettazione di tecniche più localizzate in modo da facilitare l'arrivo delle sostanze interessate e aumentarne l'efficacia. Un importante esempio è quello dei dispositivi basati sul rilascio controllato di farmaci che verrà trattato più nel dettaglio nel capitolo successivo.

Capitolo 3: Sistemi per il rilascio di farmaci antitumorali

I sistemi a rilascio controllato di farmaci (*drug delivery systems*, DDS) per la cura del glioblastoma sono un'importante attuale sfida per superare le difficoltà nell'applicazione dei trattamenti terapeutici tradizionali. Come illustrato nei capitoli precedenti, sono molti i problemi che ostacolano la cura del glioblastoma, quindi per migliorare i risultati della terapia sono stati avviati diversi studi clinici finalizzati all'utilizzo del rilascio controllato e localizzato di farmaci antitumorali.

La somministrazione locale di farmaci per il trattamento del glioblastoma presenta molti vantaggi rispetto alla somministrazione sistemica, tra cui un'efficienza superiore e minori effetti collaterali. Tuttavia, dovrebbe essere accompagnata da un intervento chirurgico per ottenere un diretto accesso al tumore. Per ridurre al minimo i rischi e il danno fisico al paziente, i farmaci vengono quindi rilasciati durante l'operazione di resezione chirurgica iniziale o con procedure minimamente invasive [54].

Sono al momento disponibili o in via di sviluppo diverse strategie riguardanti il rilascio localizzato di farmaci antitumorali. Un approccio molto usato è l'**iniezione intracranica** di agenti terapeutici. In questo caso, il farmaco viene somministrato direttamente nel bersaglio clinico, assicurando non solo un'eccellente efficienza locale ma anche la possibilità di controllare la posizione dell'iniezione con una siringa o un catetere apposito. Questo metodo mostra però ancora un'efficacia terapeutica sotto le aspettative a causa della limitata dispersione del farmaco iniettato e dell'eterogeneità dei tessuti.

Per aumentare la dispersione in tutto l'ambiente tumorale può essere usata la **somministrazione potenziata da convezione** (*Convection-Enhanced Delivery*, CED), basata sull'azione di una pompa e di una siringa in grado di generare un flusso del farmaco nel tessuto cerebrale [55].

Esistono poi **serbatoi di farmaci** come il serbatoio di Ommaya (*Ommaya reservoir*), costituito da una semisfera cava contenente il farmaco in questione, esterna al tessuto cerebrale e collegata al glioblastoma tramite un catetere. È un dispositivo dotato di più funzioni, in quanto consente di accedere direttamente e costantemente all'ambiente cerebrale, permette così la somministrazione ripetuta e controllata di farmaci chemioterapici e può essere utilizzato anche per prelevare il liquido cerebrospinale. Dato che espone il tessuto intracranico all'ambiente esterno, questa strategia aumenta i possibili rischi di infezione e infiammazione per cui si sono cercate soluzioni alternative ad esso [56].

Un sistema preferibile sono ad esempio i **wafer polimerici**, serbatoi allo stato solido impiantabili nell'ambiente tumorale. Questi sono costituiti da miscele di polimeri

biodegradabili e agenti antitumorali e vengono impiantati nella cavità dopo la resezione chirurgica del tumore. In seguito all'operazione, il sistema polimerico è in grado di rilasciare gradualmente il farmaco prevenendo così la proliferazione delle cellule cancerose e la recidiva della malattia. Tipicamente, però, vengono usati polimeri abbastanza rigidi, che quindi non sono in grado di adattarsi all'ambiente tumorale esponendo così il paziente a rischio di deficit neurologici, infiammazioni e molto spesso convulsioni. Attualmente si sta quindi cercando di sostituire tali composti con sistemi di fibre, idrogel o altri materiali più flessibili in grado di adattarsi al tessuto e integrarsi meglio [55].

In generale la limitazione comune a tutte le tecniche basate sulla somministrazione dei farmaci resta comunque il superamento della barriera ematoencefalica, sebbene i trattamenti appena descritti siano in parte in grado di bypassarla. Nei modelli progettati più recentemente sono state integrate nuove **nanotecnologie** che permettono ai farmaci rilasciati di attraversare la BBB raggiungendo più facilmente le cellule del glioblastoma. Questi nuovi approcci includono l'utilizzo di nanovettori e nanocarrier, come le nanoparticelle basate su utilizzo di liposomi, micelle polimeriche o dendrimeri, in grado di incapsulare le molecole dei farmaci e attraversare così la barriera. Numerosi studi si incentrano inoltre sul ruolo di **ultrasuoni focalizzati e campi magnetici** nel flusso di queste nanoparticelle nel microambiente tumorale, progettando dispositivi che siano in grado di controllarlo e di favorire in questo modo una terapia ancora più mirata ed efficiente [57]. Nella Figura 3.1 sono rappresentati molti dei trattamenti appena descritti, divisi in base alla loro permeabilità della BBB.

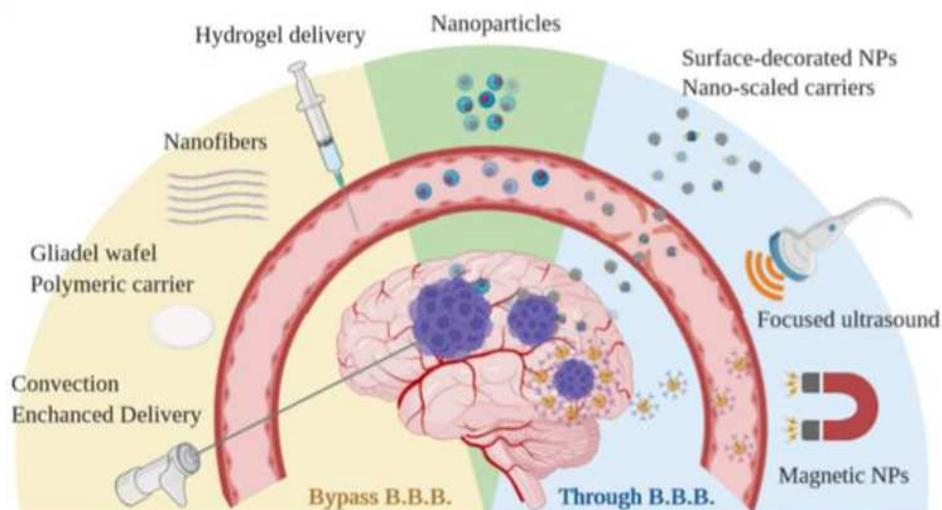


Figura 3.1 Sistemi di rilascio locale di farmaci che bypassano la barriera emato-encefalica (BBB) o che necessitano di ulteriori tecnologie concomitanti per raggiungere il tumore.

Di particolare interesse clinico sono i wafer polimerici, suggeriti come trattamento quando la resezione chirurgica non è totale e il paziente è ad alto rischio di sviluppare un glioblastoma ricorrente. In essi sono stati utilizzati come carrier vari polimeri biodegradabili tra cui polimeri naturali, sintetici e copolimeri per ottenere un rilascio prolungato di molecole terapeutiche nelle aree mirate di interesse. In questi sistemi, il meccanismo di rilascio dei farmaci e la loro efficacia dipendono fortemente dalle caratteristiche fisico-chimiche dei polimeri impiegati e dalla loro interazione con i composti terapeutici. Gli unici dispositivi di questo tipo in commercio sono i **Gliadel® wafers**, wafer polimerici a rilascio di carmustina.

Tuttavia, questo sistema terapeutico ha riscontrato molti problemi clinici a causa della sua rigidità e quindi della mancanza di adesione col tessuto cerebrale: può infatti esporre il paziente a convulsioni, ipertensione intracranica, compromissione della guarigione delle ferite neurochirurgiche e meningite [58]. Per questo motivo, diversi studi stanno valutando l'utilizzo di altri farmaci e materiali per migliorare questo approccio. Verrà quindi presentata in seguito una trattazione dettagliata su questi aspetti, focalizzata soprattutto sui biomateriali impiegati, sulle tipologie di farmaci rilasciati e sulla cinetica del rilascio, andando poi nello specifico ad analizzare alcuni dispositivi impiantabili biodegradabili particolarmente interessanti.

3.1 Meccanismo alla base del rilascio controllato

Alla base del funzionamento dei dispositivi a rilascio controllato c'è il meccanismo di cessione del farmaco antitumorale nella zona interessata. Il farmaco viene incapsulato nei biomateriali, che degradandosi rilasciano le molecole terapeutiche tra le cellule cancerose. La degradazione del biomateriale e la cinetica del rilascio del farmaco sono quindi due processi chiave strettamente collegati tra loro, che determinano l'efficacia di questa terapia. È importante analizzarli più nel dettaglio, in modo tale da comprendere le prestazioni di questi dispositivi a rilascio localizzato in considerazione dei biomateriali e dei farmaci che vengono utilizzati.

3.1.1 Degradazione del biomateriale

Una delle caratteristiche fondamentali dei biomateriali scelti per questi dispositivi è la biodegradabilità. In particolare, in ambiente biologico, devono essere in grado di degradarsi per idrolisi andando così a rilasciare il farmaco e ridurre le proprie dimensioni fino alla completa scomparsa. Una volta a contatto col materiale in questione, l'acqua è in grado di avviare la scissione della catena polimerica attraverso la rottura di alcuni legami, andando così a erodere il dispositivo. A seconda del carattere idrofilico o idrofobico del materiale, avverranno due

diversi processi di erosione: erosione di massa (*bulk erosion*) o erosione superficiale (*surface erosion*) (Figura 3.2).

