




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorat en Medicina
Departament de Medicina

Identificació de biomarcadors en càncer de mama metastàtic RH+/HER2- en curs de tractament amb inhibidors de quinases depenent de ciclines 4/6

Autor:

Eudald Felip Falgàs

Directores:

Mireia Margelí Vila

Ester Ballana Guix

Tutor:

Albert Oriol Rocafiguera

Tesis doctoral per obtenir el grau de Doctor
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, 2023

AGRAÏMENTS

Quan les coses flueixen, et deixes portar; com l'aigua de les muntanyes que s'escabella entre les valls, i acaba aigualida a la mar salada. Dit amb altres paraules, aquesta tesi ha sigut un procés d'aprenentatge en la món de la recerca translacional, un procés, que com molts cicles, es va retroalimentant i creixent de forma exponencial gràcies a totes les persones que han aportat el seu granet de sorra, de temps, de creativitat o simplement d'acompanyament. Primer tot, per paciència, bones maneres, constància i lideratge, vull agrair a la **Mireia** i l'**Ester** tots aquests anys, per oferir-me l'oportunitat i ajudar-me a plasmar en paraules, la feina feta. Aquest treball, però, no hagués sigut possible sense els equips que m'han recolzat en tot el projecte:

Unitat B de l'ICO Badalona, que m'han ensenyat el valor d'un equip, la **Bea**, amb la seva energia i constància, la **Vane** amb l'ordre i l'anàlisi, la **Marga** amb la creativitat i el control, l'**Iris** amb l'empatia i la delicadesa, l'**Angelica** amb l'inconformisme i el treball, l'**Anna** amb la senzillesa i l'adaptació i la **Milana** amb la intensitat i el dinamisme. Sense totes elles, massa res de tot el presentat avui hagués sigut possible. Tampoc em vull deixar, tots els companys de SOM, sobretot els veterans que m'ho han ensenyat tot de resident, i els companys fellows, pel recolzament mutu. Menció especial pel grup **B-ARGO**, sobretot a l'**Anna** per ser omnipresent. També a tot el personal d'hospital de dia d'Oncologia, que s'ha bolcat desinteressadament per la recerca, intentant no perdre cap mostra, revisant les programacions i estant pendents del projecte. No em vull deixar tampoc a les pacients, que de forma altruista van decidir participar.

Irisicaixa i el grup de ViHIT, que tot i les turmentes viscudes en aquests anys, tornem a navegar plàcidament i a tota vela. Volia mencionar en especial a la **Lucia**, amb qui ha sigut tan fàcil treballar, des de l'ordre, el rigor i la puntualitat. També la **Maria** i l'**Eduarne** que sempre van tenir la paciència suficient en ajudar-me amb tot el que calgués a P3 i amb els mil dubtes que encara tinc al lab. A l'**Ify**, per la companyia les tardes a P3, al seu somriure permanent, i la seva passió per la recerca; crec que es llegirà la tesis tot i ser en català. A l'**Eva**, que li podria venir de tot si veiés la meva llibreta o l'ordre dels excels, a ella per fer-ho tot bé al lab i ajudar-me a mi a fer-ho una mica millor. Finalment en **Roger**, a qui li dec l'immunofenotip, les hores al LSRII, i aprendre com tenir sempre cabina sense demanar hora. No em vull deixar l'**Ignasi**, última incorporació però ja involucrat de "pe a pa". També tots els companys de taula als mòduls que m'han alimentat de mala manera, els hi dec algun quilo.

Menys és més diuen, però no vull de deixar de nombrar les persones que m'han transmès seguretat i amor tot aquest temps. A la meu **mare**, la Margarida, que m'ha

ensenyat el valor de la perseverança, i el meu **pare**, en Miquel, per seva incondicionalitat; els hi dec tot a ells. Al meu germà, en **Damià**, el millor lector que mai he conegut, tot i que no crec que es llegeixi aquesta tesis, també a la resta de la família completa, a la **Mavi**, l'**Ausiàs** i en **Bernat**, que fan que Gràcia sigui més casa. També a tots els amics que en algun moment o altre, m'han ajudat a esbargir el cap, els Reclutes amb melons i sobretauls eters, els CoRs a qui admiro i espero mantenir a prop; i els gironins pels PRs i els ports de muntanya interminables. Per últim, a la **Paula**, qui fa del pas del temps i dels projectes de vida, il·lusió i felicitat.

Així doncs, agrair a tots els qui heu estat presents d'una forma o altra, durant tot aquest temps: Gràcies.

ABREVIACIONS

ADN	àcid desoxiribonucleic
AIC	informació d'alcaike
AIMS	the absolute intrinsic molecular subtyping
AINEs	anti-inflamatòris no esteroidals.
ARN	àcid ribonucleic
ATP	adenosina trifosfat
BRCA1/2	Breast cancer gen 1/2
CDK	ciclins dependents de quinases
CDKi	molècules inhibidores de CDK
CHEK2	checkpoint kinase 2
CI	Consentiment informat
CIK	cèl·lules inductores de mort cel·lular per citoquines
CMM	càncer de mama metastàtic
CNA	alteració del nombre de còpies o copy number alteration
CNV	variació del número de còpies o copy number variation
CPS	combined positive score
ctDNA	ADN tumoral circulant
DAMPs	Dany cel·lular associat als patògens
DMSO	dimetilsulfòxid
DNTM1	ADN metiltransferasa 1
EGF	factor de creixement epidèrmic
EMA	agència europea del medicament
ESMO	european society for medical oncology
FA	formaldehid
FAT1	FAT atypical cadherina 1
FBS	serum bovi fetal
FDA	food and drug administration
FGFR	receptor del factor de creixement del fibroblast
GLM	model lineal generalitzat
GnRH	hormona alliberadora de gonadotropina
GSAE	Gene Set Enrichment anàlisi
HER2	receptor de creixement epidèrmic humà tipus 2
HER2-E	HER2 enriched
HLA	antigen leucocitari humà
HR	hazard ratio
HT	Hormonoteràpia
IA	inhibidors d'aromatasa
iCDK4/6	iCDK4/6
ICIs	inhibidors del punt de control o immune checkpoint inhibitors
IFN	interferó
IGF-1R	Receptor de creixement similar a la insulina 1
INE	Institut nacional estadística
IQR	interval interquartílic
IRPS	signatura de resistència relacionada amb interferó
KI-67	índex de proliferació Ki67

LHRH	hormona alliberadora d'hormona luteïnitzant
MHC	complex major d'histocompatibilitat
Mo-MDSCs	cèl·lules mieloides supressores mononucleades
mTOR	diana mamífera de la rapamicina
NETs	trampes extracel·lulars de neutròfils
NFAT	factor nuclear de l'activació de cèl·lules T
NGS	next generation sequency
NK	natural killer
OR	Odds ratio
PAMPs	Patrons moleculars associats als patògens
PBMCs	cèl·lules mononuclears perifèriques circulants
PBS	buffer fosfat salí
PCR	polimerasa chain reaction
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PI3K	Fosfatidininositol 3 quinasa
PIK3CA	subunitat catalítica alfa de Fosfatidininositol 3 quinasa
PMN-MDSCs	cèl·lules mieloides supressores polimorfonuclears
pRb	proteïna del retinoblastoma
PROTACS	quimeres dirigides a la proteòlisi
pTEFb	Factor d'elongació transcripcional
QT	quimioter
Rb	Retinoblastoma
RCp	resposta completa patològica
RE	receptors d'estrògens
RH	receptors hormonals
RP	receptors de progesterona
SASP	fenotip de secreció associat a la senescència o en anglès senescense-associated secretory phenotype
SERCAs	antagonistes covalents selectius del RE
SERDS	degradadors selectius de RE
SERM	moduladors selectius de RE
SEOM	Sociedad española de oncología médica
SG	supervivència global
SLP	supervivència lliure de progressió
SNC	sistema nerviós central
SPOP	<i>speckle type BTB/POZ protein</i>
TAMs	macròfags associats al tumor
TANs	neutròfils associats al tumor
TDM1	trastuzumab emtensina
TFII-H	Factor de transcripció humà II
TILs	tumor infiltrated lymphocytes
TMB	càrrega mutacional del tumor o tumor mutation burden
TME	microambient tumoral
TNF	tumor necrosis factor
TP53	tumor protein 53
Treg	cèl·lules T reguladores

t-SNE
VEGF
WHO

t- distributed stochastic neighbor embedding
factor de creixement epidèrmic vascular
World health organization

ÍNDEX

RESUM.....	11
SUMMARY.....	13
1.INTRODUCCIÓ.....	15
1.1 CÀNCER DE MAMA.....	17
1.2 CÀNCER DE MAMA METASTÀSIC.....	21
1.2.1 Càncer de Mama Metastàtic RH+/HER2-.....	22
1.2.1.1 Opcions de tractaments hormonals.....	23
1.2.1.2 Mecanismes de Resistència a tractaments hormonals.....	24
1.2.2 Els iCDK4/6 i el cicle cel·lular.....	27
1.2.2.1 iCDK4/6 i càncer de mama.....	29
1.2.2.2 Benefici en els principals estudis clínics.....	30
1.2.2.3 Estudis comparatius amb quimioteràpia.....	34
1.2.2.4 Mecanismes de sensibilitat i de resistència a iCDK4/6: identificació de biomarcadors de resposta.....	35
1.3 SISTEMA IMMUNOLÒGIC.....	40
1.3.1 Sistema immune i càncer.....	41
1.3.1.1 Principals elements del sistema immune i el càncer.....	43
1.3.2 Càncer de mama i sistema immune.....	47
1.3.2.1 Biomarcadors predictius de resposta a la immunoteràpia en càncer de mama.....	48
1.3.2.2 Principals resultats de l'ús d'immunoteràpia en càncer de mama metastàtic.....	49
1.4 ELS ICDK4/6 COM A POSSIBLE ESTRATÈGIA IMMUNOMODULADORA O IMMUNOTERAPÈUTICA EN EL CÀNCER DE MAMA.....	51
1.4.1 Rol biològic de la via ciclina D-CDK4/6 en cèl·lules immunes.....	51
1.4.2 Combinació de iCDK4/6 amb immunoteràpia.....	54
2.HIPÒTESI.....	57
3.OBJECTIUS.....	61
4.MATERIAL I MÈTODES.....	65
5.RESULTATS.....	77
5.1 CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques DE LES PACIENTS AMB ICDK4/6.....	79
5.1.1 Descriptiva de la cohort clínica tractada amb iCDK4/6.....	79
5.1.2 Anàlisi de supervivència.....	84
5.1.2.1 Supervivència lliure de progressió (SLP).....	84
Línia de tractament i hormonosensibilitat.....	85
5.1.2.2 Supervivència Global (SG).....	87
5.1.3 Impacte del subtipus tumoral intrínsec en l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6.....	90
5.1.4 Característiques clíniques de la cohort segons l'eficàcia dels iCDK4/6.....	95
5.2 BIOMARCADORS MOLECULARS EN BIÒPSIA LÍQUIDA I EN TEIXIT TUMORAL.....	100
5.2.1 Biòpsia líquida: ADN tumoral circulant (ctDNA).....	100
5.2.1.1 Càrrega tumoral mutacional (TMB).....	103
5.2.1.2 Descripció de les mutacions puntuals identificades en ctDNA.....	105
5.2.1.3 Impacte pronòstic de supervivència de la presència de les mutacions més freqüents.....	107
5.2.2 Teixit tumoral: Expressió d'ARN en biòpsies de tumor sòlid.....	110
5.2.1 Gens relacionats amb l'eficàcia del inhibidors de CDK 4/6.....	111
5.2.2.2 Vies moleculars o signatures relacionades amb el benefici del tractament.....	112
Estudi d'enriquiment de gens (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)), basat amb la base de dades Reactome.....	113

5.2.2.3 Anàlisi de la supervivència en funció de les signatures implementades al BC360™	115
5.3 FACTORS SOLUBLES DE SANG PERIFÈRICA RELACIONATS AMB EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC.....	121
5.3.1 <i>Factors solubles i checkpoint immunològics circulants basals previs a l'inici del tractament amb iCDK4/6.</i>	121
5.3.1.1 Anàlisi integrat de la contribució dels factors solubles en plasma al benefici del tractament amb iCDK4/6: Model de regressió logística	127
5.3.1.2 Impacte de les citocines i proteïnes immunològiques solubles sobre la supervivència lliure de progressió i supervivència global	128
5.3.2. <i>Poblacions immunològiques circulants en sang perifèrica.</i>	132
5.3.2.1 Impacte de l'expressió de marcadors immunològics en limfòcits en supervivència lliure de progressió i supervivència global.	137
6.DISCUSSIÓ.....	143
7.CONCLUSIONS.....	165
8.FUTURES LÍNIES.....	169
9.BIBLIOGRAFIA	173
10.ANNEXES	193
10.1. <i>Annex 1. Signatures del BC360® significatives en l'anàlisi multivariat i els gens implicats en la signatura segons Nanostring™.</i>	193
10.2. <i>Annex 2. Finançament i institucions involucrades</i>	193

RESUM

Els inhibidors de CDK4/6 (iCDK4/6) representen l'estàndard del tractament en primera línia del càncer de mama metastàtic (CMM) amb expressió de receptors hormonals (RH+), HER2 negatiu. A part del seu principal mecanisme d'acció sobre la inhibició del complex CDK4/6-ciclinaD i el bloqueig del cicle cel·lular, els últims anys s'ha descrit com influeixen el sistema immunitari a través de l'increment d'infiltració de limfòcits al tumor, l'activació de les cèl·lules T efectores i la inhibició de la proliferació de cèl·lules immuno-evasores com les cèl·lules T reguladores. El principal objectiu de l'estudi va ser identificar quins processos immunològics poden predir l'evolució de les pacients en tractament amb iCDK4/6. Per això, vam dissenyar un projecte prospectiu observacional que incloïa malaltes candidates a rebre un iCDK4/6, recollint mostres seriades de sang i de tumor procedent de l'excedent assistencial.

Els resultats van mostrar una cohort de 100 pacients amb unes dades d'eficàcia que reproduïen els resultats dels estudis pivotals, on l'afectació visceral, l'afectació òssia exclusiva, la quimioteràpia (QT) prèvia per CMM i l'hormona-resistència s'identifiquen com a factors pronòstics clínics. L'anàlisi dels subtipus intrínsecs per PAM50®, va mostrar que els subtipus no luminals (HER-2 enriched i basal-like) s'associaven a un pitjor pronòstic. L'anàlisi molecular de les característiques tumorals mitjançant determinació de ctDNA en plasma, va identificar algunes mutacions freqüents de mal pronòstic, associades principalment a resistència hormonal, com són les mutacions a *ESR1* o *PIK3CA*, amb una reducció de la supervivència lliure de progressió (SLP) i la supervivència global (SG) observada en les pacients amb tumors amb aquestes mutacions. Així, tot i que el subtipus intrínsec tumoral i/o la presència de mutacions a ctDNA permetien identificar grups amb pitjor pronòstic, aquestes troballes no explicaven l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6.

L'anàlisi transcriptòmic dels tumors utilitzant el panell BC360™ va identificar 4 signatures relacionades amb el sistema immunològic amb impacte independent sobre la supervivència (SLP) en primera línia de tractament. En concret, l'alta expressió de les signatures de IFNGamma, TIS, Treg i la baixa expressió de PD1, identificaven una població amb menor SLP en primera línia, aportant evidències del paper cabdal de la funció immunològica en la resposta clínica als iCDK4/6. Per això es va abordar l'estudi immunològic en sang perifèrica mitjançant l'avaluació de factors solubles circulants i la caracterització dels principals subtipus immunològics cel·lulars. Els resultats van mostrar que els nivells de diferents factors solubles IL10, CTLA-4, PD-1, TIM-3 i LAG-3 en sang perifèrica, permetien caracteritzar l'eficàcia al tractament utilitzant un model lineal generalitzat. Així mateix, alts nivells de IL-8 i TIM-3 identificaven 2 poblacions amb pitjor SLP. Finalment, es van descriure una població de limfòcits T circulants amb

expressió de CTLA-4 i PD-1, en la qual una major proporció en sang perifèrica s'associava a menor eficàcia dels iCDK4/6.

En resum, aquest treball demostra que la resposta immunitària podria tenir un paper rellevant en l'eficàcia dels iCDK4/6. D'aquesta manera, les pacients amb una desregulació immunològica consistent amb una major presència immunosupressora al microambient tumoral o en sang perifèrica, presentarien una menor eficàcia als iCDK4/6 i una pitjor evolució de la malaltia.

SUMMARY

The standard of care for the first-line treatment of metastatic breast cancer (MBC) with expression of hormone receptors (RH+) and HER2 negative is CDK4/6 inhibitors (iCDK4/6). The main mechanism of action of CDK4/6 inhibitors is cell cycle blockage. However, recently, it has been described that they also influence the immune system through the increase in lymphocyte infiltration in the tumor, activation of effector T cells, and inhibition of the proliferation of immune-evading cells such as regulatory T cells. The main goal of the study was to identify which immunological processes could predict the evolution of patients treated with iCDK4/6. To this end, we designed a prospective observational project that included patients eligible to receive an iCDK4/6, collecting serial samples of blood and tumor from the surplus care.

The results showed a cohort of 100 patients with efficacy data that replicated the results of pivotal studies, where visceral involvement, exclusive bone involvement, previous chemotherapy (ChT) for MBC and hormone-resistance were identified as clinical prognostic factors. The analysis of intrinsic subtypes by PAM50®, showed that non-luminal subtypes (HER2-enriched and basal-like) were associated with worse prognosis. Molecular analysis of tumor characteristics by determination of ctDNA in plasma revealed several frequent mutations associated with poor prognosis, mainly associated with hormonal resistance, such as mutations in ESR1 or PIK3CA. A reduction in progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) was observed in these patients. Thus, although the intrinsic tumor subtype and/or the presence of mutations in ctDNA allowed to identify groups with worse prognosis, these findings did not explain the effectiveness of treatment with iCDK4/6.

The transcriptomic analysis of tumors using the BC360™ panel identified 4 signatures related to the immune system with independent impact on survival (PFS) in the first line of treatment. Specifically, high expression of the IFNGamma, TIS, Treg signatures and low expression of PD1, identified a population with lower PFS in the first line, providing evidence of the crucial role of immune function in the clinical response to iCDK4/6. Therefore, the immunological study was addressed in peripheral blood by assessing circulating soluble factors and characterizing the main cellular immunological subtypes. The results suggested that the levels of different soluble factors IL10, CTLA-4, PD-1, TIM-3 and LAG-3 in peripheral blood, allowed to characterize the effectiveness of treatment using a generalized linear model. Similarly, high levels of IL-8 and TIM-3 identified 2 populations with worse PFS. Finally, a population of circulating T lymphocytes with expression of CTLA-4 and PD-1 was described, in which a higher proportion in peripheral blood was associated with worse iCDK4/6 effectiveness.

In summary, this work demonstrates that the immune response could play a significant role in the effectiveness of iCDK4/6. In this way, patients with an immune dysregulation consistent with a greater immunosuppressive presence in the tumor microenvironment or in peripheral blood, would have lower effectiveness of iCDK4/6 and a worse evolution of the disease.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Càncer de Mama

El càncer de mama representa un problema de salut en l'àmbit mundial amb més de 2 milions de nous diagnòstics anuals arreu del món, sent el tumor maligne més freqüent en el sexe femení (1, 2). A escala estatal, l'informe de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) "las cifras del càncer en España 2023", estima pel 2023 un diagnòstic total de 35.001 casos de càncer de mama a Espanya, sent al nostre entorn, el tipus de càncer més freqüent entre les dones (28,99%). Les dades de mortalitat s'obtenen a partir de les dades publicades per l'Institut Nacional d'Estadística (INE) sobre la mortalitat a Espanya, segons les quals, durant el 2020, el càncer de mama va comportar la mort de 6.614 dones, representant el 14,6% de la mortalitat associada al càncer en dones. La prevalença del càncer de mama a 5 anys l'any 2020 va arribar a les 144.233 persones a Espanya, remarcant l'impacte social d'aquesta malaltia (3).

Malgrat el progressiu increment dels diagnòstics de càncer, i en concret, de càncer de mama; la mortalitat per càncer a Espanya s'ha vist reduïda de forma important en les últimes dècades (2). Aquesta disminució ha estat possible gràcies a les campanyes preventives, el desenvolupament de programes de diagnòstic precoç, la millora en el maneig quirúrgic, i l'administració de tractaments adjuvants oncològics. En aquesta mateixa direcció, la taxa de mortalitat per càncer de mama l'any 1991 superava els 16/100.000, mentre que el 2012 va ser inferior a les 12/100.000 (2).

Tot i que s'han descrit múltiples factors de risc relacionats amb el càncer de mama, en la majoria de les pacients diagnosticades no s'identifica una causa evident o coneguda. L'edat té un impacte tant en la incidència com en la mortalitat, amb un augment proporcional en la incidència, que es tradueix en un increment de 8-9% anual en les dones premenopàusiques i en un 2-3% anual en dones postmenopàusiques (4). La mediana d'edat de presentació se situa als voltants dels 60 anys mentre que l'edat mediana de mortalitat pel càncer de mama és al voltant dels 68 anys; amb algunes petites diferències segons els països o grups ètnics.

Diferents factors reproductius i hormonals han estat descrits com a factors de risc de càncer de mama. Per exemple, les hormones femenines d'origen ovàric com els estrògens i la progesterona provoquen el desenvolupament i proliferació de les glàndules mamàries. Per tant, una menarquia precoç amb la consegüent estimulació de forma més primerenca d'hormones endògenes s'ha associat a un increment de risc de càncer de mama (5). En conseqüència a l'estimulació hormonal, els antecedents obstètrics també tindran un impacte en el risc de desenvolupar càncer de mama. El primer embaràs s'associa a canvis permanents en l'epiteli glandular i en les propietats biològiques de les cèl·lules mamàries, provocant una major diferenciació durant l'embaràs; a més d'un cicle cel·lular allargat amb major temps a la fase G1, que permet

una major reparació de l'ADN. Aquests canvis a nivell local, provocaran que després d'un primer embaràs, les dones presentin un teixit mamari menys susceptible a carcinògens, d'acord amb la major diferenciació de la glàndula mamària (6).

En relació a mutacions hereditàries de risc, s'ha de destacar que menys d'un 10% dels diagnòstics es poden atribuir a una mutació germinal (7); de fet, la majoria de les pacients diagnosticades no tenen un antecedent familiar de primer grau. Les mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* (*BReast CAncer gene 1 o 2*), d'herència autosòmica dominant, s'associen a un increment significatiu del risc de desenvolupar càncer de mama del 57% i 40% respectivament fins als 70 anys, així com de càncer ovari (40% i 18%, respectivament) (8). Altres mutacions germinals a gens com *TP53*, *PTEN* o *CHEK2*, també s'han relacionat amb un major risc de càncer de mama, però són de menys prevalença i amb una menor penetrància (9, 10). Malgrat això, un antecedent familiar de primer grau, tot i no relacionar-se a una família portadora d'una mutació germinal, s'ha associat a un major risc de patir càncer de mama (11).

Altres factors de risc medio-ambientals són l'obesitat en pacients postmenopàusiques, el consum d'alcohol, la densitat mamària o l'exposició prèvia a radiacions ionitzants com la radioteràpia en zones pròximes a les glàndules mamàries o supervivents de catàstrofes radioactives (12-15).

Si parlem de la forma de presentació de la malaltia, més del 90% de les pacients són diagnosticades en estadis localitzats, on només es veu afectada la glàndula mamària o part dels ganglis limfàtics regionals. Els tractaments en malaltia localitzada són amb finalitat curativa i inclouen, a part de la cirurgia, tractaments complementaris per evitar les recidives locals o a distància, com la radioteràpia i la quimioteràpia, els tractaments hormonals, biològics o més recentment la immunoteràpia. Actualment, és necessari l'estadificació de la malaltia en funció del sistema d'estadiatge TNM (16) segons (i) grandària del tumor (T), (ii) afectació ganglionar (N) i (iii) presència o no de malaltia metastàtica (M).

A nivell histològic, la majoria (75-80%) dels càncers de mama, són carcinomes ductals, anomenats així perquè s'originen a les cèl·lules de l'epiteli dels ductes de la mama. Aproximadament, fins a un 15-20% són carcinomes lobel·lars, iniciats en els acins glandulars i amb pèrdua de la proteïna d'adhesió cel·lular cadherina-E i la conseqüent pèrdua de cohesió cel·lular. Altres variants histològiques menys freqüents són: carcinomes tubulars, mucinosos, micropapil·lars, apocrins, medul·lars, metaplàsics o cèl·lules en anell de segell. Per a la valoració diagnòstica patològica segons la guia de la World Health Organization (WHO), s'inclou també l'expressió dels receptors hormonals (RH) com el receptor d'estrogen (RE) i el receptor de progesterona (RP), a més de l'expressió del receptor de creixement epidèrmic humà tipus 2 (HER2) i l'índex

de proliferació Ki67. L'estudi d'aquests marcadors permet la classificació clinicopatològica del càncer de mama en: (i) malaltia hormonosensible amb HER2 negatiu, (ii) malaltia HER2 positiva que pot ser hormonosensible o no i (iii) malaltia triple negativa. Aquests subgrups no només donen informació pronòstica de la malaltia, sinó també un valor predictiu de la resposta a tractaments dirigits com poden ser els tractaments amb hormonoteràpia (HT) o anti-HER2. Alhora, aquests marcadors immunohistoquímics permeten una classificació subrogada dels subtipus intrínsecs caracteritzats des del treball de *Charles Perou* a partir de les diferències d'expressió gènica entre clústers (17) (Taula 1). Les decisions de tractaments adjuvants en càncer de mama RH+/HER2- localitzat també es prenen en base a riscos de recaigudes segons diferents tests d'expressió genètica com per exemple Oncotype[®], el MammaPrint[®] o Prosigna[®], analitzant també aquest últim el subtipus intrínsec per PAM50[®] (Luminal A, Luminal B, HER2-Enriched i Basal-Like).

Taula 1. Classificacions del càncer de mama.

Subtipus intrínsec	Definició clinicopatològica	Tractaments en estadi precoç	
		Neoadjuvants/adjuvants	No RCp
Luminal A	Luminal A-like RE positiu HER2 negatiu Ki 67 baix* PR alt** Signatura molecular de baix risc	HT ICDK4/6 si alt risc Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***	Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***
Luminal B	Luminal B-like (HER2 negatiu) RE positiu HER2 negatiu Ki67 alt* o RP baix** Signatura molecular d'alt risc	Quimioteràpia seguida de HT en la majoria dels casos. ICDK4/6+HT si alt risc Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***	Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***
	Luminal B-like (HER2 positiu) RE positiu HER2 positiu	Quimioteràpia + tractaments anti-HER2 a més de HT posterior	TDM1
HER2-Enriched (HER2-E)	HER-2 positiu RE i RP negatiu HER2 positiu	Quimioteràpia + tractaments anti-HER2.	TDM1
Basal-Like	Triple negatiu <i>RE i RP negatiu</i> <i>HER2 negatiu</i>	Quimioteràpia +/- anti-PD-1 Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***	Capecitabina Olaparib en gBRCA1/2 mutades i alt risc***

Els valors de Ki67 s'ha d'avaluar segons cada laboratori local, en general, un laboratori amb una mediana de 20%, un 30% es consideraria clarament alt, i <10% clarament baix. **Es considera RP baix quan l'expressió és menor a 20%(18). RCp: Resposta completa patològica; RE: Receptor estrogen; RP: Receptor progesterona; HT: Hormonoteràpia. TDM1: Trastuzumab-emtansina. *gBRCA1/2 mutades: pacients amb mutacions germinals de BRCA1 o BRAC2; Alt risc: a) pacients amb cirurgia d'entrada si afectació ganglionar ($\geq pN1$), o pN0 amb tumor major a 2 cm ($\geq pT2$) si tumor triple negatiu; si afectació patològica de ≥ 4 ganglis si RH positius i HER2 negatiu;*

b) després de quimioteràpia adjuvant, si malaltia residual a la mama i/o a l'aixella en cas de tumor triple negatiu; si malaltia residual a la mama i/o a l'aixella i CPS&EG score \geq 3 si RH positiu i HER2 negatiu

Per altra banda, els subtipus HER2 positius o triple negatius s'associen a elevades taxes de resposta completa patològica (RCp) després del tractament neoadjuvant amb quimioteràpia en combinació o no amb teràpia biològica o immunoteràpia (entre 30-60% segons estudis), fet que s'ha relacionat com a factor pronòstic favorable (19). Per això, sobretot en casos de malaltia localment avançada o subtipus amb bona resposta al tractament amb quimioteràpia, es recomana l'inici de tractament neoadjuvant previ a la cirurgia. Altrament, la neoadjuvència permet també avaluar la resposta biològica i oferir diferents tractaments adjuvants post-cirurgia en casos de tumors resistents i/o que s'associen a major risc de recaiguda. Alguns exemples serien l'ús de capecitabina en el subtipus triple negatiu, o olaparib en pacients portadores de mutacions germinals a BRCA1/2 o el trastuzumab-emptensina (TDM1) després d'un tractament neoadjuvant anti-HER2 (20-22). Tot plegat ens permet dissenyar el tractament òptim per cada pacient, subgrup i segons presentació de la malaltia localitzada i resposta als tractaments administrats.

No obstant això, malgrat la disminució progressiva de les recaigudes de les pacients tractades de forma radical gràcies a la millora dels tractaments quirúrgics i sistèmics en la malaltia localitzada, al voltant d'un 20-30% de les pacients presentaran una recaiguda a distància al llarg del temps (23). Desafortunadament, tot i que els tractaments actuals presenten menys toxicitat i major benefici en supervivència, el càncer de mama metastàtic (CMM) segueix sent una malaltia incurable.

En els següents apartats es profunditzarà en el focus del treball: la malaltia metastàtica amb expressió de RH i HER2 negatiu que reben tractament amb inhibidors de quinases dependents de ciclins 4 i 6 (iCDK4/6), aprofundint en el paper del sistema immune en el tractament, la resposta i l'evolució.

1.2 CANCER DE MAMA METASTÀSIC

Malgrat els avenços en el coneixement i tractament, el càncer de mama metastàtic (CMM) és encara una malaltia incurable. El tractament estàndard es basa en l'administració seqüencial de diferents tractaments sistèmics amb intenció pal·liativa, per allargar la supervivència i millorar la qualitat de vida. En casos concrets, tractaments locals com radioteràpia o cirurgies amb intenció de pal·liar complicacions o símptomes poden estar indicades segons l'estat de la malaltia. Per tant, el tractament en pacients amb afectació metastàtica segueix sent multidisciplinari.

En la presa de decisió de la seqüència de tractament, caldrà tenir en compte les comorbiditats i prioritats de la pacient entre les opcions terapèutiques disponibles segons la biologia del tumor. En general, l'edat no es considera un factor limitant per si sol, però en població d'edat avançada, sí que serà necessari una valoració geriàtrica completa per prendre les decisions de tractament (24). De forma paral·lela, els tractaments pal·liatius de suport dels símptomes no onco-específics, també han de formar part de l'esquema de tractament de forma precoç. En aquests casos, la valoració d'un equip de cures pal·liatives aportarà un millor control dels símptomes, una major qualitat de vida per la pacient i un major compliment del tractament oncològic. En els casos que l'estat general de la pacient ho permeti, es recomana considerar la participació en assajos clínics pel benefici de la pacient i la millora continuada de les teràpies.

Pel que fa al pronòstic, així com la malaltia localitzada té una probabilitat de supervivència del 85-90% als 5 anys en el nostre entorn, el CMM, malauradament té un pronòstic dolent, amb una supervivència als 5 anys del 35-45% (25). Tanmateix, aquestes dades són heterogènies en funció de les característiques del pacient, del tumor i de la forma de presentació de la malaltia avançada. Les recaigudes a distància després d'un tractament radical d'una malaltia localitzada tenen, en general, un comportament més agressiu que la malaltia diagnosticada metastàtica de debut o *de novo*. En les últimes dècades, el CMM *de novo* ha vist una millora en pronòstic (la supervivència als 5 anys al 1990 era del 28% i actualment és del 55%), fet que no s'ha vist plasmat en el CMM per recaigudes a distància després d'un tractament radical (26). Per altra banda, en els últims anys s'ha observat un increment de recaigudes a nivell del sistema nerviós central (SNC) i hepàtic, i una disminució en recaigudes òssies. Es creu que les millores del tractament en la malaltia localitzada podrien haver suposat un canvi sobre la biologia del tumor en el moment de la recaiguda, la forma de presentació de les metàstasis en les recaigudes i conseqüentment en el CMM posterior, amb una selecció a nivell molecular de clons cel·lulars més resistents i agressius.

Pel diagnòstic de CMM, es recomana si és possible la realització de biòpsia de les lesions metastàtiques per confirmar la histologia (expressió de RE, RP i HER2) i la biologia de la recaiguda. A nivell general, s'utilitzaran tractaments basats amb hormonoteràpia o anti-HER2 en casos d'expressió de RE/RP o HER2 respectivament, o l'ús de quimioteràpia amb o sense inhibidor del punt de control immunològic (ICIs de l'anglès *immune checkpoint inhibitors*) segons l'expressió de marcadors immunològics com PD-1 (en anglès "*programmed cell death protein 1*") en el cas de CMM triple negatiu. Seguidament, es detallarà l'abordatge de la malaltia metastàtica dels tumors RH+/HER2-, que és l'objecte principal d'estudi de la present tesi doctoral (27, 28).

1.2.1 Càncer de Mama Metastàtic RH+/HER2-.

El càncer de mama RH+/HER2- és heterogeni, amb nivells variables d'expressió dels nivells de RE, RP, diferències en el grau histològic, patrons d'expressió gènica diversos i mutacions genòmiques variades. Tradicionalment s'ha considerat la positivitat per RE amb una expressió superior a l'1%, recomanant l'ús de HT a la pràctica clínica per sobre d'aquest llindar, malgrat que els resultats d'eficàcia són molt discrets en els casos amb baixos nivells d'expressió. Recentment, però, s'ha desenvolupat el concepte de baixa expressió de RE (conegut en anglès com a *ER-low*) en casos d'expressió entre 1 i 10%, on s'ha vist un comportament més semblant a tumors RH-, tant per pronòstic com per resposta a tractaments (29, 30).

La seqüenciació genòmica i els perfils basats en patrons d'expressió d'ARN dels gens rellevants en la patogenicitat i pronòstic, han corroborat l'heterogeneïtat del càncer de mama RH+. Aquests subtipus intrínsecs identificats per PAM50 han permès categoritzar la malaltia metastàtica també amb diferents pronòstics i resposta als tractaments hormonals (31).

La malaltia avançada RH+/HER2-, malgrat la seva heterogeneïtat biològica, s'associa a determinades formes de presentació clínica. Així, l'afectació metastàtica més comuna en aquest tipus de malaltia, és principalment a nivell ossi, però també pot afectar la medulla òssia, els nòduls limfàtics, la pleura, els pulmons, el fetge o tenir una afectació subcutània. Les metàstasis a nivell de sistema nerviós central són menys freqüents.

La base del tractament del CMM RH+/HER2- és la teràpia endocrina, excepte en els casos de crisi visceral, on un tractament de ràpida resposta com la quimioteràpia podria està indicat. El tractament consisteix en l'administració de diferents HT de forma seqüencial, amb o sense combinació de tractaments biològics. Malgrat els bons resultats inicials d'aquestes opcions, amb el temps es desenvolupen resistències als tractaments hormonals, i les pacients posteriorment són tractades amb seqüències de quimioteràpies citotòxiques pal·liatives. Per norma general, el tractament s'administra

de forma continuada fins a la progressió de la malaltia o al desenvolupament de toxicitat no assumible. Actualment, des de l'aprovació dels inhibidors de CDK4/6 (iCDK4/6) el 2017 a Espanya, el tractament estàndard en primera línia és la combinació d'un tractament hormonal juntament amb un dels tres iCDK4/6 aprovats: ribociclib, palbociclib o abemaciclib. En apartats posteriors es mencionaran els diferents estudis, mecanismes d'acció i resistències als iCDK4/6.

1.2.1.1 Opcions de tractaments hormonals.

La HT té una llarga trajectòria en el tractament del càncer de mama RH+, i ha suposat una eina terapèutica associada a una important eficàcia amb un baix perfil de toxicitat, mantenint la qualitat de vida de les pacients, especialment en comparació al tractament amb quimioteràpia. A la pràctica clínica, la utilització del tractament hormonal té com a objectiu aconseguir la deprivació estrogènica, és a dir, disminuir o bloquejar completament els nivells d'estrògens en el cos per aconseguir la regressió o el control del creixement del tumor. Existeixen diferents estratègies per assolir aquesta deprivació estrogènica:

- *Fàrmacs que s'uneixen de forma específica als RE.* Per exemple, els moduladors selectius dels RE (SERM). El més conegut és el tamoxifè, el qual provoca un canvi estructural sobre el receptor i conseqüentment, l'expressió dels gens que depenen d'aquest receptor queda bloquejada o alterada. Un altre exemple serien els degradadors selectius dels RE (SERDs) com el fulvestrant, un antagonista competitiu dels RE, el mecanisme d'acció del qual està relacionat també amb la regulació a la baixa dels nivells de proteïna dels RE. A més, hi ha diversos nous SERDs en desenvolupament i en assajos clínics.
- *Fàrmacs que provoquen la supressió de la síntesi d'estrògens.* Els inhibidors d'aromatasa (IA), inhibeixen l'aromatasa, l'enzim del teixit adipós que sintetitza els andrògens en estrògens, principal via d'obtenció d'estrògens en les dones postmenopàusiques. Es divideixen en els no-esteroïdals, amb inhibició reversible de l'enzim, com el letrozol i l'anastrozol o els inhibidors esteroïdals irreversibles com l'exemestà. Els agonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH) o de l'hormona luteïnitzant (LHRH), inhibeixen la síntesi d'estrògens a nivell ovàric en dones premenopàusiques, essent els més utilitzats a la pràctica clínica l'acetat de leuprolida, la goserelina o la triptorelina. Els medicaments agonistes imiten a la GnRH, però de forma inactiva, i interfereixen en els senyals estimuladors de la producció d'estrògens als ovaris, provocant-ne una reducció d'aquests.

Fins a l'aparició dels iCDK4/6, el tractament en primera línia de les pacients amb CMM RH+/HER2-, era la HT en monoteràpia, amb indicació diferent segons el perfil hormonal de la pacient i el moment de la recaiguda i la valoració de la sensibilitat a tractaments hormonals previs (Figura 1).

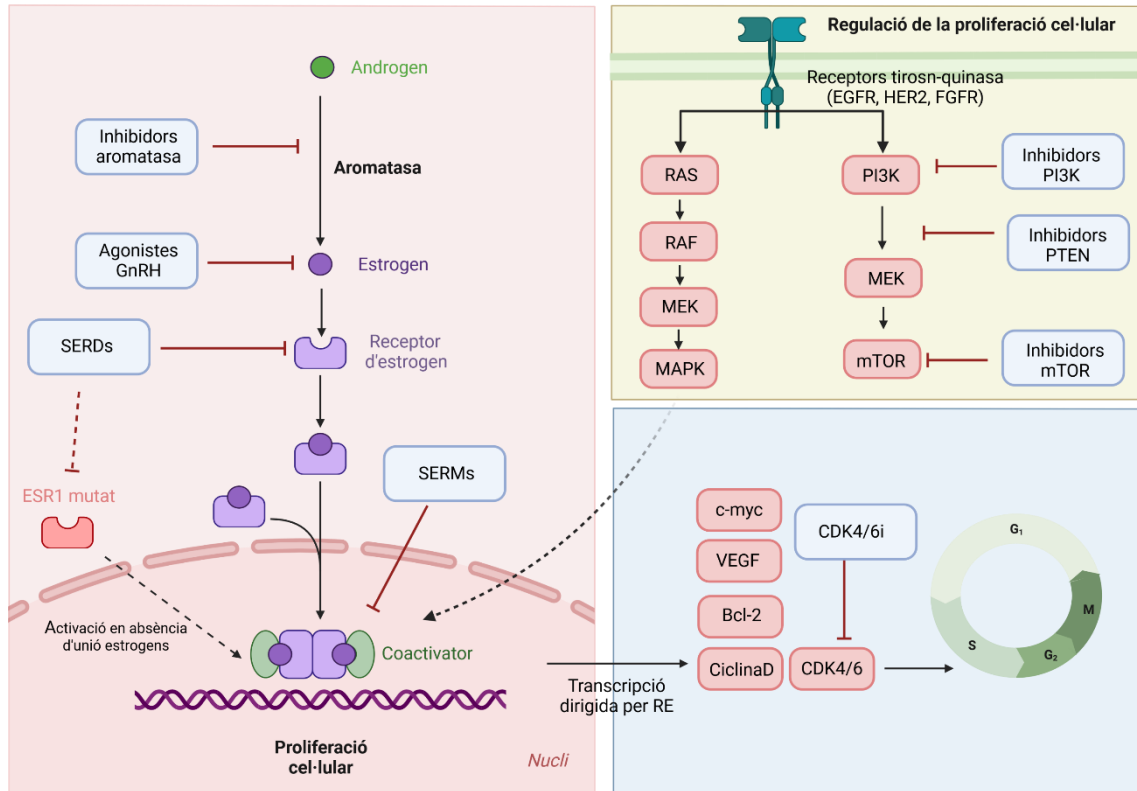


Figura 1. Esquema de mecanisme d'acció i resistència del RE i tractaments diana. La producció d'estrògens i la senyalització del receptor d'estrògens (RE) són motors de la tumorigènesi, creixement i proliferació del càncer de mama. Diferents tractaments dirigits en combinació amb teràpia endocrina inhibeixen aquest mecanisme oncogènic. Mutacions del gen ER, ESR1, o canvis epigenètics en c-myc, ciclina D i el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) s'associen a resistència el tractament endocrí. La sobreexpressió, amplifacació o mutació de AKT, del receptor del factor de creixement del fibroblast (FGFR), o del receptor del factor humà de creixement epidèrmic (HER2). *GnRH: Hormona alliberadora de gonadotropina, IGF-1R: Receptor de creixement similar a la insulina 1, mTOR: diana mamífera de la rapamicina. PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa. Figura adaptada de la revisió de Burstein 2020 (32).

1.2.1.2 Mecanismes de Resistència a tractaments hormonals.

Per tal d'arribar a un consens clínic en el disseny de diferents estudis, la societat oncològica europea (ESMO) van establir uns criteris, per definir el concepte de malaltia sensible o resistent al tractament hormonal, i si aquesta resistència era primària o secundària (27). Així, es considera que existeix una resistència primària endocrina en aquells casos que les pacients recauen en els primers dos anys en curs d'hormonoteràpia adjuvant, o els primers 6 mesos des de l'inici de la primera línia de tractament hormonal en CMM. La resistència secundària es defineix com les recaigudes

en curs d'hormonoteràpia adjuvant després dels 2 primers anys, en els primers 12 mesos després de completar el tractament hormonal adjuvant, o la progressió posterior a 6 mesos d'un tractament hormonal per CMM (27). La resta de casos es classifiquen com a sensibles a la HT.

Tot i el benefici inicial, la majoria de pacients de CMM, acaben progressant al tractament hormonal. Així doncs, s'han descrit múltiples mecanismes de resistència que hem agrupat en quatre grups: i) Alteracions en RE per pèrdua d'expressió o mutacions, ii) alteracions de la via de PI3K/AKT, iii) alteracions del cicle cel·lular i iv) alteracions en altres vies de senyalització cel·lular (Figura 1).

- Alteracions en RE. Els RE són proteïnes localitzades al nucli, les quals a l'unir-se a hormones esteroides regulen la transcripció de diferents gens responsables de la regulació del cicle cel·lular, la replicació de l'ADN, la diferenciació cel·lular, l'apoptosi i l'angiogènesi (33). S'han descrit dues classes de RE: el RE α codificat pel gen *ESR1* i el RE β , codificat pel gen *ESR2*.

En algunes pacients la resistència endocrina adquirida (34) s'explica per la pèrdua d'expressió de RE, fet que subratlla la importància de realitzar biòpsies en la malaltia metastàtica o en progressions a malalties de llarga evolució (34).

Més freqüents són les mutacions de *ESR1*, en concret en regions que codifiquen pel domini d'unió al lligand, provocant un guany de funció del RE amb activació constitutiva en absència d'estrògens i l'alteració de la transcripció de factors derivats de RE (35). Les mutacions a *ESR1* s'han associat a un menor benefici als tractaments amb IA, sense afectar l'eficàcia d'altres tractaments HT com són els SERDs (36). Aquestes mutacions a *ESR1* són rares en tumors sense tractament, però més freqüents (15-30%) en pacients que han estat principalment tractats amb IA per CMM(37).

Per revertir alguns d'aquests casos de resistència hormonal, s'han desenvolupat nous fàrmacs amb diferents mecanismes d'acció com són: (i) els antagonistes covalents selectius del RE (SERCAs), els quals inactiven tant RE mutats com no mutats actuant sobre aminoàcids conservats, provocant canvis estructurals, o (ii) quimeres dirigides a la proteòlisi (PROTACs) que s'uneixen al RE i recluten la ubiquitina E3, provocant una ràpida i completa degradació del RE.

- Alteracions de la via PI3K/AKT/mTOR: Aquesta via es relaciona amb proliferació, diferenciació cel·lular i supervivència, i es troba freqüentment sobreactivada en tumors RE+/HER2-, fet que implica la resistència a les teràpies hormonals (38, 39). A més, alteracions genòmiques a la via de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) poden arribar a ser presents fins a un 30% dels casos de CMM RE+/HER2- (40, 41). La rellevància en CMM de les mutacions *PIK3CA* (gen que regula la proteïna PI3K), ha

fet que en els últims anys hagin guanyat pes les línies d'investigació d'aquesta via i el desenvolupament de fàrmacs que la bloquegin. Inicialment, la toxicitat va limitar-ne l'ús a la pràctica clínica, però recentment ja es disposa d'un inhibidor de PI3K α com alpelisib, amb una toxicitat més manejable. L'estudi fase III SOLAR-1, va comparar el tractament amb fulvestrant + alpelisib o placebo, obtenint en la cohort de mutacions en PI3KCA, un benefici de supervivència lliure de progressió (SLP) en el grup tractat amb alpelisib de 11.0 mesos vs. 5.7 mesos ($p < 0.001$) (42).

Altres combinacions de tractament diana i hormonoteràpia que han demostrat benefici dins la mateixa via de PI3K/AKT/mTOR, són els inhibidors de mTOR com l'everolimus. L'estudi fase III BOLERO-2, va avaluar la combinació de everolimus + exemestà, observant una millora significativa en la mediana de SLP en comparació amb placebo + exemestà (7,8m vs. 3,2m) en pacients que havien progressat a IA no esteroïdals com l'anastrozol o el letrozol (43).

- Desregulacions del cicle cel·lular. Alteracions en la regulació del cicle cel·lular s'han relacionat tant amb el desenvolupament de càncer de mama com en la resistència a teràpies endocrines. La sobreexpressió de la ciclina D1, codificada pel gen *CCND1*, és un fenomen freqüent en CMM RE+/HER2-, que en algunes sèries s'estima en el 20-40% (44). S'ha descrit la relació de la sobreexpressió de ciclina D1 amb recaigudes precoces, associant-se a un pronòstic advers (45) i a resistència a HT com el tamoxifè (46). També la inactivació per mutacions de la proteïna del retinoblastoma (pRb), i la pèrdua de reguladors negatius del complex de la ciclina D amb CDK4/6, com p16, s'han associat a resistència endocrina en el càncer de mama (47). Altres proteïnes relacionades amb el control del cicle cel·lular, com la ciclina E, també s'han relacionat amb un pitjor pronòstic i resistència hormonal (48). Les alteracions del cicle cel·lular, s'abordaran de manera específica dins l'apartat de cicle cel·lular, així com les possibilitats de tractament amb l'aparició dels iCDK4/6.
- Activació d'altres vies intracel·lulars. Altres alteracions menys freqüents es relacionen amb l'activació de RE per encreuament amb altres vies de senyalització intracel·lular, fet que provoca l'activació per fosforilació d'altres co-receptors de RE, amb una conseqüent activació independent del lligand i resistència a la HT. Alguns exemples serien alteracions del factor de creixement de fibroblasts (FGFR), els receptors HER2, o alteracions en la via de RAS (49). Diferents tractaments dirigits contra alteracions de cada via, com inhibidors de FGFR, inhibidors tirosina quinasa de HER2 o inhibidors de MEK/ERK per inhibir l'activació de la via RAS han anat sorgint com a hipòtesis per revertir la resistència hormonal (Figura 1).