Nel caso in cui il materiale abbia prevalentemente un carattere idrofilico, avviene principalmente un'**erosione di massa**, attraverso la quale il materiale non degrada in modo lineare solo sulla superficie esterna, ma subisce una degradazione omogenea in tutto il suo volume. L'acqua infatti riesce a penetrare nel materiale e lo degrada dall'interno. L'**erosione superficiale** si verifica invece soprattutto se il materiale ha carattere idrofobico: in tal caso la degradazione è più lineare poiché l'acqua non riesce a penetrare all'interno e quindi idrolizza solo lo strato più esterno diminuendo col tempo le dimensioni del dispositivo. È importante notare che l'erosione di massa prevede un processo più lento e spesso a danno del farmaco incapsulato all'interno [59].

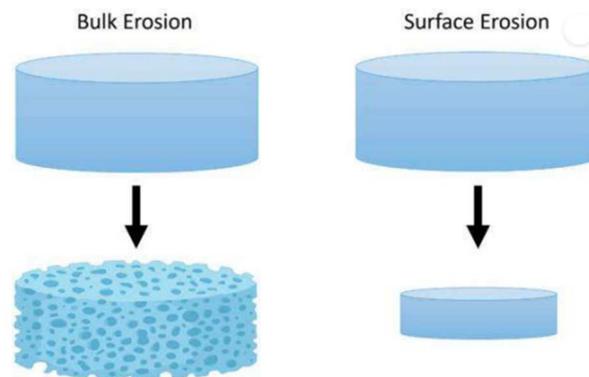


Figura 3.2 Meccanismi di degradazione del biomateriale: erosione di massa ed erosione superficiale.

Il diverso processo di degradazione è anche influenzato dalla composizione e dalle proprietà del materiale oltre che dal pH dell'ambiente circostante. Il fattore più importante da considerare quando viene analizzato il processo di degradazione è il **peso molecolare** del polimero. Nello specifico, viene studiata la percentuale di peso molecolare perduto per capire il tasso di degradazione, l'andamento del processo nel tempo e le prestazioni del biomateriale nel campo del rilascio controllato. Inoltre, dato che la degradazione provoca la scissione della catena polimerica, variazioni del peso molecolare medio del polimero determinano diversi tassi di degradazione, per cui questo parametro può essere usato per variare le proprietà del materiale e migliorare l'efficacia della terapia.

È necessario considerare che i polimeri seguono diversi andamenti di degradazione. Nello specifico, la cinetica di degradazione può essere descritta con due principali equazioni:

- Cinetica di ordine zero: $M_{w(t)} = M_{w_0} - K_{degr}t$
- Cinetica di pseudo-primo ordine: $M_{w(t)} = M_{w_0}e^{-K_{degr}t}$

dove $M_{w(t)}$ e M_{w_0} sono il peso molecolare medio del polimero al tempo t e all'istante iniziale, mentre K_{degr} è la costante del tasso di degradazione apparente del polimero. Il primo caso fa riferimento ad una degradazione lineare nel tempo mentre nel secondo caso la cinetica presenta un andamento esponenziale [59,60].

Per avere un quadro più completo del meccanismo di rilascio della sostanza terapeutica da questi dispositivi impiantabili è necessario approfondire anche la cinetica di rilascio del farmaco.

3.1.2 Cinetica di rilascio del farmaco

Il farmaco incapsulato nei sistemi polimerici viene rilasciato non solo grazie all'erosione del biomateriale ma anche tramite un meccanismo di diffusione. La cinetica di rilascio del farmaco tiene conto di questi processi e di numerose variabili tipiche dei materiali e dei farmaci utilizzati in questo campo e delle caratteristiche dell'organismo in cui il dispositivo viene impiantato.

Per analizzare il processo di rilascio è di notevole importanza focalizzarsi sul periodo di rilascio e la dose rilasciata nell'organismo. Nei grafici della Figura 3.3 vengono mostrate varie curve a seconda della concentrazione del farmaco nel tessuto. A tale proposito è importante analizzare la **concentrazione minima efficace (MEC)**, al di sotto della quale il farmaco risulta inefficace, e la **concentrazione tossica**, sopra la quale si verificano effetti collaterali indesiderati. Per il successo della terapia è quindi importante che la concentrazione del farmaco antitumorale sia tra i due livelli appena definiti. L'obiettivo dei dispositivi a rilascio controllato è proprio quello di mantenere la concentrazione costante in questo intervallo ben definito.

Le curve dei grafici descrivono inoltre l'andamento della concentrazione del farmaco nel tempo differenziando tra una cinetica del rilascio di ordine zero, di primo ordine o a rilascio immediato [60, 61].

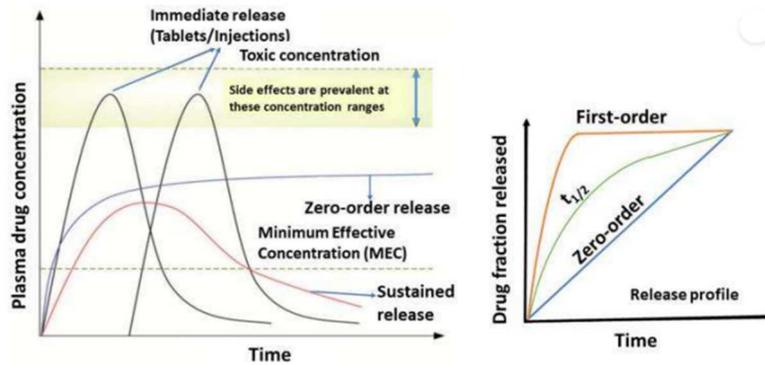


Figura 3.3 Tipici andamenti nel tempo della concentrazione del farmaco rilasciato.

La cinetica di ordine zero si riferisce a un processo con una quantità costante di farmaco eliminato per unità di tempo, con un tasso indipendente dalla concentrazione del farmaco. Il suo andamento lineare (curva blu del secondo grafico della Figura 3.3) può essere semplicemente rappresentato come $Q = Q_0 + K_0t$, dove Q è la quantità di sostanza rilasciata, Q_0 è la sua quantità iniziale in soluzione mentre K_0 è una costante specifica della cinetica di ordine zero. La cinetica di primo ordine invece è caratterizzata da un tasso di rilascio del farmaco dipendente dalla variazione di concentrazione, espressa dall'equazione $\frac{dC}{dt} = -Kt$, dove C è la concentrazione del farmaco e K è una costante specifica per la cinetica di primo ordine. Questo processo può essere ben descritto come $\log C_t = \log C_0 - \frac{Kt}{2.303}$, dove C_0 è la concentrazione iniziale e C_t è la concentrazione all'istante t . L'andamento logaritmico approssima bene quindi un'espulsione elevata di farmaco in un primo istante dopo la somministrazione della dose per poi rimanere mediamente costante nel tempo (curva arancione del secondo grafico della Figura 3.3) [62].

I sistemi con cinetica di ordine zero sono in grado quindi di superare i problemi legati al rilascio immediato e alla cinetica di primo ordine, permettendo un'eliminazione del farmaco non istantanea ma costante, in concentrazione precisa e in un periodo prolungato nel tempo. Il rilascio lento, prolungato e nei valori desiderati dopo la somministrazione di una singola dose, carattere tipico della cinetica di rilascio di ordine zero, è ideale per i wafer polimerici per la cura del glioblastoma [60,61]. Tuttavia, è importante tenere conto dell'**effetto di burst**. Durante la fase di fabbricazione, le sostanze terapeutiche incapsulate tendono ad accumularsi per lo più nello strato più esterno dei wafer. Questo comporta, dopo il loro impianto, un rilascio "a scoppio" del farmaco (detto *burst effect*) in un primo istante tramite diffusione, che fa tendere la curva tipica del rilascio con cinetica di ordine zero a un andamento tipico di quella di primo ordine.

Il rilascio immediato dopo la somministrazione è un problema che caratterizza molti polimeri e quindi wafer o matrici polimeriche per il rilascio controllato di farmaci. Per ovviare a questo effetto indesiderato proprio dei materiali scelti sono state soprattutto effettuate modifiche sulla superficie dei dispositivi [63].

3.2 Farmaci utilizzati

I farmaci inseriti nei dispositivi a rilascio controllato per il trattamento del glioblastoma sono tutti caratterizzati da un effetto antitumorale e, agendo localmente, sono in grado di svolgere un'azione citotossica mirata sulle cellule cancerose del microambiente tumorale limitando gli effetti tossici sistemici. È importante che le sostanze terapeutiche utilizzate siano compatibili con i biomateriali impiegati per incapsularli in modo da ottenere le migliori prestazioni possibili e una cinetica del rilascio di ordine zero.

Il farmaco più utilizzato nei wafer polimerici è la **carmustina** (bis-cloroetilnitrosourea, BCNU). Dal punto di vista chimico è un agente alchilante, altamente liposolubile, non ionizzante, non specifico del ciclo cellulare e in grado di penetrare abbastanza bene la BBB. Rispetto alla sua somministrazione per via endovenosa, il rilascio localizzato permette di evitare la tossicità sistemica e fornire una somministrazione duratura per diversi giorni o settimane. È stato testato il suo rilascio con diversi biomateriali tra cui il p(CPP:SA) (poli[1,3-bis(p-carbossifenossi) propano-co-acido sebaco]), usato insieme alla carmustina nei Gliadel[®] wafers attualmente in commercio [64].

Un altro agente antitumorale utilizzato nei wafer polimerici è il **temozolomide** (TMZ). Diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione locale e controllata di TMZ per mezzo di matrici polimeriche assicura una sopravvivenza superiore rispetto alla somministrazione orale di TMZ, tipica dello standard di cura attuale.

I sistemi con rilascio di questi agenti antitumorali forniscono inoltre un effetto chemioterapeutico immediato sulle cellule tumorali rimanenti dopo l'intervento chirurgico, durante il periodo di tempo che precede la chemioterapia standard, oltre che un effetto prolungato nelle settimane successive. Il rilascio controllato e graduale di queste sostanze ha permesso di aumentare notevolmente il periodo di sopravvivenza dei pazienti, grazie al loro effetto a lungo termine.

Sperimentalmente, è stata studiata la sopravvivenza nei ratti con wafer impiantabili a base di BCNU o TMZ. Con il loro utilizzo è stata dimostrata una sopravvivenza fino a 100 giorni che, se la terapia viene applicata in concomitanza con la radioterapia, può allungarsi fino ai 120 giorni.

Altri studi hanno testato questi due farmaci insieme, rilasciati da uno stesso wafer impiantabile. Il risultato è stato sorprendente in quanto oltre il 75% dei ratti godeva di una sopravvivenza a lungo termine, suggerendo così la necessità di approfondire la ricerca in questa direzione anche a livello clinico.

Sono stati anche testati altri farmaci per il rilascio controllato come paclitaxel (PTX), doxorubicina, camptotecina, dicloroacetato, curcumina o altri composti e farmaci ma nessuno di questi ha ottenuto risultati paragonabili a quelli di temozolomide e carmustina [65].

3.3 Biomateriali: requisiti ed esempi

I biomateriali impiegati per realizzare i dispositivi a rilascio controllato devono avere specifiche proprietà chimiche, fisiche e meccaniche e soddisfare particolari requisiti di base in modo da ottenere un buon incapsulamento e una regolare cessione dei farmaci. Le caratteristiche più importanti sono la **biocompatibilità** e la **biodegradabilità**. La prima si riferisce alla capacità di non evocare reazioni avverse nel sistema vivente: i biomateriali scelti devono quindi essere in grado di ben adattarsi all'ambiente cerebrale e tumorale, senza causare effetti collaterali. La biodegradabilità caratterizza invece tutti quei materiali che all'interno del sistema biologico subiscono una progressiva degradazione [66].

La degradazione, in particolare, segue i processi descritti nel paragrafo 3.1 e deve erodere il materiale rilasciando non solo sottoprodotti non tossici per l'organismo, ma anche il farmaco incapsulato in questi dispositivi.

Per rispettare questi criteri chiave vengono utilizzate determinate tipologie di polimeri, capaci di interagire in modo ottimale con i farmaci incapsulati. Nei wafer impiantabili sono stati utilizzati diversi polimeri: nel seguito verranno approfonditi più in dettaglio quelli che hanno riscontrato un migliore successo nella terapia:

- p(CPP:SA): poli[1,3-bis(p-carbossifenossi) propano-co-acido sebacico];
- PLGA: acido poli(lattico-co-glicolico);
- PCL: policaprolattone,
- PEG: glicole polietilenico [67].

3.3.1 p(CPP:SA)

Il p(CPP:SA), la cui formula chimica è riportata in Figura 3.4, è un biopolimero biodegradabile appartenente alla classe delle polianidridi. Questa classe polimerica viene usata come veicolo di somministrazione di farmaci dal 1996, quando la sua applicazione nel rilascio controllato è stata approvata dalla FDA (Food and Drug Administration), dopo numerosi studi sulle sue

proprietà legate alla degradazione e all'instabilità idrolitica. In particolare, il p(CPP:SA) è stato il primo polimero a venir usato in dispositivi biodegradabili per la somministrazione controllata di farmaci ed è il principale componente dei Gliadel[®] wafer ora in commercio.

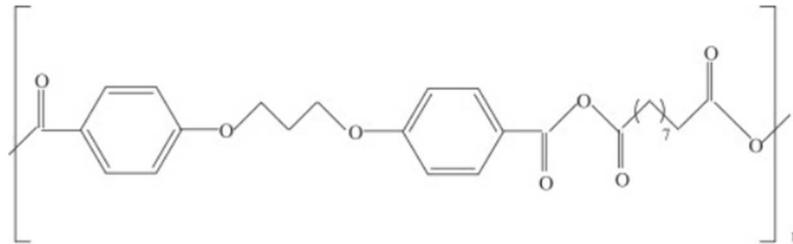


Figura 3.4 Formula chimica del p(CPP:SA).

Questo importante materiale è un copolimero di bis(p-carbossifenossi)propano (CPP) e acido sebacico (SA), due componenti molto diversi tra loro che conferiscono al polimero in questione importanti proprietà. Il componente CPP è idrofobico mentre SA è idrofilico, quindi variando le quantità dell'uno o dell'altro variano le caratteristiche fisiche del polimero. Nello specifico, si può regolare il tasso di degradazione del polimero: diminuendolo, si aumenta la velocità di degradazione, accelerando quindi il rilascio del farmaco che può variare da giorni ad anni a seconda del rapporto tra i componenti.

La degradazione per idrolisi avviene superficialmente e permette di erodere il materiale rilasciando non solo il farmaco in esso contenuto, ma anche l'acido acetico, tipicamente presente nel biomateriale stesso.

Il suo utilizzo permette di ottenere delle capsule rigide, che vengono posizionate a contatto col glioblastoma durante l'operazione di resezione chirurgica e permettono il rilascio localizzato con cinetica di ordine zero del farmaco chemioterapico, tipicamente carmustina [59,67].

3.3.2 PLGA

L'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il loro copolimero (acido poli(lattico-co-glicolico) PLGA), sono tra i materiali più usati nella terapia basata su rilascio di farmaci. Il PLGA, la cui formula chimica è riportata in Figura 3.5, è quello maggiormente utilizzato e la sua degradazione per idrolisi ai legami esterei permette il rilascio di PLA e PGA come sottoprodotti di scarto nell'organismo.

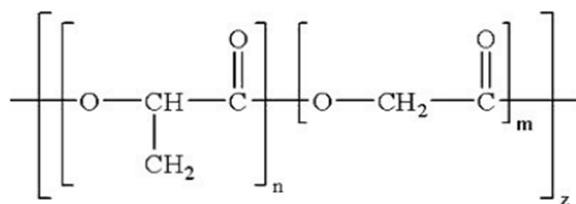


Figura 3.5 Formula chimica del PLGA.

Il PLGA usato in questo campo può avere diverse caratteristiche a seconda della sua composizione, dato l'elevato carattere idrofilico dell'acido glicolico. In particolare, come per il p(CPP:SA), il rapporto tra i monomeri influenza il periodo di degradazione: PLGA 50/50 si degrada in circa 1-2 mesi, PLGA 75/25 in 4-5 mesi e PLGA 85/15 in 5-6 mesi. Quello con un rapporto 50/50 tra i due composti di partenza presenta una maggiore instabilità idrolitica, una minore resistenza alla degradazione e quindi un rilascio del farmaco più rapido. Il meccanismo di degradazione in questo caso è di erosione di massa e ciò sfavorisce il rilascio lineare del farmaco, non permettendo il raggiungimento della cinetica di rilascio di ordine zero. In particolare il PLGA è caratterizzato da un meccanismo di rilascio con uno scoppio iniziale dato dall'effetto *burst* e una seguente cinetica con carattere simile a quella di ordine zero.

Il PLGA è usato soprattutto per realizzare carrier in forma di microsfele, microcapsule, nanosfele e nanofibre. Nonostante questa tecnologia permetta di ottenere dispositivi di piccolissime dimensioni facilmente impiantabili nel tessuto tumorale, ad esso sono preferiti altri polimeri dotati di erosione superficiale e quindi in grado di proteggere meglio le molecole terapeutiche incapsulate. Tuttavia, questo biopolimero viene comunque molto usato per il rilascio localizzato di temozolomide e carmustina, sempre unito però ad altri composti come ad esempio nei copolimeri con PLC nei wafer più flessibili o con PEG negli idrogel [67,68].

3.3.3 PCL

Il policaprolattone, oltre ad essere un ottimo biopolimero, è dotato di un'unità monomerica (ϵ -caprolattone, riportata in Figura 3.6) relativamente economica, altamente processabile e solubile in una vasta gamma di solventi organici e per questo è stato oggetto di numerosi studi ed analisi in campo biomedicale. I suoi legami estere alifatici idroliticamente labili lo rendono anche soggetto a degradazione idrolitica per cui è stato usato per dispositivi a rilascio di farmaci.

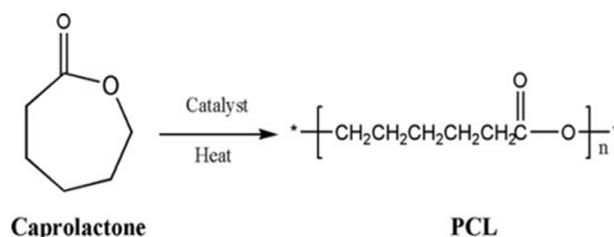


Figura 3.6 Formula chimica del caprolattone e del suo polimero, PCL.