Tot i les múltiples causes de resistència al tractament hormonal, actualment, l'estàndard de tractament en totes les pacients amb CMM RH+/HER- és la combinació d'hormonoteràpia amb els iCDK4/6, pel benefici en supervivència lliure de progressió (SLP), supervivència global (SG) i bon perfil de seguretat. Les característiques més rellevants dels iCDK4/6 es discutiran en el capítol següent, ja que el seu ús representa l'eix principal d'aquesta tesi doctoral.

1.2.2 Els iCDK4/6 i el cicle cel·lular.

Clàssicament, s'ha descrit el cicle cel·lular de les cèl·lules dels mamífers en 4 fases: G1, S, G2 i M. La progressió d'una fase a una altra, està controlada per punts de controls (o *checkpoints*), estretament regulats mitjançant processos de fosforilació dirigits per les diferents quinases dependents de ciclins (CDK) (50). En les cèl·lules humanes, s'han descrit més de 20 CDK diferents: CDK1 a CDK6 controlen la progressió del cicle cel·lular, mentre que CDK7 a CDK12 estan implicades principalment en la regulació de la transcripció gènica. L'activitat de les CDKs depèn de la unió d'una subunitat reguladora, les ciclins, que són una família de proteïnes diverses, algunes d'elles relacionades amb el cicle cel·lular com les ciclins A, B, D i E. La majoria de les ciclins no tenen activitat enzimàtica pròpia, però formen els complexos actius amb diferents CDKs, sent imprescindibles per la seva activitat i funció de promoure la progressió del cicle cel·lular. Així, l'entrada del cicle cel·lular està controlada per CDK4 i CDK6 amb la unió d'una de les 3 ciclins D descrites, ciclina D1, D2 i D3 codificades pels respectius gens *CCDN1*, *CCDN2* i *CCND3*. Un cop activat el complex CDK4/6-ciclinaD, aquest fosforila la proteïna del retinoblastoma (pRb). Conseqüentment, pRb allibera el factor de transcripció E2F que inicia la transcripció de gens necessaris per entrar a la fase S del cicle (51), tals com els que codifiquen per les diferents ciclins E, *CCNE1* i *CCNE2*, responsables de l'avanç cap a la següent fase del cicle cel·lular juntament amb CDK2. La progressió durant la fase S és controlada pel complex CDK2-ciclinaE/A. Posteriorment, la transició de fase G2 a fase M està guiada per la parella CDK1-ciclinsA/B. Durant aquest procés, també hi ha molècules inhibidores de les CDKs (CDKi) que s'uneixen de forma específica a les diferents CDKs i permeten inhibir i controlar el cicle cel·lular. Un exemple, serien la família de les proteïnes INK4 (p15, p16, p18 i p19) que s'uneixen i inhibeixen concretament la funció de CDK4/6 o la família de les proteïnes Cip/Kip (p21, p27 p57) que controlen la funció de CDK2 (52) (Figura 2).

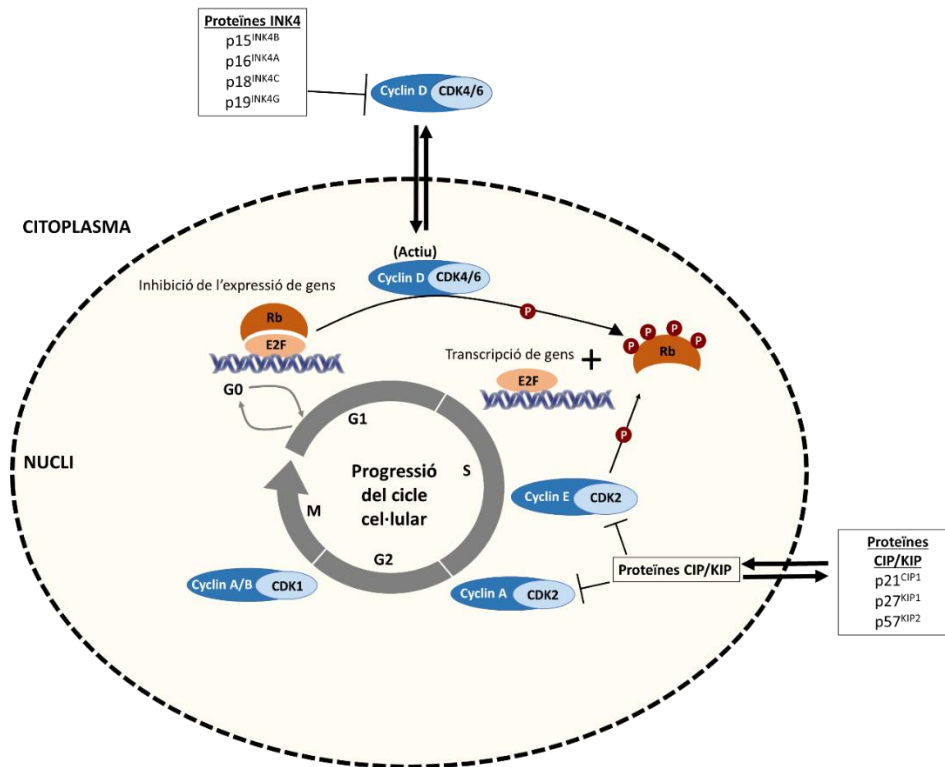


Figura 2. Representació esquemàtica de la regulació de les quinases dependent de ciclins durant el cicle cel·lular. La progressió a través de les diferents fases del cicle cel·lular involucra la successiva formació, activació i inactivació de les CDKs amb les consegüents unions i fosforilacions de cada CDK. L'entrada al cicle cel·lular, està controlada per la ciclina D amb unió a CDK4 i CDK6, que fosforilen la proteïna del retinoblastoma (pRb) i allibera el factor de transcripció E2F, que conseqüentment transcriu els gens necessaris per a l'entrada a la fase S del cicle. La progressió de la fase S està controlada pel complex CDK2-ciclinaE/ciclinaA. La unió d'inhibidors CDKs inactiva tant CDK4/6 com CDK2 (família INK4 i família Cip/kip respectivament). Finalment, la transició entre la fase G2 i la fase M està controlada per la ciclina A i B en combinació amb la CDK1; imatge adaptada de Gutiérrez-Chamorro et al. (52).

D'altra banda, s'han descrit altres funcions de les CDKs com a factors de transcripció. Per exemple, la unió de CDK7 amb la ciclina H forma el factor de transcripció humà II (TFIIH), CDK8 és un component del complex mediador que és un coactivador transcripcional o el complex CDK9-ciclinaT forma part del factor d'elongació transcripcional (pTEFb) (53, 54). No és estrany, doncs, que tota la maquinària de regulació del cicle cel·lular controlada a través de CDKs hagi despertat interès en les últimes dècades per generar nous fàrmacs contra el càncer.

Els primers inhibidors de CDK que es van avaluar a la clínica eren inhibidors genèrics inespecífics de múltiples CDKs. Alguns exemples són flavopiridol, que inhibeix CDK1,2,4,6,7 i 9 o roscovitine que inhibeix CDK1,2,5,7 i 9. La gran limitació d'aquests inhibidors de primera generació en la pràctica clínica fou el perfil de seguretat i la toxicitat demostrada en els estudis clínics. Els inhibidors de CDKs de segona generació, com per exemple dinaciclib, amb inhibició més específica per CDK1,2,4 i 9 van obtenir millors

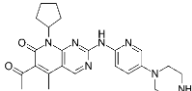
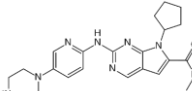
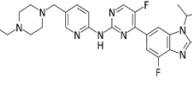
resultats en seguretat, però sense assolir eficàcia en estudis en fase II en càncer de pulmó (55). Finalment, durant l'última dècada es va aconseguir la formulació d'inhibidors més específics per CDKs, en concret els iCDK4/6 que van obtenir un bon perfil de seguretat amb molt bons resultats d'eficàcia en càncer de mama.

1.2.2.1 iCDK4/6 i càncer de mama

En el càncer de mama RH+/HER2-, un elevat percentatge de casos presenta sobreexpressió de la ciclina D1, fet que comporta una desregulació del complex ciclina-CDK4/6. Per tant, la inhibició d'aquesta via a través d'iCDK4/6, suposa una opció interessant de tractament (56). En aquest sentit, en models animals, es va observar que el complex CDK4-ciclina D1 era necessari per induir el càncer de mama, suggerint que la inhibició de CDK4 permetria controlar la proliferació de les cèl·lules malignes (57). Actualment, tres iCDK4/6 han demostrat eficàcia en càncer de mama i estant aprovats per al seu ús en humans: palbociclib, abemaciclib i ribociclib. El mecanisme d'acció de palbociclib, ribociclib i abemaciclib ha estat àmpliament descrit des de la seva aprovació per la FDA i la EMA. Com la majoria dels inhibidors de CDKs, són fàrmacs ATP-competitius que inhibeixen CDK4 o CDK6 unint-se a la fissura d'ATP d'aquestes molècules. El seu efecte antitumoral l'aconsegueixen bloquejant la fosforilació de pRb i arrestant la cèl·lula a la fase G1 del cicle cel·lular, impedit així el creixement tumoral (58). Tot i això, evidències recents demostren que la seva eficàcia recau també parcialment en la modulació del sistema immune, punt que es tractarà més endavant, a l'últim apartat de la introducció.

Tot i compartir el principal mecanisme d'acció, els tres fàrmacs aprovats presenten certes peculiaritats que els diferencien. En primer lloc, palbociclib té una potència inhibidora similar sobre els complexos CDK4/D1 i CDK6/D2 (59), en canvi ribociclib i abemaciclib tenen una major especificitat sobre CDK4. A més a més, abemaciclib presenta activitat inhibidora, tot i que modesta, sobre altres CDKs com són els complexos formats per CDK9/T1, CDK2/E2 i CDK5/p25 (60). Tot i ser fàrmacs selectius per la inhibició de CDK4/6, algunes de les seves característiques farmacocinètiques i farmacodinàmiques expliquen les diferències existents entre els perfils de toxicitat, posologia i dosificació corresponents. (Taula 2)

Taula 2. Principals característiques i diferències dels iCDK4/6 aprovats per al tractament del càncer de mama metastàtic.

Fàrmac	Estructura	IC50	Posologia	Toxicitat
Palbociclib Ibrance™		CDK4:9-11nM CDK6:15nM CDK9: NR	Oral 125mg/dia, 21 dies en tractament + 7 de descans	Neutropènia (80%) Anèmia (24%) Plaquetopènia (16%) Pneumonitis (1%)
Ribociclib Kisqalis™		CDK4: 10 nM CDK6: 39 nM CDK9: NR	Oral 600mg/dia 21 dies en tractament + 7 de descans	Neutropènia(70%) Anèmia (18%) Plaquetopènia (29%) Transaminitis (30%)
Abemaciclib Verzenio™		CDK4: 2 nM CDK6: 9,9 nM CDK9: 57 nM	Oral 150mg/12h dosis continua	Neutropènia (30%) Anèmia (20%) Plaquetopènia (10%) Diarrea (80%) Alteració funció renal (25%)

*IC50: Concentració en la qual la substància exerceix la meitat del seu màxim efecte inhibitori; nM: Nanomolar; mg: mil·ligrams; h: hores.

1.2.2.2 Benefici en els principals estudis clínics

Tot i les diferències esmentades prèviament, els tres iCDK4/6 van demostrar un bon perfil de seguretat, a més d'una gran eficàcia en CMM RH+/HER2- en combinació amb HT, tal com es va veure en els principals estudis que van avalar-ne l'aprovació, els quals es detallen a continuació.

El primer inhibidor aprovat va ser el palbociclib el 2015 per la FDA a els Estats Units. El palbociclib s'administra per via oral a dosis de 125mg/dia en un sol comprimit, amb possibilitat de reducció de dosis a 100mg o 75mg, segons la toxicitat. Els cicles són de 4 setmanes, repartits en 3 setmanes d'administració del fàrmac i una setmana de descans. El palbociclib ha estat avaluat en primera línia metastàtica en diferents estudis, el primer dels quals va ser l'estudi PALOMA-1, un estudi clínic fase II on les pacients s'aleatoritzaven a rebre palbociclib en combinació amb tractament hormonal amb letrozol vs. letrozol en monoteràpia. Els resultats van demostrar un increment estadísticament significatiu en SLP, arribant als 20,2 mesos en el grup on es va administrar palbociclib en combinació davant els 10,2 mesos en el grup de letrozol en monoteràpia (p=0.004) (61). Més endavant, en l'estudi clínic fase III, PALOMA-2, es va avaluar la combinació de palbociclib+letrozol vs. letrozol+placebo en pacients postmenopàusiques, observant una diferència de gairebé 10 mesos en SLP (24,8 mesos en el grup de palbociclib vs. 14,5 mesos en el grup del placebo, p < 0,001)(62). L'aprovació de palbociclib en pacients que ja havien rebut tractaments hormonals previs, es va fonamentar en les dades de l'estudi PALOMA-3, un estudi fase III on es van incloure pacients pre- i postmenopàusiques que havien progressat com a mínim a un tractament hormonal i un 30% havien rebut també quimioteràpia per malaltia avançada.

Les pacients s'aleatoritzaven a rebre palbociclib+fulvestrant o fulvestrant+placebo. El PALOMA-3 va observar una SLP superior en la branca de palbociclib: 9,5 mesos vs. 4,6 mesos en el grup placebo ($p < 0,001$)(63). Malgrat aquests resultats, només es va observar una diferència en SG significativa en els pacients que tenien sensibilitat a tractaments hormonals previs, amb una SG de 39.7 mesos en el grup de palbociclib+fulvestrant i 29.7 mesos en el grup que va rebre fulvestrant en monoteràpia (64).

El segon iCDK4/6 aprovat, va ser ribociclib, al 2017 per la FDA. Ribociclib també s'administra per via oral en una sola dosi de 600mg/dia, en 3 comprimits de 200mg. Els cicles complets són també de 4 setmanes (3 setmanes d'administració del fàrmac i una setmana de descans), combinat amb hormonoteràpia de forma continuada. En primera línia es va testar la combinació de ribociclib+letrozol vs. letrozol a l'estudi clínic fase III, conegut amb el nom de Monaleesa-2. En aquest estudi es va aconseguir una SLP de 25,3 mesos en la branca de ribociclib+letrozol vs. 16 mesos en la branca de letrozol ($p < 0,001$)(65). A més, va demostrar un increment en la SG a favor de la branca de la combinació de ribociclib+letrozol, arribant a una SG de més de 5 anys (63,9 mesos) vs. els poc més de 4 anys (51,4 mesos) del grup de letrozol en monoteràpia ($p = 0,004$) (66). En primera línia per malalties premenopàusiques, es va dissenyar l'estudi MONALEESA-7, un estudi clínic fase III on s'aleatoritzaven les pacients a rebre ribociclib o placebo en combinació amb tamoxifè o inhibidors d'aromatasa, juntament amb anàlegs de LHRH. La SLP en la branca de la combinació va assolir els 23 mesos vs. els 13 mesos del grup placebo ($p < 0,001$). Les dades de SG del MONALEESA-7 mostraven als 42 mesos un 70,2% de supervivència en el braç de ribociclib vs. un 46% en el braç de placebo ($p = 0,0097$)(67). L'eficàcia de ribociclib en pacients que ja havien rebut tractaments previs, es va avaluar en l'estudi fase III MONALEESA-3, que comparava la combinació de ribociclib+fulvestrant vs. fulvestrant en monoteràpia. La mediana de SLP va ser superior també en el grup que va rebre ribociclib en combinació, 20,5 mesos respecte als 12,8 mesos del grup d'hormonoteràpia en monoteràpia ($p < 0,001$)(68). Les dades de SG també van resultar ser significatives a favor de la branca de ribociclib ($p = 0,0003$) (69).

Finalment, abemaciclib va ser aprovat el 2017 per la FDA. Abemaciclib també s'administra via oral, a una dosi inicial de 125mg/12h, amb possible reduccions a 100mg/12h i 50mg/12h, però a diferència de palbociclib o ribociclib, s'administra de forma continuada sense descans. En primera línia, l'estudi clínic fase III MONARCH-3, el qual comparava el grup d'abemaciclib més IA vs. placebo més IA, va obtenir uns resultats de SLP estadísticament superiors en el grup d'abemaciclib (28,2 mesos vs. 14,8 mesos; $p < 0,0001$)(70). L'anàlisi ínterim de SG del MONARCH-3, demostrà un benefici en la branca d'abemaciclib, amb una SG de 67,1 mesos vs. els 54,5 mesos del

grup placebo, encara no significatiu amb el seguiment actual (71). En situació de resistència hormonal, l'estudi clínic fase III MONARCH-2, es va dissenyar amb pacients tant post- com premenopàusiques que havien progressat a tractaments hormonals previs, les quals s'aleatoritzaven a rebre abemaciclib o placebo en combinació amb fulvestrant. Es va obtenir un a SLP de 16,4 mesos en el grup de la combinació respecte a 9,3 mesos en el grup de placebo ($p < 0,001$) i un benefici significatiu en SG de 9,4 mesos a favor de la branca amb abemaciclib ($p = 0,01$), que arribava als 46,7 mesos en comparació amb 37,3 mesos en el grup placebo+fulvestrant (72, 73).

Per tant, els diferents iCDK4/6 han demostrat beneficis en SLP molt semblants en primera i segona línia, amb una bona tolerabilitat, mantenint la qualitat de vida de les pacients i allargant el temps fins que les pacients reben quimioteràpia (Taula 3). Ara bé, s'han vist algunes diferències pel que fa a la supervivència global, on el ribociclib és el que ha presentat resultats estadísticament significatius en primera línia. Malauradament, no s'han pogut obtenir dades de SG significatives en l'estudi en primera línia amb palbociclib, un estudi més antic amb menys experiència amb aquests tipus de fàrmacs. La diferència en SG es podria explicar pel major nombre de pacients incloses a l'estudi amb recaigudes precoces respecte als altres dos estudis en primera línia, o pel nombre important de pèrdues de seguiment en aquest estudi. De fet, en un estudi *post hoc* que exclouïa les pacients sense dades de supervivència, observava una SG de 51,6 mesos pel grup amb palbociclib contra 44,6 mesos del grup de placebo (74). A més, les pacients que tenien un SLP superior a 12 mesos en l'estudi, aconseguien una SG de 66 mesos a la branca de palbociclib(74). En el cas d'abemaciclib, les dades de SG del MONARCH-3 no són prou madures al moment actual, però sí que s'ha provat la millora en SG d'abemaciclib en estudis amb línies posteriors, com el MONARCH-2 (75).

Tot i els múltiples estudis preclínic i clínic realitzats amb els tres iCDK4/6 aprovats, no es disposa d'evidència sobre la comparació directa de l'eficàcia entre ells, i les diferències observades en SG només s'expliquen a través d'hipòtesis, tals com (i) diferències en l'afinitat a substrat o farmacocinètiques, (ii) diferències en afinitat per inhibició de les CDK4/6, (iii) altres dianes fora de les CDKs, (iv) diferències de pronòstic en les poblacions representades a cada estudi o (v) diferències en el disseny de cada estudi (com de criteris de reducció de dosi o de retirada de medicació, entre altres).

En general, però, a la pràctica clínic, la decisió de quin és el iCDK4/6 indicat per a cada pacient és complexa, i s'han de tenir en compte diferents factors, com són: les característiques i preferències del pacient, la forma de presentació de la malaltia metastàtica, el perfil de toxicitat característica de cada iCDK4/6 i les interaccions amb fàrmacs habituals de la pacient.

Taula 3. Principals estudis amb els iCDK4/6 aprovats a Espanya.

Estudi (n)	Fase	Branques (n)	Característiques Pacients	SLP	SG	Ref
PALOMA-1 (n=165)	Fase II aleatoritzat	Palbociclib + letrozol (n=84) Placebo + letrozol (n=81)	Postmenopàusiques Tractament sistèmic previ (50,9%) Afectació visceral el 44,24%	20,2 m vs. 10,2 m HR, 0,488; (CI 95%: 0.319–0,748; p= 0.0004)	37,5 m vs. 34,5 m HR:0,89 (95% CI 0,62-1,29; p= 0,28)	(61)
PALOMA-2 (n=666)	Fase III	Palbociclib + letrozol (n=444) Placebo + letrozol (n=222)	Postmenopàusiques No tractament sistèmic previ Afectació visceral 52% Recaigudes < 12 mesos: 22%	24,8m vs. 14,5m HR : 0,580 (p < .001)	53,9 m vs. 51m HR:0,95 (CI 95% : 0,77–1,17)	(74)
PALOMA-3 (n=521)	Fase III	Palbociclib – fulvestrant (n=347) Placebo – Fulvestrant (n=147)	Post+Premenopàusiques (7%) Progressió a HT en CMM. Afectació visceral el 60%. Recaiguda hormono-resistent el 21%	9,5 m vs. 4,6 m HR: 0,46 (CI 95% 0,36–0,59, p<0,001)	34,9 m vs. 28,0 m HR:0,81 (CI 95%, 0,64-1,03; p=0,09)	(64)
MONALEESA-2 (n=668)	Fase III	Ribociclib + letrozol (n= 334) Placebo + letrozol (n=334)	Postmenopàusiques No tractament sistèmic previ Recaigudes < 12m: 4,0% Afectació visceral 59%	25,3 m vs. 16 m HR: 0,568 (CI 95% 0,457–0,704; p< 0,001)	63,9 m vs. 51,4 m HR:0,76 (CI 95%, 0,63-0,93; p=0,008).	(66)
MONALEESA-3 (n=726)	Fase III	Ribociclib + fulvestrant (n= 484) Placebo + fulvestrant (n= 242)	Postmenopàusiques No tractament sistèmic el 50%, i màxim 1 línia HT. Recaiguda hormono-resistent 4.3% Afectació visceral el 60%	20,5 m vs. 12,8 m HR: 0,593 (CI 95%, 0,480 to 0,732; p < .001)	SG als 42 m: 57,8% vs. 45,9% HR:0,72 (CI 95%: 0,57-0,92; p=0.005)	(76)
MONALEESA-7 (n=672)	Fase III	Ribociclib + goserelina + HT (n=335) Placebo + goserelina + HT (n=337)	Premenopàusiques No tractament hormonal sistèmic previ (14% QT previ) Afectació hepàtica el 51% Resistència hormonal primària 30%	23 m vs. 13 m HR: 0,55 (CI 95%: 0,44-0,69; p < 0,001)	SG a 42 m 70,2% vs. 46% HR:0,71 (CI 95%: 0,54-0,95; p = 0,009)	(77)
MONARCH-2 (n=669)	Fase III	Abemaciclib + fulvestrant (n=446) Placebo + fulvestrant (n=223)	Premenopàusiques el 17,0% Resistència hormonal primària: 25,2% Afectació visceral 55.8%	16,4 m vs. 9,3 m HR: 0,553 (CI 95%, 0,449 to 0,681; p < 0,001)	46,7 m vs. 37,3 m HR:0,75(CI 95%, 0,60-0,94; p = 0,01).	(78)
MONARCH-3 (n=493)	Fase III	Abemaciclib + IA (n=328) Placebo + IA (n=165)	Postmenopàusiques CMM de novo el 40% Afectació visceral 53% No resistència primària endocrina.	28,2 m vs. 14,8 m HR: 0,525 (CI 95%, 0,415–0,665).	67,1 m vs. 54,5 m HR:0.75 (CI 95%, 0,58-0,97; p=0.03).	(71)

*n: número pacients, SLP: supervivència lliure de progressió; SG: supervivència global; Ref: referència; m: mesos; HR: hazard ratio; CI95%: interval de confiança del 95%; CMM: càncer de mama metastàtic, QT: quimioteràpia; HT: hormonoteràpia; IA: inhibidor d'aromatasa.

1.2.2.3 Estudis comparatius amb quimioteràpia

Diferents estudis han comparat el tractament amb iCDK4/6 en combinació amb hormonoteràpia respecte al tractament amb quimioteràpia. L'estudi clínic fase II, Young-PEARL (o KCSG-BR15-10), aleatoritzava les dones premenopàusiques que havien progressat a tamoxifè, a rebre palbociclib+exemestà i leuprolida o tractament amb quimioteràpia que consistia en l'administració de l'antimetabòlit capecitabina. La SLP del grup de palbociclib va ser significativament superior comparat amb el grup de capecitabina (20,1 mesos vs. 14,4 mesos). A més, el grup de palbociclib va presentar menys efectes adversos greus comparat amb el grup de capecitabina (2% vs. 17%)(79). L'estudi PEARL també va comparar palbociclib amb hormonoteràpia respecte a capecitabina en CMM RH+/HER2- en pacients que havien progressat a IA. Es va incloure una cohort tractada amb palbociclib+exemestà, i una segona cohort tractada amb palbociclib+fulvestrant que incloïa pacients amb mutacions de *ESR1* o resistència a IA, a més del grup que rebia capecitabina. En aquest cas, la segona cohort corresponent al grup de palbociclib+fulvestrant no va obtenir una millora en SLP, 7,5 mesos contra 10,0 mesos del grup de capecitabina. De manera similar, en pacients sense mutació de *ESR1* tampoc es va observar benefici en el grup amb palbociclib, on es va obtenir un SLP de 8,0 mesos en el grup de palbociclib i HT i 10,6 mesos en el grup de capecitabina. Tot i això, palbociclib sí que va demostrar un millor perfil de seguretat amb una significativa millora qualitat de vida en comparació amb capecitabina (80).

Així doncs, l'estudi Young-PEARL va demostrar una diferència que no es va poder confirmar en l'estudi PEARL. Aquesta diferència pot ser conseqüència de les característiques de la població inclosa en cadascun dels estudis. En l'estudi Young-PEARL permetia la inclusió de pacients que havien rebut entre 0 i 2 línies de tractament pel CMM, però majoritàriament no havien rebut cap línia prèvia (51,1%) o només 1 línia (33,7%). A més a més, el 49,4% de les pacients només tenien 1 òrgan afectat per malaltia metastàtica. Per contra, en l'estudi PEARL, un 32,1% de les pacients incloses rebien el tractament d'estudi en tercera línia o superior i el percentatge de pacients amb només 1 òrgan afectat era significativament inferior, de només el 28,3%, mentre que una part important (33,4%) tenien 3 o més òrgans metastàtics. Aquesta informació permet fer hipòtesis prou fermes sobre la situació on el benefici del tractament amb iCDK4/6 amb HT és més òptim; el qual seria en etapes més precoces de la malaltia, i quan s'han rebut menys tractaments previs, escenaris en els quals segurament l'heterogeneïtat és menor.

1.2.2.4 Mecanismes de sensibilitat i de resistència a iCDK4/6: identificació de biomarcadors de resposta

Tot i que el benefici clínic dels iCDK4/6 és evident en múltiples estudis clínics, un percentatge de pacients no responen al tractament, i pràcticament totes les pacients acabaran presentant resistències adquirides a causa de diferents mecanismes, ja sigui relacionats amb el cicle cel·lular, amb l'activitat oncogènica d'altres vies de senyalització de la proliferació, canvis metabòlics de les cèl·lules tumorals, o canvis en la funció de l'estroma, entre altres.

Tot i això, ara com ara no es disposa d'un biomarcador efectiu i eficaç capaç de predir la resposta clínic als iCDK4/6 (Figura 3). A continuació descriurem els principals mecanismes de resistència descrits a la literatura.

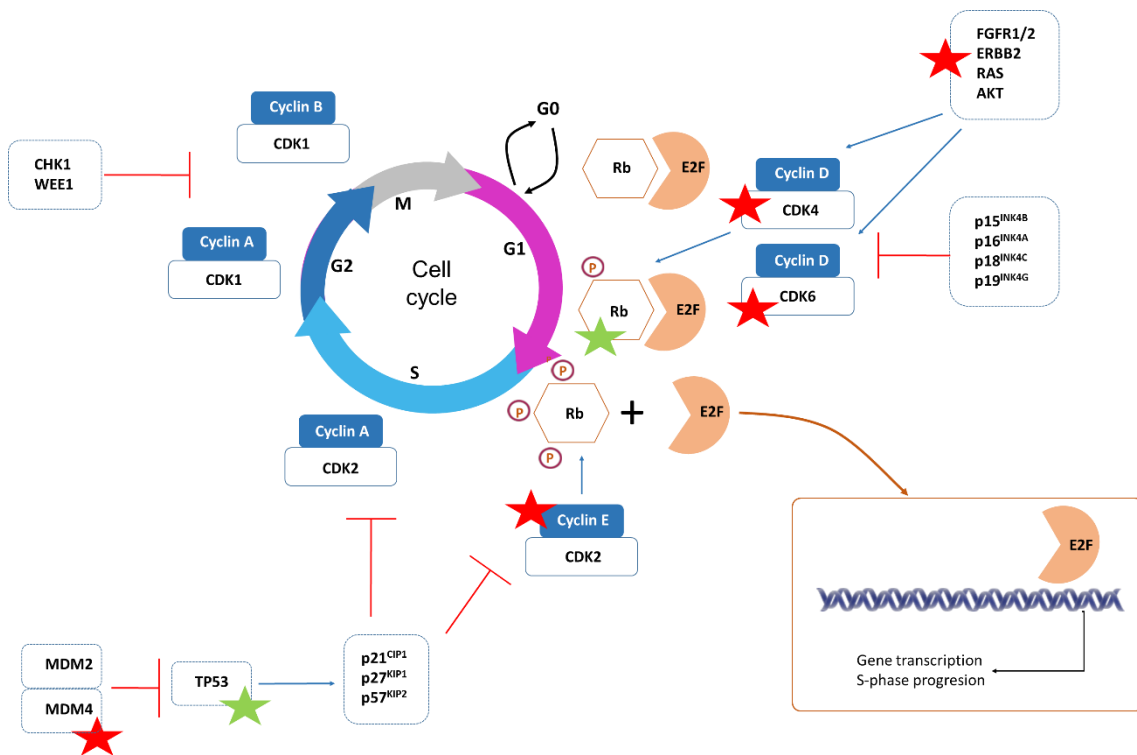


Figura 3. Mecanismes de resistència als iCDK4/6. CDK4 i CDK6 són activats per Ciclina D; aquesta activació condueix a la fosforilació de Rb1 i la inactivació de l'efecte supressor sobre el factor transcriptor E2F. A la figura, es mostren els principals mecanismes genètics de resistència als iCDK4/6: L'estrella vermella (★) representa les mutacions activadores, amplificacions o sobre-expressió. L'estrella verda (★) representen mutacions o supressions inactivadores. Figura adaptada de Álvarez-Fernández et al. 2020. (81).

Marcadors clinicopatològics

Diferents estudis han buscat biomarcadors per predir quins pacients es beneficiaran més o menys del tractament amb iCDK4/6. Un estudi combinant les poblacions incloses a MONARCH-2 i 3 va analitzar si existien paràmetres clínics o patològics que poguessin ser factors predictius del benefici d'abemaciclib (82). Els resultats van mostrar que factors clínics com localització metastàtica exclusivament òssia, un bon estat general segons l'escala ECOG; factors patològics com un baix grau de diferenciació histològica a la biòpsia tumoral, i alta expressió del RP s'associaven a una major SLP. Per contra, l'afectació hepàtica, un RP negatiu i un alt grau histològic tumoral s'associaven a mal pronòstic a les dues branques de tractament. Tot i això, en les pacients de pitjor pronòstic, el tractament hormonal en combinació amb abemaciclib també ofería de forma significativa un benefici en l'eficàcia en comparació amb el tractament hormonal en monoteràpia (82). Així doncs, ara mateix no hi ha cap paràmetre clinicopatològic que pugui predir el benefici als iCDK4/6.

Pèrdua de funció de pRb

Tenint en compte la importància de pRb en el mecanisme d'acció dels iCDK4/6, no és d'estranyar que també s'hagi postulat com un possible biomarcador. En aquest sentit, alguns estudis han demostrat l'existència de mutacions de pèrdua de funció al gen *RB1* com a mecanisme de resistència adquirida a iCDK4/6 (83). En l'anàlisi de l'ADN tumoral circulant en el marc de l'estudi PALOMA-3, es va observar l'aparició de mutacions a *RB1* en un 5% dels pacients en la mostra de progressió, únicament en el grup de pacients que rebia palbociclib, considerant-se, per tant, un mecanisme de resistència específic als iCDK4/6 (84). Altres estudis han demostrat que la pèrdua de funció de pRB era un factor de resistència tant de *novo* com adquirit als iCDK4/6 (85). Tot i això, alguns anàlisis moleculars d'estudis clínics com el PALOMA 2, no han pogut demostrar l'associació estadística entre alteracions de *RB1* i el benefici a iCDK4/6 (86). Així doncs, de manera general, la informació preclínica i les troballes clíniques, suggereixen un paper important de pRb en la funció dels iCDK4/6.

Alteració d'altres proteïnes del cicle cel·lular

Alteracions en altres proteïnes reguladores del cicle cel·lular també s'han associat a resistències o a sensibilitat a iCDK4/6. Així doncs, estudis preclínics han suggerit que la sobreexpressió de CDK6 pot comportar una resistència a iCDK4/6, la qual pot estar directament relacionada amb la persistència de l'activitat de CDK6 o per altres funcions no ben caracteritzades de CDK6 (87). Relacionat amb aquesta hiperactivitat de CDK6 s'han descrit que mutacions o pèrdues del gen supressor de tumor *FAT1* (*FAT atypical*

cadherina 1) que incrementen l'expressió de CDK6 i així provoquen la resistència a iCDK4/6 (88).

Una hipòtesi alternativa contempla l'amplificació del gen *CCND1* com a marcador de major dependència de la via de CDK4/6 i una major sensibilitat a iCDK4/6. Tot i això, l'anàlisi de la informació dels estudis PALOMA-1 i 2, no va mostrar cap correlació entre els nivells de *CCND1* i la resposta a palbociclib. Tampoc es va trobar correlació entre la resposta a palbociclib i els nivells del gen supressor de tumors *CDKN2A* que codifica p16^{INK4A}, el regulador negatiu de CDK4/6 (89).

Finalment, l'eix CDK2-ciclinaE, també s'ha proposat com a mecanisme de resistència en models *in vitro* (90). Clínicament, l'estudi PALOMA-3 va observar una correlació dels nivells del gen *CCNE1* que codifica per la ciclina E1 amb la resistència a palbociclib, essent el grup d'alta expressió el de pitjor evolució amb un SLP de 7.6 mesos respecte als 14.1 mesos del grup amb nivells baixos de *CCNE1*. Per tant, s'ha hipotetitzat que la reversió de la resistència podria aconseguir-se afegint fàrmacs amb major especificitat per inhibir el complex CDK2-CiclinaE (91).

Activació d'altres vies de proliferació i creixement cel·lular.

Amb l'increment d'anàlisis genòmics en el marc de diferents estudis clínics i la interacció entre diferents vies de senyalització i proliferació cel·lular, s'han descrit multitud de noves dades i hipòtesis, sovint de difícil interpretació. La majoria d'estudis analitzen alteracions genòmiques a nivell de tumor sòlid, però també cada vegada més s'estudia la dinàmica de les mutacions en l'ADN tumoral circulant. L'estudi PALOMA-3 incloïa un anàlisi de l'ADN tumoral circulant previ a l'inici del tractament i també a la progressió; els resultats del qual van mostrar l'adquisició de mutacions a *PIK3CA* o *FGFR2* al moment de la progressió, però aquest fenomen apareixia tant en el grup de palbociclib amb fulvestrant com el de fulvestrant en monoteràpia; concloent, per tant, que no es tractava d'un mecanisme de resistència específica a iCDK4/6 (84). En aquest mateix sentit, un subanàlisi de l'estudi PALOMA-2 avaluava l'expressió d'ARN en biòpsies prèvies al tractament en relació amb la SLP, sense poder identificar cap biomarcador predictiu del benefici del tractament (92). Els resultats, però, sí que observaven un major benefici de la branca amb palbociclib en aquelles pacients que presentaven una baixa expressió de la PD-1 o alts nivells d'expressió de CDK4, factor associat a resistència endocrina. Finalment, en el mateix subanàlisi, observaven que els tumors amb més activació de factors de creixement com l'expressió de *FGFR2* o *ERBB* a nivell de RNA missatger, obtenien un major guany estadístic en SLP en afegir palbociclib a l'hormonoteràpia (92).

Altres sèries on s'explora la resistència adquirida a partir de l'anàlisi de les biòpsies al moment de la progressió, mostren alteracions relacionades amb la híper-activació de les vies de FGFR, RAS, ERBB2, PTEN o AKT1 en tumors resistents a iCDK4/6 (93, 94). Així i tot, la majoria d'estudis s'han realitzat en cohorts petites i força heterogènies que han rebut prèviament tractament amb quimioteràpia adjuvant o neoadjuvant i on és difícil discernir les resistències al tractament hormonal, als iCDK4/6 o a la quimioteràpia, fet que complica extreure'n conclusions consistents.

Algunes mutacions al gen supressor de tumors *TP53*, també s'han associat a resistència a iCDK4/6 en línies cel·lulars i s'ha descrit que entre un 30-50% dels CMM RH+/HER2- amb resistència a iCDK4/6, tenen una mutació a *TP53* o als seus gens reguladors (*MDM2* o *MDM4*) (85).

Així, la incorporació de l'anàlisi de seqüenciació massiva a la investigació clínica ha suposat que actualment s'estiguin testant nous fàrmacs dirigits als gens on s'han identificat mutacions adquirides en alguns estudis. Alguns exemples són inhibidors específics de vies activades en tumors que progressen a iCDK4/6 i hormonoteràpia, com per exemple, els inhibidors de FGFR o els inhibidors de la tirosina quinasa de HER2.

Subtipus intrínsec molecular

La classificació per subtipus intrínsecs de càncer de mama es correlaciona també en la malaltia avançada RH+/HER2- amb diferents presentacions metastàtiques, grups pronòstics, i predicció de resposta a alguns fàrmacs. En el cas dels iCDK4/6, l'avaluació retrospectiva de les mostres dels estudis MONALEESA 2,3 i 7, va observar diferències en el benefici d'aquests fàrmacs en funció dels subtipus avaluats per PAM50. El subtipus basal, el qual representava un 2,6% de les pacients, va ser l'únic que no va obtenir benefici d'afegir ribociclib al tractament hormonal, observant-se una mala resposta tant al tractament hormonal en monoteràpia com amb combinació, i presentant una SLP estimada de 3,71 i 3,58 mesos respectivament (95). En el cas dels altres subtipus, malgrat presentar diferències pronòstiques, tots ells mostraven benefici significatiu amb l'addició de ribociclib al tractament hormonal.

Marcadors immunològics

Estudis recents relacionen el benefici del tractament dels iCDK4/6 amb el sistema immune. Així, treballs *in vitro* han demostrat el possible paper de l'interferó (IFN) en la resistència a iCDK4/6. Estudis preclínics amb línies cel·lulars amb resistència adquirida a endocrinoteràpia i palbociclib, han mostrat una correlació entre l'elevada expressió de la signatura d'interferó i la reducció de la sensibilitat de palbociclib, mitjançant l'anàlisi transcriptòmic de tot el genoma, fet que ha portat a catalogar-la com a signatura de

resistència a palbociclib relacionada amb l'interferó (IRPS) (96). Les línies cel·lulars resistents a palbociclib, a més, presentaven una activació del senyal de IFN/STAT1 comparat amb les línies no resistents o no tractades. Posteriorment, en un estudi neoadjuvant on s'utilitzava un iCDK4/6 i hormonoteràpia, es va percebre un enriquiment de IRPS i d'altres signatures relacionades amb IFN en els tumors intrínsecament resistents a palbociclib, fet que és consistent amb les observacions *in vitro*. Aquest increment de IRPS també s'associava a tumors del subtipus luminal B i es correlacionava amb l'expressió d'altres gens immunes i amb un pitjor pronòstic (97).

1.3 SISTEMA IMMUNOLÒGIC

El sistema immunològic té la funció de reaccionar de forma coordinada a diferents estímuls com poden ser infeccions per patògens, molècules ambientals o també tumors. Aquest sistema es compon de dues branques principals: la immunitat innata i la immunitat adaptativa. La immunitat innata o natural proporciona una protecció immediata contra l'estímul invasor. La immunitat adaptativa (o adquirida), en canvi, es desenvolupa més lentament i forma una defensa més especialitzada i específica contra l'estímul o antigen(98).

La immunitat innata és la primera barrera que respon a estímuls locals a nivell de pell, mucoses, alteracions locals de teixits o al primer contacte al corrent circulatori on reaccionaran fagòcits, cèl·lules limfoides innates i múltiples proteïnes com el sistema del complement. Si l'estímul extern persisteix, la immunitat adaptativa agafarà un paper important. Aquest sistema adaptatiu consisteix principalment en limfòcits amb alta diversitat i múltiples receptors contra diferents antígens i també en anticossos generats per algunes d'aquestes cèl·lules.

Diferents tipus de cèl·lules formen part de la resposta immunitària innata o adaptativa, que seran descrites en les pròximes seccions. A més, les cèl·lules i molècules d'un sistema i de l'altre, interaccionen i es coordinen per a aconseguir reconèixer l'antigen i així desenvolupar els mecanismes i la resposta immunològica adequada per eliminar l'estímul.

Així, la resposta inflamatòria primerenca està, principalment, guiada per la immunitat innata, la qual reconeix els patrons moleculars associats als patògens o a dany cel·lular (PAMPs, o DAMPS, respectivament, per les seves sigles en anglès), els processaran i identificaran com a antígens. Aquests antígens seran presentats per les cèl·lules immunitàries especialitzades que formen part del sistema innat, a les cèl·lules del sistema adaptatiu. La resposta immunitària adaptativa reclutarà cèl·lules efectores per produir anticossos específics contra l'antigen reconegut prèviament i estimular cèl·lules citotòxiques contra el patogen o cèl·lula reconegut/da. La comunicació entre cèl·lules es fa a través d'unes petites proteïnes de baix pes molecular, les citocines, que participen en molts processos com la diferenciació i maduració cel·lular, la inflamació i la resposta immunològica tant local com sistèmica, la reparació de teixits o l'hematopoesi. Hi ha moltes citocines diferents, que actuen sobre receptors específics o sobre multituds de receptors de superfície. La seva funció sobre el sistema immune també és diversa, algunes tenen funcions preferentment proinflamatòries i d'altres amb activitat antiinflamatòria; atraient i promovent subtipus cel·lulars del sistema immune amb funcions dispars. Al llarg del capítol, descriurem diferents citocines i la seva relació amb les principals cèl·lules que actuen en el sistema immune.

1.3.1 Sistema immune i càncer

L'evidència de la relació entre el sistema immunitari i el càncer és extensa; existeixen tanmateix, moltes incògnites sobre com es produeix aquesta interacció en cada tipus de tumor, així com en diferents moments de l'evolució de la malaltia (99, 100). El sistema immunitari té un paper fonamental en el reconeixement i l'eliminació de cèl·lules canceroses. Tanmateix, les cèl·lules tumorals poden desenvolupar també mecanismes per evadir o suprimir la resposta del sistema immunitari, cosa que els hi permet créixer i propagar-se.

Tant els tumors primaris com les metàstasis formen un complex ecosistema on conviuen les cèl·lules neoplàsiques juntament amb la matriu extracel·lular i altres cèl·lules no neoplàsiques com cèl·lules mesenquimals, endotelials i també cèl·lules del sistema immune, aquest conjunt es coneix com el microambient tumoral (TME).

Durant la tumorigènesi, la matriu extracel·lular articula un teixit mal funcionant que produeix una inflamació crònica (101). En diferents estadis de la tumorigènesi, la inflamació associada al càncer contribueix a la inestabilitat genòmica, modificació epigenètica, estimulació de la proliferació cel·lular, millora dels estímuls antiapoptòtics i increment de l'angiogènesi (99). De fet, s'ha descrit que aproximadament en un 25% dels càncers, la inflamació crònica n'és la causa principal, essent-ne un exemple infeccions com el virus del papil·loma humà causant del 90-100% del càncer de cèrvix, o la infecció per *Helicobacter pylori* a nivell estomacal que incrementa significativament el risc de càncer gàstric (102, 103). També, algunes malalties que comporten una desregulació immunològica, com per exemple les malalties inflamatòries intestinals d'origen autoimmune, s'han associat a major risc de càncer colorectal (104).

Així com la inflamació crònica s'ha relacionat amb el desenvolupament del càncer, l'impacte d'una inflamació aguda pot limitar també la progressió tumoral. Un exemple és la utilització d'una forma atenuada de *Mycobacterium bovis* pel tractament del càncer de bufeta (105). Aquest efecte dual de la inflamació també s'ha descrit en pacients, com es el cas dels pacients diagnosticats amb alguna immunodeficiència, els quals tenen major risc de patir càncer (106) o l'ús prolongat d'antiinflamatoris no esteroïdes (AINEs), el qual s'ha relacionat en la reducció de risc de desenvolupar càncer (107).

Sigui o no la inflamació la causa o la conseqüència, el que sí que s'observa en el càncer és l'alteració del TME, i que provoca una resposta immunològica amb presència de cèl·lules de la resposta innata i adaptativa. La presència d'un TME alterat contribueix a la progressió tumoral per selecció dels clons més agressius, induint a la immunosupressió i estimulant la proliferació cel·lular i les metàstasis; a més, aquesta alteració del sistema immunitari també es veurà reflectida a nivell del sistema immunitari perifèric (108, 109). Per tant, diferents elements del sistema immunològic tindran

protagonisme en el desenvolupament i progressió del càncer; en aquest sentit, comprendre millor el seu funcionament i interaccions, podria permetre utilitzar el sistema immunològic de forma més eficaç com a tractament del càncer (Figura 4).

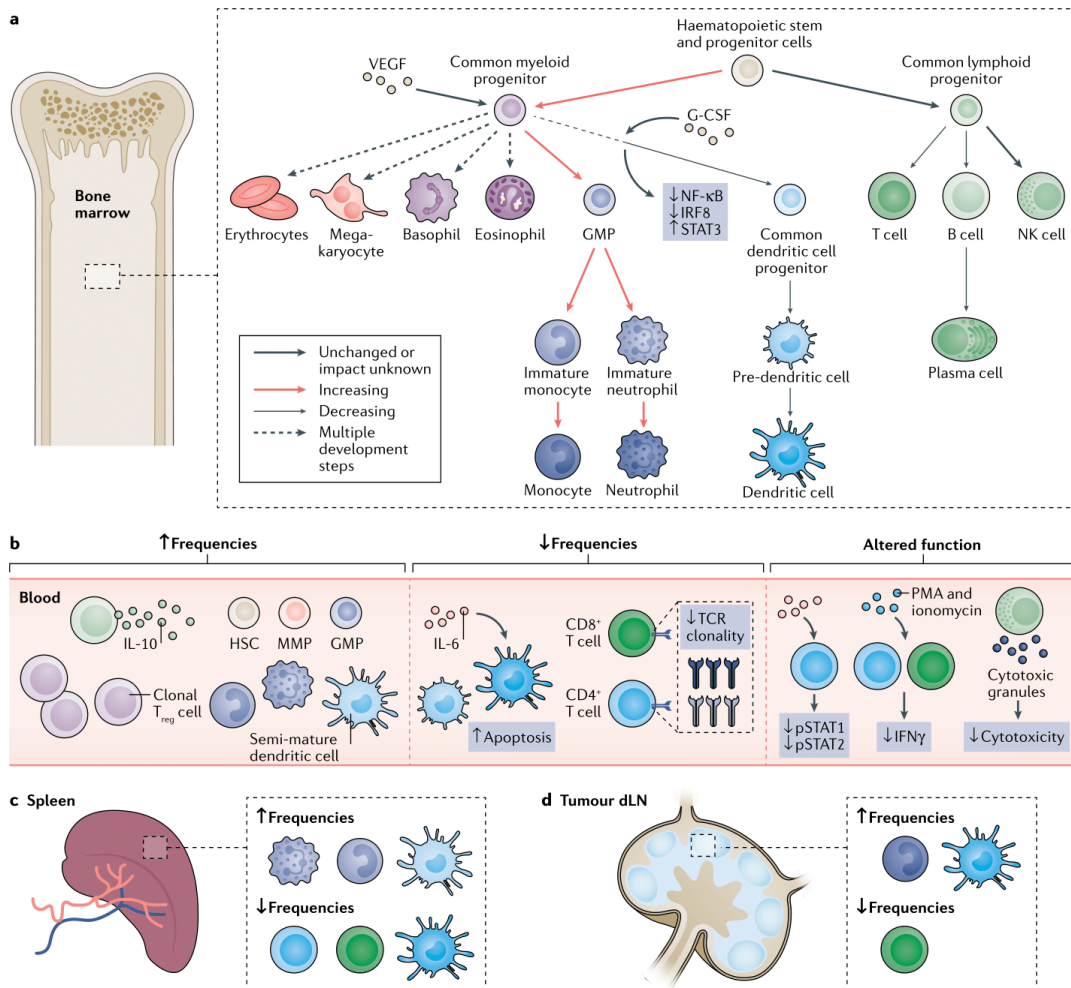


Figura 4. Alteracions i organització del sistema immunològic. El sistema immunològic perifèric es veu pertorbat en la presència d'un càncer. La medulla òssia, la sang, la melsa i els ganglis formen una xarxa immunològica en constant comunicació durant el desenvolupament del càncer. A) L'hematopoesi a la medulla òssia es veu afectada amb increment de cèl·lules *stem cell* i increment d'algunes poblacions immunològiques fet que es veurà amb repercussió a nivell de sang perifèrica (B), amb increment de cèl·lules i factors solubles immunosupressors com IL10 o cèl·lules Treg, i reducció del repertori de la clonalitat de receptors de cèl·lules T (TCR) de cèl·lules amb capacitat d'activació del sistema immunològic com limfòcits CD4+ i CD8. Aquests canvis venen acompanyats de reducció de IL-2 i IFN γ amb la consegüent alteració de la resposta immunològica i la pèrdua de capacitat d'activació de cèl·lules NK. Els canvis de poblacions de sang perifèrica, es poden confirmar a nivell de melsa (C) però també a nivell dels ganglis amb estreta comunicació amb el tumor (D), on s'ha caracteritzat un increment de monòcits i cèl·lules dendrítiques i una reducció de les cèl·lules T citotòxiques CD8+. A escala general, aquestes observacions han demostrat que les interaccions de les cèl·lules tumorals i les cèl·lules a nivell del microambient, provoquen també canvis immunològics sistèmics. Figura original del treball de Hiam-Gàlvez et al. (108).