Il meccanismo di degradazione del PCL è risultato essere l'erosione di massa in condizioni fisiologiche (pH 7,4) e l'erosione superficiale in ambiente basico (pH 13). In ambiente biologico, la degradazione è quindi di massa per cui il rilascio occuperà un periodo di tempo molto lungo, fino a 2-3 anni; per questo motivo è stato usato soprattutto come veicolo di somministrazione di farmaci a lungo termine. Per migliorare le prestazioni di questo materiale sono stati sviluppati diversi suoi copolimeri. Esempi di wafer di questo tipo per il glioblastoma includono sistemi polimerici di poli(ϵ -caprolattone-co-lattico) (PCL-LA), poliuretano a base di PCL (PCL-Diol-b-PU) e PCL reticolato con glicole polietilenico (PCL-PEG-PCL). Su questi materiali sono stati intrapresi numerosi studi finalizzati alla progettazione di scaffold flessibili caricati con agenti antitumorali come, ad esempio, un wafer stampabile in 3D a rilascio controllato, in grado di adattarsi al tessuto cerebrale ed evitare la rigidità tipica dei Gliadel[®] wafers in p(CPP:SA) [67,69].

3.3.4 PEG

Il glicole polietilenico viene molto usato sin dagli anni '70 in campo biomedico per la rigenerazione tissutale (Figura 3.7). Negli ultimi decenni sono state studiate le sue proprietà per quanto riguarda il rilascio controllato di farmaci. Questo materiale presenta un'elevata solubilità in ambiente acquoso, la sua degradazione per idrolisi è quindi molto veloce per cui viene unito ad altri materiali per raggiungere tassi di degradazione ottimali. È stato infatti coniato il termine "*PEGylation*" per indicare il meccanismo secondo il quale il PEG viene legato ai farmaci ed altri materiali per aumentarne la stabilità e la solubilità in vivo e migliorare l'efficacia del farmaco nell'organismo [70]. Questo processo, che riguarda maggiormente le nanoparticelle, è stato adattato anche ai sistemi polimerici per la cura del glioblastoma. In questi dispositivi il PEG viene legato soprattutto a PLA, PLGA o PLC, per ottenere dispositivi di piccolissime dimensioni, abbastanza flessibili e con buone proprietà compressive. Attualmente, molti studi stanno utilizzando il PEG per progettare nuovi dispositivi innovativi di questo tipo. Un esempio sono delle matrici basate su nanoparticelle di PLGA/PEG. Questi wafer sottili

possono essere modellati in diverse forme e dimensioni favorendo così l'adesione al tessuto tumorale post resezione chirurgica [64].

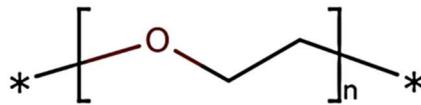


Figura 3.7 Formula chimica del PEG.

3.4 Confronto tra dispositivi per il rilascio controllato

I biomateriali e i farmaci appena descritti sono stati usati per realizzare molti sistemi per il rilascio controllato e localizzato di sostanze chemioterapiche per la cura del glioblastoma.

Le diverse proprietà dei polimeri, in particolare, hanno permesso di ottenere dispositivi con proprietà molto diverse tra loro. In seguito verranno descritti e confrontati tre approcci basati su questa tecnica terapeutica.

3.4.1 Gliadel[®] wafer

Il Gliadel[®] wafer è l'unico sistema impiantabile per la somministrazione di farmaci chemioterapici contro il glioblastoma ora in commercio. Come già detto, è un sistema a base di p(CPP:SA), in un rapporto di 20:80, a rilascio di 7,7 mg di carmustina. È un wafer di colore bianco o giallo pallido, con un diametro di 1,45 cm e uno spessore di 1 mm.

I wafer vengono impiantati nel letto tumorale dopo la resezione chirurgica, durante la medesima operazione (Figura 3.8). Possono essere impiantati fino a otto wafer, con una dose totale di farmaco di 61,6 mg, ma il numero preciso varia a seconda della dimensione e della forma della cavità di resezione [71].

La carmustina è distribuita in modo omogeneo in questi sistemi e viene rilasciata gradualmente nel sito tumorale. In vitro è stato studiato accuratamente il processo di rilascio del farmaco nel quale si sono osservate due fasi. La prima fase, detta fase di induzione, dura circa 10 ore e fa riferimento al periodo subito dopo l'impianto. In questo lasso di tempo il polimero viene idrolizzato e inizia la sua degradazione con conseguente rilascio del farmaco. In particolare già il 60% della carmustina si diffonde in questa prima fase, solo il 40% restante viene rilasciato nei seguenti 7 giorni. È stato quindi osservato un picco nella concentrazione del farmaco al giorno zero che però tendeva a diminuire entro le 24 ore per stabilizzarsi a un valore costante e

mantenerlo per i seguenti giorni (cinetica di ordine zero con effetto *burst* iniziale), fino a raggiungere un livello quasi non rilevabile dopo 14 giorni postoperatori [72].



Figura 3.8 Gliadel[®] wafers impiantati in una cavità tumorale cerebrale post resezione chirurgica.

Alla base della riuscita di questo approccio terapeutico e del rilascio ottimale del farmaco, c'è il processo di fabbricazione. Per disperdere uniformemente il principio attivo, il farmaco viene innanzitutto miscelato alla matrice polimerica allo stato liquido, poi il tutto viene sottoposto a un particolare processo di essiccazione e infine a stampaggio a pressione [59].

I wafer così ottenuti appaiono solidi e rigidi e proprio per questo non riescono ad adattarsi in modo ottimale alla superficie del sito tumorale, possono quindi esporre il paziente a numerose complicanze. Tuttavia, questa terapia, combinata con l'attuale standard di cura, migliora notevolmente l'efficacia del trattamento sul paziente affetto da glioblastoma per cui viene suggerita da molti oncologi soprattutto per prevenire il rischio di recidiva.

3.4.2 Scaffold polimerici flessibili

Data la superficie irregolare dei tessuti molli dopo l'intervento chirurgico, i polimeri rigidi non risultano la migliore opzione per la realizzazione di sistemi impiantabili a rilascio controllato di farmaci. Sono stati quindi progettati diversi film sottili flessibili per aumentare l'aderenza coi tessuti e l'efficacia della terapia. Molti studi preclinici si basano proprio sull'analisi dei polimeri da utilizzare in questo campo, in particolare si focalizzano sull'utilizzo di copolimeri con PCL, PLGA e PLA. Nella Figura 3.9 sono riportati due esempi di questi scaffold polimerici di cui si può apprezzare l'evidente flessibilità.

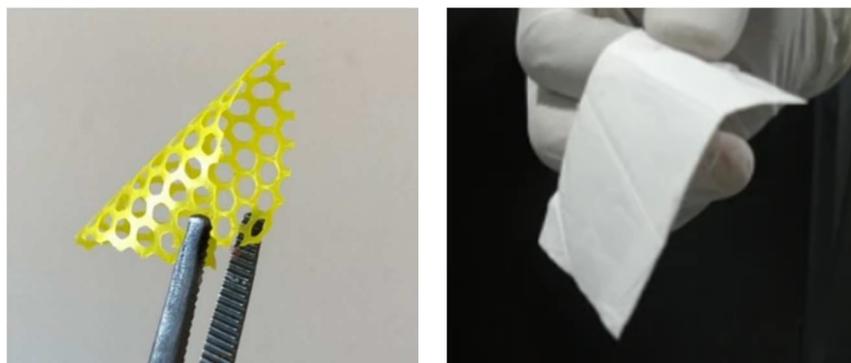


Figura 3.9 Wafer flessibili rispettivamente di PCL caricato con curcumina e PLGA-PLA-PCL caricato con TMZ.

Nella prima immagine è rappresentato uno scaffold in PCL caricato con curcumina e realizzato grazie alla stampa tridimensionale. In questo caso è stato scelto il PCL per le sue note proprietà utili per questa applicazione come biodegradabilità e flessibilità. La curcumina è invece un farmaco poco utilizzato in questo campo a causa della sua scarsa solubilità in acqua e il metabolismo veloce nel plasma, che comporta una breve emivita nell'organismo e un mancato superamento della barriera ematoencefalica. Tuttavia, combinando questi due composti e realizzando un sistema impiantabile per il rilascio localizzato di questo farmaco, si riesce a superare il problema della BBB e ottenere un ottimo risultato terapeutico.

Per garantire la dispersione omogenea della curcumina nel PCL viene utilizzato il metodo di fusione. I due composti uniti allo stato liquido vengono poi riscaldati per un paio di giorni in modo da far evaporare il solvente e infine vengono sottoposti ad estrusione così da ottenere dei filamenti che poi sono stati usati dalla stampante 3D per realizzare gli scaffold finali. Sono stati stampati dispositivi con spessori, concentrazioni di farmaco e forma dei pori diversa in modo da illustrare la versatilità di questa tecnica e trovare allo stesso tempo la combinazione migliore tra questi parametri per la terapia contro il glioblastoma. In particolare la presenza di pori a nido d'ape aumenta le prestazioni meccaniche e la durata del periodo di rilascio del farmaco ed è stata perciò scelta come la geometria migliore per questa applicazione terapeutica. In questo caso, in un dispositivo con pori a nido d'ape, caricato con il 7% di curcumina e con uno spessore di 0,2 mm, il rilascio prolungato del farmaco può arrivare fino a 48 ore, con un picco nelle prime 24 ore caratterizzate da un rilascio del 75% del principio attivo. Si possono comunque variare le caratteristiche fisiche del dispositivo con facilità, modificando così la sua flessibilità, la dose di curcumina presente e il periodo di rilascio, adattandolo alle necessità del singolo paziente [69].

Nella seconda immagine di Figura 3.9 è rappresentato un altro esempio di scaffold flessibile. A differenza del precedente, questo è stato realizzato con nanofibre di PLGA-PLA-PCL caricate con temozolomide. Le nanofibre polimeriche caricate con TMZ sono state ottenute con l'elettrofilatura (o *electrospinning*: una complessa tecnica di lavorazione dei materiali polimerici utilizzata per renderli a forma di fibre sottilissime). Sono caratterizzate da diametri di 200-1400 nm, un rapporto tra i polimeri che va da 1:1:0 a 10,2:1:1,2 e carichi percentuali di farmaci di 1-30% del peso complessivo. I dispositivi con varie composizioni sono stati sottoposti a diverse prove meccaniche ottenendo tutti delle ottime prestazioni, quelli che hanno riscontrato un maggior successo sono quelli con un rapporto PLGA-PLA-PCL di 6,7:1:0,5 e un carico di TMZ del 20%. Questa formulazione dei polimeri ha permesso di ottenere un periodo di degradazione di due mesi assicurando un rilascio a ritmo costante del farmaco per almeno un mese dall'impianto. Sebbene sia caratterizzato da un effetto *burst* iniziale molto evidente, l'elevata concentrazione di TMZ presente nei dispositivi impiantati permette un rilascio prolungato e costante nel successivo lasso di tempo, caratterizzato da una cinetica di rilascio approssimabile a quella di ordine zero. Come nel caso precedente, è comunque possibile cambiare le caratteristiche fisico-chimiche del wafer polimerico andando così a variare, ad esempio, il periodo di rilascio del farmaco, riducendolo anche a una settimana, a seconda delle necessità del paziente [73].

Oltre a questi due esempi, sono stati realizzati moltissimi altri film sottili flessibili caricati con agenti chemioterapici, sfruttando anche le proprietà di altri polimeri e farmaci. Questi dispositivi flessibili hanno tutti riscontrato un grande successo nella terapia, in quanto riescono a limitare i problemi meccanici e le complicanze legate ai Gliadel[®] wafer.

3.4.3 Idrogel e nanoparticelle polimeriche

Sebbene i film flessibili appena trattati siano una buona alternativa ai Gliadel[®] wafers, non sono la migliore opzione a causa dell'ancora incompleta adesione col tessuto tumorale. Gli idrogel invece, a differenza dei wafer solidi polimerici, vengono iniettati nel sito interessato allo stato liquido e una volta impiantati, in seguito a precisi stimoli esterni, solidificano. In questo modo, sono in grado di integrarsi perfettamente al tessuto cerebrale, gelificare adattandosi perfettamente al sito di destinazione e, col tempo, attraverso i processi di degradazione e diffusione, rilasciare gradualmente il farmaco incapsulato.

Gli idrogel sono strutture tridimensionali formate dalla reticolazione in situ di catene polimeriche idrofiliche e rappresentano l'approccio più innovativo e attuale per quanto riguarda il rilascio controllato e localizzato di farmaci antitumorali. Dato il loro carattere idrofilico, sono

stati principalmente utilizzati per trasportare farmaci idrofilici. Tuttavia, la maggior parte degli agenti chemioterapeutici sono scarsamente solubili in acqua, per cui, per adattare gli idrogel a questa terapia, sono stati introdotti numerosi nanocarriers come micelle e nanoparticelle, in modo da incapsulare i farmaci e facilitare il loro passaggio attraverso la BBB nel sito tumorale e quindi aumentare l'efficacia di questa terapia.

Gli idrogel, come i wafer solidi visti in precedenza, vengono posti nel tessuto interessato durante l'operazione chirurgica, in questo caso attraverso un'iniezione. Una volta impiantati, sono in grado di avviare un meccanismo di gelificazione, in base al quale possono essere divisi in due macro-classi: idrogel chimici o idrogel fisici. I secondi, reticolati da interazioni non covalenti, sono quelli di particolare interesse per la cura del glioblastoma. Sono in grado di reticolare in situ in seguito alla presenza di stimoli fisici [74]. Un esempio sono gli idrogel termosensibili, in grado di reticolare se inseriti in un ambiente con una temperatura pari alla loro temperatura di gelificazione. Il principale è OncoGel™, un sistema a rilascio di paclitaxel che comprende l'uso di un copolimero termosensibile di PLGA-PEG-PLGA, solubile in acqua a basse temperature e che si trasforma in un gel viscoso se raggiunge la temperatura corporea. Questi polimeri vengono usati insieme per combinare le loro proprietà e ottenere un composto che abbia soprattutto una solubilità in acqua adeguata: infatti il PLGA è tendenzialmente idrofobico mentre il PEG ha carattere idrofilico. OncoGel™ ha riscontrato un grande successo in quanto è in grado di assicurare un rilascio del farmaco nel sito interessato per almeno 6 settimane dell'iniezione grazie alla formazione di micelle di PEG-PLGA al momento della gelificazione: esse incapsulano spontaneamente il farmaco e lo rilasciano gradualmente durante il processo di degradazione del gel complessivo [75]. Queste **micelle polimeriche** sono formate dall'autoassemblaggio di copolimeri in grado di creare strutture con un esterno idrofilico e un nucleo idrofobico. Sono un approccio nanotecnologico di notevole importanza in questo campo e vengono usate per creare sistemi ibridi che sfruttino le caratteristiche base degli idrogel macroscopici e le proprietà delle micelle per migliorare le prestazioni complessive della terapia. Il guscio esterno è per lo più composto sempre da blocchi idrofilici di PEG mentre la composizione del nucleo è variabile, composto sempre però da polimeri con carattere idrofobico. Le micelle polimeriche vengono usate per incapsulare farmaci con carattere prevalentemente idrofobico al loro interno e migliorarne la diffusione nel sito tumorale grazie anche alla presenza dell'idrogel in cui sono immerse. Sono state oggetto di molti studi clinici e preclinici che hanno dimostrato una maggior tossicità locale e mirata del farmaco in questione, tipicamente temozolomide o paclitaxel, per cui un maggior successo della terapia [76].

Le micelle sono presentate schematicamente nella Figura 3.10 insieme a un altro esempio di nanotecnologia usata in questo campo, rappresentato dalle **nanoparticelle polimeriche**, in cui i farmaci possono venir incapsulati all'interno della loro matrice polimerica o assorbiti sulla loro superficie. Le più utilizzate in questo campo sono quelle a base di PEG o con un copolimero di PEG-PLGA sempre per il rilascio di TMZ o PTX. Attualmente sono presenti moltissimi studi in questo campo, che utilizzano nanoparticelle con altri polimeri per progettare idrogel ancora più all'avanguardia. Un esempio è un idrogel ultra-termosensibile tracciabile con la risonanza magnetica e caricato con nanoparticelle a rilascio di PTX. Il copolimero utilizzato è infatti caratterizzato dalla presenza dell'acido gadopentetico, dotato della capacità di contrasto alla risonanza magnetica, e ciò permette di monitorare in tempo reale il rilascio del principio attivo [74].

È importante notare però che gli idrogel, come gli scaffold flessibili, sono ancora a uno stadio preclinico di ricerca. Sono necessari ancora molti studi prima che questi nuovi approcci possano rivoluzionare lo standard di cura attuale per il glioblastoma. Nel capitolo seguente verranno descritte le applicazioni cliniche e gli attuali risultati sperimentali di questi dispositivi per il rilascio localizzato e controllato di farmaci, fornendo anche una panoramica delle prospettive future.

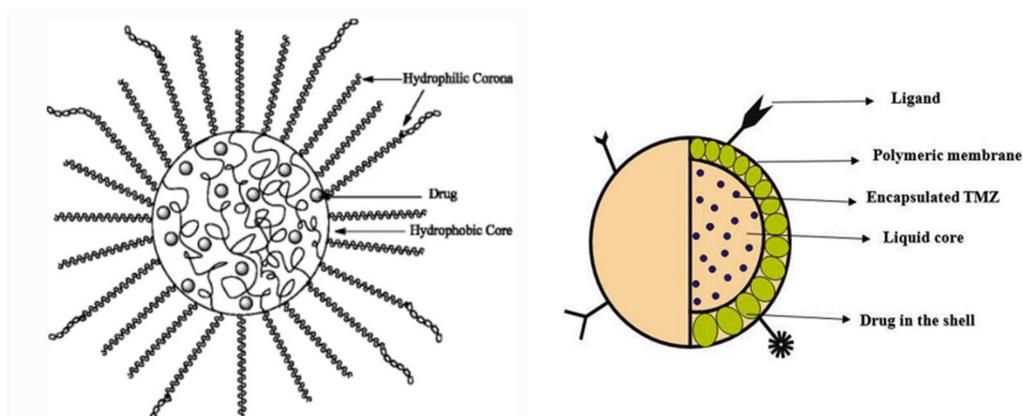


Figura 3.10 Micelle (sinistra) e Nanoparticelle (destra) polimeriche.