1.3.1.1 Principals elements del sistema immune i el càncer

Des d'estadis inicials, diferents cèl·lules immunològiques interaccionen amb les cèl·lules canceroses. Per exemple, en estadis inicials les cèl·lules citotòxiques com podrien ser les cèl·lules T natural killers (NK) i les cèl·lules T CD8+ reconeixen i eliminen les cèl·lules neoplàsiques més immunogèniques (110), fet que produeix una proliferació de les menys immunogèniques i més tolerades pel sistema immunològic de l'hoste. Per contra, els tumors amb alta infiltració per cèl·lules T es correlacionen amb un millor pronòstic (111), mentre que els tumors amb infiltració per macròfags es correlacionen amb pitjor pronòstic (112, 113). Així doncs, cada subtipus de cèl·lula immune tindrà una funció diferent segons com interacció amb les cèl·lules tumorals, canviant el pronòstic i, probablement requerint un tractament diferent, optimitzant així la possibilitat d'aconseguir la regressió tumoral. Seguidament, es descriuran les principals facetes de les cèl·lules immunològiques associades al càncer i el seu vincle amb la progressió tumoral.

Macròfags

Els macròfags interaccionen amb cèl·lules tumorals des dels estadis inicials fins al desenvolupament de les metàstasis. Com s'ha dit prèviament, els tumors amb alta infiltració de macròfags associats al tumor (TAMs) es correlacionen amb un pitjor pronòstic i una menor SG en diferents tipus de tumors sòlids (114). Els macròfags es classifiquen en proinflamatoris o M1, que s'activen principalment per lipopolisacàrids i interferó gamma (IFN γ) i antiinflamatoris o M2, activats per citocines com les interleuquines IL4 o IL13 (115). Inicialment, predominen els macròfags M1 que eliminen les cèl·lules canceroses més immunogèniques i a mesura que progressa el tumor, el TME promou la transformació a macròfags M2. A més, els TAMs secreten citocines com IL-10 i TFG- β que indueixen un estat d'immunosupressió, impedit l'activitat de les cèl·lules T efectores i inhibint la maduració de les cèl·lules dendrítiques (116). Els TAMs també estimulen la proliferació de les cèl·lules canceroses, via secreció del factor de creixement epidèrmic (EGF) i l'angiogènesi, a través del factor de creixement epidèrmic vascular (VEGF) (117).

D'altra banda, s'ha descrit que la secreció de CCL2 per part de les cèl·lules cancerígenes, atrau monòcits CCR2+ a localitzacions metastàtiques, fet que promou la sembra de cèl·lules metastàtiques (118). Altres quimosines, com CCL5, també s'han relacionat amb la capacitat d'atreure i reclutar TAMs als nínxols metastàtics (119).

Neutròfils

Els neutròfils són de les primeres cèl·lules reclutades en resposta a dany tissular per intentar eliminar els patògens o cèl·lules danyades i modular la inflamació a través de diferents mecanismes com la fagocitosi, la secreció de proteïnes antibacterianes, el dipòsit de trampes extracel·lulars de neutròfils (NETs) o l'exocitosi de grànuls rics en proteases (120). La presència de NETs al TME, s'ha associat a progressió tumoral metastàtica en pacients amb càncer de còlon després d'una cirurgia radical (121). En càncer de mama, la presència de NETs s'ha detectat en models animals; fins i tot s'ha estudiat que l'eliminació de NETs, mitjançant l'aplicació de partícules dirigides, aconseguia reduir el número de lesions metastàtiques (122).

En general, en pacients amb càncer, els nivells de neutròfils associats a tumors (TANs) s'han associat a pitjor pronòstic en diferents tipus de càncer (123). Semblant a la classificació dels macròfags, s'han descrit neutròfils protumorals i antitumorals (124). Per exemple, s'ha associat la presència d'alta expressió de CD66b+ en TANs amb millor pronòstic, considerant que col·laboren a l'estimulació de la capacitat antitumoral de les cèl·lules T CD8+. A la vegada, també s'ha demostrat que la presència de TANs induïx la immunosupressió de les cèl·lules T, mitjançant l'increment d'expressió de molècules inhibidores de les cèl·lules immunes com PD-L1 (125).

Una població fenotípicament i morfològicament semblant als neutròfils, són les cèl·lules mieloides supressores polimorfonuclears (PMN-MDSCs), que en tumors s'associen a una inflamació crònica i una major tolerància als antígens per part de les cèl·lules T. En models de càncer de mama, s'ha descrit que la producció de G-CSF per part del tumor, induïx la diferenciació i l'activació de les PMN-MDSCs facilitant la progressió tumoral (126). L'interès per entendre les funcions dels neutròfils en totes les seves variants durant l'evolució del càncer ha anat creixent, i existeixen múltiples grups treballant per a la millor caracterització dels TANs. El millor coneixement de la seva funció així com les seves interaccions, i dels condicionants de la seva activitat protumoral o antitumoral, permetrà dissenyar teràpies dirigides modulant els TANs.

Cèl·lules NK (de l'anglès *Natural Killer*)

Les cèl·lules NK formen part de la immunitat innata i tenen una activitat citolítica ràpida i potent contra una cèl·lula infectada o alterada (127). Les cèl·lules NK expressen múltiples receptors a la membrana, tant inhibidors com estimuladors de la seva activitat i que s'utilitzen per a la vigilància immunitària. Alguns receptors inhibidors de les cèl·lules NK tenen com a lligand el complex major d'histocompatibilitat I (MHC-I), fet que iniciarà el programa de mort cel·lular de les cèl·lules tumorals (128). Així, l'activitat antitumoral de les cèl·lules NK, i la seva infiltració en tumors gàstrics o colorectals s'ha correlacionat

amb un millor pronòstic (129). Un cop activades, les cèl·lules NK secreten substàncies citotòxiques com la perforina i granzima, que permeten l'eliminació de cèl·lules tumorals activant vies apoptòtiques a través de la producció de TNF α (de l'anglès “*tumor necrosis factor*”)(130). En aquest sentit, cal destacar que s'ha proposat IL-15, com a interleucina secretada pels tumors que permet el reclutament de cèl·lules NK intratumorals(131). Per tant, les dades assenyalen les cèl·lules NK com a antitumorals, evitant la progressió de les cèl·lules cancerígenes. Comprendre com es regulen i es coordinen la immunitat innata i l'adaptativa, permetrà utilitzar la modulació de les cèl·lules NK com una eina de tractament contra el càncer.

Cèl·lules dendrítiques.

Les cèl·lules dendrítiques actuen com a pont entre la resposta immune innata i l'adaptativa. Són cèl·lules especialitzades a presentar antígens, sobretot a les cèl·lules T via MCH. Es troben a tots els teixits del cos, a excepció del cervell (132). S'ha descrit la presència de cèl·lules dendrítiques infiltrades a nivell tumoral en múltiples tumors i, tot i que la seva activitat és necessària per entendre l'activació de les cèl·lules T, no ha estat un camp gaire estudiat en càncer. Tot i això, sí que s'han dissenyat alguns estudis amb cèl·lules dendrítiques com a vacunes antitumorals per incrementar la resposta immune, però amb resultats limitats (133). En general, es consideren que les cèl·lules dendrítiques tenen un paper important per consolidar la resposta adaptativa immune antitumoral.

Cèl·lules T

Les cèl·lules T formen part del sistema immune adaptatiu i són el segon subtipus més freqüent de cèl·lula immunològica associada a tumors (134). Les cèl·lules T, depenent del context immunològic, adquireixen un fenotip funcional o efector, i la seva activitat tindrà conseqüències antiinflamatòries o proinflamatòries. En estadis inicials de formació tumoral, un tumor immunogènic que produeixi suficients antígens, desencadenarà l'activació i la migració de les cèl·lules T al TME, i es generarà una resposta efectora immune que eliminarà les cèl·lules tumorals. En estadis més avançats, alts nivells d'infiltració de cèl·lules T s'associen a pronòstics favorables en múltiples tipus de càncer (135, 136). Dins el subgrup de cèl·lules T, les cèl·lules T CD8+, són les més freqüentment estudiades amb una funció clarament antitumoral, la qual és activada per cèl·lules presentadores d'antigen, produint la diferenciació de les cèl·lules T en limfòcits T citotòxics. Els limfòcits T citotòxics tenen activitat citolítica antitumoral a través d'exocitosi de grànuls de perforina o granzima (137). En canvi, les cèl·lules T *helper* CD4+, generen una resposta antitumoral per la secreció de citocines proinflamatòries

Th1 (IL2, TNF α i IFN γ) promovent l'activació de cèl·lules T citotòxiques, macròfags antitumorals i cèl·lules NK, a més d'incrementar l'exposició d'antígens tumorals i afavorir la resposta immunitària (138).

En termes generals, es considera que els tumors en estadis precoços molt immunogènics són eliminats efectivament per cèl·lules T i la corresponent resposta immunològica completa; en canvi, els tumors menys immunogènics s'escapen del control del sistema immunològic i proliferen gràcies als mecanismes que generen tolerància àmplia a la resposta immunitària (110). Un dels processos tumorals més importants és aconseguir la tolerància perifèrica mantenint l'equilibri per controlar la resposta immune. Això s'aconsegueix a través de la regulació de la resposta de les cèl·lules T efectores per activació de vies inhibidores sobre limfòcits T citotòxics i cèl·lules T CD4+ activades. Les vies inhibidores més estudiades són aquelles que inclouen la senyalització a través de punts de control immune o checkpoint immunològic (de l'anglès *immune checkpoint*), i en concret les molècules CTLA-4 i PD-1, les quals actuen regulant negativament la cèl·lules T i s'associen a l'evasió del sistema immune per part de les cèl·lules tumorals.

La progressió tumoral i els canvis a TME poden tenir com a conseqüència l'increment del nombre d'antígens que podrien ser reconeguts pel sistema immune. Per evitar-ho, la cèl·lula cancerígena i el TME incrementen el número de senyals inhibitoris i incrementen el reclutament de cèl·lules T CD4+ reguladores (Tregs). Les Tregs són responsables de suprimir l'activació, la capacitat citotòxica d'altres cèl·lules del sistema immune com cèl·lules T CD4 col·laboradores, limfòcits T citotòxics, macròfags, cèl·lules NK o neutròfils (139). Les Tregs suprimeixen la resposta immune a través de diferents mecanismes: (i) per contacte directe, (ii) per increment d'expressió de receptors inhibitoris com PD-L1, LAG3, CD39/73, CLTA4, PD-1 o TIM-3, i (iii) també per mecanismes a distància produint estímuls immunosupressors tals com diferents citocines (IL10, TGF β , prostaglandina E2) i el segrest de molècules inflamatores com IL-2 (140, 141). Les Tregs circulants, que expressen CD4+, CD25+ i FOXP3+, s'han associat a un major risc de desenvolupar metàstasis en pacients amb càncer de mama (142).

La cèl·lula T, com a pilar de la resposta immune adaptativa ha sigut d'interès per desenvolupar noves teràpies contra el càncer. Comprendre millor els mecanismes que utilitzen les cèl·lules tumorals per evadir la resposta permetrà millorar-les, i també identificar els nous antígens que es desenvolupen durant la progressió tumoral.

Cèl·lules B

Després d'activar-se en òrgans limfoides secundaris com la melsa o els ganglis limfàtics, la cèl·lula B expressa anticossos d'alta afinitat i es diferencia en cèl·lules plasmàtiques i en cèl·lules B de memòria, promovent la resposta humoral contra patògens (143). El rol de les cèl·lules B en la progressió tumoral s'ha descrit menys que en el cas de les cèl·lules T. En models animals s'ha descrit la seva activitat protumoral, observant que en absència de cèl·lules B madures, hi ha una disminució de la progressió tumoral(144). Alguns dels mecanismes protumorals descrits en les cèl·lules B, són la segregació de IL-10 o TGF β (145). Canvis al TME, com l'acumulació d'immunoglobulines, l'estimulació de l'angiogènesi i una inflamació crònica per activació de cèl·lules immunosupressores com les cèl·lules mieloides també han estat relacionats amb les cèl·lules B (146).

Així doncs, les diferents cèl·lules del sistema immune constitueixen un entramat de subtipus cel·lulars amb funcions diferents, les quals, estableixen diferents interaccions espacio-temporals entre elles i amb el tumor a nivell del TME. Aquestes interaccions poden desencadenar una activitat tant protumoral com antitumoral, en funció dels estímuls prominents en cada situació. Així doncs, en un escenari ideal, cèl·lules NK amb funció antitumoral secretarien CCL5 en estadis inicials de formació del tumor, promovent el reclutament de cèl·lules dendrítiques al TME i la consegüent activació de limfòcits T antitumorals (147). De manera semblant, l'increment de TNF α i IFN γ al tumor, potencia la diferenciació dels limfòcits T citotòxics i incrementa el número de macròfags fagocitaris que permetran eliminar cèl·lules tumorals (148). Per contra, si el tumor ha aconseguit escapar-se de l'activitat antitumoral immunològica inicial, aquest desenvolupa mecanismes per incrementar la tolerància mitjançant TAMs amb fenotip M2 immunosupressors i cèl·lules Treg (112, 149, 150). En aquest cas, pel que fa al TME, abundaran molècules com IL-10, TGF β , prostaglandines i s'inhibirà la presència de citocines del tipus Th-1 proinflamàtiques (151). Tot això, provocarà una menor activació de cèl·lules NK i dels limfòcits efectors citotòxics, afavorint la progressió tumoral.

A la pràctica clínica, s'han testat diferents estratègies dirigides al bloqueig d'aquests mecanismes immunològics, conegudes com a immunoteràpia.

1.3.2 Càncer de mama i sistema immune

El càncer de mama s'ha considerat com un tumor poc immunogènic, amb baixa presentació de pèptids o antígens, i per tant amb poc benefici de la immunoteràpia. Tanmateix, el major del coneixement dels mecanismes moleculars de la interacció entre el tumor i el sistema immune ha permès començar a testar la immunoteràpia com una nova opció de tractament sola o en combinació amb tractaments ja existents, com la quimioteràpia, els tractaments diana o la radioteràpia. Una peculiaritat del càncer de

mama és la seva l'heterogeneïtat; presentant una discordant i complexa infiltració intratumoral que varia segons el subtipus de càncer de mama, considerant els tumors triples negatius o HER2 amplificats, com els primers candidats a testar aquests tractaments amb immunoteràpia, per la seva major infiltració intratumoral.

Per tant, per tal d'optimitzar el benefici de la immunoteràpia és necessari reconèixer biomarcadors adequats que permetin una correcta selecció de candidates.

1.3.2.1 Biomarcadors predictius de resposta a la immunoteràpia en càncer de mama

A continuació descriurem els principals biomarcadors de resposta a la immunoteràpia estudiats i valorats en el càncer de mama:

- Les proteïnes transmembrana PD-1/PD-L1 ha estat les més utilitzades com a biomarcadors, i és la que compta amb més tractaments dirigits desenvolupats contra aquesta diana, els ICIs sobre PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) o els més selectius que bloquegen el seu lligand PD-L1 (atezolizumab o durvalumab). Els primers estudis en CMM, van testar teràpies anti-PD-1 en pacients amb CMM HER2+ politractades. Un estudi fase Ib que avaluava la combinació de trastuzumab i durvalumab va observar que les pacients sense expressió de PD-L1 no presentaven resposta, probablement per un esgotament de les cèl·lules T (152). Posteriorment, diferents assaigs clínics han validat aquest marcador com a predictor de resposta en diferents tumors i també en particular en el càncer de mama (153). Tot i això, la valoració de l'expressió de PD-L1 s'ha fet de forma desigual en els diferents treballs, utilitzant diferents anticossos, plataformes de detecció i criteris per a definir la positivitat dels tumors. La manca de protocols i tècniques estandarditzades en aquest sentit impedeix a dia d'avui identificar correctament qui es beneficiaria d'un eventual tractament amb immunoteràpia dirigida a l'eix PD-1/PD-L1.
- La càrrega mutacional del tumor o en anglès el "*tumor mutation burden*" (TMB). Aquest marcador s'ha utilitzat en múltiples tumors, i s'ha observat una major resposta al tractament d'immunoteràpia com amb ICIs (154). De tota manera, altres estudis observen una millora en SG quan els tumors amb TMB alt s'acompanyen d'un TME també amb alta càrrega immunològica, però no amb TME poc immunològics (155).
- Altres molècules essencials en la immunitat antitumoral com l'interferó γ (IFN- γ) s'han proposat com a predictives de resposta. Per exemple, la pèrdua del receptor d'IFN- γ disminueix l'efectivitat dels ICIs (156). També s'ha relacionat positivament l'expressió de PD-L1 i la signatura d'IFN γ , associant-se l'expressió

de PD-L1 i HLA tipus I amb la fosforilació de STAT1 (en anglès “signal transducer and activator of transcription 1”), factor rellevant en la via d'IFN- γ (157).

- La infiltració limfocitària tumoral, coneguda com a TILs, és potser el biomarcador de component immunològic de major impacte avui en dia en càncer de mama. En un metaanàlisi amb més de 3.000 pacients amb càncer de mama precoç tractats de forma neoadjuvant, els TILs presentaven un paper pronòstic i predictiu de la resposta a la quimioteràpia en els diferents subgrups, especialment en triple negatiu o HER-2 positiu, però amb majors dubtes en CM RH+ (158). Aprofundint en les diferents classes de TILs, alguns estudis demostren que l'alta expressió de PD-1 o FOXP3, es correlaciona amb mal pronòstic, per contra, alts nivells de limfòcits T citotòxics CD8+ intra-tumorals, prediuen un bon pronòstic (159, 160). Diferents estudis en una població de pacients amb càncer de mama triple negatiu, tractades amb o sense quimioteràpia adjuvant, va mostrar un millor pronòstic de les pacients amb tumors amb alta infiltració de TILs; el que ha portat a la hipòtesi de que alguns subgrups de pacients amb poca càrrega de malaltia i alta infiltració de TILS podrien ser candidates a una desescalada del tractament complementari amb quimioteràpia (161-164).

En conclusió, difícilment existeix un únic biomarcador immunològic el qual sigui el responsable o el factor predictiu majoritari de resposta a la immunoteràpia. Així doncs, és necessària una millor comprensió dels mecanismes immunològics subjacents al desenvolupament tumoral així com la interacció del sistema immunològic amb el càncer i els canvis conseqüència dels diferents tractaments, per tal de poder disposar d'una combinació de factors que permetin seleccionar les pacients de CMM que potencialment es beneficiarien de la immunoteràpia.

1.3.2.2 Principals resultats de l'ús d'immunoteràpia en càncer de mama metastàtic

L'heterogeneïtat del càncer de mama i la seva diferent infiltració immunològica també es veu reflectida en la resposta dispar a la immunoteràpia. El càncer de mama triple negatiu, més immunogènic que els altres subtipus de càncer de mama, i amb una major expressió de PD-L1, és l'únic en el qual existeixen dades d'eficàcia amb els ICIs, fet que ha suposat la seva incorporació a la pràctica clínica en diferents escenaris, com són el tractament neoadjuvant del càncer de mama triple negatiu d'alt risc, i el tractament de la malaltia avançada triple negativa en cas de sobreexpressió de PD-L1. Així, en el context del CMM, s'han publicat dos estudis fase III que demostren el benefici de l'ús de la immunoteràpia en CMM en tumors triple negatiu. L'estudi IMpassion 130 aleatoritzava pacients amb CMM triple negatiu en primera línia de tractament a rebre nab-paclitaxel

amb o sense atezolizumab. En aquest estudi, es va observar un benefici en SLP en les pacients amb tumors amb expressió de PD-L1 superior al 1% (7.5 mesos versus 5.0 mesos; $p < 0.001$) (165). A més, la població amb expressió de PDL1 > 1%, va presentar un increment significatiu de SG, 25.4 mesos en el grup d'atezolizumab comparat el 17.9 en el grup de placebo. El benefici en SG no es va consolidar en les pacients sense expressió de PD-L1 (166). Per contra, l'estudi fase III IMpassion131, on s'aleatoritzava les pacients amb CMM triple negatiu en primera línia a rebre paclitaxel amb o sense atezolizumab no va demostrar benefici en SLP; ni les que expressaven PD-L1 > 1 % ni les PD-L1 negatives. Aquesta disparitat de resultats, ha provocat dubtes sobre la combinació de quimioteràpia amb atezolizumab i la necessitat de seleccionar millor les pacients (167).

Finalment, l'estudi KEYNOTE35 va aleatoritzar les pacients amb CMM en primera línia a rebre quimioteràpia (carboplatí amb gemcitabina o un taxà com paclitaxel o nab-paclitaxel) amb o sense pembrolizumab. Amb una mediana de seguiment de 44 mesos, el grup PD-L1 positiu (definit per CPS ≥ 10) va obtenir un benefici de 7 mesos en SG en comparació el grup sense pembrolizumab (23.0 mesos vs. 16.1 mesos, $p = 0.0185$) (153).

Els estudis fets amb pacients amb tumors amb RH+ i immunoteràpia han presentat resultats molt discrets. En un estudi clínic fase II, a les pacients candidates a rebre capecitabina s'afegia també pembrolizumab independentment de l'estat de PD-L1 o altres biomarcadors. Les taxes de resposta i SLP comparades amb cohorts històriques semblaven no observar benefici amb l'addició de la immunoteràpia, obtenint només un 29% de taxa de benefici clínic (168). Altres estudis semblen indicar un benefici discret, com l'estudi clínic fase II amb eribulina i pembrolizumab en pacients amb CMM RH+ que havien rebut 1-2 línies prèvies de quimioteràpia; observant un benefici clínic del 56.8% però amb una SLP de 6 mesos (169).

Per tant, els resultats obtinguts fins el moment obren noves oportunitats, però limitades a petits subgrups de pacients, com ara alguns dels CM triple negatiu. En el CMM RH+ els beneficis són molt més modestos, fent imprescindible optimitzar estratègies, ja sigui seleccionant millor les pacients candidates, reformulant el tractament amb diferents bloquejos de proteïnes immunològiques, o intentant estimular i canviar la immunogenicitat tumoral per tal d'aconseguir un major taxa de respostes.

1.4 ELS iCDK4/6 COM A POSSIBLE ESTRATÈGIA IMMUNOMODULADOR O IMMUNOTERAPÈUTICA EN CÀNCER DE MAMA.

En els últims anys, existeix una creixent evidència tant preclínica com clínica sobre el fet de que el benefici clínic dels iCDK4/6 no només té relació amb la seva capacitat de bloquejar el cicle cel·lular, sinó també per un efecte sobre el sistema immune. Tant les ciclines com les diferents CDKs són necessàries pel desenvolupament i la funcionalitat de les cèl·lules immunes (170). Tot i així, no totes les poblacions immunes necessiten les mateixes ciclines ni CDKs pel seu desenvolupament, expansió i activació, provocant també una sensibilitat diferent entre la inhibició de les diferents CDKs. A més, les CDK també poden comprometre l'activitat de les cèl·lules immunes a través de vies independents al cicle cel·lular.

1.4.1 Rol biològic de la via ciclines D-CDK4/6 en cèl·lules immunes

La funció de les diferents CDKs amb el sistema immune, s'ha pogut estudiar modulant l'expressió de ciclines o CDKs en models animals. Els models amb doble inhibició de CDK4 i CDK6, presenten letalitat embrionària acompanyada per un defecte fetal de l'hematopoesi, semblant al fenotip presentat per un triple knock-out per les ciclines D1,2 i 3, que inclouen múltiples anormalitats hematopoètiques. Un altre exemple serien els models de ratolins knock-out per CDK6 o ciclina D3 que desenvolupen defectes en la maduració de cèl·lules B, i també presenten alteracions en els compartiments de granulòcits, hipoplàsia de timus i de melsa (171, 172). Per tant, la CDK6 i la interacció amb la ciclina D2 i D3 es considera rellevant pel desenvolupament de les cèl·lules mieloides (173). Així, no és sorprenent que la neutropènia representi l'efecte dosi limitant més destacat tant per palbociclib com ribociclib, necessitant a més una dosi intermitent, amb períodes de descans, per a poder administrar-se a la pràctica clínica (174, 175).

En models animals, també s'ha descrit un paper rellevant de CDK6 i la ciclina D3 en l'hematopoesi de cèl·lules mare ("stem cells" en anglès), per la regulació, proliferació i desenvolupament del llinatge de les cèl·lules T (176, 177). Així doncs, diverses subpoblacions de cèl·lules T tenen una diferent sensibilitat i es veuen afectades de forma variada pels iCDK4/6. En un treball on s'elaborava una anàlisi per citometria de flux de les cèl·lules immunes circulants en models animals, el tractament amb palbociclib o abemaciclib, provocava una reducció de les cèl·lules Treg FOXP3+, que tenen un paper immunosupressor (178). Aquest fet no es veia en altres cèl·lules T, cosa que es pot explicar per la major expressió de ciclina D i CDK4/6 o la presència de Rb1 en aquest subtipus cel·lular. A més, els iCDK4/6 també inhibeixen selectivament l'enzim DNMT1 de les cèl·lules Treg, provocant una disminució selectiva en la seva proliferació i disminuint l'activitat immunosupressora d'aquest subtipus cel·lular (178). Per tant, la

inhibició farmacològica de CDK4/6 produeix alteracions de diferents sub poblacions cel·lulars relacionades amb el sistema immune. Conèixer el mecanisme i els canvis produïts durant el tractament permetria dissenyar millors combinacions o dissenyar noves molècules diana (Figura 5).

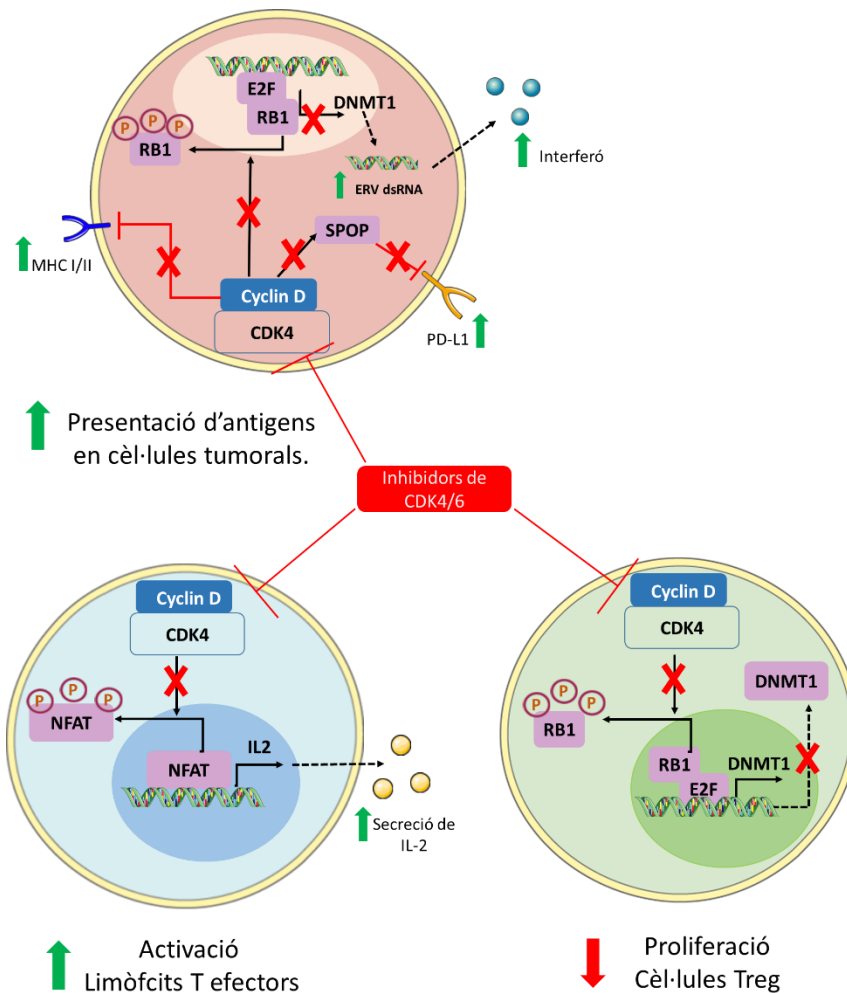


Figura 5. Efectes immunològics dels iCDK4/6 sobre la cèl·lula tumoral, la cèl·lula T efectora i les cèl·lules immunosupressores com les Tregs. Primer, un increment de la presentació d'antigen per la cèl·lula tumoral i conseqüentment, una major expressió de MHC I/II, PD-L1 i secreció d'IFN-III. Segon, s'observa una major activació de les cèl·lules T efectors a través de la regulació de NFAT (factor nuclear de cèl·lules T activades) i la major secreció de IL-2. Finalment, la disminució de la proliferació de les cèl·lules immunosupressores Treg mitjançant la reducció de l'expressió de DNMT1 (ADN metiltransferasa 1). Figura adaptada de la revisió de Petroni et al.(179).

Els canvis produïts al sistema immune pels iCDK4/6 poden provocar també un canvi en l'equilibri del microambient tumoral i en la interacció entre el tumor i l'hoste. Les principals vies proposades com a determinants en els canvis fruit d'aquesta interacció, són (i) la major infiltració intratumoral, (ii) l'increment de la presentació d'antigen, (iii)

canvis en l'expressió de citocines al microambient i (iv) modificacions en les molècules co-inhibitòries com PD-L1 (58, 178, 180, 181).

Major infiltració immune intra-tumoral

Els efectes dels iCDK4/6 sobre la infiltració tumoral s'han estudiat en models animals de càncer de pulmó, on es va observar una disminució de la infiltració tumoral de cèl·lules T reguladores FOXP3+ durant el tractament amb palbociclib. Tot i que el nombre absolut de cèl·lules T CD4+ i CD8+ no es veia modificat, sí que n'incrementava el percentatge per la disminució de les cèl·lules immunosupressores (178).

L'aturada del cicle cel·lular i la inducció d'un estat de senescència subseqüent a la inhibició de CDK4/6 pot comportar també l'activació del fenotip de secreció associat a la senescència de les cèl·lules tumorals conegut com a SASP ("senescence-associated secretory phenotype" en anglès). Aquest estat provoca el reclutament de múltiples cèl·lules de la immunitat innata al microambient tumoral gràcies a l'increment de producció de citocines inflamatòries com IL1, IL6, IL-8 i FAI-1 (181, 182).

Increment de la presentació d'antígens.

Diversos treballs han demostrat *in vitro* l'activitat dels iCDK4/6 com a promotors de la immunitat antitumoral. El tractament amb abemaciclib aconseguia disminuir el volum tumoral i reduir la proliferació cel·lular en models animals (178). Analitzant l'expressió gènica, s'evidenciava una reducció en l'expressió dels gens relacionats amb el cicle cel·lular, la mitosi, i els gens diana de E2F; però també un increment en l'expressió de gens responsables del processament i la presentació d'antígens, inclòs MHC tipus I. A més, els tumors tractats amb iCDK4/6 presentaven una reducció de l'activitat de DNMT1 i conseqüentment una menor metilació dels gens que regulen la funció immune, com també gens retrovirals endògens (178). Això, generava un increment d'expressió de doble-cadena d'ARN, semblant al "mimetisme viral" que estimula la producció de la resposta d'interferó i de la resposta immune. Analitzant el mateix fenomen, però amb les dades del The Cancer Genome Atlas, els càncers de mama amb amplificació de *CCND1*, i una major activitat de CDK4/6, presentaven una menor expressió de MHC tipus I, i molècules com HLA-a, HLA-b i HLA-c comparat amb tumors sense amplificació de *CCND1* (178).

Increment secreció de citocines al microambient tumoral

Els iCDK4/6 s'han identificat com a compostos capaços d'activar cèl·lules T incrementant la secreció de IL2 a través d'un cribratge a gran escala de llibreries de molècules ja conegudes (180). Aprofundint sobre el mecanisme d'activació del sistema

immunològic per part de CDK6, es va observar que CDK6 regulava el factor nuclear d'activació de cèl·lules T (NFAT), una proteïna que té un paper crucial per l'activació i la funcionalitat de les cèl·lules T (180). Així, la inhibició de CDK4/6, provoca un increment dels nivells de NFAT i la posterior expressió de diferents citocines relacionades amb l'activació de les cèl·lules T o quimosines com CXCL9 i CXCL10, dins el grup de les quimosines Th1 que promouen les cèl·lules efectores intra-tumorals. Per contra, citocines com IL6, IL10 o IL23; produïdes per cèl·lules mieloides immunosupressores es veien reduïdes (180, 183).

Efecte sobre l'expressió de PD-L1 i altres molècules co-inhibitòries

La proteïna PD-L1 fluctua durant la progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules malignes, arribant al pic en la fase M i a l'inici de G1, amb una reducció brusca en les altres fases del cicle cel·lular. Aquesta regulació està molt lligada al complex CDK4-ciclinaD, el qual fosforila la proteïna SPOP (en anglès *speckle type BTB/POZ protein*) que és responsable de la degradació de PD-L1 via proteasoma. La inhibició de CDK4/6 incrementa l'expressió de PD-L1, però només en les cèl·lules canceroses amb SPOP competent (184). En un altre treball on s'utilitzaven models animals, el tractament amb iCDK4/6 durant 7 dies, disminuïa l'expressió de PD-1 i CTLA-4 en les cèl·lules T CD4+ i CD8+ infiltrades al tumor (180). Així doncs, encara queden punts per resoldre, com la influència i els canvis d'expressió d'altres molècules co-inhibitòries degut al tractament amb iCDK4/6.

1.4.2 Combinació de iCDK4/6 amb immunoteràpia

Donat els resultats *in vitro* i *in vivo* que demostren canvis immunològics a conseqüència del tractament amb iCDK4/6, diferents estudis van avaluar la combinació de iCDK4/6 amb ICIs que bloquegen PD-1. Un estudi fase Ib, amb dos cohorts de 25 pacients cadascuna, una en pacients amb càncer de pulmó i una altra amb càncer de mama, avaluaven l'administració d'abemaciclib en combinació amb pembrolizumab. Malauradament, els resultats van mostrar un increment de toxicitat superior al descrit per cada fàrmac, amb un 80% de toxicitat grau 3; amb un discret benefici amb una taxa de resposta parcial del 24% en la cohort de pulmó i del 8% en la cohort de CM, i per això els autors conclouïen que el balanç risc benefici no justificava continuar avaluant aquesta combinació (185).

D'altra banda, l'estudi Checkmate 7A8, va avaluar el tractament de malaltes amb càncer de mama hormonosenible HER2- amb palbociclib en combinació amb anastrozol amb o sense un inhibidor de PD-1 com nivolumab. Els resultats de toxicitat, amb un increment de toxicitat hepàtica grau 3 en més del 20% dels pacients, es van considerar com a no

admissibles per a continuar aquest desenvolupament (186). Finalment, un tercer estudi fase I/II va incloure 20 pacients amb CMM amb RH+/HER2-, que van ser tractades amb palbociclib, pembrolizumab i letrozol en primera línia. L'estudi va reportar un increment de la toxicitat grau 3 comparat amb els estudis PALOMA sense immunoteràpia, especialment en forma de neutropènia (83%), trombocitopènia (17%) i alteració del perfil hepàtic (17%). La mediana del SLP de l'estudi es va situar als 25,2 mesos, semblant a l'històric observat al PALOMA-2 (24,8 mesos). Curiosament, però, la combinació amb pembrolizumab incrementava de forma significativa la taxa de respostes completes fins al 31% (187). Actualment, diferents estudis es troben en reclutament amb diferents combinacions d'inhibidors de CDK amb immunoteràpies, i durant els pròxims anys, en conjunt amb una profunda anàlisi biològica i de possibles biomarcadors, se seguirà avançant en el coneixement de com i qui es beneficia de tractaments que actuïn aprofitant la interacció dels inhibidors del cicle cel·lular i la resposta immune.

En resum, múltiples estudis il·lustren la connexió complexa entre el sistema immune i la regulació del cicle cel·lular obrint les portes a la possibilitat d'una nova àrea de combinacions. Malgrat els resultats prometedors *in vitro* i *in vivo* en models animals, els estudis que combinen iCDK4/6 amb anticossos monoclonals anti-PD-1 no han mostrat grans canvis amb eficàcia però sí un increment de toxicitat greu, sobretot a nivell hepàtic. Per aconseguir els resultats esperats, caldrà entendre millor tots els canvis produïts biològicament durant el tractament amb iCDK4/6, juntament amb estudis de recerca translacional que permetin dissenyar noves combinacions òptimes i tolerables.

2. HIPÒTESI

En els últims anys, els iCDK4/6 han revolucionat el tractament del CMM RH+/HER2-, obtenint resultats rellevants en quant al seu benefici tant en SLP com en SG, amb un perfil de tolerabilitat excel·lent. Malgrat tot, un percentatge de pacients no es beneficien del tractament, i amb els mesos o anys la majoria desenvoluparan resistències, tumors més agressius i necessitat de quimioteràpia; fins a un procés irreversible de final de vida. D'altra banda, existeix una necessitat clínica rellevant, sobre quin ha de ser el tractament a la progressió d'aquests fàrmacs.

El principal mecanisme d'acció dels iCDK4/6 és el bloqueig del cicle cel·lular, però existeix una evidència creixent sobre el seu paper immunomodulador; com a possible estimulador de l'activitat immunològica antitumoral. Aquests canvis immunològics podrien explicar, en part, l'eficàcia als iCDK4/6, però també els seus mecanismes de resistència. En conseqüència, comprendre millor la interacció dels iCDK4/6 i el sistema immunològic, és fonamental per poder millorar el tractament d'aquestes pacients; i en última instància, permetria dissenyar possibles combinacions concomitants o seqüencials tant dels pacients amb resistència primària com adquirida. Així doncs, aquest treball parteix de les següents **hipòtesis**:

- L'absència de biomarcadors predictius tant a nivell clínic com molecular fa difícil la predicció de l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6. La identificació de biomarcadors predictius de l'eficàcia permetria seleccionar les pacients que es beneficien dels iCDK4/6, i alhora seleccionar aquells susceptibles d'altres opcions terapèutiques
- Evidències preclíniques suggereixen que els iCDK4/6 exerceixen una funció moduladora del sistema immunitari. Per tant, l'estat immunològic del pacient previ a l'inici del tractament podria determinar-ne l'eficàcia i l'evolució de la malaltia.
- La interacció entre els iCDK4/6 i el sistema immunològic pot ser cabdal pel disseny de noves estratègies terapèutiques encaminades a superar la resistència primària i adquirida als iCDK4/6.

3. OBJECTIUS

Objectiu principal:

- **Definir i caracteritzar biomarcadors immunològics i moleculars en pacients amb CMM RH+/HER2- determinants de l'eficàcia al tractament amb iCDK4/6.**

Objectius secundaris:

- Estudiar les característiques clíniques i moleculars en sang perifèrica per ADN circulant tumoral (ctDNA) de les pacients tractades de manera assistencial amb els diferents iCDK4/6
- Definir dues poblacions d'eficàcia independents de les característiques clíniques i moleculars; que ens permetin identificar quines signatures determinen l'eficàcia dels iCDK4/6
- Descriure biomarcadors a partir de signatures d'expressió gènica presents en biòpsies tumorals.
- Analitzar determinants immunològics de l'eficàcia clínica durant el tractament amb iCDK4/6, a través de factors immunològics de la biòpsia líquida i de les poblacions cel·lulars del sistema immunitari perifèric que determinin el benefici dels iCDK4/6.

4. MATERIAL I MÈTODES

Cohort clínica i disseny de l'estudi.

Es tracta d'un estudi prospectiu, observacional que inclouïa pacients amb CMM RH+/HER2- que iniciaven tractament amb iCDK4/6. Es recollia informació clínica i l'evolució de la malaltia oncològica, a més de l'emmagatzematge de mostres biològiques (sang perifèrica abans de l'inici del tractament i en diferents moments de l'evolució, també es recol·lectava el bloc de biòpsia tumoral en cas de romanent de la pràctica assistencial).

Entre el març del 2018 i l'abril del 2022, es va oferir la possibilitat de participar a l'estudi a totes les pacients de l'Institut Català d'Oncologia de Badalona que van iniciar un iCDK4/6 (palbociclib, ribociclib o abemaciclib) en qualsevol línia de tractament per a CMM.

L'anàlisi final va incloure totes les pacients reclutades amb seguiment a dia 22 de Juliol del 2022. Totes les pacients que van participar van ser informades de l'estudi, dels diferents procediments i van signar un consentiment informat específic de projecte i un específic de banc de tumors de l'Hospital Germans Trias i Pujol pel processament de les mostres de sang i tumorals, respectivament.

L'estudi es va dur a terme d'acord amb els principis ètics de la Declaració d'Hèlsinki i va ser avaluat pel Comitè d'Investigació i Ètica de l'Hospital Germans Trias i Pujol, (PI-18-063) i aprovat el dia 25.05.2018. L'estudi complia també les normes de bona pràctica clínica, la legislació sobre investigació biomèdica (Llei 14/2007), la obtenció i tractament de les mostres biològiques i biobanc (RD1716/2011). El projecte es va dur a terme d'acord amb la normativa aplicable en matèria de confidencialitat i protecció de dades (Llei Orgànica 3/2018 del 5 de desembre, de Protecció de Dades Personals i garantia dels drets digitals) i el Reglament (UE 2016/ 679 del parlament europeu i del consell de 27 d'abril del 2016) relatiu a la protecció de les persones físiques per al tractament de dades personals i la lliure circulació d'aquestes dades.

La font de recollida de dades va ser la història clínica, un cop la pacient va donar el seu consentiment per escrit. Les dades es van tractar de manera codificada posteriorment a la recollida de dades, complint així amb la llei de protecció de dades. L'anonimat de les pacients es va mantenir en tot moment durant el projecte gràcies a la utilització d'un codi numèric d'identificació. Es va crear un arxiu Excel paral·lel per a la identificació de cada pacient relacionant-ne el nom amb el codi numèric d'identificació, i sota responsabilitat de l'investigador principal. Les dades es van emmagatzemar al servidor de l'hospital.

Variables clíniques de la cohort

Variables incloses: any de naixement, data de diagnòstic de malaltia (localitzada i/o a distància), tractaments previs (ja fossin per la malaltia local o a distància), data de

progressió de la malaltia, localització de malaltia metastàtica, característiques immunohistoquímics del tumor (RE, RP i HER2), data de mort, causa de la mort, resposta al tractament, durada de la resposta al tractament i sensibilitat al tractament hormonal (considerant hormonosensibles les pacients que iniciaven el tractament per la malaltia metastàtica *de novo* com les de primera línia amb recaiguda més enllà dels 12 mesos; i hormonoresistents es van considerar aquelles que van progressar en curs d'hormona adjuvant o durant els 12 mesos posteriors o que ja havien rebut un tractament hormonal per a la malaltia metastàtica).

Recollida de mostres de la cohort

Confirmada la participació en l'estudi, i coincidint amb altres analítiques del procés assistencial a l'hospital de dia d'Oncologia, es va extreure sang perifèrica en diferents moments: previ a l'inici del tractament, als 15 dies de l'inici, a cada avaluació radiològica de la malaltia i al moment de la confirmació de progressió al tractament.

També es van revisar les mostres de parafina de biòpsies del tumor previ al tractament, tant del primari intervingut com de biòpsies de malaltia metastàtica en cas de disponibilitat, fruit d'excedent del procés assistencial.

Mostres biològiques: Sang perifèrica

En les extraccions assistencials, es van utilitzar 3 tubs d'EDTA de 10ml. La sang es va processar al mateix dia, en un màxim de 4 hores després de l'extracció. Primer, els tubs EDTA es centrifugaven a 1600g durant 10 minuts i posteriorment s'extreia el plasma repartint-lo en tubs Eppendorf® de 2ml (1.5ml per tub), els quan es van emmagatzemar criopreservats a -80°. Un cop separat el plasma, de la fracció cel·lular resultant, es van aïllar les cèl·lules sanguínies mononuclears de sang perifèrica (PMBCs de l'anglès *peripheral blood mononuclear cells*) a través d'un gradient de Ficoll® i un cop aïllats es van criopreservar a nitrogen líquid a una concentració de 10 milions de PBMCs/mL en medi de congelació (sèrum boví fetal (FBS) al 10% de dimetilsulfòxid (DMSO)).

ADN circulant tumoral (ctDNA)

El plasma aïllat a partir del procediment de doble centrifugació va ser analitzat amb Guardant Health (Redwood City, CA, USA) per a la determinació del DNA circulant tumoral, seguint els protocols establerts i validats per a Guardant™. L'ADN circulant es va extreure de les al·lotes de 1,5ml prèviament emmagatzemades utilitzant el "QIAamp circulating nucleic acid kit" (Qiagen); es va concentrar utilitzat el l'Agencourt Ampure XP beads (Beckam Coulter) i quantificar amb el "Quobit fluorometer" (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Es va detectar el tipus i número d'alteracions genòmiques de l'ADN circulant (insercions, delecions, amplificacions o variacions úniques de nucleòtid) d'un panell de més de 500 gens inclosos en el Guardant OMNI (<https://www.guardanthealthamea.com/>). Un cop es va aïllar l'ADN circulant per captura híbrida, es va completar l'assaig utilitzant algorismes bioinformàtics amb seqüenciació paral·lela massiva, propietat d'Illumina, la plataforma Hi-Seq 2500 a un laboratori acreditat CLIA/CAP (Guardant Health; Redwood City, CA, USA). Els protocols de Guardant™ també permetien establir el número de mutacions tumorals i calcular el TMB.

Determinació de gens passengers i drivers

El tipus i les característiques dels gens identificats en el panell de ctDNA es va utilitzar la plataforma oberta del laboratori de Barcelona Biomedical Genomics (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/analysis>). Aquesta eina, permet classificar segons bases públiques, i identificar quines mutacions tenen un paper important (conegudes com a mutacions *drivers*).

Aquestes mutacions *driver*, algunes ja es consideren establertes o conegudes i altres es categoritzen com probablement oncogèniques (predits per l'aplicació a través d'algorismes de *Machine Learning*). A més, també es detecten altres mutacions sense una influència en la biologia del tumor (conegudes com a mutacions *passengers*). Per l'anàlisi posterior es va tenir en compte les mutacions *drivers* (tant conegudes com les predites), el número de mutacions *passengers* i el TMB.

Detecció de factors inflamatoris circulants en plasma

Es van determinar els nivells de factors inflamatoris circulants com citocines, quimosines o factors de creixement mitjançant diferents tècniques, escollides segons la capacitat d'anàlisi paral·lel de les diferents proteïnes i la seva sensibilitat de detecció.

Per al primer cribratge de factors solubles inflamatoris a les mostres de plasma dels pacients, es va utilitzar la tecnologia xMAP de Luminex, concretament el panell predeterminat de MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Premixed 29 Plex - Immunology Multiplex Assay (ref, HCYTMAG-60K-PX29, Merck, Kenilworth, New Jersey).