Capitolo 4: Applicazioni e prospettive

Come illustrato nel capitolo precedente, sono molti i sistemi per il rilascio localizzato e controllato di farmaci chemioterapici per il trattamento del glioblastoma, messi a punto con l'obiettivo di integrare l'attuale standard di cura per assicurare ai pazienti una terapia più efficiente e un maggiore tasso di sopravvivenza.

L'eterogeneità del glioblastoma e la presenza della barriera ematoencefalica non permettono infatti ai trattamenti del protocollo Stupp di eliminare completamente il tumore. L'introduzione di una somministrazione di farmaci localizzata, oltre che sistemica, aumenterebbe l'effetto citotossico complessivo riducendo notevolmente la progressione del glioblastoma e il rischio di recidiva.

In seguito verranno descritti gli attuali studi in vitro e in vivo in questo campo, soffermandosi sui risultati clinici, sull'effetto sinergico con il trattamento standard di cura e sulle prospettive future.

4.1. Sperimentazione preclinica

Il primo passo per valutare le prestazioni di questi nuovi sistemi è testarli in **modelli di coltura in vitro** 2D o 3D. Gli studi più recenti utilizzano questi ultimi, sfruttando anche le co-culture con tessuti tumorali e tessuti sani, come nel caso degli organoidi cerebrali. I modelli in vitro in grado di riprodurre le condizioni sia patologiche che fisiologiche sono uno strumento di notevole rilievo in questo campo e in un futuro prossimo verranno sempre più usati per verificare le prestazioni dei sistemi a rilascio controllato, permettendo di valutare non solo il loro effetto terapeutico, ma anche gli eventuali effetti collaterali sui tessuti sani circostanti.

Data l'elevata eterogeneità del glioblastoma, è molto difficile riuscire a riprodurre in vitro tutte le diverse caratteristiche proprie di questo tumore. Le colture tridimensionali di recente sviluppo stanno così cercando di creare una struttura che sia la più vicina possibile a quella reale, simulando al meglio anche sottostrutture particolari che riproducano il microambiente tumorale e la barriera ematoencefalica. Attualmente, tuttavia, sono pochi gli studi che sfruttano queste tecnologie all'avanguardia per valutare i dispositivi a rilascio controllato; di conseguenza, è necessario un numero molto elevato di test in vivo per valutare la sicurezza di questi sistemi e i loro possibili effetti indesiderati.

A livello preclinico, la fase di **sperimentazione su modelli animali** ha un ruolo chiave. Esiste un'ampia varietà di modelli di roditori con i requisiti per testare questi dispositivi: la scelta del modello più adatto dipenderà poi dalle dimensioni, dalla specie, dall'ambiente cerebrale e da

altri fattori, in base alle necessità del sistema a rilascio controllato da valutare. In particolare, la dimensione dell'animale è un importante fattore da analizzare. La cavità tumorale post resezione chirurgica può variare dai 9 mm³, nei topi, ai 28 mm³ nei ratti più grandi, mentre nell'uomo ha un volume decisamente maggiore (14-55 cm³) [77]. È importante tener conto di questa notevole differenza di dimensioni, che può influire sull'interpretazione dei risultati e quindi sull'effetto totale della terapia. Proprio per questo, gli studi preclinici hanno testato questi dispositivi anche su altri animali: ad esempio, i test su conigli e scimmie hanno dato risultati chiave per quanto riguarda l'utilizzo dei Gliadel[®] wafer sull'uomo.

Le sperimentazioni precliniche su animali di maggiori dimensioni hanno permesso di analizzare meglio soprattutto la cinetica di rilascio del farmaco e la durata del periodo in cui la terapia risulta essere più efficace [64]. Gli altri scaffold polimerici di più recente progettazione, come quelli descritti nel Capitolo 3, sono ancora fermi a questo stadio di sperimentazione preclinica, con i test dei dispositivi prevalentemente in vitro e su modelli di roditori di medie dimensioni. Sebbene i test in vivo su modelli animali abbiano permesso di ottenere dei risultati davvero promettenti, sono comunque necessarie ulteriori ricerche in questo campo prima di cominciare le applicazioni cliniche vere e proprie.

La Tabella 4.1 schematizza un elevato numero di sistemi polimerici di questo tipo a rilascio di farmaci antitumorali, evidenziandone i vari stadi di sperimentazione [78].

4.2. Sperimentazione clinica

Gli unici sistemi a rilascio controllato per la cura del glioblastoma ad uno stadio clinico di sperimentazione, approvati dall'FDA, sono i Gliadel[®] wafers. Attualmente lo studio su questi dispositivi è a uno stadio molto più avanzato rispetto ad altri, in quanto sono stati progettati già decine di anni fa. Dal 1997 sono state infatti eseguite più di 20000 procedure con wafer a rilascio di carmustina, tutte con discreti risultati per quanto riguarda la sopravvivenza del paziente.

Local delivery system	Drug	Clinical stage
pCPP:SA wafer	BCNU	FDA approved
	PTX	Preclinical
	Mitoxantrone	Preclinical
	DOX	Preclinical
	Camptothecin	Preclinical
	Minocycline	Preclinical
	Riluzole + memantine	Preclinical
6-Carboxylcellulose plates	Cisplatin	Pilot study
Open cell polylactic acid solution	Cisplatin	Preclinical
Caprolactone-glycolide polymer beads	Rapamycin	Preclinical
Drug-PLGA implant	DOX	Preclinical
Liquid crystalline cubic phases	PTX + carboplatin	Pilot study
EVAc polymer	Camptothecin	Preclinical
PLGA wafer	BCNU	Preclinical
PLGA microassemblies implants	PTX	Preclinical
	PTX + etanidazole	Preclinical
	5-FU	Phase II
	Carboplatin	Preclinical
	BCNU	Preclinical
Nanofiber membranes	BCNU + irinotecan + cisplatin	Preclinical

Tabella 4.1 Stadi di sperimentazione di dispositivi polimerici a rilascio controllato.

Come già accennato nei capitoli precedenti, è comunque presente il rischio di sviluppare effetti collaterali a causa della rigidità dei dispositivi in p(CPP:SA). Diversi studi hanno stimato l'incidenza complessiva per ciascun evento avverso: edema cerebrale 4-23%, ipertensione intracranica 4-9%, perdite di liquido cerebrospinale 5%, infezione intracranica 4-5%, convulsioni 19-33%, trombosi 10% ed embolo polmonare 8%. Tra queste, l'infezione intracranica e le convulsioni sono state quelle riportate più frequentemente dai pazienti [79]. Anche se appaiono numerosi i rischi di complicanze, i benefici di questa terapia sono però evidenti. La sopravvivenza globale mediana nei pazienti in cui è stato impiantato un wafer Gliadel[®] post resezione tumorale è di circa 16-18 mesi, con un tasso di sopravvivenza di 39,8% e del 31,5% a 2 e 3 anni, rispettivamente, dopo l'operazione chirurgica. In tali valori sono compresi sia pazienti con glioblastoma di nuova diagnosi che quelli con glioblastoma ricorrente. È importante perciò distinguere i due casi, tenendo conto che il periodo di sopravvivenza nei pazienti con glioma di prima diagnosi è maggiore rispetto a quelli che hanno mostrato una recidiva della malattia (Figura 4.1).

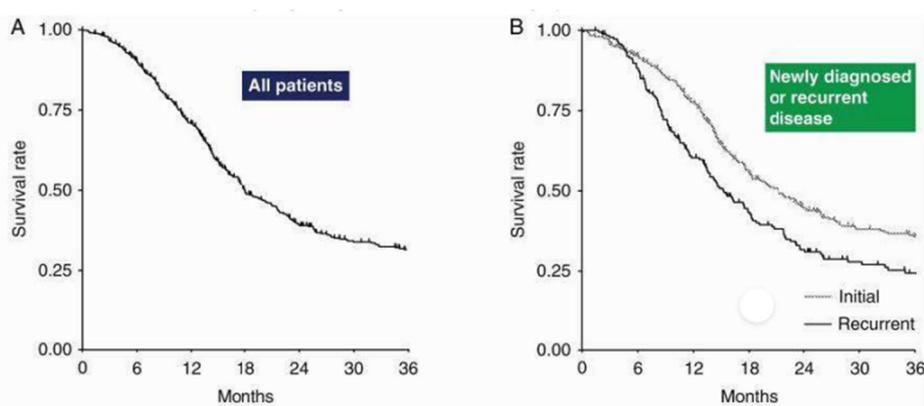


Figura 4.1 Andamento del tasso di sopravvivenza in pazienti con glioma di prima diagnosi o ricorrente.

Nella valutazione del tasso di sopravvivenza in seguito alla terapia con Gliadel[®] non vanno però sottovalutati anche altri importanti fattori come l'età dei pazienti e il tasso di resezione tumorale. Nel caso dell'età bisogna considerare anche il declino generale della salute fisica dei pazienti più anziani; non sorprende infatti che essi abbiano una sopravvivenza più breve, soprattutto se di età maggiore di 65 anni. Un'altra variabile che comporta una prognosi più sfavorevole è il basso tasso di resezione: se la cavità tumorale post operazione chirurgica è più ampia, è possibile impiantare un numero maggiore di wafer, aumentando così la dose di farmaco rilasciata, l'efficacia della terapia e quindi la sopravvivenza del paziente [80].