Luminex utilitza boles magnètiques farcides amb dos fluorocroms i conjugades amb un anticòs específic, fet que permet detectar simultàniament múltiples dianes seleccionades. Aquest primer panell inclou les següents proteïnes: citocines de factors de creixement com EGF, G-CSF, GM-CSF; citocines immunomoduladores com IFN α 2, IFN γ , IL1 α , IL1 β , IL1RA, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12 (p40), IL12 (p70),

IL13, IL15, IL17A, TNF α , TNF β , IP10, VEGF i quimosines com MCP1, MIP1 α , MIP1 β , Eotaxin/CCL11.

Posteriorment, en base als resultats del primer cribratge, es va dissenyar un panell addicional personalitzat, en el que es van incloure una selecció de 5 citocines a més d'ampliar l'estudi a proteïnes solubles relacionades amb el sistema immunitari. El panell utilitzat va ser el High Sensitivity 9-Plex Human ProcartaPlex™ (ref EPXS090-12199-901; Termofisher, Waltham, Massachusetts, U.S) i les citocines que es van analitzar van ser: EGF, IFN γ , IL6, IL8, IL10 a més dels components solubles del checkpoint immunològic com TIM-3, PD-L1, CTLA-4 i LAG3.

Per la baixa detectabilitat de IFN γ i IL6, es va completar la sèrie amb un altre procediment de major sensibilitat com és el ProQuantum™ (Termofisher, Waltham, Massachusetts, U.S). ProQuantum™ permet detectar una molècula de forma concreta per unió anticòs-antigen, amplificar-la i quantificar-la per la tècnica de PCR (de l'anglès polymerase chain reaction) a temps real, permetent detectar quantitats i nivells més baixos de concentració de proteïna. Es va quantificar IL6 i IFN γ amb el kit de IFN γ Human i IL6 Human ProQuantum Immunoassay Kit (Referència: A35576 i A35573 respectivament; Termofisher, Waltham, Massachusetts, U.S).

Citometria de flux

Per a la determinació i caracterització funcional dels diferents subtipus cel·lulars del sistema immunitari circulant, així com la seva activació, es van dissenyar 2 panells d'anticossos per a l'anàlisi multiparamètric per citometria de flux. La citometria de flux permet identificar i caracteritzar tipus cel·lulars, per una il·luminació concreta la fluorescència emesa per uns fluorocroms que s'uneixen a receptors o molècules de la cèl·lula que interessa. Per tant, es van dissenyar els dos panells amb fluorocroms concrets per diferents components cel·lulars que permetien identificar el grup de cèl·lules circulants d'interès. Els anticossos i fluorocroms utilitzats en cada panell es resumeixen a la Taula 4.

Taula 4. Anticossos i fluorocroms inclosos en els panells de citometria multicolor utilitzats per a la immunofenotipat de les cèl·lules immunitàries circulants.

Panell 1: poblacions cel·lulars		Panell 2: Funció cèl·lula T	
Component cel·lular-Fluorocrom	Referència	Component cel·lular-Fluorocrom	Referència
CD3-BV421	BD Horizon® Cat: 563798	CD3-BV421	BD Horizon® Cat: 563798
CD4-BV786	BioLegend® Cat: 317442	CD4-BV786	BioLegend® Cat: 317442
CD11-PE	BD Pharmingen® Cat: 557321	CD25-APC	BioLegend® Cat: 302610

CD14-BV510	BD Horizon® Cat: 563079	CD45RA-PE	BioLegend® Cat: 304107
HLA/DR-PeCy7	BDBioscience®	PD-1-BV605	BioLegend® Cat: 329924
CD16-APC_Cy7	BioLegend® Cat 302018	CCR7-BV510	BioLegend Cat: 353232
CD19-PerCP	BioLegend® Cat 392510	FOXP3-FITC	BioLegend® Cat: 320106
CD33-BV605	BD Optibuild Cat: 745229	CTLA-4-PeCy7	BioLegend Cat: 106314
CD56-BV650	BioLegend Cat: 362532		

Pel diferents marcatges, es van descongelar una mostra de PBMCs i es van processar el mateix dia. Inicialment, es van aïllar 150.000 PBMCs per cada panell, es van realitzar 2 rentats amb buffer fosfat salí (PBS), amb un posterior marcatge amb la preparació de cada panell amb els marcatges de superfície durant 30 minuts a la foscor, 2 subsegüents rentats amb PBS i posteriorment una fixació final amb formaldehid (FA) al 4% durant 20 minuts; després 2 nous rentats amb PBS i finalment fixació amb FA al 1% previ al processament de la mostra a través de la citometria FACS LSR II.

En el segon panell, que s'inclouen dos anticossos intracel·lulars com són FOXP3 i CTLA-4, posterior a la fixació amb FA 4%, es realitzaven 2 rentats amb el buffer de permeabilització del kit FOXP3 Fix/Pem buffer Set (BioLegend, Cat: 421403), després 40 minuts amb la preparació dels anticossos intracel·lulars, 2 rentats amb el buffer de permeabilització i finalment la fixació també amb FA 1% previ al processament per la citometria.

L'estratègia de classificació del primer panell (Figura 6) va permetre identificar diferents subpoblacions: limfòcits T CD4+ (CD3+ i CD4+), per exclusió els limfòcits T CD8+ (CD3+, CD4-), cèl·lules NK (CD3-,CD56+, i segons expressió de CD16 la citotoxicitat d'aquests), neutròfils (CD 11b+, CD 16+), monòcits (CD14+, CD16+), MDSCs (CD11b+, CD 33+). El panell 2, l'estratègia de selecció (Figura 7) es va focalitzar en la funció de la cèl·lula T, i va permetre identificar els limfòcits T CD4 i CD8 igual que el panell previ. En les poblacions CD3+, es va analitzar l'expressió de CTLA-4, PD-1, FOXP3 i CD25 segons l'expressió de CD4. També es va classificar els limfòcits CD3+ segons l'expressió de CCR7 i CD45RA amb cèl·lula T verge (CD45RA+, CCR7+), la cèl·lula T de memòria central (CD45RA-,CCR7+), la cèl·lula T de memòria efectora (CD45RA-,CCR7-) i la cèl·lula de memòria efectora (CD45RA+,CCR7-).

Les dades es van analitzar utilitzant dos programes, primer el programa FlowJo (Bd Biosciences) per la quantificació de cada població cel·lular dels PBMCs segons les estratègies explicades prèviament i un segon programa per les representacions gràfiques i visualitzacions de dades, el programa online OMIQ (<https://www.omiq.ai/>). El

programa OMIQ permet la realització d'algoritmes de reducció dimensional per visualitzar dades en dos dimensions com l'openTSNE. L'openTSNE una implementació a través de mòduls de Phyton de l'algoritme t-SNE (o en anglès t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) que consisteix en crear una distribució de probabilitat que representa semblança entre veïns en un espai gran dimensió a un espai de menor dimensió, permeten agrupar els valors més semblants i representar-los en 2 dimensions.

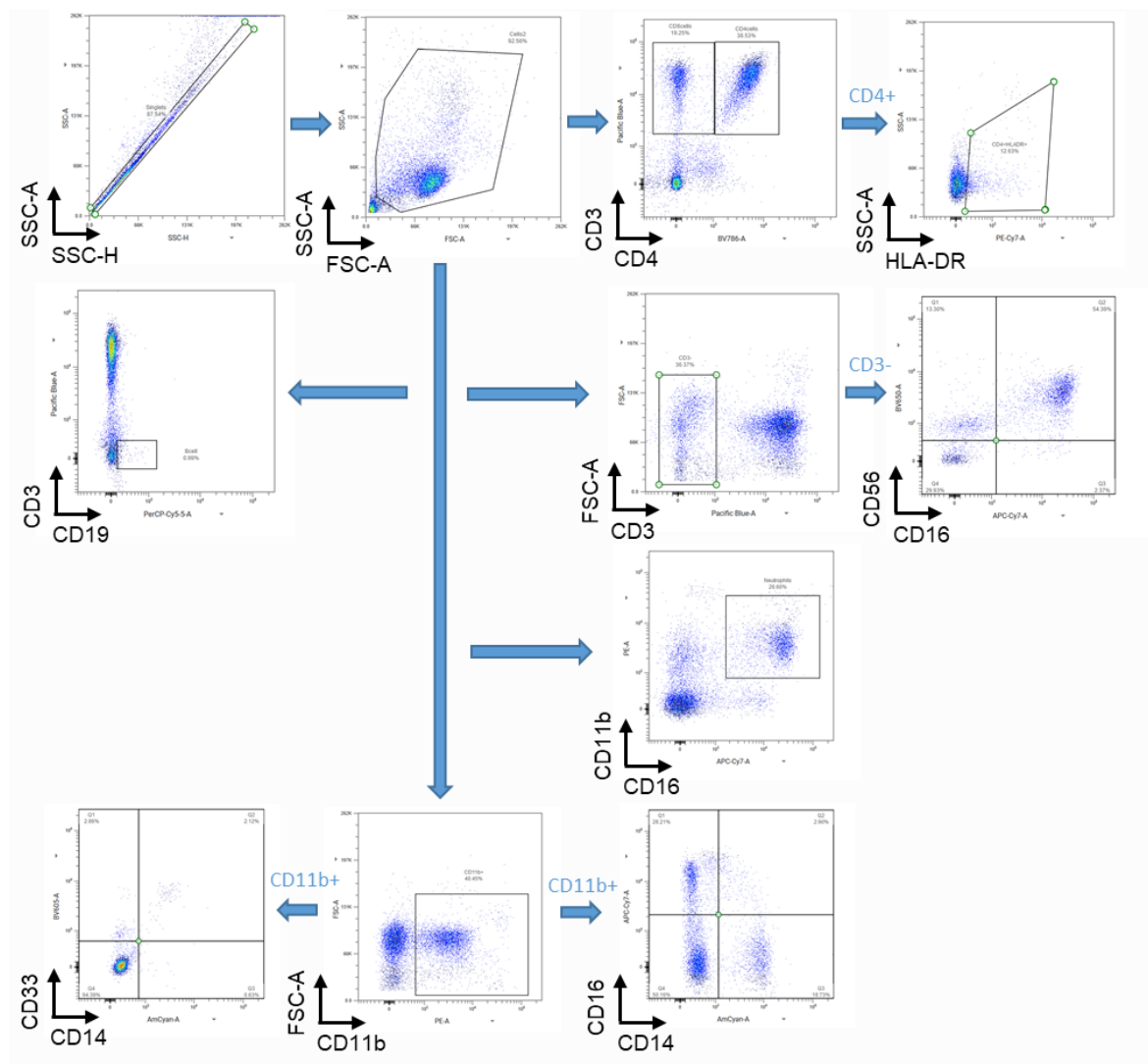


Figura 6. Estratègia per la selecció de les diferents poblacions cel·lulars a partir dels singlets i cèl·lules vives. Es seleccionaven els limfòcits (CD3+), segons la seva expressió de CD4 en limfòcits CD4+ o per exclusió CD8+ i es valorava l'expressió de HLA-DR en els CD4+. Les cèl·lules B es consideraven aquelles CD3- i CD19+. També s'identificaven: les cèl·lules NK (CD3+CD56+) i la seva citotoxicitat segons l'expressió de CD16 i els neutròfils segons l'expressió de CD16 i CD11b. Finalment, a partir de la positivitat de CD11b, es descriuen les MDSCs (CD33+) i els monòcits (CD16+ i CD14+).

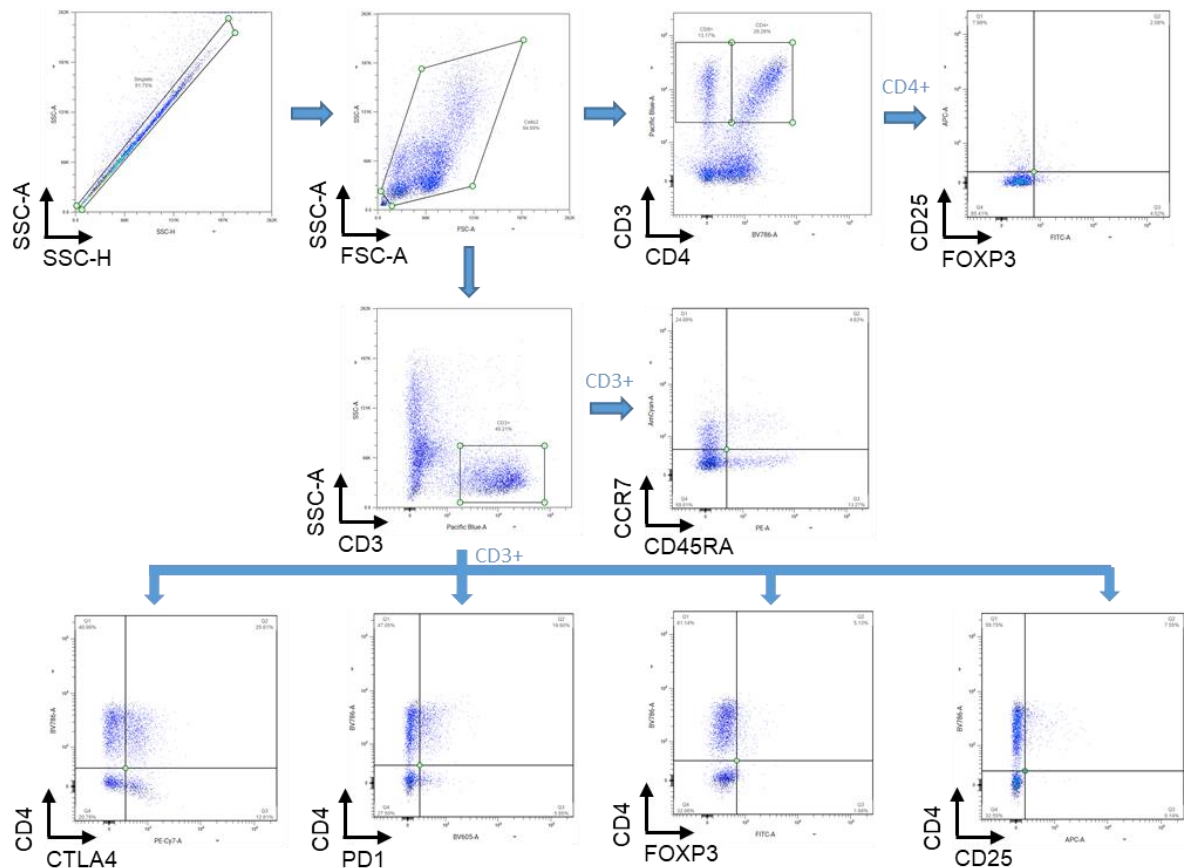


Figura 7. Estratègia per la identificació de les diferents poblacions de limfòcits T dels singles i les cèl·lules vives. Es seleccionaven els limfòcits (CD3+), segons la seva expressió de CD4 en limfòcits CD4+ o per exclusió CD8+. A partir de les CD4+ s'identificaven les cèl·lules Tregs (CD25+ i FOXP3+). Amb la selecció de les cèl·lules CD3+, s'identificaven els subtipus de limfòcits: Limfòcits T verges (CD45RA+ i CCR7+), els limfòcits de memòria central (CD45RA- i CCR7+), els limfòcits efectors de memòria (CD45RA- i CCR7-) i els limfòcits efectors (CD45RA+ i CCR7-). Finalment, amb les cèl·lules CD3+, es va valorar l'expressió de CTLA-4, PD-1, FOXP3 i CD25 en els limfòcits T CD4+ o CD8+ (per exclusió de CD4).

Mostres biològiques: biòpsies tumorals

La recollida de mostres de tumor es va fer de manera retrospectiva, incloent tant tumors primaris com biòpsies de localitzacions metastàtiques prèvies a l'inici de tractament. Es va fer la selecció i el maneig de les mostres a través del Banc de Tumors de l'Hospital Germans Trias i Pujol conjuntament amb el servei d'Anatomia Patològica. De cada mostra, amb la col·laboració d'un patòleg, es va seleccionar una àrea enriquida (mínim del 40% de cèl·lules tumorals) amb un tall d'hematoxilina/eosina.

Extracció de ARN de mostres tumorals

L'extracció de ARN es va realitzar a partir de 6 talls de 10micres/tall, seleccionats i realitzats al Banc de Tumors de l'HUGTIP, mitjançant el protocol establert al kit RNeasy FFPE Kit de Qiagen (Venlo, Netherlands) i seguint les instruccions del fabricant. L'ARN resultant es va quantificar mitjançant el Nanodrop, eliminant les mostres que no

aconseguien una qualitat i quantitat mínima, amb una concentració de 50ng/μL i un valor de la ratio de 260/280 entre 1.7 i 2.3. Les mostres que no complien aquestes requisits no van ser incloses en l'estudi posterior .

Panell d'expressió d'ARN per nCounter® panell Breast Cancer 360™

Es van utilitzar 250ng de ARN de cada mostra en 5ul, per analitzar l'expressió gènica amb el Panell BC360, utilitzant el sistema nCounter FLEX Analysis (NanoString Technologies, Seattle, USA). La tecnologia Nanostring utilitza un codi de barres moleculars concrets per cada gen objectiu d'estudi. Aquest codi de barres, conté una única seqüència de colors de fluorocroms per a cada diana, en el nostre cas de l'ARN directament, que és llegit per fluorescència automatitzada.

El panell BC360™ inclou l'expressió dels 50 gens per identificació del subtipus intrínsec segons PAM50™ (luminal A, luminal B, HER2-E, basal-like)(188), a més de 680 gens addicionals que permeten obtenir informació tant de cada gen individual com de diferents signatures genòmiques ja descrites i rellevants en la biologia del càncer de mama. Aquestes signatures, inclouen també, informació del microambient tumoral i vies relacionades amb el sistema immunològic a part de signatures oncogèniques importants com la hipòxia, proliferació com activació de EGFR, mutacions de *TP53* o signatures de resposta hormonal entre d'altres. A més, es va revisar que cada mostra obtingués uns valors adequats i complís els criteris de qualitat predefinides per Nanostring®, en cas contrari, van ser excloses. Es van comparar tant la mitjana d'expressió de cada gen individual, com la mitjana d'expressió del conjunt de cada signatura preestablerta per Nanostring® que inclou el panell BC360™, entre el grup de bona i mala eficàcia, utilitzant el test de Wilcoxon. A l'annex 1, es poden veure els gens inclosos de les diferents signatures significatives en l'anàlisi de supervivència.

Anàlisi d'enriquiment gènic

Per la anàlisi d'enriquiment gènic, o el que es coneix com a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) es va utilitzar la llista de pre-rank basat amb els valors Log2 de la diferència d'expressió (Diferència Log2FC>0.6 i valor p<0.1) entre el grup de bona i mala eficàcia, i es va comparar amb la base de dades de les signatures moleculars de Reactome (exactament la base Molecular signatures Database MsigDB v7.4). Els pesos de l'enriquiment estadístic es van basar amb 1000 permutacions, i es van escollir els considerat possiblement significatius amb un FDR ajustat valor q<0.2 i un valor p <0.05. Els mapes de visualització es van realitzar com havien estat descrits per anàlisi de seqüenciació de ARN, i es va utilitzar per les gràfiques el programa Cytoscape v.3.9.1 (189, 190).

Anàlisi estadística

Per l'anàlisi estadística i les representacions gràfiques es van utilitzar els programes GraphPad Prism (v.9.3.0) per la representació de corbes de supervivència Kaplan-Meier i per les gràfiques de caixes (Boxplot); i el programa Rstudio (v4.5.1) per l'anàlisi estadística de variables clíniques, la representació de mapes de calor (Heatmaps) utilitzant el paquet *pheatmap* i els histogrames amb el paquet *ggplot2*.

Per l'anàlisi descriptiu clínic, les variables quantitatives es van representar mitjançant la mediana i els rangs, i les variables qualitatives mitjançant la freqüència absoluta i el valor del percentatge. La SLP es va calcular des de l'inici del tractament amb iCDK4/6 fins a deixar el tractament per qualsevol causa. La SG es va estimar considerant la data d'inici del tractament amb iCDK4/6 fins a la mort. Tant la SLP com la SG es van avaluar mitjançant les corbes de Kaplan-Meier i es van analitzar segons el valor estadístic log-rank, considerant-se significatiu menor de 0.05. Per les variables quantitatives independents es van utilitzar els test de Kruskal-Wallis, test de Wilcoxon o U de Mann-Whitney, i per les variables qualitatives el test de Chi-quadrat; considerant la significança $p < 0.05$.

Pel disseny del model de regressió logística, es va considerar la variable dependent binària de bona o mala eficàcia als iCDK4/6, segons cadascuna de les variables clíniques descrites detalladament a l'apartat de resultats. Com a variables independents, es va utilitzar el valor de la citocina o de la proteïna moduladora del sistema immune. Per a la realització del model, es va utilitzar la funció *glm* del paquet *stat* del software Rstudio v4.5.1, que permet la realització d'un model lineal generalitzat (GLM). Aquest model és una generalització flexible de la regressió lineal. Per a la selecció del model final, es va utilitzar la funció *dropterm* del paquet de *MASS*, que permet valorar la millora del model amb l'eliminació d'una variable, a partir del criteri d'informació de Akaike (AIC), que mesura la qualitat de l'ajust del model. Es va calcular la odds ratio (OR) de cada factor segons l'augment de 10 unitats de cada proteïna soluble en el model.

L'anàlisi de supervivència segons l'expressió de variables biològiques, es va fer amb els paquets *survminer* i *survival* de programa Rstudio. Primer es van buscar dos grups amb expressió diferent segons la supervivència, utilitzant la funció *surv_cutpoint* que utilitza el mètode de maxstat. A partir d'aquí, les variables significatives en el model univariat de la regressió de Cox utilitzant la funció *coxph*, es van utilitzar pel model multivariant de regressió de Cox. La representació dels models multivariants i la HR corresponent, es va fer amb la funció *ggforest* del paquet *survminer*. Finalment, es van representar les corbes de supervivència de Kaplan-Meier segons el grup d'expressió amb el programa GraphPad Prism utilitzant el test log-rank per a la comparació entre corbes.

5. RESULTATS

5.1 Característiques clíniques de les pacients tractades amb iCDK4/6

Els iCDK4/6 formen part de l'esquema assistencial del tractament del CMM RH+HER2- a l'ICO de Badalona des del 2017. L'estudi prospectiu descrit en aquest treball es va realitzar a la població de pacients que iniciava tractament amb iCDK4/6 entre el març del 2018 i l'abril del 2022 (n= 211).

D'aquestes 211, 104 pacients van acceptar participar de forma voluntària al projecte. Finalment, la cohort d'estudi consta de 100 pacients ja que es van excloure 4 pacients pels següents motius: falta d'adherència al tractament (1 cas), complicacions que van causar la mort de la pacient abans dels 20 dies d'inici del tractament (2 casos) i administració de iCDK4/6 com a teràpia de manteniment després de quimioteràpia (1 cas). D'aquestes 100 pacients, 81 pacients havien tingut seguiment suficient per a determinar l'eficàcia del tractament (Figura 8).

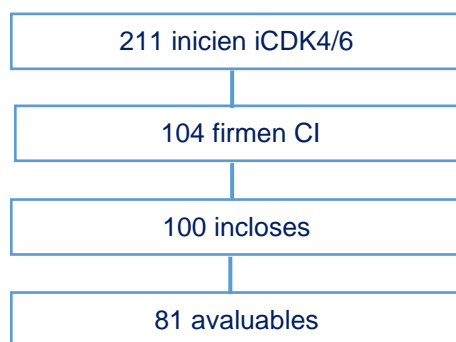


Figura 8. Diagrama de les pacients de l'estudi des del Març del 2018. 211 pacients van iniciar un iCDK4/6 a l'ICO Badalona des de la data d'inici de l'estudi, 104 van firmar el consentiment informat (CI), finalment 100 van ser incloses i 81 pacients eren avaluables a nivell d'eficàcia clínica en base el seu temps de seguiment.

5.1.1 Descriptiva de la cohort clínica tractada amb iCDK4/6

La descripció de les característiques clíniques de la cohort, tant de l'estudi global com estratificades per tipus de iCDK4/6 es descriuen a la Taula 5. La última actualització de la cohort es va realitzar a data del 21 de juliol del 2022.

Taula 5. Característiques clíniques de la cohort, segons cada iCDK4/6 administrat.

	Cohort (n=100)	Abemaciclib (n=19)	Palbociclib (n=60)	Ribociclib (n=21)	p
Edat a l'inici, mitjana [IQR]	62.3 [51.6;69.8]	63.5 [54.3;68.5]	62.3 [53.0;69.9]	55.3 [48.1;70.7]	0.659
Any d'inici de tractament, n (%)					<0.001
2018	36 (36.0%)	5 (26.3%)	22 (36.7%)	9 (42.9%)	
2019	26 (26.0%)	2 (10.5%)	22 (36.7%)	2 (9.5%)	
2020	16 (16.0%)	5 (26.3%)	11 (18.3%)	0 (0.0%)	
2021	16 (16.0%)	6 (31.6%)	3 (5.0%)	7 (33.3%)	
2022	6 (6%)	1 (5.3%)	2 (3.3%)	3 (14.3%)	
Número de línia, n (%)					0.080
1	60 (60.0%)	8 (42.1%)	35 (58.3%)	17 (81.0%)	
2	13 (13.0%)	2 (10.5%)	9 (15%)	2 (9.5%)	
> 2	27 (27.0%)	9 (47.4%)	16 (26.7%)	2 (9.5%)	
Tractament Hormonal acompanyant, n (%)					0.043
Tamoxifé	9 (9.0%)	2 (10.5%)	3 (5.0%)	4 (19.0%)	
IA	53 (53.0%)	10 (52.6%)	29 (48.3%)	14 (66.7%)	
Fulvestrant	38 (38.0%)	7 (36.8%)	28 (46.7%)	3 (14.3%)	
Tractament amb anàleg LH-RH, n (%):					0.002
Sí	19 (19.0%)	2 (10.5%)	7 (11.7%)	10 (47.6%)	
No	81 (81.0%)	17 (89.5%)	53 (88.3%)	11 (52.4%)	
Debut amb metàstasi de novo, n (%)					0.309
Sí	29 (29%)	7 (36.8%)	14 (23.3%)	8 (38.1%)	
No	71 (71%)	12 (63.2%)	46 (76.7%)	13 (61.9%)	
Sensibilitat hormonal al moment de tractament, n (%)					0.019
Debut metastàtic de novo	14 (14%)	1 (5.3%)	6 (10%)	7 (33.3%)	
1L i recaiguda >12m post fi HT adjuvant	29 (29%)	5 (26.3%)	17 (28.3%)	8 (38.2%)	
2L o recaiguda en adjuvència o <12m HT adjuvant	30 (30%)	4 (21.0%)	21 (35%)	4 (19%)	
>2L línia metastàtica	27 (27%)	9 (47.4%)	16 (26.7)	2 (9.5%)	
Quimioteràpia prèvia per M1, n(%)					0.077
Sí	23 (23%)	8 (42.1%)	12 (20%)	3 (14.3%)	
No	77 (77%)	11 (57.9%)	48 (80%)	18 (85.7%)	
Marcadors immunohistoquímics					
Expressió RE, mediana, [IQR]	90.0 [87.5;95.0]	90.0 [80.0;99.5]	90.0 [90.0;95.0]	90.0 [90.0;95.0]	0.950
Expressió RP<20, n (%)	41.0 (41%)	7 (36.8%)	29 (48.3%)	5 (23.8%)	0.133
HER2, n (%):					0.841
HER2 negatiu	47 (47.0%)	8 (42.1%)	29 (48.3%)	10 (47.6%)	
HER2 low	46 (46.0%)	8 (42.2%)	28 (46.6%)	10 (47.6%)	
Sense informació	7 (7.0%)	3 (15.8%)	3 (5.0%)	1 (4.8%)	

*n= número de pacients, HT=hormonoteràpia, IA= inhibidors d'aromatasa, L= número de línia, m=mesos, RE= receptors estrògens, RP= receptors progesterona, IQR= rangs interquartils, M1=metàstasi, p= valor p segons el test estadístic Chi-Quadrat considerat significatiu menor de 0.05 (marcat en cursiva).

L'edat mitjana de la cohort va ser de 62.3 anys, no existint diferències significatives en funció de quin era el fàrmac rebut. La inclusió de pacients comprèn des del març del 2018 fins l'abril del 2022, observant-se diferències significatives respecte a l'ús dels diferents iCDK4/6 en funció de l'any d'inici del tractament ($p < 0.001$). Això s'explica per l'elecció d'un o altre iCDK4/6 segons els canvis d'evidència, d'aprovació o d'indicació durant el període de l'estudi.

Referent a la línia de tractament pel que es va administrar el iCDK4/6, es tracta d'una cohort heterogènia. La majoria de les pacients van rebre iCDK4/6 en primera línia (60%); amb tendència a un major ús de ribociclib en aquesta primera línia (més del 80%), en comparació al 58% i 42% dels grups de palbociclib i abemaciclib respectivament.

El tractament hormonal més comú emprat de forma conjunta amb iCDK4/6, van ser els IA (53%) seguit del fulvestrant (38%), i es van observar diferències significatives segons el iCDK4/6 rebut ($p = 0.043$), arrel d'un major nombre de IA en les pacients amb ribociclib respecte el grup de palbociclib i abemaciclib. Una altra diferència, va ser l'enriquiment en el tractament amb anàlegs de LH/RH en el grup que va rebre ribociclib, degut principalment, a que el 70% de totes les pacients pre-menopàusiques de la cohort van ser tractades amb ribociclib.

L'eficàcia dels iCDK4/6 depèn de la línia de tractament en la que són administrats, però també de la sensibilitat hormonal prèvia, per això es important conèixer en quina situació reben el tractament les pacients. Tot i que la cohort conté un 29% de pacients amb afectació metastàtica *de novo*, només la meitat d'aquestes van rebre el iCDK4/6 com a primera línia de la seva malaltia metastàtica, representant així el 14% del total. També, és important destacar que un 29% de les pacients rebien el iCDK4/6 en primera línia després d'una recaiguda amb un interval superior a 12 mesos després de la fi de l'últim tractament hormonal adjuvant. Aquestes dues poblacions, *de novo* i amb una recaiguda tardana (més enllà de 12 mesos de finalitzar el tractament hormonal), van ser considerades com a població amb malaltia hormonosensible; representant un 43% del global de la cohort. Per contra, gairebé un terç de les pacients (30%) van rebre el iCDK4/6 en situació de progressió durant la HT adjuvant, durant els 12 mesos posteriors a la fi de l'hormonoteràpia adjuvant i un 27% en segona o línies posteriors de tractament per a CMM. Aquests grups de pacients es van considerar com a població amb malaltia hormona-resistent i van representar el 57% restant del global de la cohort. D'altra banda, el percentatge de pacients considerades com a hormonosensibles representaven un 71.4% de les tractades amb ribociclib, mentre només un 31.6% i un 38.3% en els grups tractats amb abemaciclib i palbociclib, respectivament, sent aquesta diferència significativa ($p = 0.019$; Taula 5).

Finalment, centrant-nos amb les característiques biològiques del tumor l'estudi immunohistoquímic, les pacients tenien una alta expressió de receptors d'estrògens, amb una mediana del 90%. Respecte als receptors de progesterona, un 41% de pacients presentaven una expressió <20%, repartida de forma homogènia entre els diferents grups.

Descrivint les pacients segons la localització de la malaltia metastàtica, l'afectació a distància més freqüent de la cohort va ser l'afectació òssia, arribant al 85% de les malaltes, amb una afectació visceral de fins el 44%. Cal destacar que 4 pacients (4%) van ser tractades amb iCDK4/6 conseqüència de l'afectació al sistema nerviós central (SNC) (Taula 6).

Taula 6. Localització de la malaltia metastàtica segons els diferents iCDK4/6.

	Total (n=100)	Abemaciclib (n=19)	Palbociclib (n=60)	Ribociclib (n=21)	p
Afectació Visceral, n (%):	44 (44%)	13 (68.4%)	22 (36.7%)	9 (42.9%)	0.052
Només afectació òssia, n (%):	27 (27%)	3 (15,8%)	18 (30%)	6 (28,5%)	0.007
Localització, n (%)					
Òssia	85 (85%)	17 (89.5%)	51 (85.0%)	17 (81.0%)	0.797
Ganglionar	36 (36%)	6 (31.6%)	23 (38.3%)	7 (33.3%)	0.832
Pleural	14 (14%)	4 (21.1%)	7 (11.7%)	3 (14.3%)	0.563
Hepàtica	26 (26%)	9 (47.4%)	13 (21.7%)	4 (19.0%)	0.080
Pulmonar	24 (24%)	5 (26.3%)	13 (21.7%)	6 (28.6%)	0.760
SNC	4 (4%)	3 (15.8%)	1 (1.7%)	0 (0.0%)	0.038
Altres	5 (5%)	2 (11.8%)	3 (5.1%)	0 (0.0%)	0.413

*n: número de pacients; SNC: sistema nerviós central; p: valor p segons el test estadístic Chi-quadrat, considerat significatiu si <0.05.

Analitzant la localització metastàtica, es van observar diferències en funció de la localització de les metàstasis i el fàrmac utilitzat. Així, per exemple, el 68.4% de les malaltes tractades amb abemaciclib presentaven afectació visceral, mentre la proporció era menor en els grups de pacients tractades amb palbociclib i ribociclib (36.7% i 42.9%, respectivament), al límit de la significança (p=0.052). Aquesta major afectació visceral del grup tractat amb abemaciclib tenia relació directa amb la major afectació observada a nivell hepàtic (47.4%), en comparació als grups tractats amb palbociclib i ribociclib (21.7% i 19.0% respectivament).

De manera similar, l'afectació metastàtica exclusivament òssia representava un 30% i 28.5% en els grups tractats amb palbociclib i ribociclib respectivament, en comparació a una menor proporció de les pacients tractades amb abemaciclib (15.8%), sent aquesta diferència estadísticament significativa (p=0.007).

Finalment, tenint en compte l'afectació en altres localitzacions metastàtiques, també s'observaven diferències en l'afectació de sistema nerviós central, on el grup tractat amb abemaciclib inclou 3 de les 4 pacients de la sèrie.

Així doncs, al moment de l'últim anàlisi al Juliol del 2022, un 29% de les pacients es trobaven encara en curs de tractament amb iCDK4/6; el 63% de les pacients havien progressat i un 8% havien suspès el tractament per altres motius (Figura 9).

Les causes de suspensió de tractament sense progressió de la malaltia van ser:

- Toxicitat pulmonar amb pneumonitis grau 4 secundària a iCDK4/6, 1 cas (191)
- Astènia i voluntat de les pacients a no seguir amb el tractament amb iCDK4/6, 3 casos
- Aparició de càncer d'ovari metastàtic, 1 cas
- Mala tolerància digestiva en forma de deposicions líquides i insuficiència renal secundària, 2 casos
- Mort per SARS-CoV2 en la primera onada de la pandèmia, 1 cas

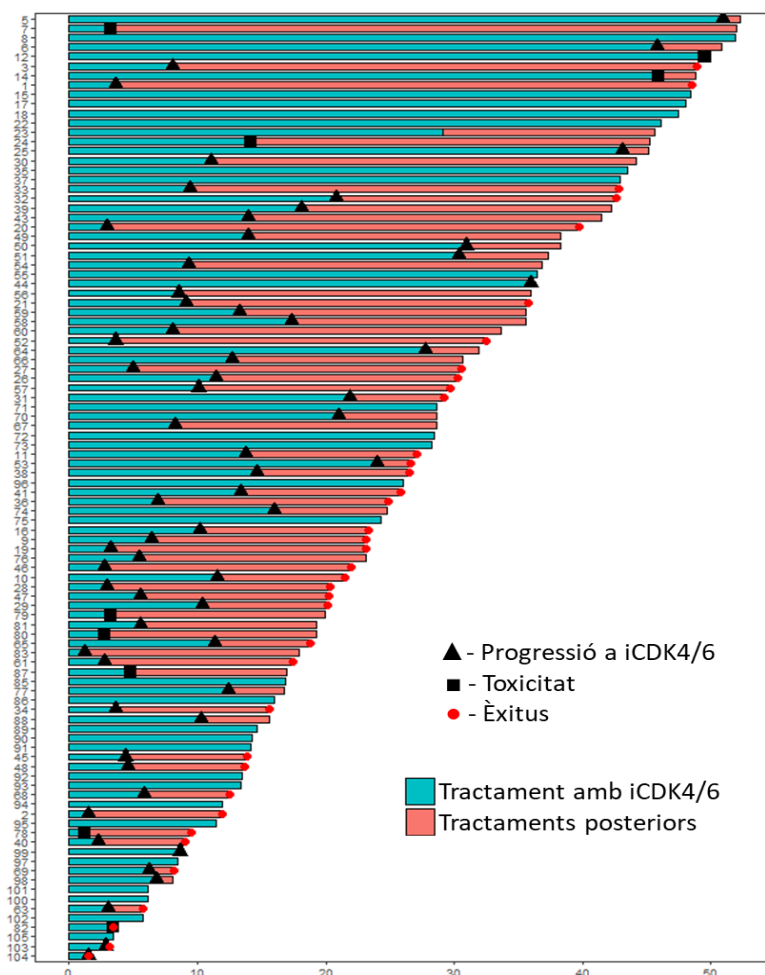


Figura 9. Representació gràfica de la durada del tractament amb iCDK4/6. Cada barra mostra el temps de tractament en mesos de cada pacient durant el transcurs dels iCDK4/6 (blau) i dels tractaments posteriors (vermell). A cada pacient, també s'exposa el motiu d'abandonament del iCDK4/6 (▲ per progressió de la malaltia o ■ per toxicitat al tractament). Finalment, en cas d'èxitus, es representa amb ● en la informació de cada pacient.

En l'anàlisi final de supervivència, un 62% de les pacients continuaven vives, per contra, un 36% havien mort per progressió de la malaltia oncològica, i 2 casos (2%) per infecció de SARS-CoV2, una en curs de tractament amb iCDK4/6 i l'altra ja en curs de quimioteràpia endovenosa. No es van observar diferències significatives entre els diferents iCDK4/6 i paràmetres associats a la supervivència (Taula 7).

Taula 7. Estat de la cohort en el moment de l'anàlisi de supervivència amb punt de tall el juliol de 2022.

	Cohort (n=100)	Abemaciclib (n=19)	Palbociclib (n=60)	Ribociclib (n=21)	p
Fi de tractament, n (%):					0.056
En curs	29 (29.0%)	5 (26.3%)	13 (21.7%)	11 (52.4%)	
Fi per progressió	63 (63.0%)	11 (57.9%)	43 (71.7%)	9 (42.9%)	
Fi per toxicitat.	8 (8.0%)	3 (15.8%)	4 (6.7%)	1 (4.8%)	
Estat últim control, n (%)					0.625
Viu	62 (62.0%)	11 (57.9%)	36 (60.0%)	15 (71.4%)	
Mort, càncer	36 (36.0%)	7 (36.8%)	23 (38.3%)	6 (28.6%)	
Mort, altres causes	2 (2.0%)	1 (5.3%)	1 (1.7%)	0 (0.0%)	

*n=número de pacients, p= valor p amb el test de Chi-Quadrat considerant significatiu < 0.05.

5.1.2 Anàlisi de supervivència

5.1.2.1 Supervivència lliure de progressió (SLP)

La mediana de SLP del total de la cohort de 100 pacients va ser de 13.7 mesos, mentre que va arribar als 30.4 mesos per les pacients tractades en primera línia (60 pacients) (Figura 10).

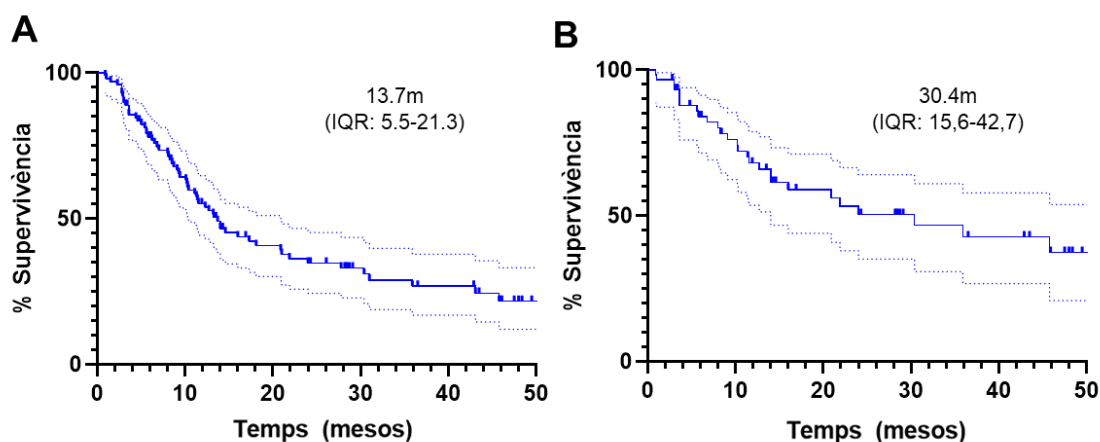


Figura 10. Supervivència lliure de progressió. A) SLP de tota la cohort clínica (n=100). B) SLP de les pacients en primera línia (n=60). *IQR: rang interquartílic; m:mesos.

En base a la descripció de les característiques clíniques de la cohort estudiada, es van determinar els principals factors que van implicar diferències a la SLP, essent els més importants: (i) localització de la malaltia metastàtica, (ii) la línia de tractament i (iii)

l'hormonosensibilitat; característiques que es van estudiar amb més detall, com descrivim a continuació.

Localització de la malaltia metastàtica

Analitzant les diferents característiques clíniques de les pacients i l'impacte en la SLP, es va observar que l'afectació visceral impactava en la SLP. Centrant-nos en l'afectació hepàtica, les pacients sense afectació hepàtica obtenien una SLP de 18.6 mesos, gairebé 12 mesos superior a la de les pacients amb afectació hepàtica, la qual va ser de 6 mesos ($p < 0.001$, Figura 11A). Per contra, a les pacients amb afectació metastàtica exclusivament òssia, la SLP va arribar als 30.4 mesos en comparació als 11.3 mesos de les pacients que presentaven alguna altra localització metastàtica ($p = 0.04$, Figura 11B).

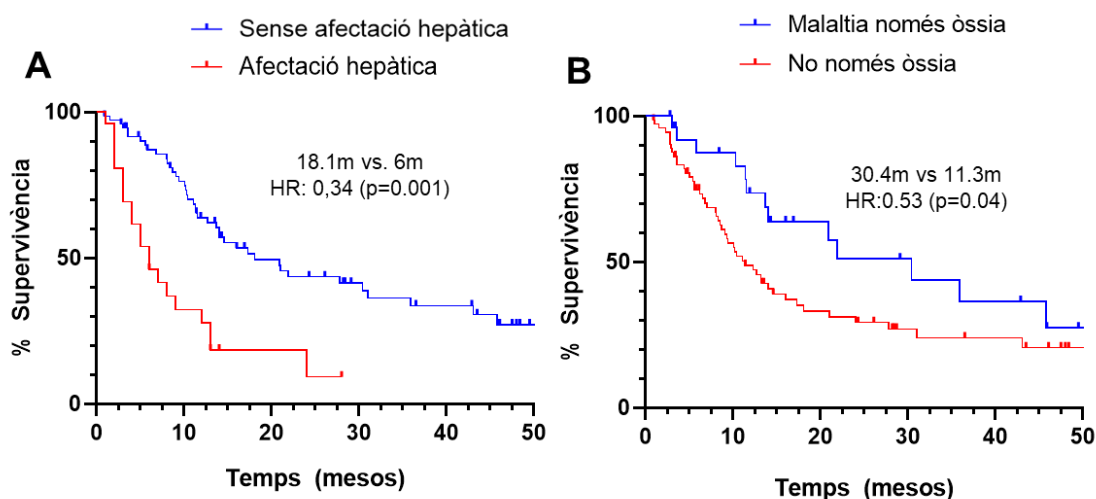


Figura 11. Supervivència lliure de progressió segons la localització de la malaltia metastàtica representada per corbes Kaplan-Meier. Es mostren estratificades segons l'afectació hepàtica (A) o segons l'afectació exclusivament òssia (B). El temps es representa en mesos (m), es mostren les pacients amb informació censurada i el valor p es calcula segons el test estadístic log-rank. IQR: rang interquartílic.

Línia de tractament i hormonosensibilitat

Comparant la SLP dels iCDK4/6 en primera línia o en línies posteriors, s'observaven diferències significatives, arribant fins a 30.4 mesos en primera línia, en comparació als 9.3 mesos en línies posteriors ($p = 0.001$, Figura 12A), essent aquestes diferències també significatives. A l'analitzar específicament la segona línia respecte a les línies posteriors, la SLP va ser de 12 mesos i 8.7 mesos respectivament ($p = 0.001$, Figura 12B).

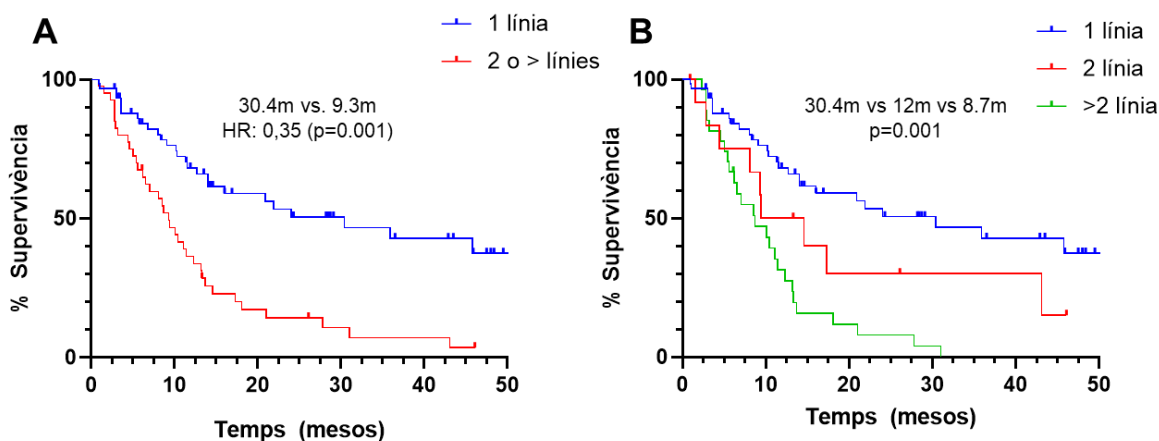


Figura 12. Temps lliure de progressió segons línia de tractament representades amb corbes Kaplan-Meier. La primera gràfica A, mostra la 1a línia vs. 2a. La gràfica B mostra la SLP segons 1 línia, 2a línia o línies posteriors. El temps es representa en mesos (m), es mostren els pacients amb informació censurada i el valor p es calcula segons el test estadístic log-rank.

Aquest benefici observat en primera línia, però, no va ser homogeni per a totes les pacients. La seva situació d'hormonosensibilitat impactava en la SLP en primera línia. Considerant les pacients en 4 grups, segons la situació en que rebien el iCDK4/6, trobem: a) en el subgrup amb malaltia metastàtica *de novo* (n=14) la mediana de SLP va ser de 24 mesos; b) en aquelles pacients amb recaigudes posteriors als 12 mesos de fi de tractament adjuvant (n=29), amb una SLP de fins a 35.9 mesos; c) a les pacients amb recaiguda durant l'adjuvència, durant primers 12 mesos des de la fi de l'adjuvència o després de tractament hormonal per CMM (n=30), la mediana va ser de 10.3 mesos; i d) finalment, el grup de les pacients que havien rebut una línia de tractament quimioteràpic previ per malaltia metastàtica (n=27) presentaven una mediana de SLP de 8.7 mesos (p=0.001, Figura 13A).

Quan vàrem realitzar el mateix anàlisi tenint en compte només les pacients en primera línia, es va observar una tendència similar, és a dir, la SLP era menor en les pacients amb recaigudes durant l'adjuvència o en els 12 mesos posteriors, amb una SLP de 10 mesos, en comparació als 24 mesos dels casos *de novo* o els més de 35 mesos en recaigudes tardanes (Figura 13B).

Així, estratificant les pacients de tota la cohort (n=100 segons la sensibilitat hormonal, vam observar una SLP de 35.9 mesos en pacients hormonosensibles vs.10.1 mesos en pacients amb situació d'hormonoresistència, diferències estadísticament significatives (p=0.001, Figura 13C).

Finalment, es va avaluar les pacients en curs de iCDK4/6 en segona línia o posteriors segons si havien rebut quimioteràpia previ per a CMM. Les pacients que havien rebut ≥ 1 línia de quimioteràpia prèvia per a CMM van obtenir una SLP significativament inferior a aquelles pacients que només havien rebut tractaments hormonals o altres teràpies dirigides per a la malaltia metastàtica (8.7 mesos vs. 11.1 mesos, $p < 0.005$) (Figura 13D).

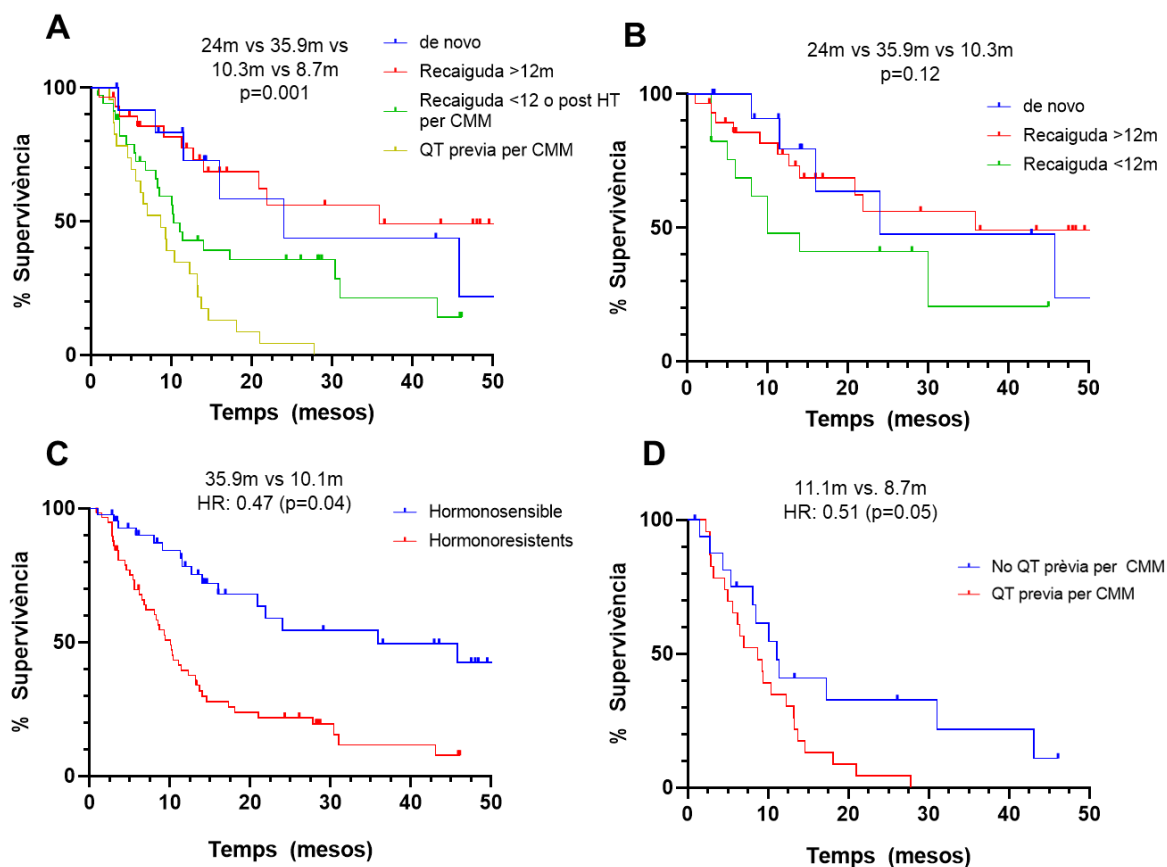


Figura 13. Supervivència lliure de progressió segons les característiques clíniques de les pacients. (A) Situació clínica al rebre iCDK4/6 (n=100). (B) Pacients tractades amb iCDK4/6 en primera línia (n=60), estratificades segons si eren *de novo*, recaigudes tardanes o recaigudes precoces. (C) Segons l'estat hormonosensibilitat al moment del tractament amb inhibidor de CDK4/6. (D) Pacients tractades amb iCDK4/6 en segona línia o posteriors (n=40) i estratificades segons si havien rebut quimioteràpia prèvia per malaltia metastàtica. El temps es representa en mesos (m), es mostren les pacients amb informació censurada i el valor p es calcula segons el test estadístic log-rank. *IQR: interval interquartílic; m:mesos; QT: quimioteràpia.

5.1.2.2 Supervivència Global (SG)

La SG de la cohort, considerant l'inici del tractament amb iCDK4/6 + HT fins a èxitus per qualsevol causa, va ser de 42.8 mesos al moment del punt de tall d'anàlisi el juliol 2022. Fixant-nos només en les pacients en primera línia, la SG va arribar fins al 48.9 mesos. La principal limitació per analitzar la SG, és el propi seguiment limitat de les pacients, el qual és menor que l'esperança de vida de la població amb CMM RH+/HER2- reportada recentment (66). A més, les dades no són prou madures per definir correctament la SG

de la nostra cohort, tenint en compte que al moment de l'anàlisi un 62% de les pacients encara seguien vives (Figura 14).

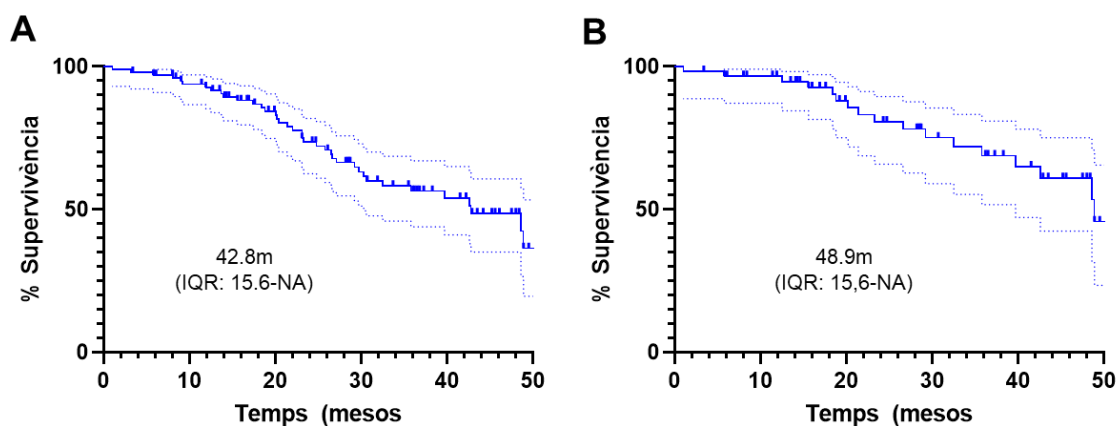


Figura 14. Supervivència global de la cohort. A) Inclou totes les pacients de l'estudi (n=100) amb l'IQR. B) Inclou les pacients només en primera línia de tractament (n=60). *IQR: interval interquartílic; m:mesos.

De la mateixa manera que en l'anàlisi de la SLP, es va realitzar l'anàlisi de SG en base a les característiques clíniques predefinides: (i) localització de la malaltia metastàtica, (ii) la línia de tractament i (iii) l'hormonosensibilitat, característiques que s'han estudiat amb més detall a continuació.

Localització de la malaltia metastàtica

De forma similar al que observàvem amb la SLP, l'afectació hepàtica al moment de rebre el iCDK4/6 impactava en la SG amb una reducció de la mitjana en més de 20 mesos, sent de 48.9 mesos en el grup sense afectació hepàtica i de 23.1 mesos quan es presenta afectació hepàtica. Malgrat la immaduresa de les dades pel breu seguiment, la diferència era estadísticament significativa ($p < 0.001$, Figura 15A).

Pel que fa a la afectació exclusivament òssia de la malaltia metastàtica, les dades no eren prou madures, i tot i la tendència a una major SG en aquest subgrup de pacients, no s'obtenia una diferència estadísticament significativa (Figura 15B).

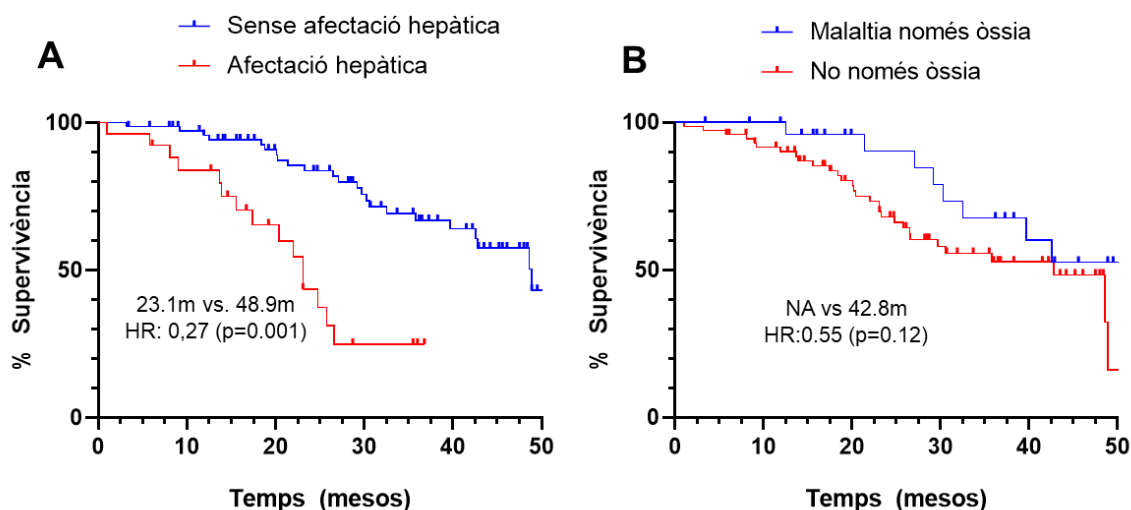


Figura 15. Supervivència global segons afectació metastàtica. (A) SG de les pacients estratificades segons l'afectació metastàtica hepàtica. (B) SG de les pacients estratificades segons l'afectació exclusiva òssia. El temps es representa en mesos (m), es mostren les pacients amb informació censurada i el valor p es calcula segons el test estadístic log-rank. *IQR: interval interquartílic; m:mesos.

Així doncs, tal i com observàvem en els resultats de SLP on la situació clínica en el que es rebia el tractament amb iCDK4/6 impactava en els resultats, vam observar una tendència en la mateixa direcció pel que fa a la SG, tot i que el poc temps de seguiment de l'estudi limitava les interpretacions dels resultats.

Línia de tractament i hormonosensibilitat

Es va considerar el moment clínic en què les pacients rebien el iCDK4/6, segons els 4 grups descrits prèviament en l'anàlisi de SLP (malaltia metastàtica *de novo*, recaigudes hormonosensibles, recaiguda hormono-resistent i pacient amb quimioteràpia prèvia per CMM). S'observa que les pacients que havien rebut tractament amb quimioteràpia prèvia presentaven una SG significativament inferior comparada amb la SG de la resta de grups (p=0.009, Figura 16A).

També vàrem realitzar el mateix anàlisi per grups clínics, en les pacients tractades en primera línia (n=60), sense observar diferències significatives, segurament per la falta de seguiment de la cohort (Figura 16B).

Posteriorment, en l'anàlisi d'hormonosensibilitat de tota la cohort descrit també prèviament, es varen observar diferències significatives, amb SG superior en el grup hormonosensible, pel qual no es va poder obtenir la mediana de SG per manca de seguiment, mentre que el grup hormono-resistent obtenia una mediana de SG de 39.7 mesos (p=0.04, Figura 16C).

Finalment, seleccionant les pacients amb línies avançades de tractament (a partir de segona línia de CMM), i valorant segons si havien rebut tractament amb quimioteràpia

prèvia, s'observa una tendència a una SG inferior en aquelles pacients amb quimioteràpia prèvia (Figura 16D).

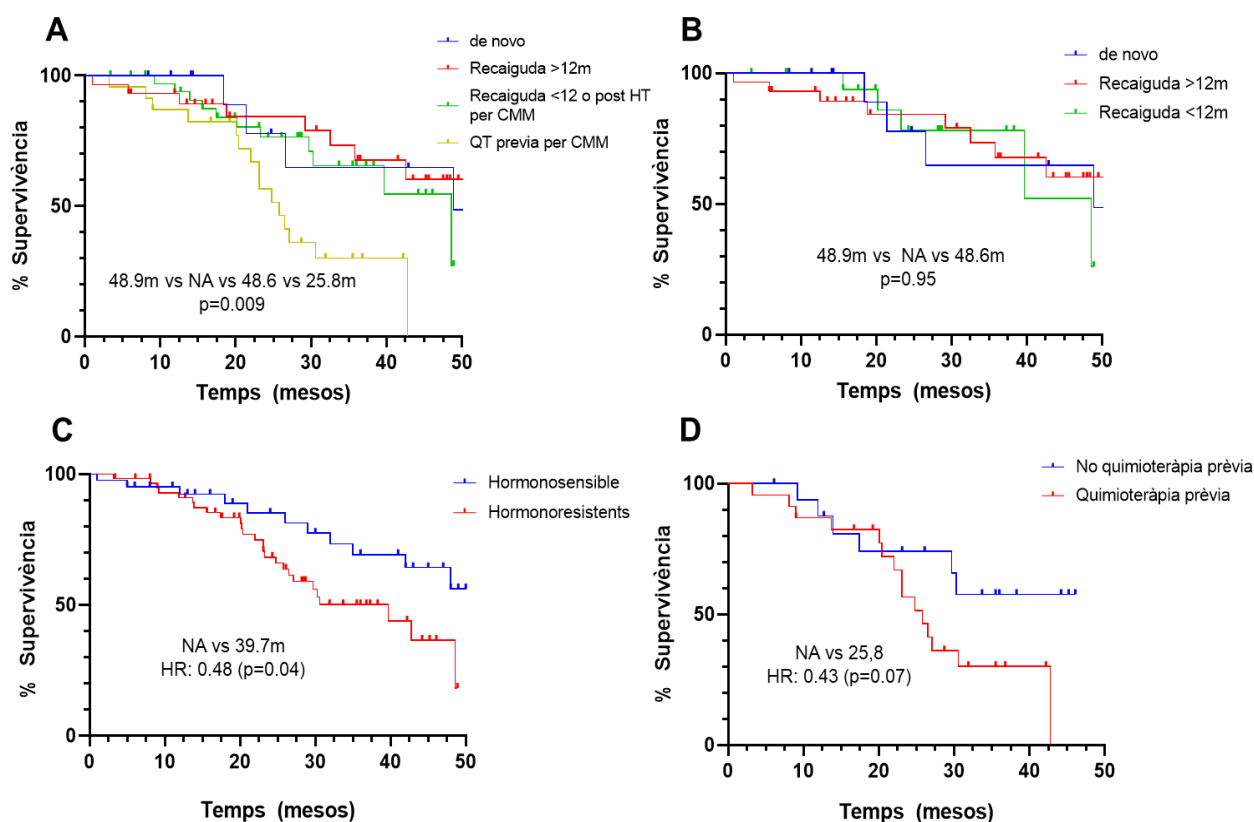


Figura 16. Supervivència global segons les característiques clíniques de les pacients. (A) SG segons la situació clínica al rebre el iCDK4/6 de tota la població (n=100). (B) SG de les pacients CMM en primera línia (n=60) segons debut *de novo*, recaigudes tardanes o recaigudes precoces. (C) SG segons l'estat de sensibilitat hormonal al moment del tractament amb el iCDK4/6. (D) SG en pacient que havien rebut el iCDK4/6 en segona línia o posteriors, estratificades segons quimioteràpia prèvia per a CMM. El temps es representa en mesos (m), es mostres les pacients amb informació censurada i el valor p es calcula segons el test estadístic log-rank. *IQR: interval interquartílic; m:mesos; QT: quimioteràpia.

En definitiva, la valoració de SLP i SG de la cohort, va ratificar que diverses característiques clíniques com la sensibilitat hormonal, la localització metastàtica i els tractaments previs rebuts mostraven un valor pronòstic en CMM RH+/HER2-.

5.1.3 Impacte del subtipus tumoral intrínsec en l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6

Descripció de subtipus intrínsecs

L'avaluació retrospectiva dels subtipus intrínsecs en alguns dels estudis fase III amb iCDK4/6, mostra evidència que el subtipus tumoral intrínsec podria determinar, en part, l'eficàcia clínica del iCDK4/6 (95, 192), especialment en casos de subtipus no luminals. En aquest sentit, es va determinar el subtipus intrínsec a través de la signatura

d'expressió gènica PAM50 en 63 mostres de 55 pacients diferents, corresponents tant a biòpsies del tumor primari (n=39) com biòpsies de lesions metastàtiques (n=24). En 8 pacients es van obtenir mostres aparellades, és a dir, tant del tumor primari com de biòpsia de la malaltia metastàtica.

En la valoració del subtipus intrínsec definitiu de les pacients, es va seleccionar l'última mostra de les 55 pacients de la qual es tenia informació, és a dir, en cas de tenir biòpsia del primari i del metastàtic, es va tenir en compte el subtipus de la mostra metastàtica, disposant així de 31 casos de tumor primari i de 24 de la metastasi. Les característiques clíniques de cohort on es va valorar el subtipus intrínsec per PAM50 es veuen resumides i estratificades per cada subtipus a la Taula 8 i Figura 17A.

Seleccionant només l'origen del tumor primari, es van estudiar 39 pacients, dels quals 19 presentaven un subtipus intrínsec luminal A, 18 luminal B i 2 HER-2 enriched (HER2-E), sense cap mostra classificada com a subtipus basal. Curiosament, la distribució de les biòpsies d'origen metastàtic per subtipus intrínsec, presentava un panorama significament diferent: de les 24 mostres estudiades, 6 es classificaven com a luminal A, 11 com a luminal B, 5 com a HER2-E i 2 com a basal. La distribució entre les dos poblacions presentava diferències significatives; així, a les mostres metastàtiques, hi havia un increment de casos classificats com a no luminals (HER2-E i basal-like) respecte als primaris ($p=0.034$, Figura 17 B i C).

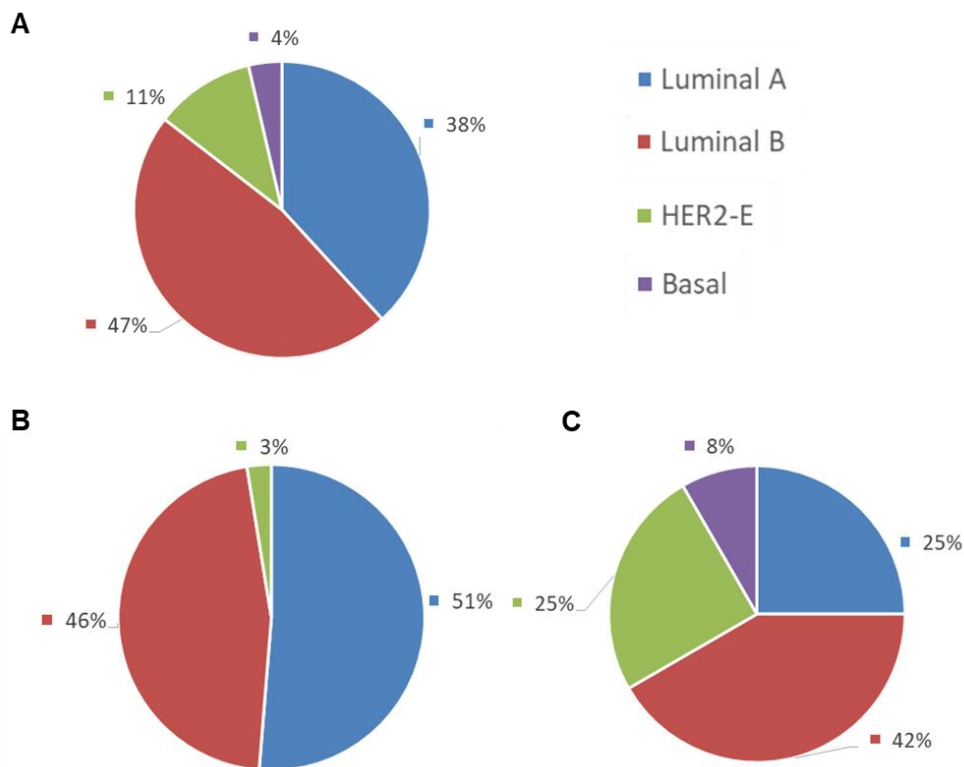


Figura 17. Distribució del subtipus intrínsec en les biòpsies estudiades. (A) Cohort dels 55 pacients amb estudi per PAM50 dels subtipus intrínsec, i la seva distribució (B) Distribució del

subtipus intrínsecs per PAM50 en les 39 mostres d'origen primari. (C) Distribució del subtipus intrínsec per PAM50 en les 24 mostres d'origen metastàtic.

Es coneix que els subtipus moleculars o subtipus intrínsecs poden variar entre tumors primaris i progressions, descrivint canvis en progressions metastàtiques cap a subtipus més desfavorables, segurament per la selecció clonal o per canvis secundaris en les cèl·lules tumorals conseqüència de la pressió de tractaments (193). A la nostra sèrie, vam disposar de 8 pacients amb tumors primaris i metastàtics, on es va poder determinar el subtipus intrínsec per PAM50 del mateix pacient a les dues mostres.

Així doncs, en les 8 biòpsies dels tumors primaris, 4 pacients es van classificar com a luminal A i en 3 casos van canviar de subtipus a la biòpsia metastàtica, 2 a luminal B i 1 a HER-2-E. De les 3 pacients classificades com a luminal B en el primari, 1 es va revalorar com a subtipus basal a la metastasi. Finalment, 1 pacient amb un tumor classificat com a HER2-E a la biòpsia del primari, es va transformar a subtipus luminal B a la biòpsia de la metastasi (Figura 18).

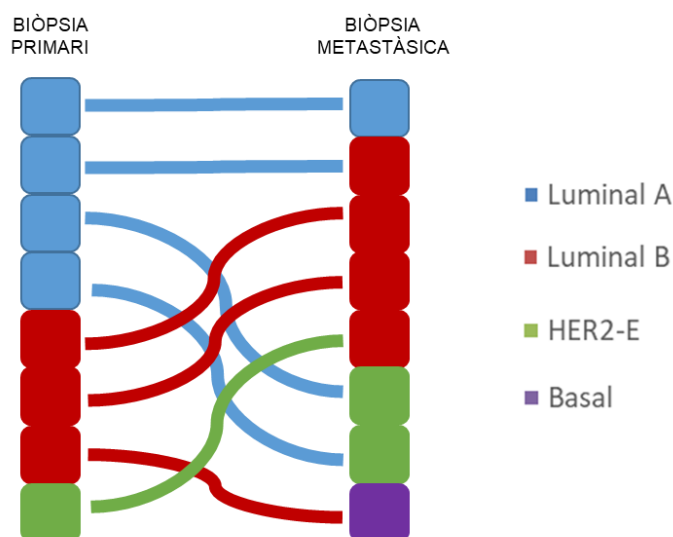


Figura 18. Subtipus intrínsec per PAM-50 de les pacients (n=8) que presentaven biòpsies aparellades del tumor primari i de la metastasi. A l'esquerra la classificació al tumor primari i a la dreta de la metastasi, classificades amb un codi de colors en funció del subtipus.

L'anàlisi d'aquesta cohort (n=55) no va objectivar diferències estadísticament significatives en la mediana d'edat entre els diferents subtipus, així com tampoc el iCDK4/6 administrat, tot i que les dues úniques pacients amb subtipus basal van rebre abemaciclib. Curiosament, sí que es van observar divergències amb el número de línia estratificant segons el subtipus, amb un major percentatge de luminals A en primera línia, i per contra, les dues pacients amb subtipus basal van rebre el iCDK4/6 en línies posteriors a segona línia (p=0.047). Així mateix, també s'observava una diferència entre les pacients que havien rebut quimioteràpia prèvia per CMM segons el subtipus

intrínsec, on les dues pacients amb tumors amb subtipus basal, van rebre també quimioteràpia prèvia per malaltia avançada. Considerant la localització de les metàstasi, també es van observar una sèrie de discrepàncies segons el subtipus intrínsec, per exemple, les pacients amb tumors tipus luminal A, presentaven un major percentatge de diagnòstic de metàstasi òssia com a únic òrgan afectat. Per contra, l'afectació visceral i hepàtica era més freqüent en la resta de subtipus no luminals A (Taula 8).

Taula 8. Característiques clíniques bàsiques de les pacients segons el subtipus luminal.

	Cohort (n=55)	Luminal A (n=21)	Luminal B (n=26)	HER2-E (n=6)	Basal (n=2)	p
Edat a l'inici, mediana [IQR]	60.5 [49.8-71.2]	60.2 [51.8- 68.4]	60.3 [49.1-11.5]	70.6 [60.7-80.5]	64.8 [62.2-67.4]	0.711
Tractament						0.061
Abemaciclib	9 (16.4%)	2 (9.5%)	4 (15.4%)	1 (16.7%)	2(100%)	
Palbociclib	30 (54.5%)	14 (66.7%)	13 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	
Ribociclib	16 (29.1%)	5 (23.8%)	9 (34.6%)	2 (33.3%)	0 (0%)	
Número de línia, n (%)						0.047
1 L	37 (63.7%)	17 (81%)	16 (61.5%)	4 (66.7%)	0 (0%)	
2 L	8 (14.5%)	1 (4.8%)	6 (23.1%)	1 (16.7%)	0 (0%)	
>2 L	10 (18.2%)	3 (14.3%)	4 (15.4%)	1 (16.7%)	2 (100%)	
Hormona acompanyant, n (%)						0.956
Tamoxifè	6 (10.9%)	3 (14.3%)	3 (11.5%)	0 (0%)	0 (0%)	
IA	28 (50.9%)	10 (47.6%)	13 (50%)	4(66.7%)	1 (50%)	
Fulvestrant	21 (38.2%)	8 (38.1%)	10 (38.5%)	2 (33.3%)	1(50%)	
Sensibilitat hormonal, n (%)						0.062
CMM <i>de novo</i>	9 (16.4%)	4 (19%)	3 (11.5%)	2 (33.3%)	0 (0%)	
1L i recaiguda >12m post HT	20 (36.4%)	8 (38.1%)	9 (34.6%)	0 (0%)	0 (0%)	
2L o recidiva en adjuvència <12m	26 (47.3%)	7 (47.6%)	13 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	
>2L línia metastàtica	9 (16.4%)	2 (9.5%)	4 (15.4%)	1 (16.7%)	2 (100%)	
Quimioteràpia prèvia per M1, n(%)	9 (16.4%)	2 (8.7%)	4 (16.7%)	1 (16.7%)	2 (100%)	0.012
Localització malaltia metastàtica						
Només òssia	16 (29.1%)	11 (52.4%)	4 (15.4%)	1 (16.7%)	0 (0%)	0.027
Visceral	24 (43.6%)	5 (23.8%)	14 (53.8%)	3 (50%)	2 (100%)	0.068
Hepàtica	12 (21.8%)	5 (23.8%)	5 (19.2%)	0 (0%)	2 (100%)	0.029
SNC	3 (5.5%)	0 (0%)	2 (7.7%)	1 (16.7%)	0 (0%)	0.285
Origen						0.039
Primari	31 (56.4%)	15 (71.4%)	15 (57.7%)	1 (16.7%)	0 (0%)	
Metastàtic	24 (43.6%)	6 (28.6%)	11 (42.3%)	5 (83.3%)	2 (100%)	

*n=número de pacients; m=mesos; IQR= interval interquartilic; L= línia, HT= hormonoteràpia; IA= inhibidor aromataasa; M1= metàstasi; SNC= sistema nerviós central.

Seguidament, amb la cohort de les 55 pacients s'ha procedit a aprofundir en l'anàlisi de supervivència i en la repercussió del subtipus intrínsec en CMM.

Supervivència lliure de progressió (SLP)

En l'anàlisi de la SLP tenint en compte tota la cohort independentment del número de línia, s'observava una tendència a diferències en SLP segons el subtipus intrínsec, sent de 24 mesos i 14.6 mesos en tumors luminals (A i B respectivament) vers un pitjor pronòstic en tumors no luminals, de 8.1 mesos i 9.7 mesos en HER2-E i Basal, respectivament. Aquestes diferències, però, no aconseguen la significança estadística (Figura 19A).

Per tal d'estudiar en més profunditat l'impacte del subtipus intrínsec al tractament amb iCDK4/6, evitant biaixos del número de línia tractament, es va seleccionar només aquelles pacients que van rebre el iCDK4/6 en primera línia de tractament. Així, les pacients amb subtipus intrínsec luminal A (n=17) van obtenir una SLP de 35.9 mesos, mentre les pacients luminal B (n=16) presentaven una corba de supervivència lleugerament inferior, però al moment del punt de tall en el seguiment no s'havia aconseguit el seguiment suficient per valorar la mediana de SLP. Per contra, les pacients amb un tumor classificat com a HER2-E (n=4), presentaven una mediana de SLP significativament menor (p=0.02) de només 7.4 mesos; manifestant una diferència en benefici als iCDK4/6 en quan a SLP en primera línia entre tumors luminals i no luminals segons el subtipus intrínsec per PAM50 (Figura 19B).

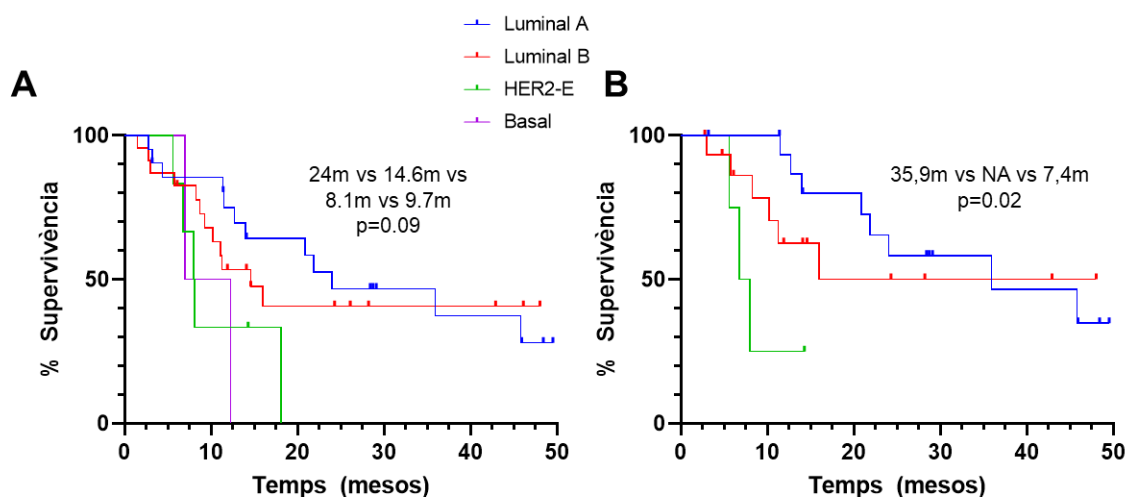


Figura 19. Corbes de supervivència Kaplan-Meier segons el subtipus intrínsec per PAM50. (A) La SLP segons el subtipus intrínsec de tota les pacients estudiades (n=55) independentment del número de línia de tractament. **(B)** La supervivència lliure de progressió (SLP) a iCDK4/6 de les pacients en primera línia (n=37).

Supervivència global (SG)

En l'avaluació de la SG, tant seleccionant les pacients de tota la cohort, com només aquelles de primera línia, el grup de pacients amb tumors luminals no arribava a la mediana de SG, presentant un temps insuficient de seguiment per completar l'anàlisi final.

Així doncs, en la nostra cohort vam observar diferències significatives en la SLP en primera línia segons el subtipus intrínsec però aquestes diferències no van poder ser confirmades en la SG per la falta de seguiment de la cohort. Tot i així, es considera que probablement, la determinació del subtipus intrínsec permet obtenir una informació pronòstica de l'evolució de la pacient.

En resum, tenint en compte totes les característiques clíniques descrites fins ara, podem concloure que partíem d'una cohort de pacients heterogènia, amb les característiques habituals de les pacients afecte d'un CMM RH+/HER2-, però amb un percentatge alt de pacients tractades amb iCDK4/6 en línies avançades. Per tant, per reduir l'impacte de l'heterogeneïtat en el número de línies i el tipus de tractaments previs amb hormonoteràpia o quimioteràpia, vàrem generar grups d'eficàcia clínica segons la SLP esperada per a cada grup basant-nos amb els principals estudis clínics fase III (63, 65, 73, 74, 77, 194). Aquesta classificació de grups (bona eficàcia vs. mala eficàcia) es descriurà en el proper apartat i l'utilitzarem per obtenir grups amb diferent benefici clínic, els quals s'utilitzaran per l'anàlisi comparatiu biològic subsegüent.

5.1.4 Característiques clíniques de la cohort segons l'eficàcia dels iCDK4/6

Per definir l'eficàcia clínica dels iCDK4/6, i tenint en compte les poblacions incloses i la SLP reportada als principals estudis dels diferent iCDK4/6; es van establir dos possibles grups d'eficàcia (bona vs. mala), en funció de l'eficàcia esperada per a cada població. Així doncs, es va considerar que les pacients que superaven la mediana de la SLP dels principals estudi amb característiques semblants a la seva situació, com a bona eficàcia, i en cas d'obtenir una SLP inferior, es va catalogar de mala eficàcia.

D'aquesta forma, es va poder identificar les pacients que més es beneficiaven dels iCDK4/6 en comparació d'aquelles amb un menor benefici, independentment de la línia de tractament i dels tractaments previs, situacions que podrien comportar un biaix en l'eficàcia del tractament. Principalment, la classificació es va obtenir en funció de les característiques individuals de cada pacient al moment de rebre al tractament, en funció de la hormonosensibilitat i el tractament previ amb quimioteràpia per a CMM.

El primer grup en categoritzar l'eficàcia fou el de les pacients considerades hormonosensibles (aquelles sense tractament previ per CMM, ja sigui per un debut *de novo* o en primera línia amb recaigudes més enllà dels 12 mesos de la HT adjuvant).

Basant-nos en els estudis clínics fase III on aquestes pacients estaven més representades, i. e., >95% en el MONALEESA-2, 80% en el PALOMA-2 o 99% en el MONARCH-3, la decisió d'eficàcia clínica va ser la següent:

1. **Bona eficàcia;** amb SLP igual o superior a 24 mesos
2. **Mala eficàcia,** amb SLP inferior a 24 mesos.

El segon grup de pacients categoritzades, foren les resistents a la HT, el qual inclou pacients amb resistència endocrina tant primària com secundària (progressió durant la HT per a CMM o durant la HT adjuvant). Per la valoració de la SLP, es va establir segons els resultats dels estudis MONALEESA-3, ja que encaixava amb els criteris d'inclusió on cap pacient havia rebut quimioteràpia per malaltia metastàtica o el PALOMA-3 i el MONARCH-2, en ambdós casos al voltant del 70% de les pacients pertanyien a aquest grup. En aquest grup, la decisió de l'eficàcia clínica va ser:

1. **Bona eficàcia;** amb SLP superior a 12.
2. **Mala eficàcia;** amb una SLP inferior a 12 mesos.

Finalment, en el tercer grup de pacients, es van incloure les pacients que ja havien rebut quimioteràpia prèvia per a CMM. L'eficàcia clínica, es va calcular segons la SLP de les pacients tenint en compte l'estudi MONARCH-1 on hi havia pacients politractades amb una SLP de 6 mesos i l'estudi PALOMA-3 on el 33% de les pacients havien rebut quimioteràpia prèviament, amb una SLP de 9 mesos, la decisió d'eficàcia va ser:

1. **Bona eficàcia;** amb SLP superior a 7 mesos
2. **Mala eficàcia;** amb SLP inferior als 7 mesos.

Així doncs, tenint en compte aquesta nova variable d'eficàcia clínica, es van poder classificar 81 pacients de les 100 incloses a la cohort. Les 19 pacients restants, no disposaven de suficient temps de tractament per decidir a quin grup dins la variable d'eficàcia encaixaven.

Un cop classificades les pacients en els dos grups categòrics, es van analitzar novament les característiques de cada grup per analitzar-ne les peculiaritats i validar la classificació. Així, la classificació de les 81 pacients segons l'eficàcia clínica va resultar en 42 pacients en el grup de bona eficàcia i 39 pacients en el grup de mala eficàcia (Taula 9). Entre les característiques clíniques més rellevants, es va objectivar una homogeneïtzació de l'edat. Per altra banda, no es van observar diferències en la distribució del número de línies de tractament previ, el tipus de tractaments i l'expressió de RE i RP, igual com en la distribució dels diferents subtipus tumorals intrínsecs per PAM50; validant d'aquesta manera la nova classificació realitzada i proporcionant una categorització dicotòmica que va permetre la comparació els paràmetres biològics que es discutiran més endavant en aquesta tesi (Taula 9).

Taula 9. Característiques clíniques de les pacients segons els dos grups d'eficàcia clínica al tractament (la valoració de resposta).

	Cohort d'eficàcia (n=81)	Bona eficàcia (n=42)	Mala eficàcia (n=39)	p
Edat, a l'inici, mediana [IQR]	61.8 [50.9;68.0]	62.1 [50.9;67.6]	58.6 [51.0;68.1]	0.564
Núm. de línia, n (%):				0.856
1L	45 (56.8%)	23 (57.1%)	22 (56.4%)	
2L	10 (11.1%)	6 (11.9%)	4 (10.3%)	
> 2L	26 (32.1%)	13 (31.0%)	13 (33.3%)	
Inhibidor de CDK4/6				0.385
Abemaciclib	13 (16.0%)	6 (14.3%)	7 (17.9%)	
Palbociclib	55 (67.9%)	27 (64.3%)	28 (71.8%)	
Ribociclib	13 (16.0%)	9 (21.4%)	4 (10.3%)	
Hormona acompanyant, n (%)				0.583
Tamoxifé	8 (9.9%)	4 (9.5%)	4 (10.3%)	
IA	40 (49.4%)	23 (54.8%)	17 (43.6%)	
Fulvestrant	33 (40.7%)	15 (35.7%)	18 (46.2%)	
Tractament amb anàleg LH-RH, n (%)				1.000
Sí	16 (19.8%)	8 (19.0%)	8 (20.5%)	
No	65 (80.2%)	34 (81.0%)	31 (79.5%)	
Debut amb metàstasi de novo, n (%)				0.426
Si	22 (27.2%)	13 (31%)	9 (23.1%)	
No	59 (72.8%)	29 (69%)	30 (76.9%)	
Sensibilitat hormonal, n (%):				0.123
Debut metastàtic <i>de novo</i>	8 (9.9%)	6 (14.2%)	2 (5.2%)	
1L i recaiguda >12m post HT	22 (27.2%)	13 (31%)	9 (23%)	
2L o recaiguda en adjuvència <12m	25 (30.9%)	10 (23.8%)	15 (38.4)	
>2L línia metastàtica	26 (32%)	13 (31%)	13 (33.3%)	
Quimioteràpia prèvia per M1, n(%)				0.129
Si	23 (28.4%)	15 (35.7%)	8 (20,5%)	
No	58 (71.6%)	27 (64.3%)	31 (79.5%)	
Expressió marcadors IHQ				
Expressió RE, mediana [IQR]	90.0 [80.0;95.0]	90.0 [85.0;95.0]	90.0 [80.0;95.0]	1.000
Expressió de RP <20, n (%)	31 (38.3%)	14 (33.3%)	17 (43.6%)	0.343
HER2, n (%):				0.418
HER2 negatiu	37 (45.7%)	18 (42.9%)	19 (48.7%)	
HER2 low	39 (48,1%)	20 (47.6%)	19 (48.7)	
Sense informació	5 (6.2%)	4 (9.5%)	1 (2.6%)	
Subtipus Intrínsec, n/total sèrie				0.242
Luminal A, n (%)	19 (43.2%)	11 (47.8%)	8 (38.1%)	
Luminal B, n (%)	18 (40.9%)	9 (39.1%)	9 (42.9%)	
HER2-Enriched, n (%)	5 (11.4%)	1 (4.3%)	4 (19%)	
Basal, n (%)	2 (4.5%)	2 (8.6%)	0	

*n: número de mostra; L: línia, IA: inhibidor d'aromatasa; M1:metàstasi; HT: hormonoteràpia; IQR: rang interquartílic; IHQ: immunohistoquímica; RE: receptors estrògens; RP: receptors progesterona; p: valor p segons el test de Chi-Quadrat, es considerant <0.5 la significança.

Pel que fa a la distribució de la localització de la malaltia metastàtica, també es va observar una distribució homogènia per l'afectació visceral, hepàtica o afectació exclusivament òssia, factors pronòstics importants en l'eficàcia, tal i com hem vist en els apartats anteriors. Aquesta homogeneïtzació entre els grups de bona i mala eficàcia, reforça la idea de dos grups d'eficàcia dispars tot i les característiques clíniques semblants (Taula 10).

Taula 10. Afectació metastàtica segons la valoració d'eficàcia.

	Cohort valoració d'eficàcia (n=81)	Bona eficàcia (n=42)	Mala eficàcia (n=39)	p
Afectació Visceral	37 (45.7%)	18 (42.9%)	19 (48.7%)	0.760
Només afectació òssia	20 (24.7%)	13 (31.0%)	7 (17.9%)	0.175
Localitzacions, n (%)				
Òssia	69 (85.2%)	33 (78.6%)	36 (92.3%)	0.154
Ganglionar	30 (37.0%)	14 (33.3%)	16 (41.0%)	0.627
Pleural	12 (14.8%)	7 (16.7%)	5 (12.8%)	0.862
Hepàtica	22 (27.2%)	9 (21.4%)	13 (33.3%)	0.340
Pulmonar	20 (24.7%)	8 (19.0%)	12 (30.8%)	0.335
Sistema nerviós central	3 (3.7%)	2 (4.8%)	1 (2.6%)	1.000
Altres	3 (3.9%)	2 (5.1%)	1 (2.7%)	1.000

*n=número de mostres, p= valor p segons el Test Chi-Quadrat considerat significatiu <0.05.

Finalment, al moment de l'anàlisi, gairebé un 20% de les pacients (16 casos) de la cohort encara continuaven en tractament amb iCDK4/6, totes en el grup de bona eficàcia. També es van observar diferències en l'estat de l'últim control, on més del 70% de la cohort de bona eficàcia seguien vives en comparació al 35% de la cohort de mala eficàcia. Cal destacar que aquesta nova classificació aporta una variable d'eficàcia clínica robusta que permet obtenir de forma independent al número de línia i a l'afectació metastàtica, dos grups de pacients amb una SLP i una SG completament diferenciada (Figura 20). Les pacients classificades com a bona eficàcia, presenten una SLP de 30.4 mesos i una SG no aconseguida dins del temps de seguiment de l'estudi. Per contra, en les pacients amb mala eficàcia, la SLP és de només 6 mesos amb una SG de 29.7 mesos. Aquestes diferències, tant per SLP com per SG són estadísticament significatives (p<0.001).

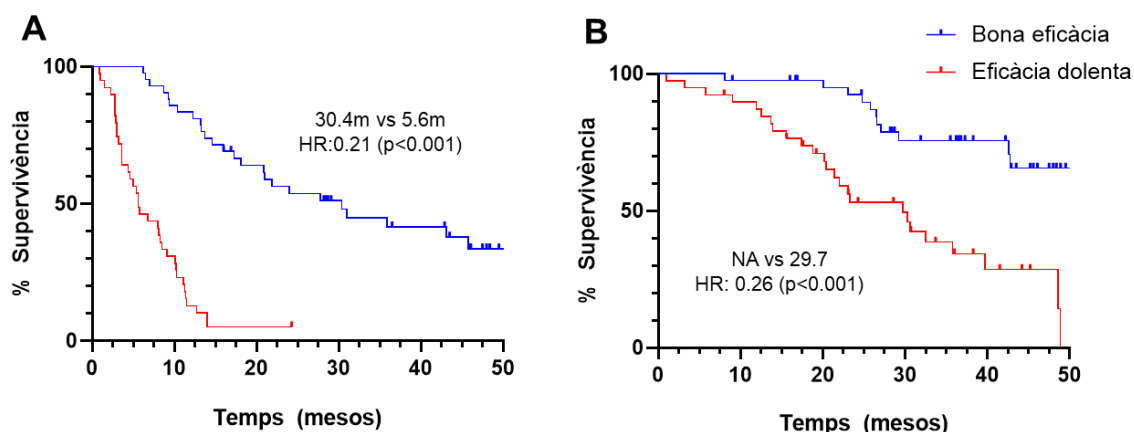


Figura 20. Anàlisi de supervivència en funció dels grups d'eficàcia clínica. (A) Supervivència lliure de progressió de la cohort estudiada (n=81) i **(B)** supervivència global segons l'eficàcia clínica als iCDK4/6 de la mateixa cohort (n=81).

En definitiva, la cohort de CMM amb RH+/HER2- recollida en el marc de la present tesis doctoral, era heterogènia tant pel que fa al número de línia i tipus de tractament previs, així com en el tipus d'afectació metastàtica i característiques clíniques de sensibilitat hormonal. Ara bé, també era una cohort coherent amb el que ens trobem a la pràctica assistencial pel que fa a l'edat, l'afectació metastàtica, el debut de malaltia metastàtica *de novo* i la SLP als iCDK4/6.

Per últim, la classificació segons criteris d'eficàcia clínica ajustat a la SLP tal com s'ha explicat en aquest últim apartat, permet reajustar la categorització segons la situació de sensibilitat a HT i el número de línia en què la pacient rep el iCDK4/6, tot obtenint dos grups amb benefici oposat però equilibrades amb localització de l'afectació metastàtica i principals característiques clíniques. És aquest treball exhaustiu de categorització clínica de les pacients en dos grups, el que ens permetrà realitzar l'estudi comparatiu biològic entre les pacients amb gran benefici clínic i aquelles refractàries al tractament; i així avançar en el coneixement d'altres paràmetres biològics cabdals per definir la resposta al tractament amb iCDK4/6.

5.2 Biomarcadors moleculars en biòpsia líquida i en teixit tumoral

Els biomarcadors moleculars es poden obtenir estudiant directament el teixit tumoral a través d'una biòpsia o en sang perifèrica per l'alliberació de l'ADN propi del tumor en el torrent sanguini (ADN tumoral circulant o ctDNA). En el proper apartat es detallaran els biomarcadors moleculars estudiats en la cohort clínica a través: i) de l'anàlisi de mutacions identificades en el ctDNA, ii) de l'avaluació de l'expressió gènica per ARN missatger en les biòpsies de teixit tumoral disponibles de la cohort, així com les corresponents vies o signatures que afecten l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6.

5.2.1 Biòpsia líquida: ADN tumoral circulant (ctDNA)

El potencial benefici i l'aplicació de la biòpsia líquida en càncer de mama encara està en desenvolupament, tot i que múltiples treballs ja han abordat la seva utilitat en diferents situacions (195). Entre les principals oportunitats que ofereix la biòpsia líquida en tumors sòlids, estarien: i) la detecció assequible (sang) de mutacions potencialment tractables que permetessin escollir un tractament dirigit, ii) la monitorització de la resposta al tractament a través de l'evolució del percentatge de mutació detectada, iii) la possible detecció precoç de recidives durant els seguiments de les pacients en controls i iv) la valoració més exhaustiva del pronòstic segons la presència de mutacions concretes.

En el context del CMM, reconèixer diferents biomarcadors en cada línia de teràpia permetria dissenyar una seqüenciació de tractaments més personalitzada per a cada pacient segons la presència de mutacions de resistència o de sensibilitat a un fàrmac en concret. A més, el ctDNA ofereix la possibilitat de conèixer l'heterogeneïtat tumoral a través d'una extracció sanguínia, ja que permet recollir les mutacions de les poblacions de cèl·lules tumorals independentment de la seva localització.

En el nostre treball, l'anàlisi del ctDNA es va realitzar amb el panell GuardantOMNI™ en 49 pacients en mostres basals (abans d'inici el iCDK4/6). Aquest panell permet identificar variants en el número de còpies o alteracions d'un únic nucleòtid en 500 gens (<https://www.guardanthealthamea.com/>). A més, també permet obtenir la càrrega mutacional del tumor (o TMB, de les sigles en anglès *tumor mutation burden*) concepte que també es tractarà en el següent apartat de la tesis. Les característiques clíniques de les 49 pacients amb dades de ctDNA eren semblants a la cohort completa de l'estudi, i no es van evidenciar diferències significatives en cap característica concreta: ni pel número de línia que van rebre el iCDK4/6, ni l'hormona acompanyant, sensibilitat hormonal, localització metastàtica, subtipus intrínsec o eficàcia clínica. Aquesta semblança també es traduïa amb una SLP i SG equiparable (Taula 11).

Taula 11. Característiques clíniques de la cohort de l'estudi complet i del subgrup amb ctDNA circulant avaluable.