Un miglioramento della sopravvivenza, senza un aumento di tossicità, si ha combinando i Gliadel[®] wafers con l'attuale standard di cura. Le chemioterapie combinate (carmustina localmente tramite i wafer e temozolomide sistemico per via orale) hanno infatti un effetto sinergico che aumenta la citotossicità e quindi la riduzione del tessuto tumorale. Inoltre, l'impianto dei wafer Gliadel[®] durante l'intervento di resezione chirurgica permette la somministrazione del farmaco nella finestra temporale, di 3-6 settimane, tra l'operazione e l'inizio della chemio- e radioterapia standard. Questo conferisce continuità al trattamento oltre che un effetto immediato. I pazienti in cui il protocollo Stupp standard è stato integrato con l'utilizzo dei Gliadel[®] wafer hanno riportato una sopravvivenza media libera da progressione di 10-11 mesi e una sopravvivenza globale di circa 19 mesi. È apprezzabile quindi un miglioramento del trattamento non solo rispetto all'attuale radioterapia con temozolomide concomitante ma anche a questi due trattamenti osservati individualmente o alla cura con i soli wafer polimerici a rilascio di carmustina [81].

Dato il successo di questo dispositivo, molti oncologi lo suggeriscono come integrazione all'attuale standard di terapia. Tuttavia, dati i suoi possibili effetti collaterali è importante

continuare la ricerca in questo campo per migliorare il trattamento e far procedere ad uno stadio clinico anche gli altri sistemi polimerici a rilascio controllato di farmaci chemioterapici.

4.3. Prospettive future

Al giorno d'oggi, la cura del glioblastoma rimane un grande problema medico dato lo scarso successo della terapia attualmente a disposizione. I dispositivi trattati in questa tesi possono avere un notevole impatto positivo sul trattamento del tumore in questione e migliorare la sopravvivenza dei pazienti. È innanzitutto importante però migliorare la fase di sperimentazione integrando tecnologie che siano in grado di riprodurre al meglio il microambiente tumorale. L'utilizzo di **organoidi** o di altri modelli tridimensionali potrebbe aumentare l'attendibilità dei risultati. Anche essi hanno delle limitazioni, come la carenza di risposte immunitarie e l'assenza di vasi sanguigni, per cui l'innovazione e lo sviluppo tecnologico dovrebbero lavorare in questa direzione per creare dei modelli preclinici più realistici. In particolare, al momento sono in corso diversi studi che progettano metodi per indurre la vascolarizzazione degli organoidi in vitro. Se si riuscisse a ricreare i vasi sanguigni in laboratorio, ad esempio attraverso l'uso di cellule endoteliali, si potrebbe controllare meglio la risposta immunitaria del microambiente del glioblastoma e l'effetto della barriera ematoencefalica. Ciò permetterebbe di testare nuovi dispositivi e realizzare dei sistemi polimerici a rilascio controllato più mirati ed efficienti [53].

Un altro problema legato alla terapia attuale è la tossicità sistemica. È possibile limitare gli effetti collaterali nell'organismo somministrando i farmaci localmente con rilascio controllato con i dispositivi descritti in precedenza, in questo modo l'effetto del principio attivo risulta maggiore nel sito desiderato ed è perciò sufficiente utilizzare una dose di farmaco minore. Tuttavia, i sistemi ora a disposizione sono realizzati con biomateriali con bassa efficienza di intrappolamento per i farmaci idrofobici, per cui il loro rilascio risulta troppo rapido nel microambiente tumorale, non garantendo una terapia a lungo termine. Al momento, la ricerca scientifica sta cercando nuovi polimeri in grado di soddisfare i requisiti base necessari, sfruttando anche tecniche più innovative per migliorare l'incapsulamento del principio attivo. Tra queste, quelle di maggior rilievo risiedono nella nano-medicina [82].

Gli studi che analizzano le potenzialità della nanotecnologia in questo campo sono innumerevoli, molti di questi cercano di integrarla agli attuali dispositivi polimerici per rendere la terapia più mirata, come nel caso degli idrogel con nanoparticelle. Attualmente è in via di sviluppo anche un approccio che cerca di unire queste due tecnologie, con la creazione di nanoparticelle di idrogel (note come **nanogel**). Queste porzioni di idrogel di piccolissime

dimensioni sono in grado di unire le proprietà delle nanoparticelle e degli idrogel polimerici, permettendo di ottenere delle ottime prestazioni complessive e per questo hanno attirato molta attenzione nella ricerca, soprattutto per le loro proprietà legate al rilascio di farmaci.

I nanogel sono strutture polimeriche reticolate tridimensionalmente, di misura nanometrica, in grado di incapsulare in maniera ottimale i farmaci, dotati di tossicità minima, reattivi agli stimoli dell'ambiente circostante e localizzabili via tecniche di bioimaging. Inoltre, date le loro dimensioni ridotte, risultano essere anche adatti alla somministrazione per via endovenosa, superando la necessità di operare in modo invasivo il paziente. Questi sistemi permetterebbero di superare anche un'ulteriore criticità dei wafer polimerici, legata al **targeting** della terapia. È cruciale che l'effetto citotossico sia limitato alle cellule cancerose, proprio per questo si sta cercando di integrare dei composti bioattivi sui dispositivi in modo che siano in grado di riconoscere le cellule interessate e generare una risposta mirata solo su di esse. La funzionalizzazione delle superfici dei sistemi a rilascio controllato è oggetto di analisi da anni e i nanogel sono risultati particolarmente adatti all'applicazione di questa tecnica permettendo l'accoppiamento alla loro superficie di una vasta gamma di composti bioattivi, come proteine recettive specifiche. Date queste caratteristiche, i nanogel sono considerati alla base della prossima generazione dei sistemi a rilascio controllato per la terapia dei tumori [74].

Oltre al rilascio controllato, gli studi preclinici attualmente in corso si focalizzano anche su terapie mirate con utilizzo di biomarcatori specifici, su nuove tecniche di immunoterapia o su strumentazione elettronica per diagnosi e monitoraggio. Infatti, la principale finalità della ricerca scientifica resta quella di progettare terapie da integrare al protocollo Stupp, in modo da perfezionare la cura, i trattamenti di supporto e favorire la prognosi, utilizzando approcci multidisciplinari, che sfruttino tecniche diverse per migliorare lo standard di vita dei pazienti affetti da glioblastoma.

Conclusione

Considerando le caratteristiche di aggressività ed eterogeneità del Glioblastoma Multiforme, si stanno mettendo a punto diversi sistemi innovativi che consentano di integrare le terapie standard previste dal protocollo Stupp, allo scopo di migliorare la prognosi attualmente del tutto sfavorevole.

Con questa tesi, si è valutato lo stato dell'arte delle terapie correnti, con una panoramica dei protocolli chemioterapici in utilizzo e dei sistemi a rilascio controllato e localizzato utilizzabili ad integrazione. Le potenzialità di biomateriali e sistemi di rilascio sono ampiamente trattate in letteratura, ma gli ostacoli incontrati nelle fasi precliniche portano alla necessità di intraprendere ulteriori ricerche, con l'obiettivo di mettere a punto sistemi che possano ottimizzare le terapie attuali.

Nonostante le incoraggianti evidenze sperimentali, quindi, sono necessari ulteriori studi, per aumentare la gamma di materiali e sistemi disponibili per la fase clinica, attualmente limitata al solo Gliadel[®] wafer.

Bibliografia

- [1] Standring S, Anatomia del Grey: le basi anatomiche per la pratica clinica, Edra, 2017
- [2] Felten DL, O'Banion MK, Summo Maida M, Atlante di neuroscienze di Netter, Edra, 2017
- [3] Kadry H, Noorani B, Cucullo L, A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity, *Fluids and Barriers of the CNS*, 2020; 17(1): 69
- [4] Autori vari, Trattato di anatomia umana, Edi-ermes, 2010
- [5] Louis DN, et al. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, *Acta Neuropathology*, 2007; 114: 97-109
- [6] Louis DN, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central nervous System: a summary, *Acta Neuropathology*, 2016; 131(6): 803-20
- [7] Louis DN, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Neuro Oncology*, 2021; 23(8): 1231-1251
- [8] Tan AC, et al. Management of glioblastoma: State of art and future directions, *CA Cancer Journal of Clinicians*, 2020; 70(4): 299-312
- [9] Ostrom QT, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of science” review, *Neuro Oncology*, 2014; 16(7): 896-913
- [10] Molinaro AM, et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma, *Nature Reviews Neurology*, 2019; 15(7): 405-417
- [11] Kuman V, Abbas AK, Aster JC, Robbins e Contran. Le basi patologiche delle malattie. Malattie degli organi e degli apparati, Edra, 2021, edizione 10
- [12] Verger A, Langen KJ, Glioblastoma: Chapter 9, Codon Publications, 2017
- [13] Silantyev AS, et al. Current and Future Trends on Diagnosis and prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics, *Cells*, 2019; 8(8): 863
- [14] Muller Bark J, et al. Circulating biomarkers in patients with glioblastoma, *British Journal of Cancer*, 2020; 122(3): 295-305
- [15] Lah TT, Novak M, Breznik B, Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases, *Seminars in Cancer Biology*, 2020; 60: 262-273
- [16] Quail DF, Joyce JA, The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors, *Cancer Cell*, 2017; 31(3): 326-341
- [17] Witthayanuwat S, et al. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2018; 19(9): 2613-2617
- [18] Nam JY, de Groot JF, Treatment of Glioblastoma, *Journal of Oncology Practice*, 2017; 13(10): 629-638

- [19] Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C, Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme, *EMBO molecular medicine*, 2014; 6(11): 1359-70
- [20] Cahill DP, Extent of resection of Glioblastoma: A critical Evaluation in the Molecular Era, *Neurosurgery clinics of North America*, 2021; 32(1): 23-29
- [21] Osorio JA, Aghi MK, Optimizing glioblastoma resection: intraoperative mapping and beyond, *CNS Oncology*, 2014; 3(5): 359-66
- [22] Davis ME, Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 2016; 20(5): S2-S8
- [23] Pouratian N, et al. Gamma Knife radiosurgery after radiation therapy as an adjunctive treatment for glioblastoma, *Journal of Neuro-Oncology*, 2009; 94(3): 409-18
- [24] Chédeville AL, Madureira PA, The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance, *Cancers*, 2021; 13(3): 542
- [25] Gondi V, Radiotherapy intensification for glioblastoma: enhancing the backbone of treatment, *Chinese Clinical Oncology*, 2021; 10(4): 39
- [26] Stupp R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *The New England journal of medicine*, 2005, 352(10): 987-96
- [27] Fernandes C, et al. Glioblastoma: Chapter 11, Codon Publications, 2017
- [28] Karachi A, et al. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma, *Neuro-Oncology*, 2018; 20(12): 1566-1572
- [29] Jiapaer S, et al. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma, *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*, 2018; 58(10): 405-421
- [30] Stupp R, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patient with Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial, *JAMA*, 2017; 318(23): 2306-2316
- [31] Yu MW, Quali DF, Immunotherapy for Glioblastoma: Current progress and Challenges, *Frontiers in Immunology*, 2021; 12: 676301
- [32] McGranahan T, et al. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma, *Current treatment Options in Oncology*, 2019; 20(3): 24
- [33] Nduom EK, Weller M, Heimberger AB, Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma, *Neuro-Oncology*, 2015; 17(7): vii9-vii14
- [34] Huang B, Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme, *Frontiers in Immunology*, 2020; 11:603911
- [35] Kong Z, et al. Vaccination in the immunotherapy of glioblastoma, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2018; 14(2): 255-268

- [36] Paff M, et al. The evolution of the EGFRvIII(rindopepimut) immunotherapy for glioblastoma multiforme patients, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2014; 10(11): 3322-3331
- [37] Ampie L, et al. Heatshock protein vaccines against Glioblastoma: From bench to bedside, *Journal of Neuro-Oncology*, 2015; 123(3): 441-448
- [38] Gedeon PC, et al. Checkpoint inhibitor immunotherapy for glioblastoma: current progress, challenges and future outlook, *Expert review of Clinical Pharmacology*, 2020; 13(10): 1147-1158
- [39] Wang X, et al. Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma, *Journal of experimental and Clinical Cancer Research*, 2019; 38:87
- [40] Li L, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Glioblastoma: Current and Future, *Frontiers in Immunology*, 2020; 11:594271
- [41] Choi BD, et al. Immunotherapy for Glioblastoma: Adoptive T-Cell Strategies, *Clinical Cancer Research*, 2019; 25(7): 2042-2048
- [42] Mende AL, et al. Current Advances in Immunotherapy for Glioblastoma, *Current Oncology Reports*, 2021; 23(2):21
- [43] Mihelson N, McGavern DB, Viral Control of Glioblastoma, *Viruses*, 2021; 13(7): 1264
- [44] Fukuhara H, et al. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn, *Cancer Science*, 2016; 107(10): 1373-1379
- [45] Ghiaseddin AP, et al. Tumor treating Fields in the Management of Patient with Malignant Gliomas, *Current Treatment Options in Oncology*, 2020; 21(9): 76
- [46] Rominiyi O, et al. Tumor treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions, *British Journal of Cancer*, 2021; 124(4): 697-709
- [47] Cruz Da Silva E, et al. A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials, *Cancers*, 2021; 13(8): 1795
- [48] Touat M, et al. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights, *Annals of Oncology*, 2017; 28(7): 1457-1472
- [49] Tskiran E, et al. Health-related Quality of Life Assessment in Patients with Malignant Gliomas, *Neurology India*, 2021; 69(6): 1613-1618
- [50] Pitter KL, et al. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma, *Brain*, 2016; 139(5): 1458-1471
- [51] Doherty GJ, de Paula BHR, Cannabinoids in glioblastoma multiforme - hype or hope?, *British Journal of Cancer*, 2021; 124(8): 1341-1343

- [52] Ratliff M, et al. Patient-Derived Tumor Organoids for Guidance of Personalized Drug Therapies in Recurrent Glioblastoma, *International Journal of Molecular Science*, 2022; 23(12): 6572
- [53] Zhang C, et al. Organoid models of glioblastoma: advances, applications and challenges, *American Journal of Cancer Research*, 2020; 10(8): 2242-2257
- [54] Tseng YY, Chen TY, Lui SJ, Role of Polimeric Local Drug delivery in Multimodal Treatment of Malignant Glioma: A Review, *International Journal of Nanomedicine*, 2021; 16: 4597-4614
- [55] Cha GD, et al. Local Drug Delivery Strategies for Glioblastoma Treatment, *Brain Tumor Research and Treatment*, 2022; 10(3): 151-157
- [56] Zubair A, De Jesus O, Ommaya Reservoir, StatPearls Publishing, 2022
- [57] Hsu JF, et al. Nanotechnology and nanocarrier-Based Drug Delivery as the potential Therapeutic Strategy for Glioblastoma Multiforme: An Update, *Cancers*, 2021; 13(2): 195
- [58] Xing W, et al. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis, *Drug Design, Development and Therapy*, 2015; 9: 3341-8
- [59] Pena ES, et al. Design of Biopolymer-Based Interstitial Therapies for the Treatment of Glioblastoma, *International journal of molecular sciences*, 2021; 22(23): 13160
- [60] Fu Y, Kao WJ, Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010; 7(4): 429-444
- [61] Adepu S, Ramakrishna S, Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions, *Molecules*, 2021; 26(19): 5905
- [62] Paarakh MP, et al. Release kinetics–concepts and applications, *International Journal of Pharmacy Research and Technology*, 2018; 8(1): 12-20
- [63] Huang X, Brazel CS, On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*; 2001; 73(2-3): 121-36
- [64] Wait SD, et al. Polymeric drug delivery for the treatment of glioblastoma, *Neuro-Oncology*, 2015; 17(2): ii9-ii23
- [65] Nam L, et al. Drug Delivery Nanosystems for the Localized treatment for Glioblastoma Multiforme, *Materials*, 2018; 11(5): 779
- [66] Di Bello C, Bagno A, *Biomateriali dalla Scienza dei Materiali alle Applicazioni cliniche*, Patron Editore, 2016
- [67] Nair LS, et al. Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in polymer Science* 2007; 32(8): 762-798

- [68] Su Y, et al. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application, *Drug Delivery*, 2021; 28(1): 1397-1418
- [69] Li R, et al, Three-Dimensional printing of Curcumin-Loaded Biodegradable and Flexible Scaffold for Intracranial Therapy of Glioblastoma Multiforme, *Pharmaceutics*, 2021; 13(4): 471
- [70] Veronese FM, Mero A, The impact of PEGylation on biological therapies, *BioDrugs*, 2008; 22(5): 315-29
- [71] Panigrahi M, et al. Brain tumor and Gliadel wafer treatment, *Indian Journal of Cancer*, 2011; 48(1): 11-7
- [72] Ohnishi T, et al. Is Interstitial Chemotherapy with Carmustine (BCNU) Wafers Effective against Local Recurrence of Glioblastoma? A Pharmacokinetic Study by Measurement of BCNU in the Tumor Resection Cavity, *Brain Science*, 2022; 12(5): 567
- [73] Ramachandran R, et al. Theranostic 3-Dimensional nano brain-implant for prolonged and localized treatment of recurrent glioma, *Scientific Reports*, 2017; 7: 43271
- [74] Basso J, et al. Hydrogel-Based Drug Delivery Nanosystems for the Treatment of Brain Tumors, *Gels*, 2018; 4(3): 62
- [75] Elstad NL, Fowers KD, OncoGel (ReGel/paclitaxel)-clinical applications for a novel paclitaxel delivery system, *Advanced drug delivery reviews*, 2009; 61(10): 785-94
- [76] Gothwal A, et al. Polymeric Micelles: Recent Advancements in the Delivery of Anticancer Drugs, *Pharmaceutical Research*, 2016, 33(1): 18-39
- [77] Bastiancich C, et al. Rationally designed drug delivery systems for the local treatment of resected glioblastoma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021; 177: 113951
- [78] Bastiancich C, et al. Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma, *Journal of Controlled Release*, 2016; 243: 29-42
- [79] Sabel M, Giese A, Safety profile of carmustine wafers in malignant glioma: a review of controlled trials and a decade of clinical experience, *Current Medical Research and Opinion*, 2008; 24(11): 3239-57
- [80] Iuchi T, et al. Long-term effectiveness of Gliadel implant for malignant glioma and prognostic factors for survival: 3-year results of a postmarketing surveillance in Japan, *Neuro-Oncology Advances*, 2022; 4(1): 189
- [81] Ashby LS, et al. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review, *World Journal of Surgical Oncology*, 2016; 14(1): 225

[82] Delello Di Filippo L, et al. Drug Delivery Nanosystems in Glioblastoma Multiforme Treatment: Current State of the Art, *Current Neuropharmacology*, 2021; 19(6): 787-812