	Cohort Completa (n=100)	Cohort ctDNA (n=49)	p
Número línies,			0.183
1L	60 (60%)	22 (44.9%)	
2L	13 (13%)	7 (14.3%)	
>2L	27 (27%)	20 (40.8%)	
HT combinada			0.487
Tamoxifè	9 (9%)	6 (12.2%)	
IA	53 (53%)	24 (29%)	
Fulvestrant	27 (27%)	19 (38.8%)	
Estat recaiguda M1			0.141
Debut <i>de novo</i>	14 (14%)	4 (8.2%)	
Recaiguda >12m	29 (29%)	12 (24.5%)	
Recaiguda <12m o HT CMM	34 (34%)	16 (32.7%)	
QT	23 (23%)	17 (34.7%)	
Localització M1			0.721
Visceral	44 (44%)	22 (44.9%)	
Hepàtica	26 (26%)	14 (28.6%)	
Només òssia	27 (27%)	10 (20.4%)	
Subtipus intrínsec per PAM 50			0.510
Luminal A	21 (21%)	11 (22.4%)	
Luminal B	26 (26%)	7 (14.3%)	
HER2-Enriched	6 (6%)	3 (6.1%)	
Basal	2 (2%)	0 (0%)	
No avaluat	45 (45%)	28 (57.1%)	
Eficàcia			0.587
Bona	42 (42%)	23 (43.9%)	
Mala	39 (39%)	26 (53.1%)	
No valorable	19 (19%)	0 (0%)	
Supervivència			
SLP (mesos)	13.7	11.3	0.241
SG (mesos)	42.8	42.8	0.871

*n: número de mostres, L: número de línia, HT: hormonoteràpia, IA: inhibidor d'aromatasa, M1: metàstasi, QT: quimioteràpia; SLP: supervivència lliure de progressió, SG: supervivència global, p: valor p segons el Test Chi-Quadrat per la comparació de les característiques i el test Log-Rank en l'anàlisi de supervivència, és considerat significatiu si <0.05

Per tal d'interpretar la informació genòmica obtinguda al ctDNA, es van classificar les variacions o mutacions de seqüència en funció del canvi introduït al gen corresponent. Primer, es van excloure aquelles mutacions silents o sinònimes, és a dir, que no provocaven cap canvi d'aminoàcid i que el seu paper biològic està entredit. Per tant, només es van considerar pel posterior anàlisi les mutacions que donaven lloc a un canvi d'aminoàcid (no sinònimes). Posteriorment, es van filtrar les mutacions puntuals somàtiques no sinònimes identificades, utilitzant la plataforma disponible online Cancer Genome Interpreter (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/analysis>)(196). Aquesta plataforma oberta i lliure, utilitza els algorismes de BoostDM i de OncodriveMut per classificar les mutacions segons l'impacte a nivell biològic en l'origen i evolució dels

tumors; anomenant-les mutacions *driver* si tenen un probable rol oncogènic i mutacions *passenger* si no tenen un rol conegut a nivell biològic (196, 197).

A les 49 pacients on es va realitzar biòpsia líquida, es van reconèixer 257 mutacions no sinònimes, en 97 gens diferents (Figura 21). En general, el ctDNA de cada pacient va permetre identificar múltiples mutacions *passenger* en cada pacient i en menor mesura també diverses mutacions tipus *driver* en el mateix pacient.

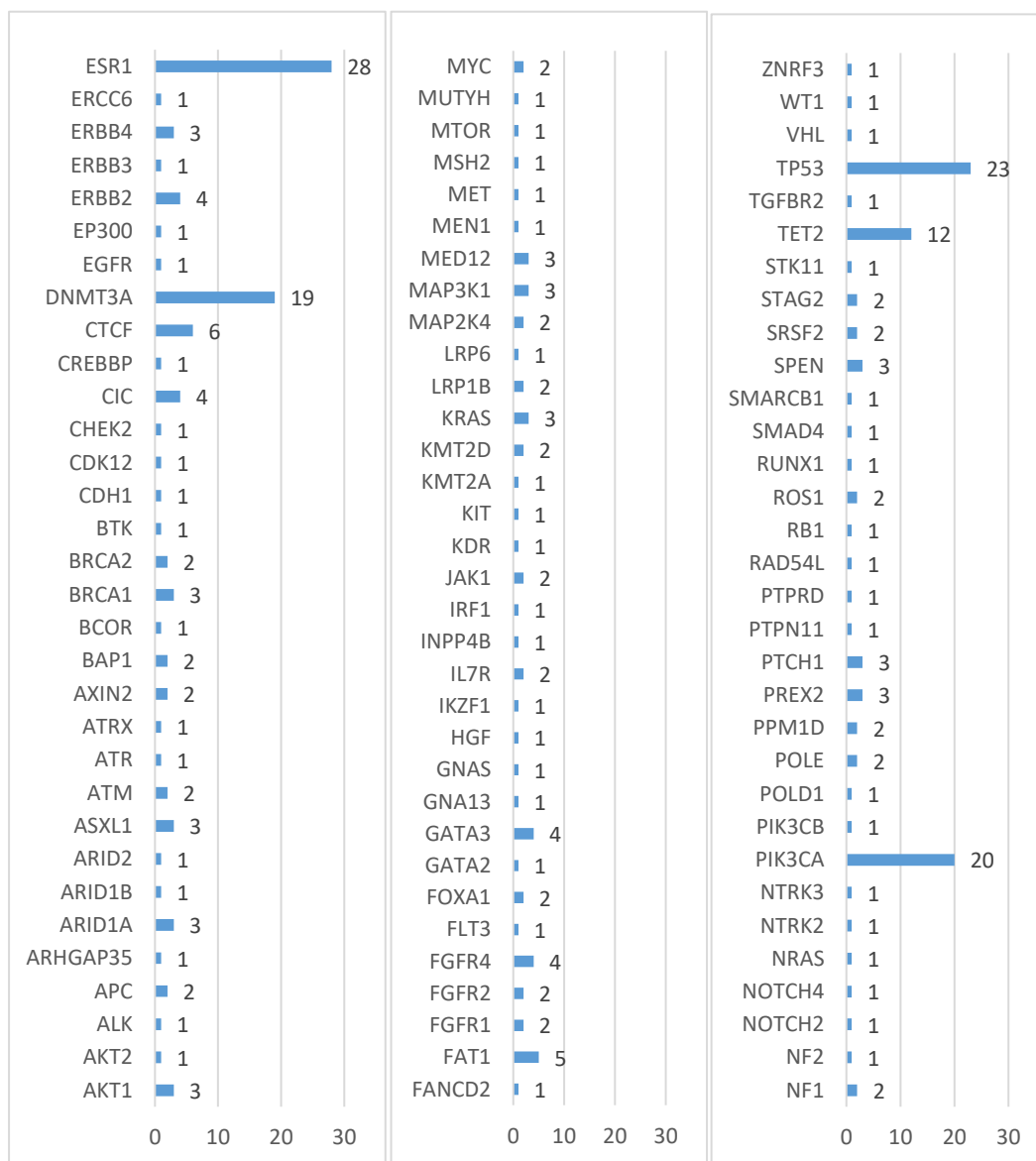


Figura 21. Número de mutacions *driver* totals trobades en cada gen en les 49 pacients on es va estudiar el ctDNA. Alguns pacients presentaven més d'una mutació al mateix gen.

Per tal de determinar si el número de canvis identificats en el ctDNA es correlacionava amb l'eficàcia al tractament amb iCDK4/6, es van comparar els grups d'eficàcia clínica descrits anteriorment. La mediana del número mutacions trobades en el grup de bona eficàcia, va ser lleugerament menor que en el grup de mala eficàcia, sense arribar a la significança estadística. Aquesta tendència també s'observava en el número de

mutacions tipus *driver* tant coneguts com predits, on el percentatge de més de 2 mutacions era de 17% i 52% en les pacients de bona eficàcia vs. al 26% i 65%, en el grup mala eficàcia (Taula 12).

Taula 12. Distribució de les mutacions segons la valoració de resposta al tractament amb iCDK4/6.

	Bona Eficàcia (n=23)	Mala Eficàcia (n=26)	p
Mutacions per pacient; mediana [IQR]	20 [16.75-23.25]	23 [15.5-26.5]	0.303
Passengers per pacient; mediana [IQR]	7 [4.75-8]	7 [4-8]	0.753
Drivers per pacient; mediana [IQR]	3 [2-6]	5 [2.5-6.5]	0.393
Drivers predits per pacient; mediana [IQR]	2.5 [1-5]	3[2-5]	0.341
0, n (%)	1 (4.3%)	1 (3.8%)	
1-2, n (%)	10 (43.4%)	8 (30.8%)	
>2, n (%)	12 (52.2%)	17 (65.4%)	

*n: número de pacients, IQR: interval interquartílic, p: valor p segons el test Chi-Quadrat o Kruskal-Wallis, considerat <0.05 el límit de la significança.

5.2.1.1 Càrrega tumoral mutacional (TMB)

La biòpsia líquida també permet detectar el número total de mutacions, concepte conegut com a càrrega tumoral mutacional (TMB, de l'anglès, *Tumor Mutational Burden*). El TMB ha estat utilitzat com a possible marcador predictiu de la resposta a la immunoteràpia amb ICIs com el pembrolizumab. L'estudi del TMB a sang perifèrica a través de la identificació de ctDNA on es cobreix àmpliament la seqüenciació de múltiples gens, s'ha correlacionat correctament amb el TMB del tumor sòlid estudiat per biòpsia (198, 199).

En concret, la plataforma Guardant utilitzada en aquest treball, basada en assajos del tipus Next Generation Sequencing (NGS) cobreix una extensió de l'ADN suficient per obtenir bona correlacions entre el TMB tumoral i el TMB detectat per ctDNA (200). El TMB es calcula a partir del total de mutacions no sinònimes per megabase, (excloent les mutacions sinònimes sense canvis d'aminoàcids) considerant un alt TMB la presència de més de 20 mutacions/megabase(201). En la nostra anàlisi, de les 49 pacients de la cohort del ctDNA, es va obtenir informació del TMB de 39 pacients, 5 d'aquestes es va considerar amb un TMB alt, i les 34 restants un TMB baix (Figura 22).

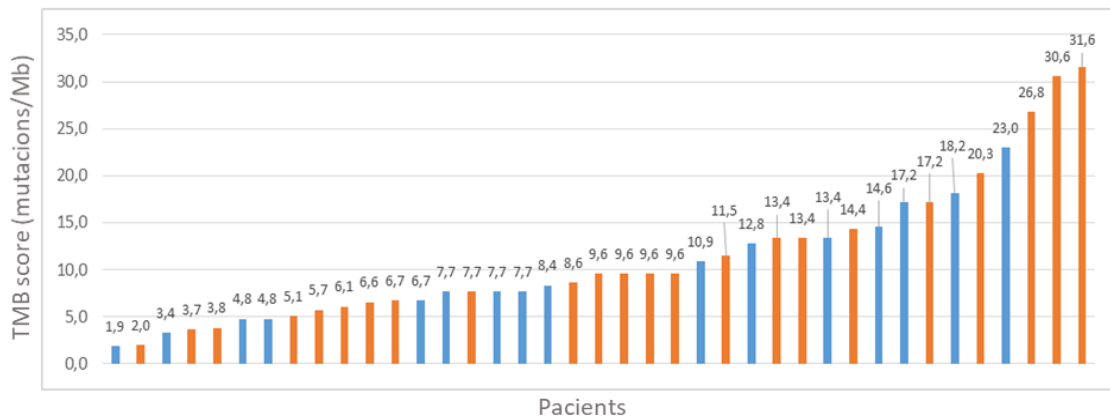


Figura 22. Histograma amb el TMB (mutacions/megabase). En color ●(blau) es representen els pacients considerats de bona eficàcia clínica (n=16), per contra, en color ●(taronja) es representen els pacients considerats de mala eficàcia clínica (n=23).

En general, les pacients amb un TMB alt es caracteritzaven per haver rebut iCDK4/6 en línies més avançades (80% dels casos amb TMB alt havien rebut 2 o més línies de tractament previ vs. el 38% de TMB baix). A més, els casos amb TMB alt, estaven enriquit amb pacients que havien rebut quimioteràpia prèvia per a malaltia metastàtica. Aquestes diferències, però, no eren significatives, probablement degut al número reduït de pacients dins el grup de TMB alt (n=5), que va limitar el poder estadístic de les comparacions (Taula 13).

Taula 13. Característiques de les pacients segons el TMB.

	TMB (n=39)	TMB baix (n=34)	TMB alt (n=5)	p
Edat Mediana [IQR]	62.1 [49.0;67.8]	62.1 [48.4;68.6]	62.1 [61.8;64.7]	0.919
Número de línia, n (%):				0.197
1	16 (41.0%)	15 (44.1%)	1 (20.0%)	
2	6 (15.4%)	6 (17.6%)	0 (0.0%)	
> 2	17 (43.6%)	13 (38.2%)	4 (80.0%)	
Sensibilitat hormonal, n (%):				0.159
Debut metastàtic de novo.	2 (5.1%)	2 (5.9%)	0 (0%)	
1L i recaiguda >12m post HT.	8 (20.5%)	8 (23.5%)	0 (0%)	
2L o recaiguda en adjuvència o <12m.	12 (30.8%)	11 (32.4%)	1 (20%)	
>2L línia metastàtica	17 (43.6%)	13 (38.2%)	4 (80%)	
Eficàcia clínica				0.306
Bona eficàcia	16 (41.0%)	15 (44.1%)	1 (20%)	
Mala eficàcia	23 (59.0%)	19 (55.9%)	4 (80%)	
Quimioteràpia prèvia per M1, n (%)				0.060
Si	23 (58.9%)	22 (64.7%)	1 (20%)	
No	16 (41.1%)	12 (35.3%)	4 (80%)	

*n=número de pacients; TMB: tumor mutation burden o càrrega mutacional IQR= interval interquartílic; L= línia, M1= metastasi, IHQ: immunohistoquímics, p: valor p del test estadístic Chi Quadrat o Kruskal Wallis, considerat significatiu si <0.05.

Posteriorment, es va avaluar l'impacte del TMB tant en la SLP com en SG. Les pacients amb un TMB més alt, tenien una tendència a una reducció en la SLP, amb una mediana de 5 mesos en comparació als 10,4 mesos de les pacients amb les pacients amb TMB baix. Aquest impacte també s'observava en la SG, on la diferència en supervivència entre els dos grups va ser de 15 mesos. Aquesta tendència no aconseguia la significança estadística probablement en relació al reduït nombre de pacients en la branca de TMB alt (Figura 23).

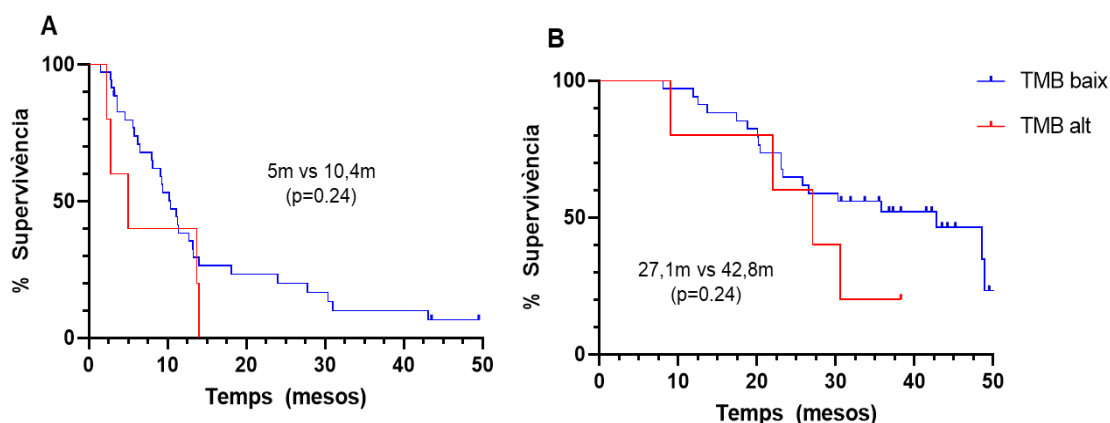


Figura 23. Anàlisi de supervivència en funció del nivell de TMB. Impacte del valor de TMB en SLP (A) i SG (B). m:mesos; p: valor p calculat segons el test Log-Rank.

5.2.1.2 Descripció de les mutacions puntuals identificades en ctDNA

Seguidament, vàrem avaluar aquells gens els quals la freqüència de mutacions *driver* era superior al 4% de les pacients d'estudi (Figura 24A). Els 5 gens on es van identificar mutacions amb major freqüència van ser *ESR1* (36% de les pacients), *PIK3CA* i *DNMT3A* (32% de les pacients), *TP53* (28% de les pacients) i *TET2* (22% de les pacients). D'altra banda, en 21 pacients disposaven de informació sobre el subtipus intrínsec per PAM50 i ctDNA, i per tant, es va poder estudiar la relació entre la presència de mutacions en els gens més freqüents i els subtipus intrínsecs per PAM50. Així, d'aquests 21 pacients, 11 (52%) es classificaven com a tumors luminal A, 7 (33%) com a luminal B i 3 (14%) com a HER-2 *enriched*. Els tumors classificats com a luminal A presentaven una freqüència superior de mutacions en *PIK3CA* (50%) i *TET2* (40%), en comparació a la resta de subtipus, els quals no presentaven mutacions en *TET2* i menor freqüència de mutacions de *PIK3CA* (20-30%). D'altra banda, els tumors classificats com a luminal B presentaven també una freqüència inferior de mutacions al gen *DNMT3A*, per sota del 20%, mentre que en el cas dels tumors luminal A i HER-2 *enriched* aquesta era del voltant del 30%. Per contra, la freqüència de mutacions en els altres gens era més semblant entre els diferents subtipus, essent al voltant del 30% per *ESR1* i al voltant del 40% per *TP53* en tots els casos (Figura 24B).

Altrament, estratificant les pacients segons el grup de bona o mala eficàcia clínica, es mantenia la distribució de les mutacions entre els dos grups, sense identificar diferències estadísticament significatives ($p=0.666$, Figura 24C). Finalment, analitzant la distribució i la detecció sincrònica de mutacions en aquests 5 gens, es va observar que *ESR1* fou el que més freqüentment es va trobar aïllat de forma individual (16% de les 49 pacients), en cas contrari, les mutacions en *TET2* es presentaven de forma única només en el 2% de les 49 pacients (Figura 24D).

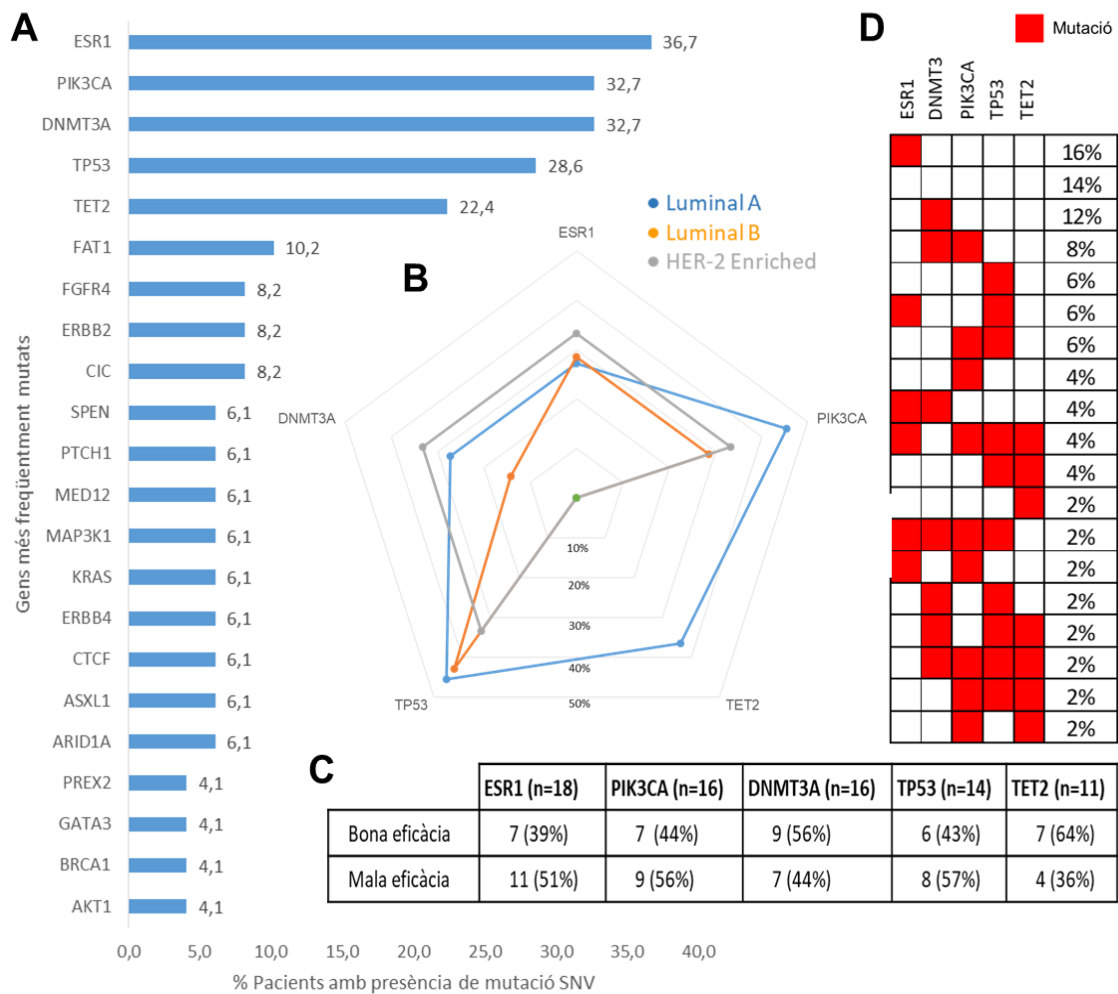


Figura 24. Distribució de gens mutats (>4%) en les 49 pacients on s'han identificat mutacions classificades com a *driver* al ctDNA. (A) Freqüència relativa de gens on s'han identificat mutacions, ordenats de major a menor. En aquells casos on s'ha observat més d'una mutació al mateix gen en un sol pacient, només s'ha comptabilitzat una vegada. (B) Les mutacions més freqüents i la seva distribució segons els subtipus intrínsecs. (C) Les mutacions més freqüents i la seva distribució segons bona d'eficàcia (n=23) i mala eficàcia (n=26). (D) Coexistència de mutacions en els gens més freqüentment mutats i el seu % de mutacions sincròniques en la cohort de 49 pacients.

La identificació de mutacions tumorals en determinats gens, ja sigui a partir del mateix tumor o del ctDNA, és de gran interès ja que pot donar informació rellevant sobre

resistències primàries o adquirides, i potser aportar informació clau pel disseny d'estratègies terapèutiques. Així doncs, seguidament, a partir dels gens mutats en una freqüència superior al 4% en la nostra estudi (Figura 24A), es va prosseguir a estudiar el seu impacte pronòstic, valorant la seva influència en la SLP i la SG.

5.2.1.3 Impacte pronòstic de supervivència de la presència de les mutacions més freqüents

Avaluant l'impacte de les mutacions sobre la SLP, només en 4 dels gens, *KRAS*, *FGFR4*, *PIK3CA* i *ESR1* es va observar un impacte significatiu en supervivència en alguna situació clínica. Concretament, les pacients amb mutacions a *KRAS* o *FGFR4* presentaven una reducció en la SLP. Així doncs, la mutació al gen *KRAS* reduïa la SLP fins a 3.7 mesos, en comparació als 11.7 mesos de les pacients que no presentaven la mutació (Figura 25A). Respecte a la presència de mutacions en el gen *FGFR4*, es van observar en 4 pacients (8.2%), relacionant-se també amb una reducció significativa de la SLP (3.9 vs. 11.6 mesos) segons la presència de la mutació (Figura 25B).

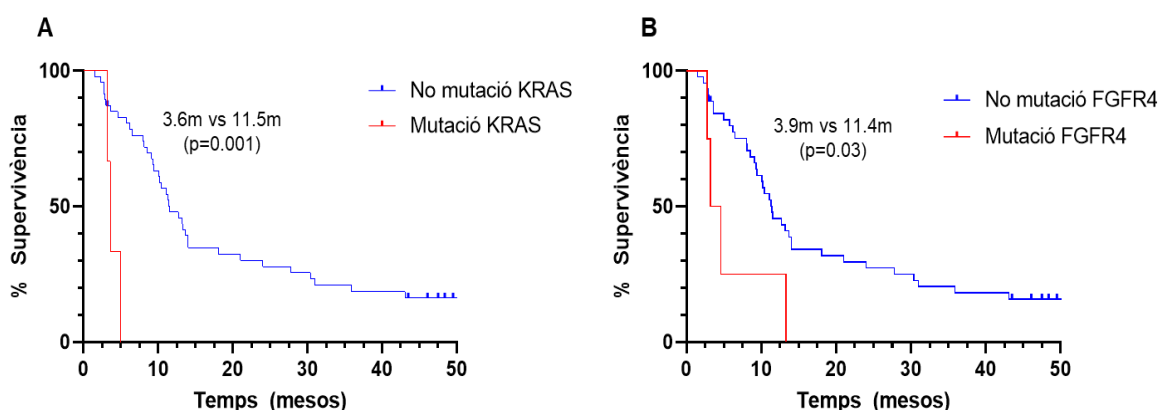


Figura 25. Supervivència lliure de progressió segons la presència de mutacions driver als gens *KRAS* i *FGFR4*. A) Corbes de SLP de les pacients amb mutacions a *KRAS* (n=3) en vermell i les pacients sense mutacions a *KRAS* (n=46) en blau. B) Corbes de SLP de les pacients amb mutacions de *FGFR4* (n=4) en vermell i les pacients sense mutacions a *FGFR4* (n=45) en blau. Es mostren les corbes de supervivència per Kaplan-Meier en mesos (m) i es comparen estadísticament utilitzant el test Log-Rank (considerant significatiu si <0.05).

Les altres mutacions amb impacte sobre la SLP en algun context clínic, van ser *PIK3CA* que s'observava en el 32% de les pacients; i *ESR1*, la més freqüent de la sèrie, amb un 36% de les pacients. De les 49 pacients amb informació per a ctDNA en primera línia, el 50% (11 pacients) presentaven mutacions a *PIK3CA*.

La presència de mutacions de *PIK3CA* en primera línia, es va associar a una a menor SLP en comparació al grup sense mutació d'aquest gen (Figura

26A). Centrant-nos amb l'impacte sobre SLP, la mutació de ESR1 es va també s'associava a una reducció de la SLP, 12.1 mesos sense mutació vs. 10.4 mesos en cas de presència de mutació, diferències estadísticament significatives (Figura 26B).

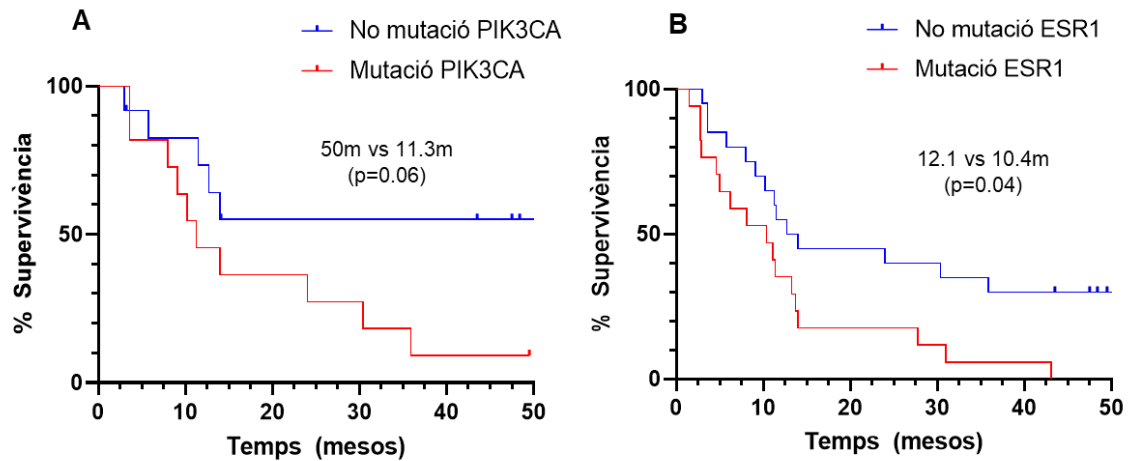


Figura 26. Supervivència lliure de progressió (SLP) segons mutacions als gens *PIK3CA* i *ESR1*. (A) SLP en pacients amb mutacions a *PIK3CA* que havien rebut tractament amb iCDK4/6 en primera línia (n=22). (B) SLP en pacient amb mutació de *ESR1* en la cohort de ctDNA. Es mostren les corbes de supervivència per Kaplan-Meier en mesos (m) i es comparen estadísticament utilitzant el test Log-Rank (considerant significatiu si <0.05).

Per acabar, es va estudiar l'impacte de les troballes en ctDNA en la SG de les pacients. Cal destacar que les tendències observades a la SLP es van mantenir en la SG. Així doncs, mutacions a *KRAS* i *FGFR4*, reduïen de forma significativa la SG, amb medianes de 23 i 22.5 mesos en cas de presència de mutacions, vs. 48.6 mesos sense mutacions (p=0.03 i p=0.003, respectivament Figura 27A i 27B).

En el cas de les mutacions a *PIK3CA* s'observava una tendència semblant, és a dir, menor SG en el grup amb mutacions a *PIK3CA*, comparat amb el grup sense mutacions, tot i que en aquest últim no s'havia arribat a la mediana de SG com a conseqüència del temps limitat de seguiment de l'estudi (30.6m vs. NA, p=0,13; Figura 27C). Finalment, la presència de mutacions en *ESR1* es relacionava també amb una menor mediana de SG, en comparació al grup sense mutacions (27.1 mesos vs. 48.6 mesos respectivament, p=0.03; Figura 27D).

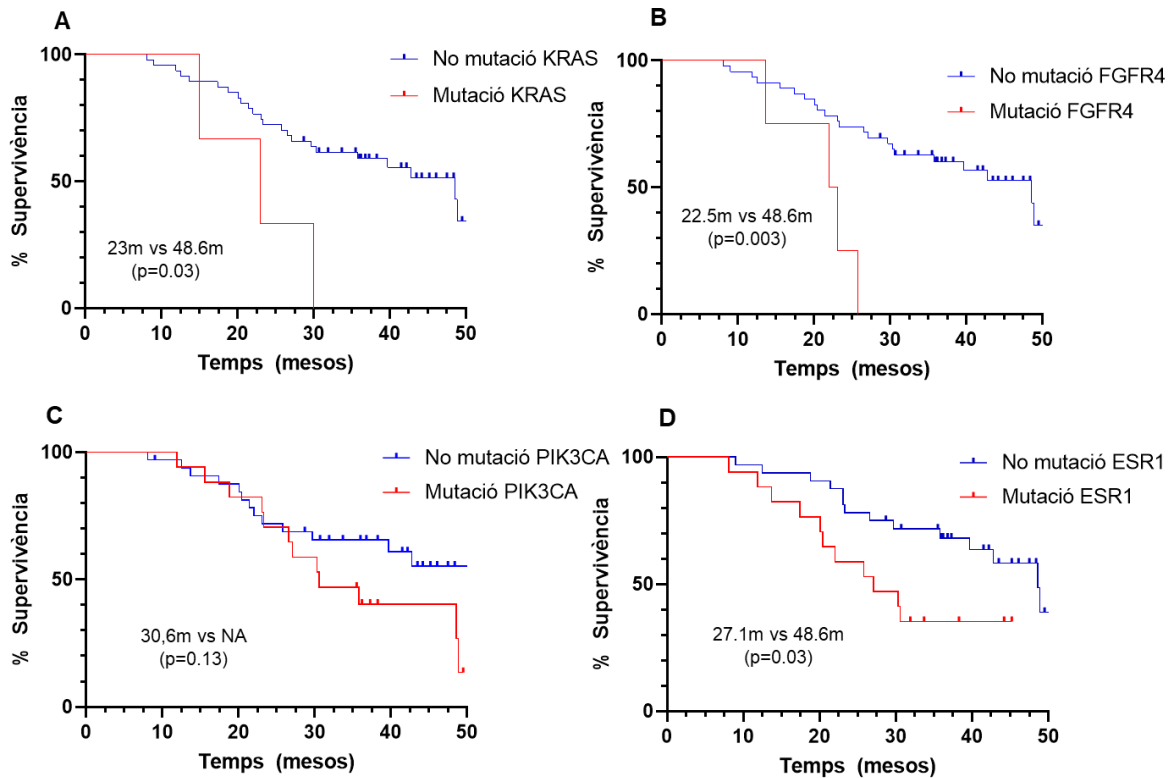


Figura 27. Supervivència global segons les mutacions amb impacte sobre SLP en les pacients amb estudi de ctDNA (n=49). (A) SG de les pacient segons la presència de mutacions a *KRAS*. (B) SG de les pacients segons la presència de mutacions a *FGFR4*. (C) SG de les pacients segons la presència de mutacions a *PIK3CA*. (D) SG de les pacients segons la presència de mutacions a *ESR1*.

En resum, l'estudi de mutacions al ctDNA, possibilita la caracterització d'alguns paràmetres moleculars que permeten identificar pacients amb pitjor pronòstic. En primer lloc, les pacients amb TMB alts, degut probablement als tractaments previs i a una evolució més llarga del CMM i l'adquisició de resistències; presenten una tendència a una menor SLP i SG. Així mateix, algunes mutacions puntuals en determinats gens com *KRAS* i *FGFR4*, també presenten estadísticament menor SLP i SG; i mutacions en gens com *PIK3CA* i *ESR1*, descrits com a resistència teràpia endocrina també s'associen a una menor SLP.

Tot i així, aquests paràmetres ens expliquen una proporció petita de l'eficàcia dels iCDK4/6. Per tant, cal aprofundir en l'estudi de la complexitat tumoral i la interacció entre el tumor i l'hoste al TME, fet que permetria entendre millor els mecanismes de resistència o sensibilitat als iCDK4/6. Així doncs, en el següent capítol ens centrarem en la descripció molecular mitjançant expressió gènica en les biòpsies tumorals, on també s'estudia al TME. A més, amb els resultats actuals del ctDNA, també podem concloure, que els grups definits com a bona i mala eficàcia, són robustos per a l'avaluació de marcadors biològics, ja que són comparables tan des del punt de vista clínic com des

del punt de vista de les alteracions genètiques detectades per ctDNA (en referència al TMB i a la presència de mutacions amb un valor pronòstic).

5.2.2 Teixit tumoral: Expressió d'ARN en biòpsies de tumor sòlid

La biòpsia tumoral permet estudiar les característiques immunohistoquímiques del tumor i analitzar també part del TME. De la cohort global de 100 pacients incloses en l'estudi, es van poder obtenir 63 mostres (39 provinents del tumor primari i 24 de la metastasi) de 55 pacients diferents, en les quals es va realitzar el panell BC360™, considerant la mostra metastàtica en cas de tenir mostra parellada. Així doncs, finalment vam estudiar 31 mostres d'origen del tumor primari i 24 de biòpsies metastàtiques.

Inicialment, es va avaluar la representativitat d'aquesta cohort dins la cohort global, sense trobar diferències significatives pel que fa a les característiques clíniques, incloent distribució de línia de tractament amb iCDK4/6, sensibilitat hormonal, localitzacions metastàtiques i variables de supervivència: SLP o SG (Taula14).

Taula 14. Característiques clíniques de la cohort on s'ha realitzat el panell BC360™ de Nanostring™ en comparació amb la cohort clínica completa.

	Cohort Completa (n=100)	Cohort BC360™ (n=55)	p
Número línies, n (%)			0.468
1L	60 (60%)	37 (67.3%)	
2L	13 (13%)	8 (14.5%)	
>2L	27 (27%)	10 (18.2%)	
HT combinada, n (%)			0.572
Tamoxifè	9 (9%)	6 (10.9%)	
IA	53 (53%)	28 (50.9%)	
Fulvestrant	27 (27%)	21 (38.2%)	
Estat recaiguda M1, n (%)			0.833
Debut <i>de novo</i>	14 (14%)	9 (16.4%)	
Recaiguda >12m	29 (29%)	17 (30.9%)	
Recaiguda <12m o HT CMM	34 (34%)	20 (36.4%)	
QT	23 (23%)	9 (16.4%)	
Localització M1, n (%)			0.862
Visceral	44 (44%)	24 (43.6%)	
Hepàtica	26 (26%)	12 (21.8%)	
Només òssia	27 (27%)	16 (29.1%)	
Eficàcia clínica, n (%)			0.969
Bona eficàcia	42 (42%)	23 (42%)	
Mala eficàcia	39 (39%)	21 (38%)	
No valorat	19 (19%)	11 (20%)	
Supervivència (mesos)			
SLP	13.7m	16m	0.430
SG	42.8m	48.9m	0.770

*n= número de mostra; L=línia, IA=inhibidor d'aromatasa; M1=metàstasi; m=mesos; QT= quimioteràpia; SLP supervivència lliure de progressió; SG= supervivència global; p= valor p segons el test de Chi-Quadrat o test Log-Rank per la supervivència; es considera <0.05 la significança.

5.2.1 Gens relacionats amb l'eficàcia del inhibidors de CDK 4/6

El panell de BC360™ de Nanostring® avalua l'expressió gènica de 776 gens associats al càncer de mama, tant a nivell d'expressió de cada gen individual com en funció de vies moleculars relacionades amb el càncer de mama o el sistema immunològic.

En primer lloc, es van seleccionar aquells gens amb una diferència d'expressió entre el grup de bona i mala eficàcia (considerant el punt de tall $p < 0.1$). Utilitzant els gens que complien aquest requisit, es va prosseguir a la realització d'un heatmap no supervisat amb l'expressió de cada gent en les 55 pacient, on es van observar 2 clústers de pacients, amb cert enriquiment en funció de la valoració de resposta segons alguns clústers de gens (Figura 28A).

Per tal d'identificar els gens diferentment expressats en funció de l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6, es van analitzar les expressions de cada gen entre els dos grups d'eficàcia. En aquest anàlisi, es van considerar significatius si la diferència d'expressió valorada en log2 era superior 0.6 i el valor $p < 0.05$ (equivalent a $-\log_{10}$ de 0.05, 1.30) (Figura 28B).

Així, es va observar una sobre-representació de gens relacionats amb la resposta immune (4 de 10) entre aquells que presenten major expressió en el grup de mala eficàcia, com son: IL20RB, CCL7, ISG15 i EREG. En concret, IL20RB és el gen del receptor de la subunitat beta de IL20, relacionat amb la regulació del sistema immunològic amb una infiltració intratumoral immunosupressora i un pitjor pronòstic (202). En la mateixa direcció, el gen inductor de l'estimulació d'interferó com ISG15, que també esta induït pel propi interferó tipus I, associat a una infiltració crònica i una major expressió de FOXP3 i CD68 promovent un microambient immuno-tolerant (203, 204). En una situació semblant, el gen CCL7 que transcriu la quimosina MCP3 que mobilitza els macròfags amb fenotip semblant al tipus M2 immunosupressors i facilitat la disseminació metastàtica en tumors de CM triple negatius (205, 206). Finalment, el gen EREG, de la família del EGFR, també considerat recentment un gen immuno-oncològic, i que es relaciona amb una major infiltració de cèl·lules immunològiques exhaustes (207).

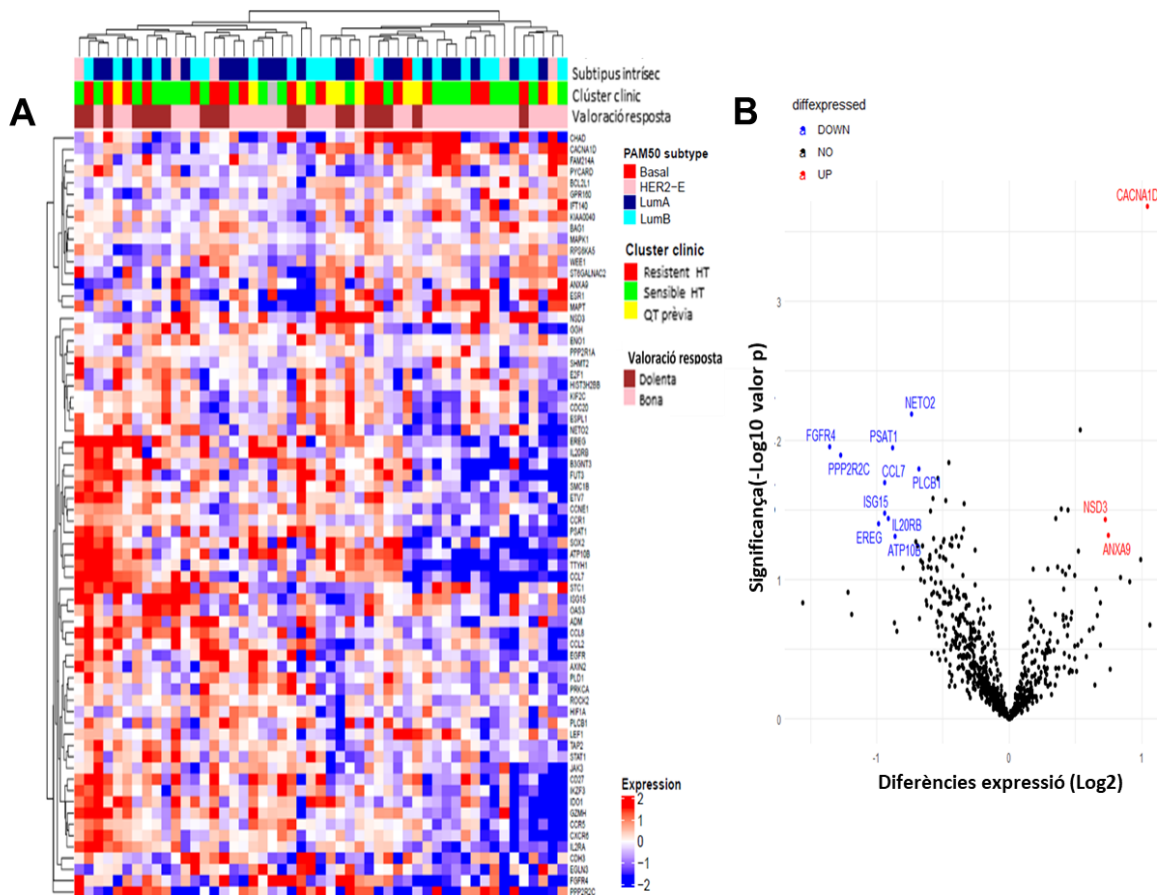


Figura 28. Impacte dels gens estudiats en el BC360. A) Mapa de calor o heatmap no supervisat dels gens més significatius, associats a les característiques de les pacients (subtipus intrínsec, clúster clínic i eficàcia al tractament de totes les mostres estudiades per expressió d'ARN, n=55). B) Gràfica tipu volcà o Volcano plot dels gens diferentment expressats en funció dels grups d'eficàcia clínica al tractament amb iCDK4/6. Els gens en vermell són els significativament presenten una major expressió en el grup de bona resposta en comparació amb els de mala resposta. Els gens representats en blau, es troben menys expressats en el grup de bona resposta.

Per tant, les diferències observades a nivell d'expressió gènica segons l'eficàcia dels iCDK4/6 suggereixen una sobre-expressió d'un seguit de gens relacionats la via de control del sistema immunològic en el grup de mala eficàcia clínica, processos que podrien està relacionat amb la resistència als iCDK4/6 i es caldria valorar l'opció d'estratègies seqüencials o combinades amb els iCDK4/6 per revertir-la.

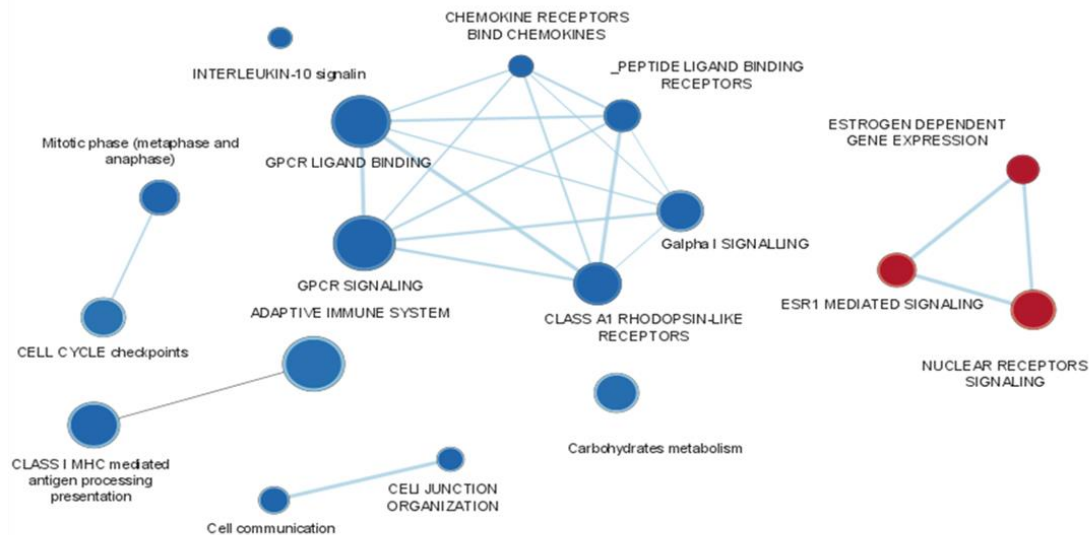
5.2.2.2 Vies moleculars o signatures relacionades amb el benefici del tractament

Per tal d'identificar les vies biològiques o processos cel·lulars implicats en l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6, es va realitzar l'anàlisi comparatiu tenint en compte el conjunt de gens que es relacionaven funcionalment. Aquest tipus d'anàlisi es va realitzar mitjançant dues aproximacions diferents:

- *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), basat amb la base de dades Reactome.
- Signatures gèniques definides per Nanostring del panell BC360™.

Estudi d'enriquiment de gens (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)), basat amb la base de dades Reactome.

Utilitzant l'eina bioinformàtica GSEA es van identificar aquells grups de gens significativament sobre-expressat o infra-expressat en el grup de bona i mala eficàcia. Així, a partir de les dades d'expressió gènica individual es van identificar 17 vies diferentment expressades entre els dos grups. En el grup de bona eficàcia, s'observava principalment un increment en les vies relacionades amb l'expressió i la senyalització dels estrògens (nodes vermells, Figura 29). Per altra banda, les vies més sobreexpressades en el grup de mala resposta, es relacionaven amb processos del sistema immune com la presentació d'antígens, del sistema immunològic adaptatiu, de la senyalització de IL-10, receptors de quimosines o senyalització GPCR (en anglès "G-protein-coupled receptor") que actua sobre la mobilització de leucòcits (nodes blaus, Figura 29).



Node		Edge	
Size	<p>200 ← → 5 Gene set size</p>	Color	<p>-2 0 2 NES</p>
Size	<p>↑ ↓ Overlap size</p>		

Figura 29. Mapa d'enriquiment del conjunt de gens de la base Reactome de vies significativament enriquides. En blau es mostres les vies menys expressades en el grup de bona resposta i en vermell, les sobre-expressades. El tamany de cada node representa el número de gens relacionats amb la via molecular.

Signatures gèniques definides al BC360™.

El propi panell de BC360™ defineix diferents vies moleculars o signatures on s'analitzen de forma conjunta l'expressió de gens amb funcionalitat semblant, dels quals se n'ha descrit en major o menor mesura el seu impacte en la biologia del càncer de mama. Es va comparar la mediana d'expressió entre els grups de bona i mala eficàcia. De manera semblant als resultats obtinguts amb el GSEA, les vies més expressades en el grup de bona eficàcia estaven relacionades amb la diferenciació o la senyalització de la via dels estrògens (ER.SIGNALING, ESR1). També, la signatura de Rb1, cabdal en el control del cicle cel·lular i per a la funció del complex CDK4/6-CiclinaD, es va identificar com a sobre-expressada en el grup de bona eficàcia.

Per altra banda, les pacients amb mala eficàcia, presentaven una sobre-expressió de 14 signatures, on majoritàriament (10 de les 14) estaven relacionades amb la disfunció del sistema immunològic; tals com: signatura IDO1, signatura Treg, signatura de citocines inflamatòries (Inflammatory chemokines), signatura TIS ("tumor infiltration signature), signatura TIGIT, signatura IFN gamma, Macrofàgs (Macrophages), signatura PD-1 i signatures d'infiltració de NK i CD8 (signatura citotoxicity i signatura citotoxic cells).

Altres signatures sobre-expressades en el grup de mala resposta, però no associades amb el sistema immunològic eren: i) signatura SOX2, relacionada amb la capacitat de disseminació metastàtica i proliferació cel·lular, ii) la signatura d'hipòxia, iii) la signatura HRD (reparació de la recombinació homòloga) que prediu la sensibilitat a inhibidors de la reparació del DNA i iv) la signatura BCp53 que es correlaciona amb l'estat mutacional de p53, també s'han vist més expressades en el grup de mala eficàcia (figura 30).

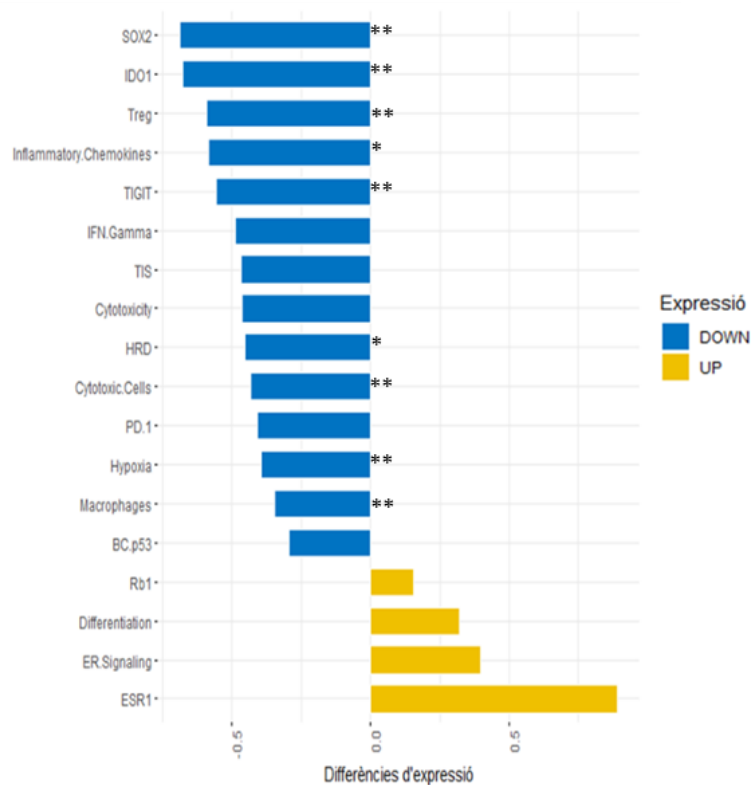


Figura 30. Gràfic de barres amb l'expressió de les signatures definides per Nanostring®, en groc es mostren les sobre-expressades en el grup de bona eficàcia i en blau les infra-expressades. Es presenten aquelles signatures amb una diferència (>0.3 log2) entre els de bona i mala eficàcia. Es mostra ** p<0.05 i *p<0.1 segons la significança amb el test Kruskal-Wallis.

Així doncs, múltiples signatures relacionades amb el sistema immunològic són les que de forma més significativa es van identificar sobre-expressades entre aquelles pacients amb una eficàcia limitada als i CDK4/6, suggerint de nou, un paper rellevant de la funció immune en l'eficàcia del tractament.

5.2.2.3 Anàlisi de la supervivència en funció de les signatures implementades al BC360™

Per tal d'aprofundir en l'impacte de les diferències observades en l'expressió gènica en el tumors segons l'eficàcia clínica al iCDK4/6, es va realitzar un anàlisi de supervivència tenint en compte les signatures incloses en el BC360™. Així, es van seleccionar les signatures biològiques més expressades en el grup de mala eficàcia descrites a l'apartat anterior (figura 30) per analitzar-ne l'impacte la SLP i la SG.

Per a l'anàlisi de supervivència es va haver de transformar cada signatura, inicialment variables quantitatives, en una variable dicotòmica (qualitativa) com alta expressió o baixa expressió, per tal d'obtenir dues poblacions comparables. Tal i com hem vist al primer capítol de la tesi, la línia de tractament en la qual les pacients rebien el iCDK4/6

tenia un impacte significatiu en SLP (Figura 12), per això l'anàlisi de supervivència es va realitzar realitzat en la cohort sencera (n=55), i es va estratificar les pacients en funció del número de línia, primera línia (n=37) o línies posteriors (n=18) (Taula 15).

Taula 15. Anàlisi de supervivència univariat en diferents situacions: la cohort completa del BC360™ (n=55), només les pacients en primera línia (n=37) i línies posteriors (n=18). Es mostra el valor de la HR amb IC (95%) i el valor p del grup amb baixa expressió.

Signatura	Cohort completa (n=55)		Primera línia (n=37)		Segona línia (n=18)	
	HR (IC95)	p	HR(IC95)	p	HR(IC95)	p
TIS	0.44 (0.22-0.90)	0.025	0.37 (0.14-0.97)	0.042	0.07 (0.01-0.59)	0.014
BC.p53	0.42 (0.20-0.86)	0.018	0.13 (0.04-0.44)	0.001	0.39 (0.12-1.24)	0.110
Cytotoxic.Cells	0.40 (0.16-0.99)	0.048	1.91 (0.72-5.03)	0.192	0.07 (0.01-0.59)	0.014
Cytotoxicity	0.42 (0.20-0.88)	0.022	0.46 (0.16-1.31)	0.147	0.08 (0.01-0.64)	0.017
HRD	0.35 (0.17-0.71)	0.004	0.38 (0.15-1.00)	0.049	0.29 (0.06-1.33)	0.111
Hypoxia	0.29 (0.12-0.70)	0.005	1.90 (0.69-5.22)	0.214	0.04 (0.00-0.44)	0.008
IDO1	0.33 (0.15-0.73)	0.006	0.39 (0.14-1.05)	0.063	0.18 (0.04-0.84)	0.029
IFN.Gamma	0.30 (0.14-0.64)	0.002	0.18 (0.06-0.56)	0.003	0.17 (0.02-1.33)	0.090
Inflammatory Chemokines	0.45 (0.22-0.92)	0.028	0.30 (0.11-0.86)	0.025	0.33 (0.10-1.10)	0.072
Macrophages	0.52 (0.25-1.11)	0.092	0.10 (0.07-0.78)	0.028	0.16 (0.03-0.74)	0.019
PD.1	1.71 (0.76-3.82)	0.194	4.87 (1.39-6.97)	0.013	0.26 (0.07-0.95)	0.042
SOX2	0.39 (0.19-0.81)	0.012	0.40 (0.09-1.78)	0.229	0.00 (0-NC)	0.999
TIGIT	0.48 (0.23-0.99)	0.046	0.41 (0.15-1.13)	0.084	0.30 (0.08-1.12)	0.073
Treg	0.38 (0.17-0.86)	0.020	0.20 (0.09-0.96)	0.043	0.33 (0.09-1.22)	0.098

*n= número de pacients; HR= hazard ratio; IC95= interval de confiança del 95%, p= valor p en l'anàlisi univariat de supervivència utilitzant la regressió de Cox. En negreta es mostren aquelles signatures significatives en primera línia en l'anàlisi univariat.

Per seguir estudiant l'impacte en la SLP de les signatures i considerant que el número de línia i els tractaments previs tenen un pes molt rellevant en aquesta SLP, es va homogeneïtzar la cohort seleccionant només les pacients en primera línia. D'aquesta manera, disminuïem els biaixos en la comprensió dels resultats.

Així doncs, vam identificar 8 signatures on l'alta o baixa expressió, representava un impacte significatiu en la SLP segons el model de cox, eren les següents signatures: TIS, BCp53, HRD, IFN.Gamma, Inflammatory Chemokines Macrophages, PD-1 i Treg. Per verificar si l'impacte sobre la SLP d'aquesta signatures era independent entre elles,

es va prosseguir a l'anàlisi multivariat subseqüent, on vam observar que les signatures BC p53, IFN.Gamma, PD-1, TIS i Treg mentien una correlació significativa independent sobre la SLP (Figura 31). Així doncs, es va observar que la baixa expressió de les signatures BC p53, IFN.Gamma i Treg, atorgava de forma significativa i independent, una protecció a la progressió i permetia un major SLP. Per contra, una baixa expressió de signatures com PD-1 o TIS, representaven un factor de mal pronòstic i es reduïa la SLP en les pacients amb baixa expressió (Figura 31).

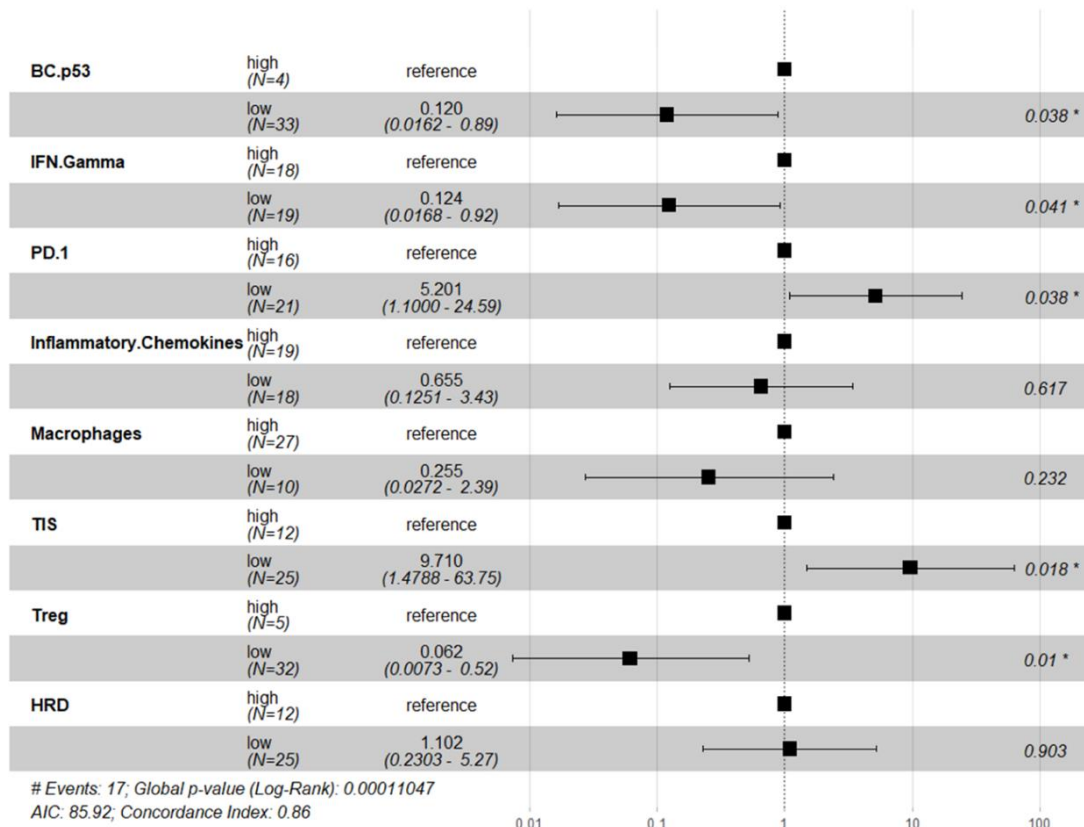


Figura 31. Anàlisi Multivariat de regressió de Cox de la SLP segons l'expressió de les signatures (alta vs. baixa expressió). Només s'han valorat els pacients en primera línia (n=37). *High: grup d'alta expressió (n=numero de pacients), Low: grup de baixa expressió (n=número de pacients), es mostra la HR (hazard ratio) i el IC (interval de confiança 95%) de cada HR, finalment es mostra el valor p del model cox considerant significatiu si p<0.05.

Finalment, es va aprofundir en l'estudi de la SLP per a les signatures que es van relacionar amb un pronòstic favorable o desfavorable independent en l'anàlisi multivariant de regressió de cox, comparant el grup d'alta i baixa expressió per a cadascuna de les signatures mitjançant corbes Kaplan Meier (Figura 32).

Així doncs, el grup amb alta expressió segons les signatures IFN.Gamma, TIS, BCp53 i Treg, obtenien una reducció significativa de la SLP en primera línia. Per contra, l'alta expressió de la signatura de PD-1 va concedir una protecció, i s'observava una major SLP en comparació amb les pacients amb de baixa expressió (Figura 32).

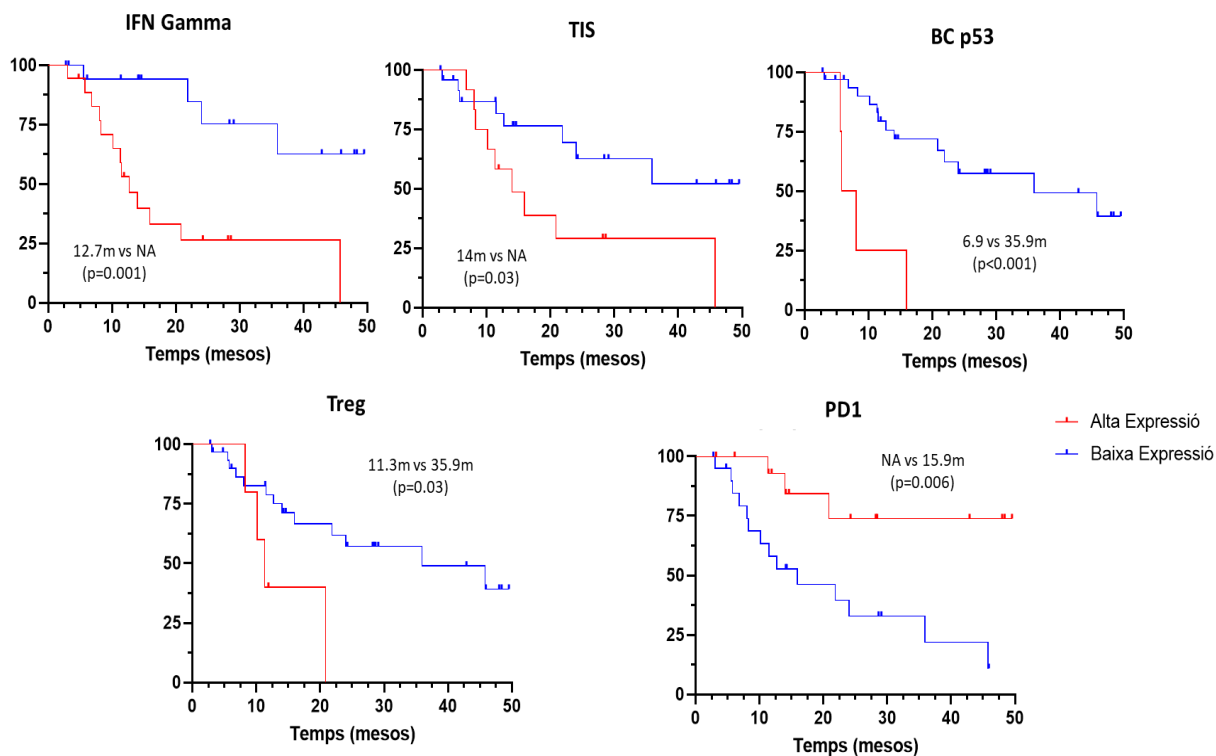


Figura 32. Corbes Kaplan-meier de la SLP en primera línia segons l'expressió (alta vs. baixa) de les diferents signatures. S'han seleccionat aquelles signatures amb impacte independent a l'anàlisi multivariat. Es presenta la SLP en mesos (m) i valors p segons el test Log-Rank.

Per obtenir una visió més completa de l'impacte pronòstic o predictiu de les signatures en la supervivència de les pacients, es va estudiar la SG d'aquestes 5 signatures en les pacients amb iCDK4/6 en primera línia. Tot i el temps de seguiment limitat de la cohort, en l'anàlisi multivariant de la SG es van observar resultats similars a la SLP. Així, en primera línia, les pacients amb baixa expressió de les signatures BCp53 i Treg, tenien, una SG més perllongada en comparació amb les pacients d'alta expressió.

En direcció contrària, la baixa expressió de la signatura TIS es correlacionava amb una pitjor SG en primera línia (Figura 33A). L'anàlisi de supervivència de les signatures de forma individual, només es va poder completar en el cas de la signatura Treg, degut a les limitacions en el temps de seguiment de la cohort, obtenint uns resultats significatius i comparables a la SLP d'aquesta signatura (Figura 33B).

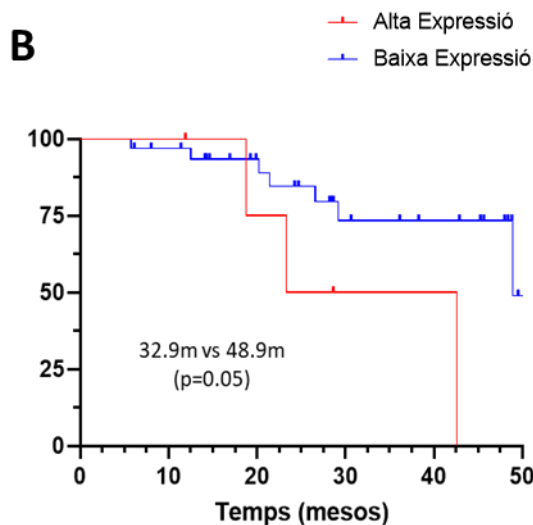
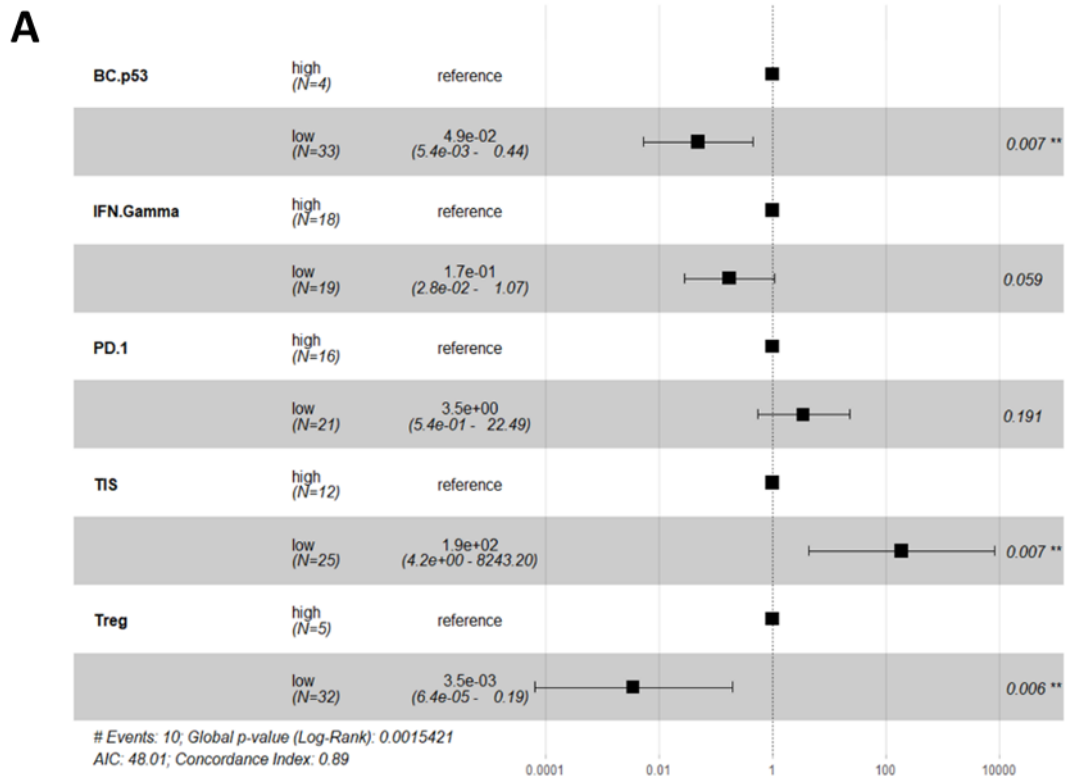


Figura 33. Anàlisi de supervivència de les pacients en primera línia (n=37).

(A) Anàlisi Multivariat de cox de la SG segons l'expressió de les signatures (alta vs. baixa expressió).

(B) Corbes de SG segons l'expressió alta o baixa de la signatura Treg. *High: alta expressió, low: baixa expressió, es mostra la HR (hazard ratio) i l'interval de confiança del 95%, m: mesos. L'anàlisi estadístic del valor p del model de Cox es considera significatiu si <0.05, i es mostra el valor p en la corba de supervivència utilitzant el test Log-Rank.

En definitiva, l'anàlisi de l'expressió gènica per ARN a nivell de la biòpsia tumoral, també assenyalava l'alteració i la disfunció del sistema immunològic com una via important per a l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6 en les pacients amb CMM RH+/HER2-. L'alta expressió de les signatures relacionades amb el sistema immunològic com interferó gamma, la signatura d'immunosupressió com la Treg i la signatura d'infiltració intra-tumoral com la TIS, a més de la baixa expressió de la signatura de PD-1, va identificar una població amb una menor SLP, fet que podria permetre proporcionar nous

enfocaments terapèutics relacionats amb canvis al sistema immunològic per revertir aquest pronòstic.

Davant la confirmació de la desregulació del sistema immunològic al microambient tumoral com a possible biomarcadors de l'eficàcia dels iCDK4/6, es va proposar identificar en sang perifèrica factors soluble o factors immunològics circulants que també permetessin predir l'eficàcia dels iCDK4/6. Aquesta proposta es presentarà en el següent capítol.

5.3 Factors solubles de sang perifèrica relacionats amb el sistema immunològic.

Una de les utilitats de la biòpsia líquida és que permet identificar diferents senyals circulants sanguinis estimuladors o inhibidors del sistema immunològic i fer-ne un seguiment de forma accessible. Aquests estímuls estant principalment classificats entre proteïnes solubles circulants com citocines, quimosines o altres proteïnes com són els punts de control immunològics solubles o checkpoint immunològics (en anglès, *immune checkpoint*). Aquestes proteïnes solubles permeten la comunicació intercel·lular entre el tumor i el sistema immunològic, i per tant, no només poden tenir una funció important a nivell tumoral promovent la angiogènesi, la transformació epiteli-mesenquimal i la metàstasi, sinó també poden provocar canvis de la configuració del microambient tumoral. A més, la biòpsia líquida, també permet estudiar i comprendre l'estat de les diferents cèl·lules circulants del sistema immunològic, i valorar tant la distribució relativa com la seva funció mitjançant la caracterització de l'expressió de diferents receptors que determinen la funcionalitat de cada població.

En el capítol anterior hem constatat la importància de la funció immune com a determinant de la resposta al tractament amb iCDK4/6, per tant, és necessari aprofundir en el coneixement dels determinants immunològics de les pacients per tal de comprendre quins mecanismes són necessaris per obtenir un benefici clínic als iCDK4/6. En el primer apartat d'aquest capítol, ens centrarem en l'estudi de la correlació entre la presència de factors solubles i *checkpoints* immunològics circulants i l'eficàcia clínica dels iCDK4/6.

En un segon apartat, ens focalitzarem en la caracterització fenotípica i funcional de les poblacions de cèl·lules immunes circulants més freqüents per tal de valorar el seu impacte en l'eficàcia clínica i supervivència associada al tractament amb iCDK4/6.

5.3.1 Factors solubles i *checkpoint* immunològics circulants basals previs a l'inici del tractament amb iCDK4/6.

L'estudi de citocines circulants es va poder realitzar en un total de 68 pacients a nivell basal, previ a l'inici del tractament. Aquestes 68 pacients, presentaven característiques clíniques similars a la cohort completa de 100 pacients incloses a tot l'estudi (Taula 16).

Taula 16. Característiques clíniques de la cohort de citocines (n=68), en comparació amb la cohort completa de l'estudi (n=100).

	Cohort Completa (n=100)	Cohort citocines (n=68)	p
Número línies, n(%)			0.952
1	60 (60%)	39 (57.4%)	
2	13 (13%)	9 (13.2%)	
>2	27 (27%)	20 (29.4%)	
HT combinada, n(%)			0.696
Tamoxifè	9 (9%)	6 (8.8%)	
IA	53 (53%)	37 (57.4%)	
Fulvestrant	27 (27%)	25 (36.8%)	
Estat recaiguda M1, n(%)			0.91
Debut <i>de novo</i>	14 (14%)	7 (10.3%)	
Recaiguda >12m	29 (29%)	20 (29.4%)	
Recaiguda <12m o HT CMM	34 (34%)	24 (35.3%)	
QT	23 (23%)	17 (25.0%)	
Localització M1, n(%)			0.98
Visceral	44 (44%)	31 (45.6%)	
Hepàtica	26 (26%)	18 (26.5%)	
Només òssia	27 (27%)	18 (26.5%)	
Subtipus intrínsec per PAM50, n(%)			0.93
Luminal A	21 (21%)	15 (22.1%)	
Luminal B	26 (26%)	15 (22.1%)	
HER2-Enriched	6 (6%)	4 (5.9%)	
Basal	2 (2%)	2 (2.9%)	
No avaluat	45 (45%)	32 (47.1%)	
Eficàcia clínica, n(%)			0.963
Bona	42 (51.8%)	35 (51.4%)	
Mala	39 (48.2%)	33 (48.6%)	
No valorat	19	0	
Supervivència			
SLP	13.7m	12.3m	0.6
SG	42.8m	42.8m	0.93

*n: número de mostra; L: línia, IA: inhibidor d'aromatasa; M1: metàstasi; m: mesos; HT: hormonoteràpia, CMM: càncer de mama metastàtic; SLP: supervivència lliure de progressió; SG: supervivència global; p: valor p segons el test de Chi-Quadrat o test Log-Rank (Mantel-Cox) per la supervivència i la significança es considera a partir de valors <0.05.

Per tal de determinar si l'estat inflamatori mesurat com la presència de certes citocines/quimosines en el torrent circulatori previ a l'inici del tractament determina, en part, l'eficàcia clínica dels iCDK4/6, es va realitzar un primer estudi exploratori en 20 pacients de la sèrie (10 de bona eficàcia i 10 de mala eficàcia) que incloïa 29 citocines, presents al panell predissenyat de Immunology Multiplex Assay amb el MILLIPLEX® de

Merck™. Per tal de realitzar l'anàlisi associatiu, primer es van considerar només aquells factors solubles amb valor per sobre del llindar de detecció en almenys un 70% de les mostres incloses, resultant en 14 factors. Aquests 14 factors solubles que complien els criteris d'inclusió/detecció es van normalitzar i es va realitzar una clusterització jeràrquica en funció de la matriu de dades d'expressió, resultant en 3 clústers diferenciats (Figura 34).

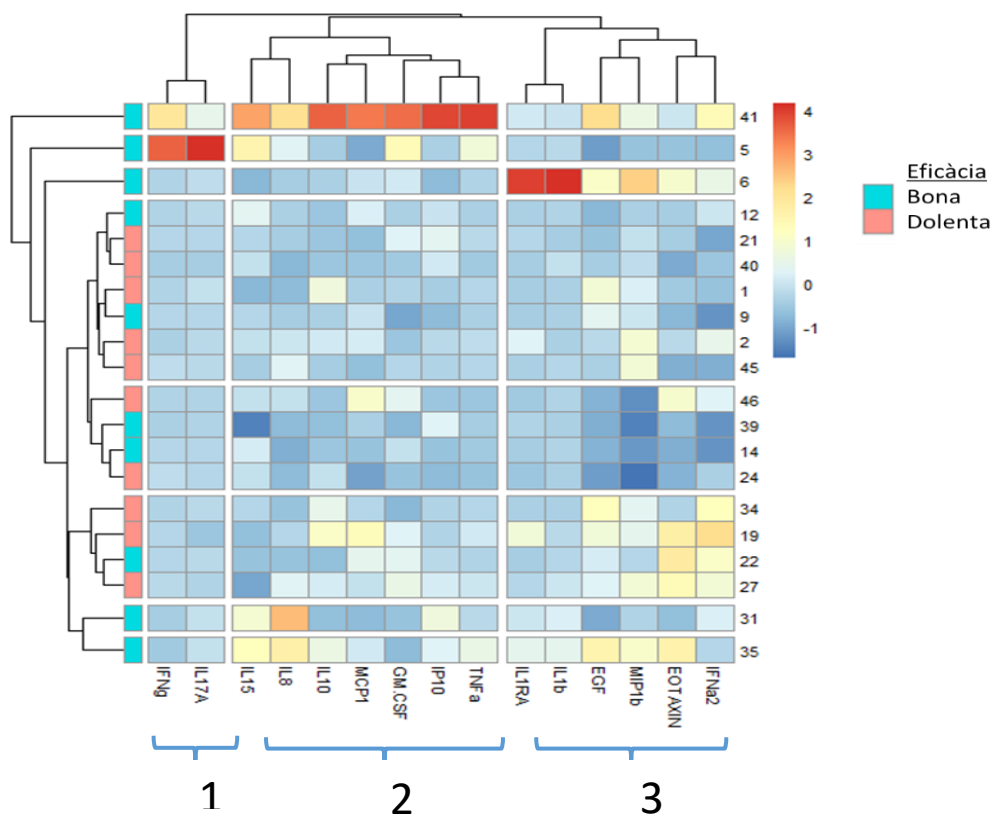


Figura 34. Mapa d'expressió de les 14 citocines detectades en els 20 pacients de la cohort exploratòria. Els valors es van normalitzar segons les columnes (valors de cada citocina). Per tal de realitzar els clústers de pacients i de les citocines s'ha fet utilitzant la distància de la funció matemàtica de Minkowski obtenint 3 grups de citocines.

En aquest anàlisi exploratori, tot i la clusterització observada, no es van detectar diferències estadísticament significatives associades a l'eficàcia clínica, probablement pel número reduït de mostres utilitzades. Per tant, amb l'objectiu d'aprofundir en l'estudi i ampliar el número de mostres, es va seleccionar una/dues citocines de cada clúster, en funció dels p-valors nominals obtinguts, per a l'anàlisi subsegüent a la cohort sencera. Així doncs, les citocines seleccionades del primer anàlisi exploratori van ésser: IFNγ del primer clúster, IL8 i IL10 del segon; i EGF del tercer. A més, es va afegir a la selecció la determinació de IL6, ja que a la literatura existeixen evidències del seu paper com a determinant de resposta a tractaments, però no es s'havia pogut detectar de manera robusta amb la tècnica de Luminex. Per això, en aquest segon anàlisi, IL6 es va mesurar

a través d'una tècnica de detecció basada a l'amplificació de la senyal per PCR, anomenada Proquantum. La tècnica Proquantum presenta major sensibilitat, reduint significativament el llindar de detecció, fet que ens va permetre rescatar IL6. Aquesta mateixa tècnica es va utilitzar per detectar també IFN γ en el segon panell, ja que els valors mesurats per Luminex eren també molt propers al llindar de detecció. També es van incloure 4 checkpoint immunològics solubles (TIM3, PD-1, CTLA-4 (CD152) i LAG3), ja que aquestes proteïnes no estaven incloses en el primer panell predissenyat utilitzat, però existeix una evidència de correlació entre nivells d'aquestes i el tractament amb iCDK4/6 (180). Per tant, en 68 pacients de la cohort completa (35 bona eficàcia i 33 mala eficàcia) previ a l'inici del tractament, es van mesurar els nivells de 9 proteïnes solubles circulants, 5 factor solubles (IL6, IL8, IL10, EGF i IFN γ) i 4 punts de checkpoint immunològics solubles TIM3, PD-1, CTLA-4 (CD152) i LAG3, els quals per la seva diferent funcionalitat es van analitzar per separat.

En l'anàlisi de les diferents citocines de forma individual es va observar una tendència a una major expressió de citocines inflamatòries com IL6, IL8 o EGF en pacients amb mala eficàcia, sense arribar a diferències significatives entre grups (Figura 35A). També es va explorar el valor de les 5 citocines en un mapa de calor amb la realització de clústers no supervisats, observant 8 clústers segons l'expressió d'aquestes 5 citocines on alguns estaven enriquits amb bona o mala eficàcia (Figura 35B).

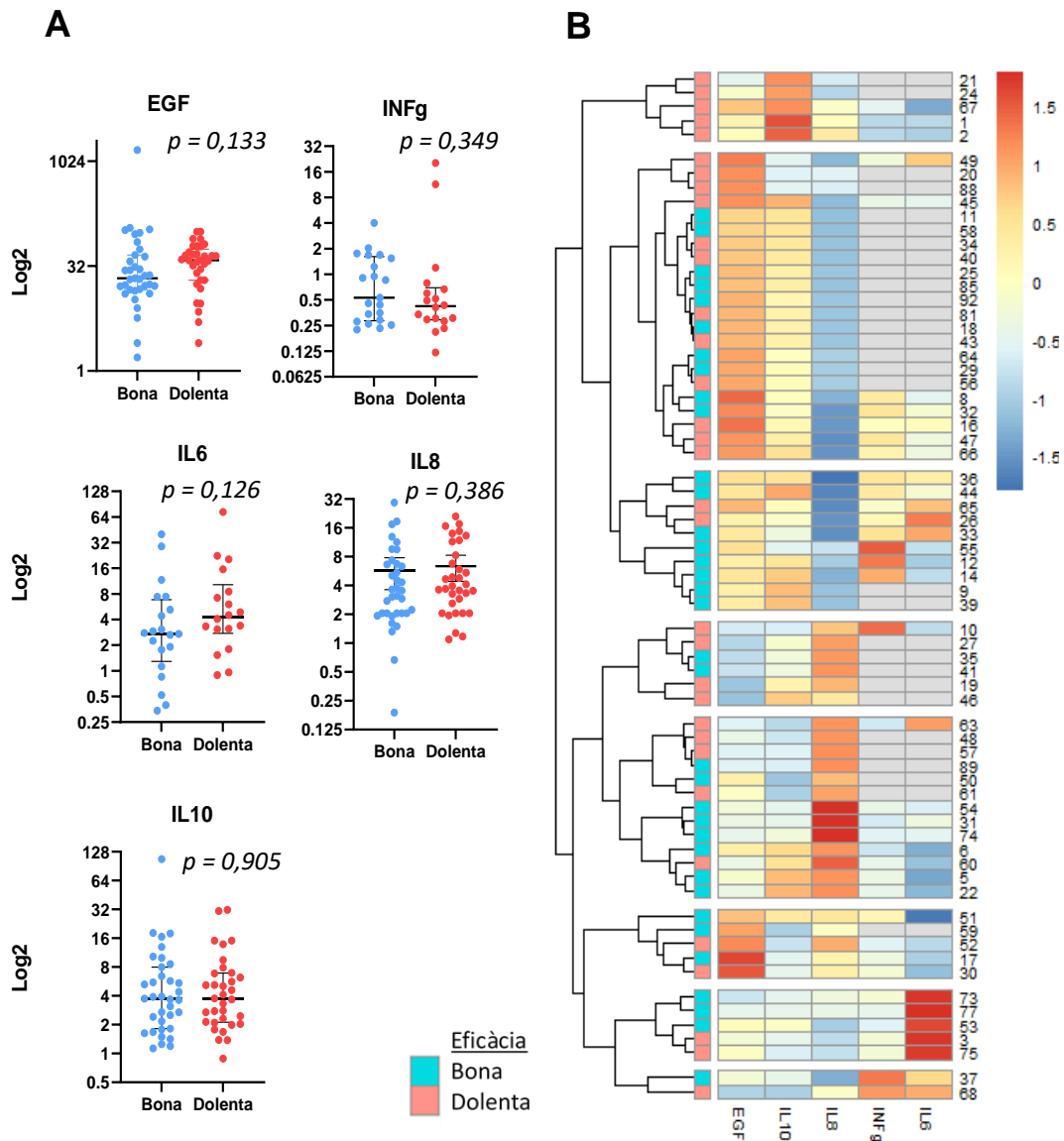


Figura 35. Anàlisi del valor de les 5 citosines seleccionades en 68 pacients. A) El valor (Transformat amb Log₂ del valor) de les 5 citosines seleccionades comparades entre grups d'eficàcia clínica (bona vs. dolenta), es mostra el valor p utilitzant el Test U de Mann-Whitney. B) Mapa d'expressió o heatmap de les 5 citocines. A les pacients que no es va realitzar IFN γ ni IL6 per ProQuantum, el valor surt en color gris. Els pacients es divideixen en 8 clústers utilitzant la distància de la funció matemàtica de Minkowski.

Centrant-nos en els valors dels *checkpoint* immunològics solubles, s'observava també una tendència a una major expressió de proteïnes immunosupressores com TIM3 o LAG3 en el grup de mala eficàcia, encara que les diferències tampoc eren estadísticament significatives (Figura 36A). Seguidament, també es va estudiar l'expressió dels *checkpoint* immunològics i la possibilitat de classificació en clústers segons l'expressió d'aquests, i es van observar 4 clústers però sense poder-ne identificar cap amb un enriquitment de bona o mala eficàcia clínica (Figura 36B)

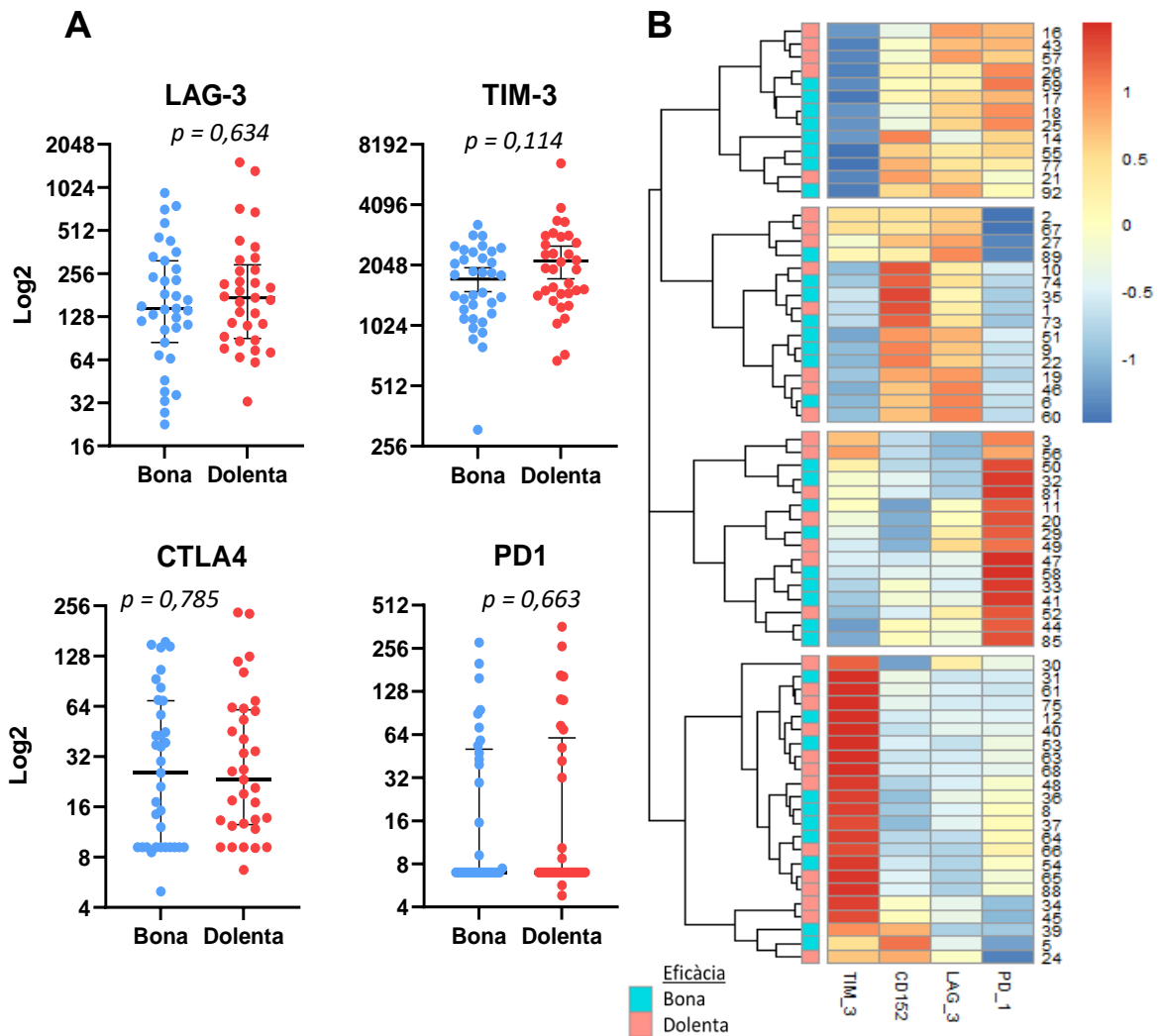


Figura 36. Anàlisi dels checkpoint immunològics solubles en els 68 pacients. A) Gràfics de caixes segons l'expressió de cada grup d'eficàcia (bona vs. mala) de cada proteïna soluble. Es mostres el valor de significança segons el valor p del test de Mann-Whitney. B) Mapa de calor o heatmaps de les diferents checkpoint immunològics i els clústers del pacients amb la seva valoració d'eficàcia, utilitzant la distància de la funció matemàtica de Minkowski.

Com resum de l'anàlisi dels diferents factors solubles, vam objectivar una tendència de major expressió en el grup de mala eficàcia en la majoria dels factors estudiats de forma individual. S'ha de dir, però que aquestes diferències no van ser significatives. De la mateixa manera, l'agrupació per clúster, no permetia una bona diferenciació segons l'eficàcia. Així doncs, per poder estudiar la complexitat i la interacció dels diferents factors solubles entre ells i la seva possible capacitat de predir l'eficàcia del tractament, es va completar l'anàlisi amb un model de regressió logística que seguidament es detallarà.

5.3.1.1 Anàlisi integrat de la contribució dels factors solubles en plasma al benefici del tractament amb iCDK4/6: Model de regressió logística

Tenint en compte els resultats previs i donada la complexitat del sistema immunològic i les seves múltiples interaccions, es va realitzar un nou anàlisi integrat, per tal de representar les diferents citocines i els *checkpoint* immunològics solubles en un únic model que permetés, segons l'expressió de cada citosina, predir si la pacient obtindria un benefici clínic bo o dolent.

Inicialment, es va tenir en compte el valor dels 9 factors solubles estudiades per biòpsia líquida en les 68 pacients (IFN γ , IL6, IL8, IL10, EGF, TIM3, CTLA-4, LAG3 i PD-1). Seguidament, amb el valor de cada factor (transformat a Log2) es va dissenyar un model de regressió logístic lineal flexible (un model generalitzat lineal) amb aquells factors que millor ajudaven a predir l'eficàcia clínica (bona vs. mala) de la pacient.

Primer, es van anar retirant de forma progressiva i individual, els factors que més empitjorava el model segons el valor del criteri d'informació Akaike (AIC), que és un estimador de l'error predictiu del model. Així doncs, eliminant les variables una a una, que no ajudaven a predir l'eficàcia, es va arribar a un model amb les següents variables: IL10, TIM3, CTLA-4, LAG3 i PD-1.

Totes les variables seleccionades, tenien un impacte estadísticament significatiu per ajudar a predir la variable dicotòmica dependent d'eficàcia (bona vs. mala). El model observava que la major expressió de IL10, TIM3 i LA3, amb un valor beta positiu, s'associava a una major probabilitat de presentar una mala eficàcia. Per contra, una major expressió de PD-1 o CTLA-4, predeïa una major possibilitat de bona eficàcia (Taula 17).

Taula 17. Model de regressió logística per estimar la contribució dels factors solubles detectats en plasma. S'exposen els coeficients estimats, l'error i el valor p de cada variable. (Desviació residual de 76.5 amb 62 graus de llibertat).

	Coefficient	Error estàndard	Valor p
Intercept	-2.761	0.992	0.005
IL10	0.336	0.169	0.047
TIM3	0.001	<0.001	0.015
CTLA-4	-0.069	0.027	0.010
LAG3	0.012	0.005	0.020
PD-1	-0.023	0.010	0.032

Així doncs, en el model obtingut, es va calcular la odds ratio (OR) de cada factor soluble d'obtenir una mala eficàcia als iCD4/6 (calculat a partir de l'increment de 10 punts de cada factor soluble). Els factors solubles, com ara TIM3, LAG3 i especialment IL10, van mostrar una associació significativa amb un major risc de mala eficàcia del tractament.

Aquests tres factors solubles van obtenir un Odds Ratio (OR) superior a 1, indicant una relació positiva amb la falta de resposta al tractament.. Per altra banda, l'increment en sang perifèrica dels checkpoint immunològics com PD-1 i CTLA-4, afavoria la predicció d'una bona eficàcia clínica als iCDK4/6, amb OR inferiors a 1 (Figura 37).

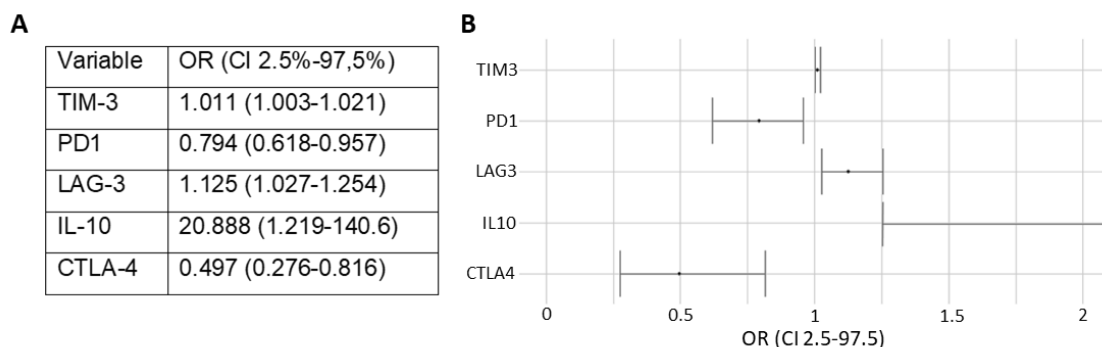


Figura 37. Odds ratio de les diferents variables utilitzades en el model posterior. A) Odds ratio (OR) de cada factor soluble en el model de regressió lineal dissenyat, amb interval de confiança (CI) de 2.5%-97.5%. B) Representació gràfica amb forest plot dels diferents OR del model.

Així doncs, tot i les limitacions de l'estudi, principalment pel reduït tamany mostral i la manca d'una cohort de validació independent, es va obtenir un model amb capacitat predictiva de l'eficàcia dels iCDK4/6 utilitzant factors solubles circulants, principalment checkpoint immunològics, els quals apunten de nou cap a un paper important del sistema immunològic en l'eficàcia clínica dels iCDK4/6.

5.3.1.2 Impacte de les citocines i proteïnes immunològiques solubles sobre la supervivència lliure de progressió i supervivència global

Per tal de comprendre l'impacte de l'expressió dels factors solubles circulants en la supervivència de les pacients tractades amb iCDK4/6 es va realitzar un estudi de supervivència. L'expressió de cada proteïna, va ser avaluada just abans d'iniciar el tractament tant pels pacients en primera línia com en línies posteriors, ja que, al contrari de les biòpsies tumorals, les quals es van recollir amb anterioritat a l'inici del tractament, la biòpsia líquida permet un tenir el valor immediatament anterior a l'inici del tractament, molt més representatiu de l'estat immunològic de l'hoste. Aquest fet fa que l'expressió de les diferents citocines pugui aportar informació del moment en el que s'inicia la línia independentment de la línia de tractament.

Per tant, es va dur a terme un anàlisi de regressió de Cox de cada factor soluble sobre la SLP en el conjunt de la cohort de la biòpsia líquida (n=68) i estratificat per la línia de tractament (primera línia, n=39 i en línies posteriors n=29). Com en l'apartat anterior, es

va convertir cada variable quantitativa en una variable dicotòmica, per tal de poder realitzar les comparacions entre dos grups de pacients (Taula 18).

Així, es van identificar 2 factors solubles, una citocina, IL8, i un checkpoint immunològic, TIM3, els quals s'associaven amb una reducció de la SLP de la cohort estudiada. No s'observaven resultats significatius quan estratificàvem en funció de la línia de tractament, probablement per la reducció en el número de mostres inclosa en cada subgrup.

Taula 18. Anàlisi de supervivència univariat de les citocines i impacte en SLP. Es mostra el valor de la HR amb IC (95%) i el valor p del grup de baixa expressió. Amb negreta es mostres aquelles signatures significatives en tota la cohort.

Variable	Cohort citocines (n=68)		Primera línia (n=39)		Segona o més línia (n=29)	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
EGF	0.65 (0.37-1.13)	0.128	0.60 (0.26-1.36)	0.220	0.78 (0.36-1.67)	0.516
IFN γ	1.76 (0.84-3.67)	0.131	3.45 (1.27-9.38)	0.015	0.83 (0.25-2.78)	0.763
IL10	1.53 (0.65-3.61)	0.331	3.13 (1.03-9.45)	0.043	0.64 (0.15-2.72)	0.544
IL8	0.45 (0.23-0.89)	0.021	0.52 (0.18-1.54)	0.239	0.42 (0.17-1.04)	0.062
TIM3	0.30 (0.14-0.62)	0.001	0.40 (0.13-1.18)	0.096	0.0 6(0.01-0.27)	0.000
CD152	1.41 (0.81-2.45)	0.223	1.81 (0.81-4.05)	0.146	0.76 (0.36-1.64)	0.491
LAG3	1.64 (0.91-2.96)	0.100	2.36 (0.99-5.61)	0.052	0.93 (0.42-2.08)	0.860
PD-1	1.32 (0.76-2.29)	0.328	1.54 (0.69-3.44)	0.290	0.91 (0.42-1.96)	0.805
IL6	0.00 (0-NA)	0.997	0.00 (0-NA)	0.998	NA	NA

*n=número de pacients; HR= hazard, ratio; IC95= interval de confiança del 95%, p= valor p en l'anàlisi univariat de supervivència de la regressió de Cox.

Seguidament, seleccionant les variables positives en l'anàlisi univariat (IL8 i TIM-3), es va realitzar l'estudi multivariat afegint, també, el número de línia. En aquest anàlisi multivariat, com era d'esperar, el número de la línia segueix tenint un pes rellevant en la SLP però l'expressió de TIM3 manté un impacte independent sobre la SLP. (Figura 38).

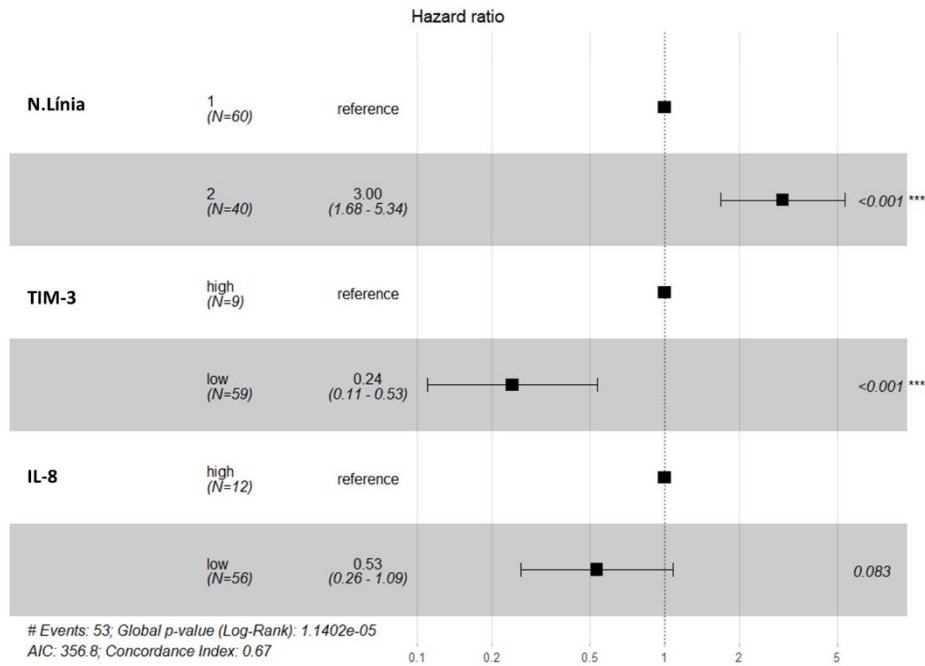


Figura 38. Anàlisi multivariats de supervivència (SLP) de regressió de Cox en la cohort completa (n=68) amb les variables amb impacte significatiu en l'univariats previ (IL8 i TIM3) i el número de línia.

Finalment, es va aprofundir en l'estudi de la SLP per als factors solubles que s'havien relacionat amb un bona o mala eficàcia en l'anàlisi multivariats, comparant el grup d'alta i baixa expressió per a cadascun d'ells mitjançant corbes Kaplan Meier. Així vam observar que el grup que presentava nivells baixos de TIM3 o IL8 circulants en el moment de l'inici del tractament presentava SLP superiors al grup amb nivells alts de proteïnes circulants. Per tant, l'estat inflamatori de l'hoste previ, avaluat en sang perifèrica abans de l'inici del tractament amb iCDK4/6, va permetre diferenciar grups de pacients amb SLP ben diferenciada. (Figura 39).

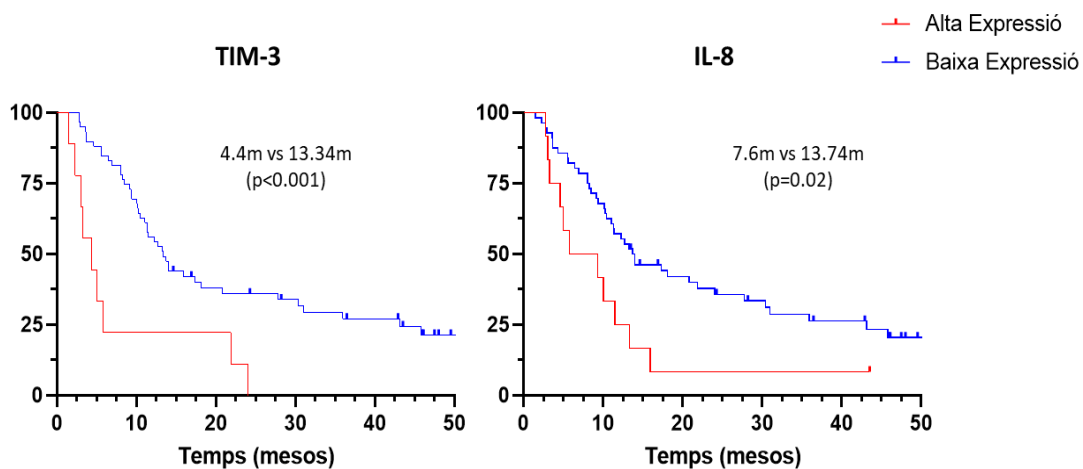


Figura 39. Supervivència lliure de progressió segons l'expressió de TIM3 i IL8, separant grups d'alta o baixa expressió. La SLP es presenta amb mesos (m) i es comparen les corbes utilitzat el test Log-Rank, considerant la significança si <0.05.

Finalment, per conèixer l'impacte en el pronòstic de la malaltia de TIM3 i IL8, es va valorar la SG de les pacients segons els grups d'alta o baixa expressió de cada citocina. El grup amb alta expressió de TIM3 va obtenir una SG de només 13.9 mesos en comparació als 48.6 mesos del grup amb baixa expressió. La mateixa tendència s'observava entre els grups amb alta o baixa expressió de IL8, on s'obtenien 24.5 mesos vs. 48.6 mesos, respectivament ($p=0.002$). També cal destacar, que en l'anàlisi multivariant d'aquestes dues citocines amb el número de línia, TIM3 es mantenia com una variable estadísticament significativa independent mentre que IL8, perdia la significança com a variable independent (Figura 40).

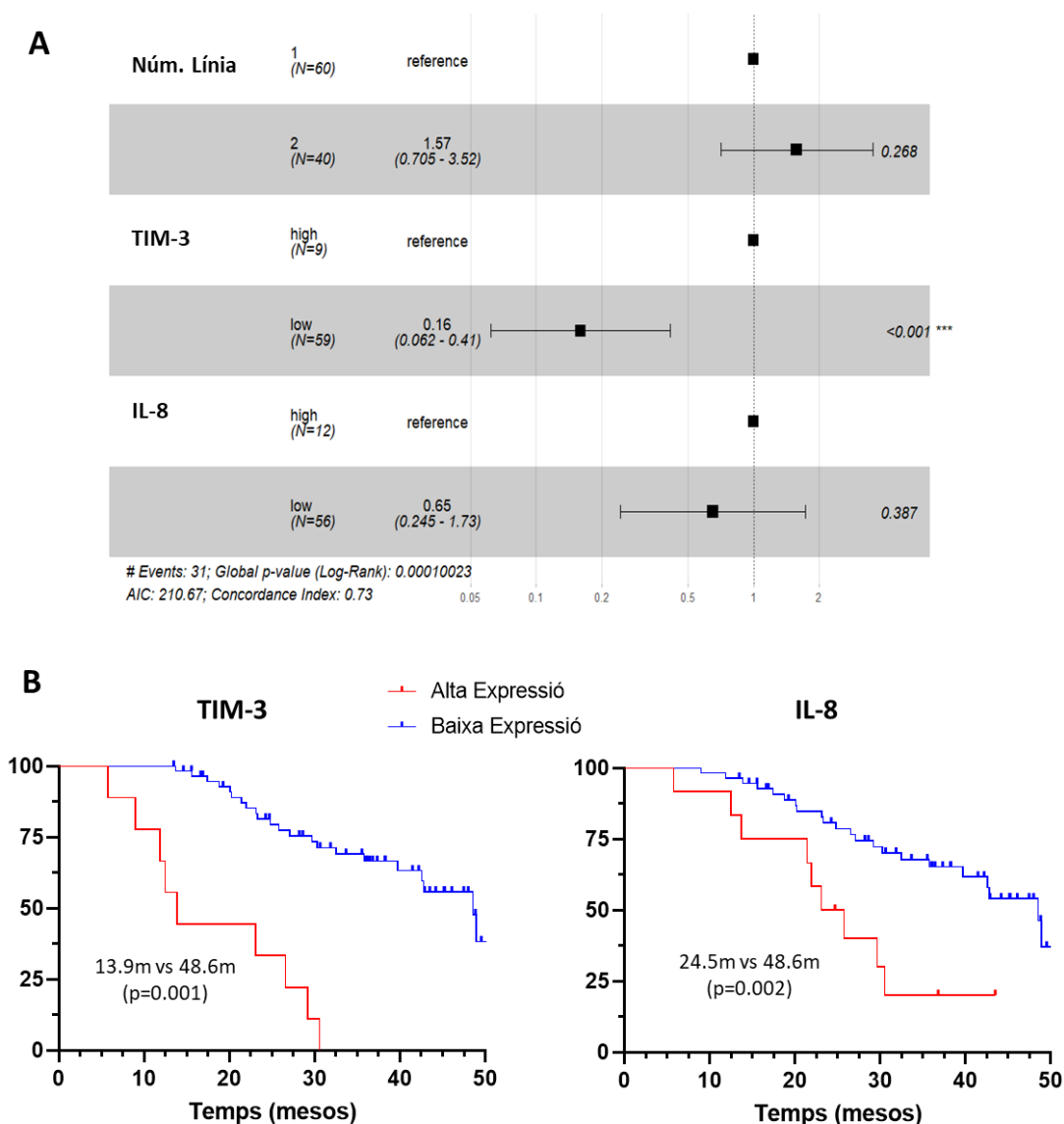


Figura 40. Anàlisi de supervivència de les citocines amb impacte independent sobre SG. A) Anàlisi multivariant de supervivència de COX amb el número de línia, TIM3 i IL8. B) Corbes de supervivència Kaplan-Meier segons els grups d'alta i baixa expressió de TIM3 i IL-8 de tota la cohort ($n=68$).

En resum, l'expressió de diferents factors solubles, tant citocines com checkpoint immunològics en sang perifèrica ens permeten diferenciar a través de diferents mètodes (models de regressió, regressió de Cox de supervivència o comparant SLP segons expressió) però amb la mateixa coherència, pacients amb una SLP reduïda. Aquest fet, indica, que probablement el sistema immunològic de l'hoste abans de l'inici del tractament també té un impacte amb l'evolució i l'eficàcia als iCDK4/6. Per tal d'aprofundir en l'estat immunològic de l'hoste, es van completar l'estudi de les diferents poblacions immunològiques circulants i el seu impacte segons la distribució d'aquestes poblacions i les seves característiques.

5.3.2. Poblacions immunològiques circulants en sang perifèrica.

La interacció entre el sistema immunològic i les cèl·lules cancerígenes al microambient tumoral ha despertat gran interès en els últims anys, especialment pel seu impacte pronòstic, o pel seu hipotètic valor com a biomarcador de la resposta a diferents tractaments. Aquests canvis al microambient tumoral, podrien tenir també una representació en canvis en diferents poblacions de cèl·lules immunitàries circulants a la sang perifèrica. Poder identificar subpoblacions immunes cel·lulars que en determinin la funció a sang perifèrica també permetria poder-ne fer un seguiment durant el tractament i dissenyar tractaments seqüencials segons l'expressió i els canvis observats en el sistema immunològic.

A més, en el cas dels iCDK4/6, s'ha descrit el seu paper com a moduladors del sistema immunològic (178, 180), però sense poder concretar l'impacte d'aquests canvis en la resposta al tractament *in vivo*.

En aquest sentit, es van caracteritzar fenotípicament les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica per citometria de flux, abans de l'inici de tractament amb iCDK4/6. Aquest estudi es va realitzar amb una mostra representativa de la cohort original (n=36) la qual no presentava diferències estadísticament significatives amb les característiques clíniques de les pacients incloses a l'estudi (Taula 19).

L'avaluació del fenotip immunològic de les pacients tractades amb iCDK4/6 es va abordar inicialment amb el disseny d'un primer panell destinat a caracteritzar les principals poblacions immunològiques en sang perifèrica, amb l'objectiu d'identificar possibles diferències entre els pacients que presentaven una bona o mala eficàcia als iCDK4/6. Les principals cèl·lules del sistema immunològic, mantenien una distribució homogènia entre les pacients amb bona eficàcia i eficàcia refractària o dolenta; és a dir, el percentatge relatiu de subtipus de cèl·lules immunològiques no es veia afectat ni intervenia amb l'eficàcia del tractament.

Taula 19. Característiques clíniques de la cohort on s'ha realitzat la caracterització immunofenotípica de les cèl·lules mononuclears en sang perifèrica i la comparació amb la cohort completa de l'estudi.

	Cohort Completa N=100	Cohort amb Immunofenotip N=36	p
Número línies			0,667
1 L	60 (60%)	24 (66.7%)	
2 L	13 (13%)	5 (13.9%)	
>2 L	27 (27%)	7 (19.4%)	
HT combinada			0.536
Tamoxifè	9 (9%)	2 (5.6%)	
IA	53 (53%)	20 (55.6%)	
Fulvestrant	27 (27%)	14 (38.9%)	
Estat recaiguda M1			0.999
Debut <i>de novo</i>	14 (14%)	5 (13.9%)	
Recaiguda >12m	29 (29%)	10 (27.8%)	
Recaiguda <12m o HT CMM	34 (34%)	15 (41.7%)	
QT	23 (23%)	6 (16.7%)	
Localització M1			0.915
Visceral	44 (44%)	18 (50%)	
Hepàtica	26 (26%)	9 (25%)	
Només òssia	27 (27%)	10 (27.8%)	
Subtipus intrínsec per PAM 50			0.405
Luminal A	21 (21%)	12 (33.3%)	
Luminal B	26 (26%)	7 (19.4%)	
HER2-Enriched	6 (6%)	4 (11.1%)	
Basal	2 (2%)	1 (2.8%)	
No avaluat	45 (45%)	12 (33.3%)	
Eficàcia			0.853
Bona	42 (43%)	18 (50%)	
Mala	39 (39%)	18 (50%)	
No valorable	19 (19%)	0 (0%)	
Supervivència			
SLP	13.7m	13.65 m	0.892
SG	42.8m	48.9 m	0.741

*n=número de línia; L= línia; HT=hormonoteràpia, M1= metàstasi, m=mesos, CMM= càncer de mama metastàtic; SLP= supervivència lliure de progressió; SG=supervivència global; p = el valor p segons el test Chi-quadrat per la comparació de la distribució dels dos grups i el test Log-Rank per la comparació de supervivència dels dos grups.

En l'anàlisi comparatiu de l'abundància relativa de les diferents poblacions de cèl·lules immunològiques caracteritzades en aquest primer panell, no es van observar diferències entre la freqüència de limfòcits T CD4+ (identificats com la població per CD3+ i CD4+), limfòcits T citotòxics (identificats com la CD3+ i CD8+), limfòcits B (expressats com a

CD3- CD19+), cèl·lules Natural Killer o NK (expressades com CD3-, CD56+ i segons l'expressió de CD16 altament citotòxiques), monòcits (CD11b+ i CD14+) o cèl·lules mieloides supressores amb (expressió de CD11b+ i CD33+, i que es diferenciaven entre polimorfonuclears o monòcits segons l'expressió de CD14) (Figura 41).

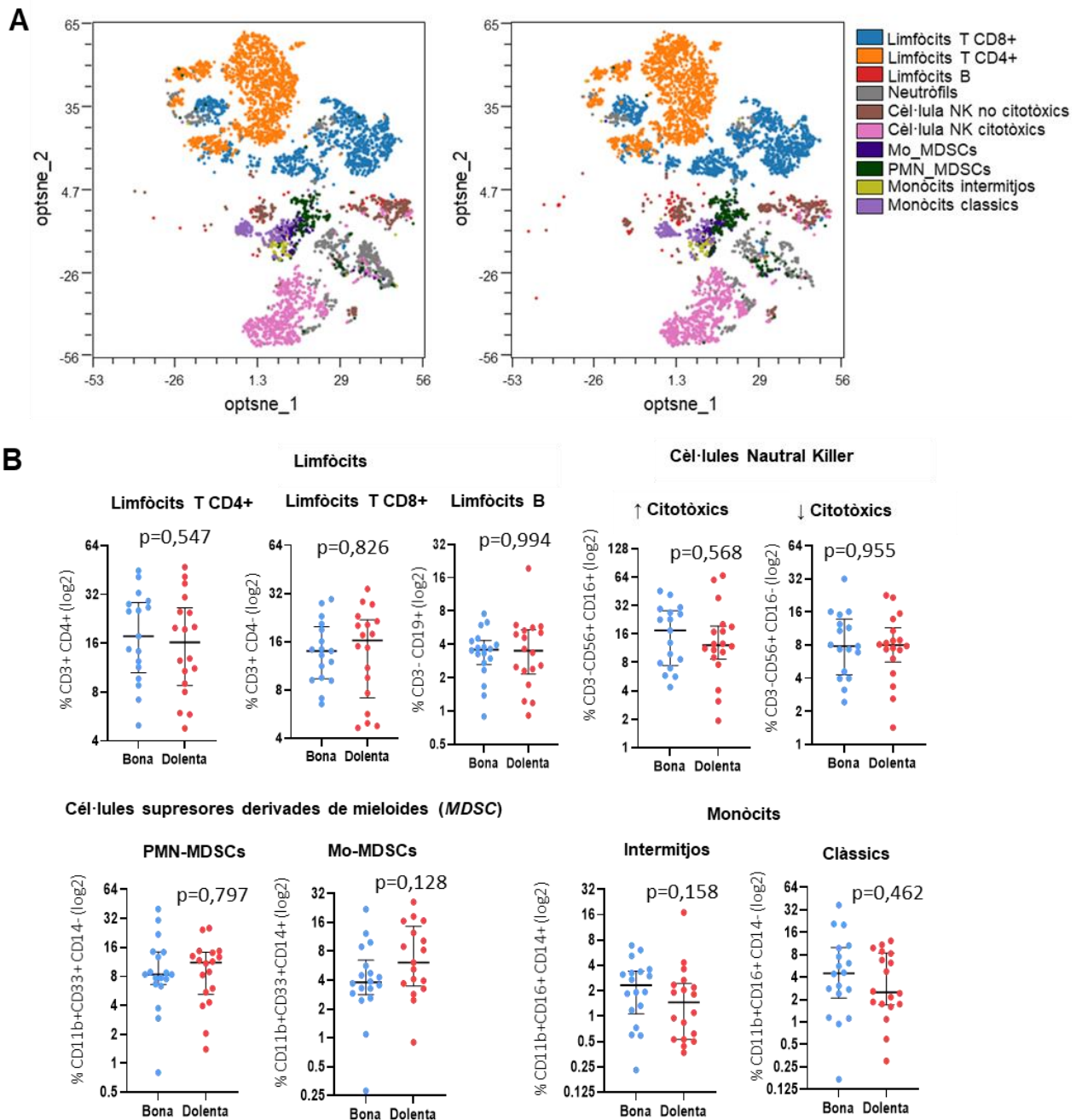


Figura 41. Representació de les poblacions del sistema immunitari en sang perifèrica. A) Gràfics on es visualitzen la representació 2D dels algoritmes de distribució openTSNE (optsne) de la freqüència de cada subpoblació en pacients amb bona i mala eficàcia. **(B)** Gràfiques de caixes (Box-plots) representant el Log2 del percentatge de cada població immunològica segons l'eficàcia clínica (bona vs. mala eficàcia), s'ha utilitzat el test de U de Mann-Whitney en les comparacions. *NK: Natural Killer, ↑ Altament, ↓ Lleument. MDSCs: Cèl·lules mieloides supressores. PMN: Polimorfonucleades. Mo: Monocitiques.

Seguidament, es va dissenyar un segon panell destinat a avaluar els subtipus principals de limfòcits T. En primer lloc, es va caracteritzar la proporció relativa de limfòcits T efectors (*effector* en anglès i considerats com els CD45RA+CCR7-), els limfòcits T efectors de memòria (*effector memory* en anglès i CD45RA-CCR7-), limfòcits T central de memòria (*central memory* en anglès, CCR7+CD45RA-) i els limfòcits T verge (naïve en anglès i CD45RA+CCR7+). També es van analitzar el número de cèl·lules T reguladores, considerant aquelles que expressaven simultàniament CD4, CD25 i FOXP3. De manera similar a la caracterització de les subpoblacions, no es van observar diferències en el número de les diferents subpoblacions de limfòcit T circulants abans del tractament entre el grup de pacient amb bona eficàcia en comparació amb els de mala eficàcia (Figura 42).

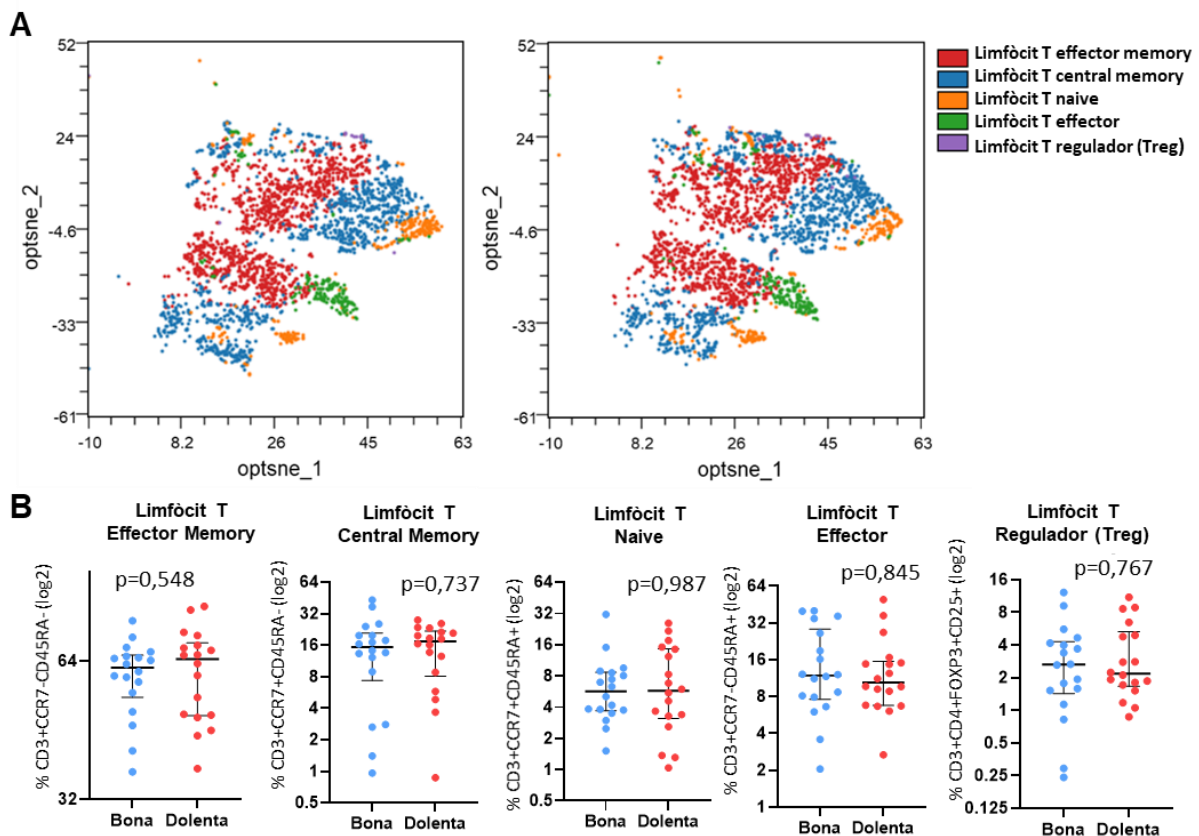


Figura 42. Distribució de les poblacions de limfòcits T en pacients amb bona i mala resposta. A) Gràfics on es visualitzen la representació 2D dels algoritmes de distribució openTSNE (optsne) de la freqüència de cada subpoblació en les pacients amb bona i mala eficàcia. B) Gràfiques de caixes (Box-plots) representant el valor (en log2) de cada població individualment i avaluat amb el test estadístic test de U de Mann-Whitney.

Finalment, es va estudiar la funcionalitat dels limfòcits T CD4 i T CD8, tenint en compte marcadors d'activació (CD25) o marcadors inhibitoris de la funció de les cèl·lules T, tals com PD-1, CTLA-4 o FOXP3. En aquest cas, les pacients amb mala eficàcia, presentaven una major expressió de molècules inhibitoris del sistema immunològic com CTLA-4 en limfòcits T CD4+ i CD8+ (Figura 43).

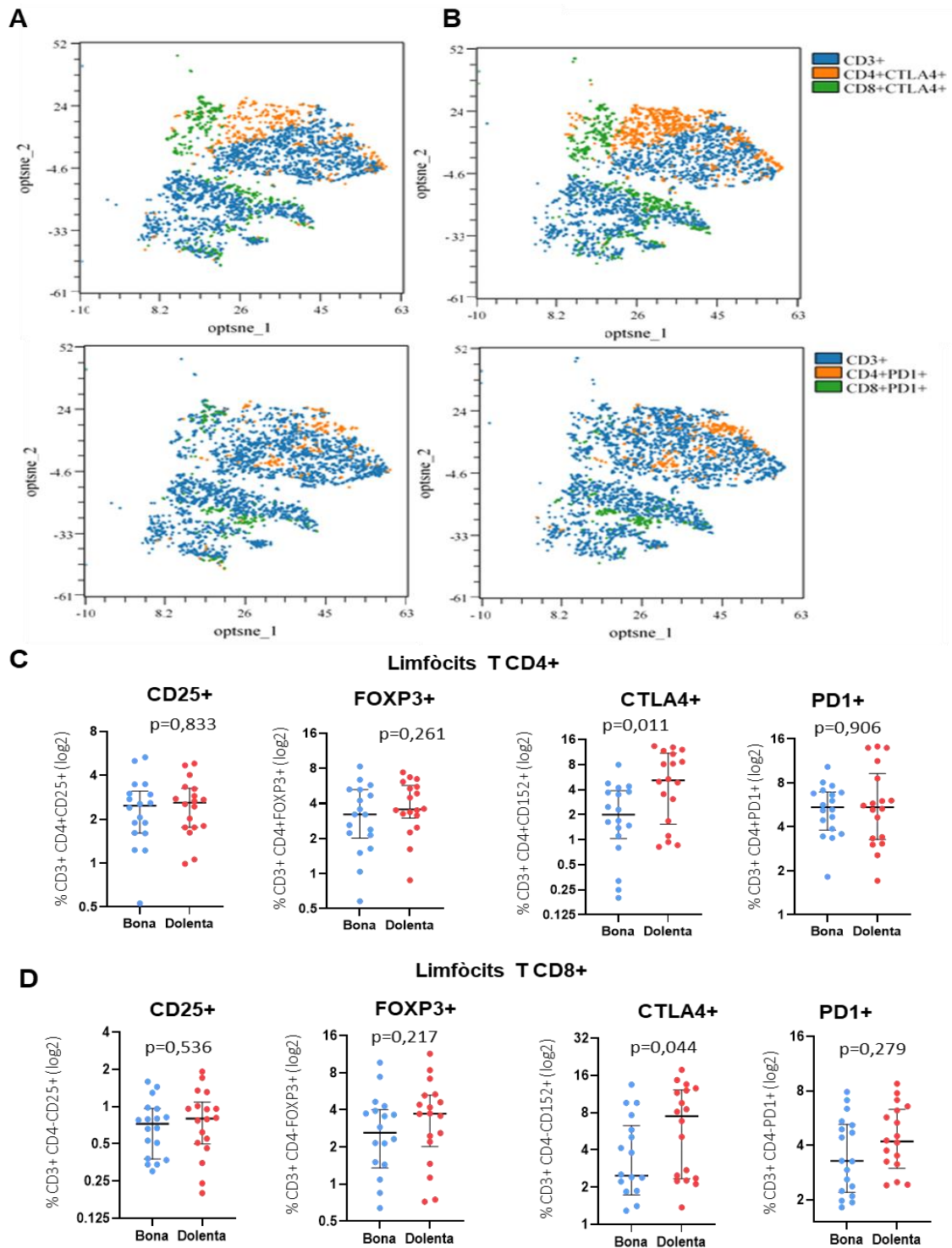


Figura 43. Representació de les poblacions de limfòcits T. Primer es mostren les distribucions representades en 2D utilitzant l'algorisme openTSNE (optnse) mostrant la freqüència de cada

subpoblació en A) Pacients amb Bona resposta i B) Pacients amb mala resposta. (C) Box plot (en log₂) de cada població individualment i avaluat amb el test estadístic test de U de Mann-Whitney, primer en Limfòcits T CD4+ (C) i després en Limfòcits T CD8+ (D).

En resum, les pacients amb una eficàcia reduïda als iCDK4/6 presentaven una major expressió de CTLA-4 en limfòcits T circulants previ a l'inici de tractament. Aquesta major expressió de CTLA-4 podria explicar una desregulació pròpia del sistema immunològic de l'hoste que no permet una resposta adequada envers al tumor i no s'aconsegueix el benefici esperat del tractament amb iCDK4/6.

Aquestes pacients, per tant es podrien beneficiar d'una estratègia diferent que permetés re-establir els mecanismes immunològics propis de la pacient per fer front a la progressió tumoral.

5.3.2.1 Impacte de l'expressió de marcadors immunològics en limfòcits en supervivència lliure de progressió i supervivència global.

Després d'analitzar l'expressió de les diferents molècules en limfòcits T CD4+ i CD8+ segons el grups de benefici clínic bo o dolent, es va valorar si l'expressió de CD25, FOXP3, CTLA-4 i PD-1 permetia diferenciar pacients amb diferent SLP i SG.

Amb la mateixa sistemàtica que en apartats previs, es van seleccionar punts de tall de la cohort amb l'immunofenotip (n=36) i segons la línia de tractament (primera n=24 i posteriors n=12). Segons l'expressió de cada molècula es van obtenir grups d'alta i baixa expressió amb la tècnica *maxstat* i seguidament es va valorar el seu impacte individual en la SLP en el conjunt de la cohort, en primera línia o en línies posteriors.

En aquest cas, tenint en compte que l'estudi d'expressió també es pot considerar un estudi de biòpsia líquida dinàmic i que els valors d'expressió representen l'estat del pacient just abans de començar el tractament, es va valorar en el conjunt de la cohort, sense tenir en compte la línia de tractament.

En aquesta població, la baixa expressió de CTLA-4 o PD-1 en els limfòcits CD4+ tenia un efecte protector, així com també la baixa expressió de PD-1 en limfòcits T CD8+. Aquests valors significatiu, es perdien en línies posteriors, probablement també degut a la major variabilitat i a un número de mostres inferior i per tant amb menys poder estadístic (Taula 20).

Taula 20. Anàlisi univariat dels grups segons el percentatge d'expressió de CD25, CTLA-4, FOXP3 i PD-1 en limfòcits CD4+ i CD8+. Es mostren les HR del grup amb baixa expressió en comparació als d'alta expressió, amb CI del 95% i els valors p.

Variable	Conjunt Cohort (n=36)		Primera línia (n=24)		Línies posteriors (n=12)	
	HR (CI 95%)	p_value	HR (CI 95%)	p_value	HR (CI 95%)	p_value
CD4CD25	0.50 (0.23-1.07)	0.075	0.40 (0.09-1.78)	0.229	0.13 (0.02-0.93)	0.042*
CD4CTLA-4	0.30 (0.13-0.68)	0.004	0.16 (0.05-0.53)	0.003*	3.13 (0.3-30.12)	0.323
CD4FOXP3	0.32 (0.10-1.06)	0.063	0.31 (0.09-1.13)	0.076	0.00 (0-inf)	0.998
CD4PD-1	0.26 (0.08-0.82)	0.022	0.24 (0.07-0.86)	0.029*	4.44 (0.86-22.85)	0.075
CD8CD25	0.58 (0.17-1.92)	0.369	1.72 (0.64-4.86)	0.285	0.34 (0.07-1.62)	0.174
CD8CTLA-4	0.39 (0.15-1.03)	0.057	0.36 (0.12-1.09)	0.070	0.35 (0.07-1.70)	0.193
CD8FOXP3	1.75 (0.41-7.43)	0.448	0.65 (0.23-1.86)	0.425	0.14 (0.02-1.19)	0.071
CD8PD-1	0.40 (0.18-0.89)	0.025	0.34 (0.12-1.00)	0.049*	0.00 (0-INF)	0.998

*n= número de pacients; HR= hazard ratio; IC95= interval de confiança del 95%; INF= infinit; p= valor p en l'anàlisi univariat de supervivència utilitzant la regressió de Cox.

Així doncs, es van seleccionar les variables significatives en l'anàlisi univariat per seguir amb la valoració del seu impacte en SLP en un anàlisi de supervivència multivariat a través de la regressió de Cox, tenint en compte també el número de línia de tractament. Com era d'esperar, el número de línia es mantenia com un factor independent al temps de SLP, però també l'expressió de CTLA-4 i PD-1 en limfòcits T CD4+, sent una baixa expressió, un factor protector independent de progressió a iCDK4/6 (Figura 44).

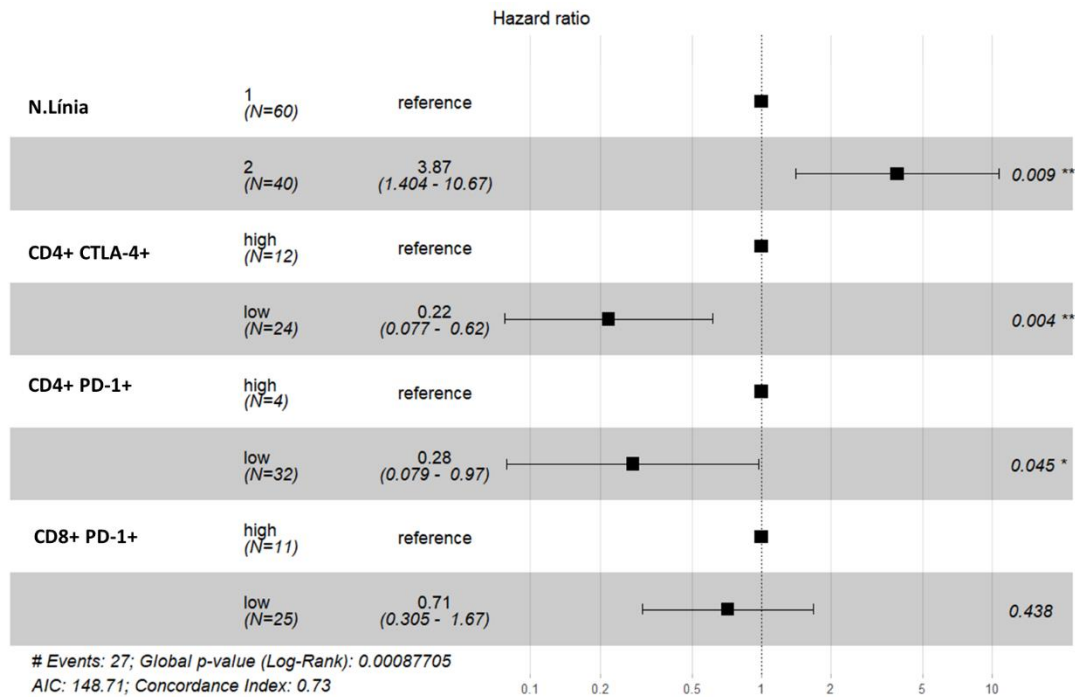


Figura 44. Anàlisi multivariat de supervivència amb el número de línia i segons els grups d'expressió de CTLA-4 en limfòcits T CD4+, i l'expressió de PD-1 en limfòcits T CD4+ i CD8+. Es mostra la HR amb IC (95%) i els valors de significança.

Seguidament, es van valorar individualment les diferències en supervivència entre els grups d'alta i baixa expressió de les variables significatives i independents en l'anàlisi multivariat. Es va observar que les pacients amb baixa expressió de CTLA-4 en limfòcits T CD4+ circulants, obtenien una SLP significativament major que les pacients amb alta expressió de CTLA-4, de 17.34 mesos vs. els 8.05 mesos. En la mateixa direcció, expressió elevada de PD-1 en limfòcits CD4+, també aportava un mal pronòstic, amb 8.6 mesos de SLP envers els 14 mesos del grup amb baixa expressió (Figura 45).

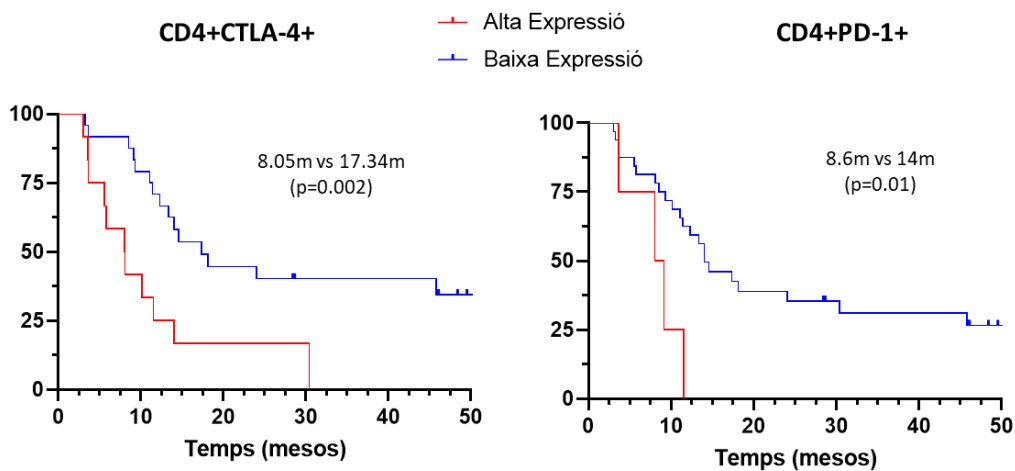


Figura 45. Corbes de SLP Kaplan-Meier segons l'expressió de CTLA-4 i PD-1 en limfòcits T CD4+ en la cohort de 36 pacients. La SLP es mostres en mesos (m) i es comparen els grups utilitzant el test Log-Rank.

Finalment, es va estudiar quina influència tenien els grups d'alta o baixa expressió de les variables involucrades, en la SG de la cohort. L'anàlisi multivariat de SG d'aquestes variables, mostrava que només l'expressió de CTLA-4 en els limfòcits CD4+ es mantenia com una variable independent significativa en la SG de les pacients, amb un efecte protector en el grup de baixa expressió de CTLA-4 (Figura 46A).

Valorant el temps de SG segons els grups d'expressió, s'observava que les pacients amb baixa expressió de CTLA-4 obtenien de forma significativa una major supervivència (no aconseguida al moment de l'anàlisi de SG) en comparació amb el grup d'alta expressió (27.9 mesos). De manera similar, es va estudiar també l'altre variable amb impacte en SLP, l'expressió de PD-1 en limfòcits T CD4+, però no es van observar diferències estadísticament significatives en SG (Figura 46B).

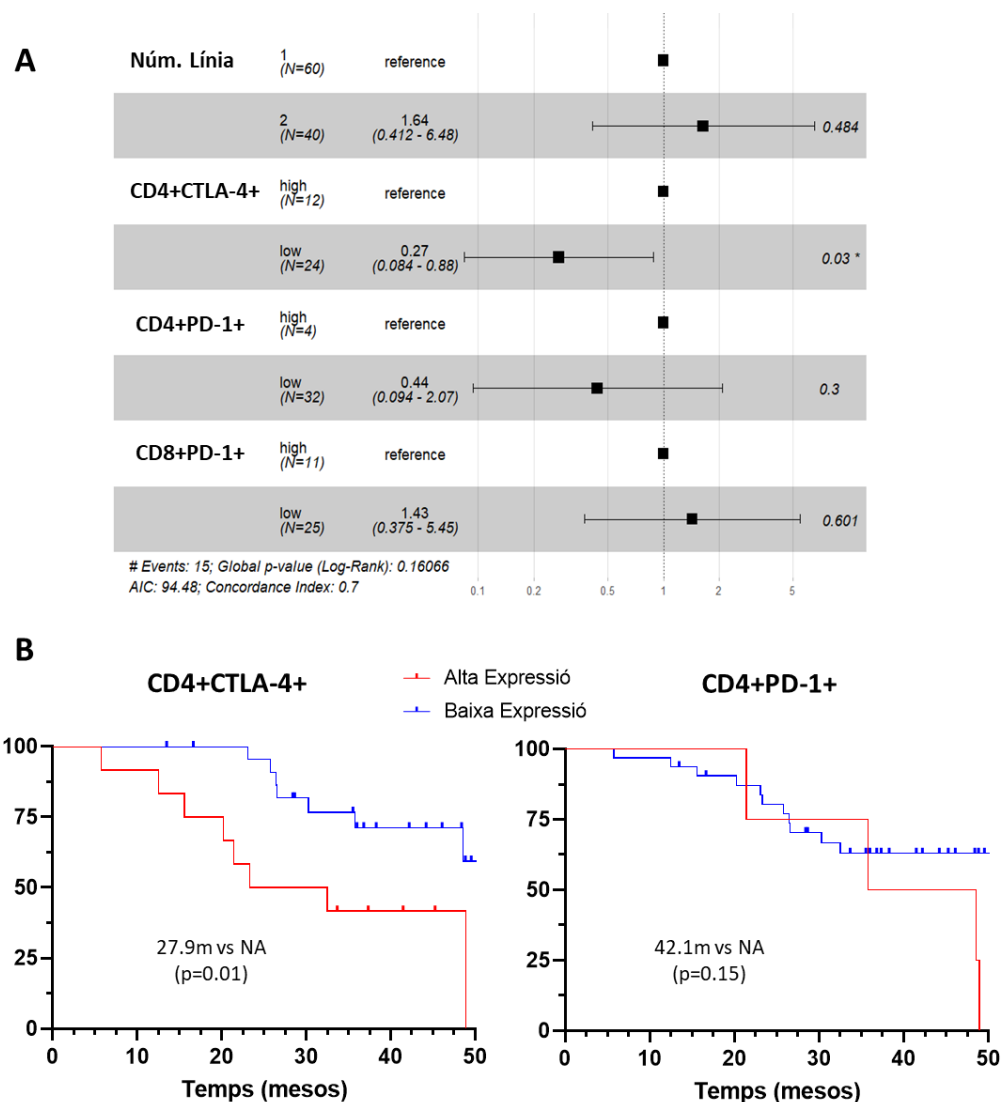


Figura 46. Supervivència Global segons expressió de CTLA-4 i PD-1 en limfòcit T CD4+. (A) Anàlisi multivariat de SG en l'expressió de CTLA-4 en limfòcits CD4+ i PD-1 en limfòcits CD4+ i CD8+. (B) Corbes de SG segons alta o baixa expressió de CTLA-4 i PD-1 en limfòcits T CD4+.*m=mesos, valor p de les corbes de SG, s'ha calculat amb el test log-rank.

Podem concloure que el sistema immunològic s'adapta i es modula segons els diferents estímuls sistèmics presents en l'organisme en cada moment concret, incloent també el càncer de mama metastàtic. Així doncs, els canvis observats en les cèl·lules del sistema immunològic perifèric poden explicar la capacitat de reacció de l'hoste envers les diferents cèl·lules tumorals i a diferents tractaments. En la nostra cohort vam observar que les pacients amb una alta expressió de CTLA-4 en limfòcits T CD4+ presenten una pitjor pronòstic, amb una menor eficàcia al tractament amb iCDK4/6 i una SG reduïda en comparació al grup de pacient amb baixa expressió de CTLA-4.

6. DISCUSSION

Els iCDK4/6 han representat el major avenç en el tractament del càncer de mama metastàtic dels darrers anys, però tot i la seva vàlua, un percentatge de pacients no obté el benefici esperat. Aquesta tesi s'ha centrat en la descripció de potencials biomarcadors de resposta a iCDK4/6, a partir de l'estudi d'una cohort de 100 pacients tractades de forma assistencial entre el març del 2018 i l'abril del 2022 amb qualsevol dels tres iCDK4/6 aprovats a l'Estat Espanyol. Com qualsevol estudi de pacients no seleccionades, presenta diferències en les característiques clíniques en comparació amb els principals estudis fase III que van portar a l'aprovació d'aquests fàrmacs; diferències que representen la pràctica clínica habitual, per la qual cosa es fa necessari una molt bona caracterització clínica prèvia a la descripció de qualsevol biomarcador. A continuació es discutiran els resultats amb l'ordre presentat prèviament: a) valoració les característiques clínico-patològiques de les pacients i de l'eficàcia clínica dels fàrmacs en el context de les dades publicades; b) distribució dels subtipus intrínsec de la cohort així com la seva implicació pronòstica i/o predictiva; c) els biomarcadors moleculars i immunològics caracteritzats a l'estudi, ja sigui en teixit o en sang perifèrica, i el seu potencial valor pronòstic i/o predictiu i, finalment, es discutiran els possibles nous abordatges per aquestes pacients.

Característiques clíniques de les pacients de l'estudi

Es tracta d'una cohort representativa de la població CMM RH+/HER2- assistencial, com demostra la seva notòria similitud amb les característiques clíniques dels registres internacionals reportats (208). Les pacients del nostre estudi tenien una mediana d'edat de 62.3 anys, sent un 25% de la cohort major de 70 anys. Un 44% de les pacients presentava afectació visceral, mentre que en un 27% la malaltia a distància era exclusivament òssia i en un 4% localitzada al SNC. Aquestes característiques, són molt similars a altres treballs, com el registre internacional SONOBRE publicat per la Universitat de Maastricht, amb dades de 2000 pacients amb CMM RH+/HER2-, tant en la mediana d'edat (66 anys), població superior a 70 anys (40%), com malaltia visceral (54%), afectació exclusiva òssia (33%) o afectació SNC (3%)(208). A més a més, el nostre treball reflexa la incorporació progressiva a la pràctica clínica dels diferents iCDK4/6, que es va produir durant el transcurs de l'estudi, a mesura que es van anar presentant els resultats dels principals estudis. La distribució del tipus de iCDK4/6 administrat, es va anar equilibrant amb els anys amb l'aprovació dels diferents iCDK4/6. Així, palbociclib va ser el primer aprovat a l'estat, fet que va comportar que fos inicialment el més prescrit, representant un 60% del total de la cohort, seguit del 21% de ribociclib i un 19% abemaciclib. Aquest comportament es repeteix al registre SONABRE abans esmentat; on de les 518 pacients registrades, un 85% va rebre palbociclib, un 17%

ribociclib i menys d'1% abemaciclib. Si bé, la nostra cohort no té potència per a determinar diferències entre els tres iCDK4/6 aprovats; sí que ens va permetre avaluar si existien factors que condicionaven l'eficàcia clínica d'aquests fàrmacs com a conjunt. D'altra banda, al moment actual, tampoc existeixen resultats reportats d'estudis fase III aleatoritzats que comparin els diferents iCDK4/6 entre ells.

Les primeres dades amb iCDK4/6 al 2018 procedien d'estudis tant en primera línia com en línies posteriors, fet que va comportar que durant els primers anys es tractessin un percentatge important de pacients en segona línia i posteriors, els quals no havien pogut rebre iCDK4/6 en línies anteriors. Així, en la sèrie reportada, un 60% de les pacients van ser tractades amb iCDK4/6 en primera línia, un 13% en segona línia i cal destacar que fins en un 27% de les pacients, els iCDK4/6 van constituir la 3a línia o posterior de tractament per a CMM. Aquesta heterogeneïtat de la població i com evitar que constituís un biaix important per a les diferents avaluacions de biomarcadors, va representar un repte en el present treball. A més a més, es tracta també d'una població heterogènia pel que fa als criteris d'hormonosensibilitat. Segons els criteris clínics adaptats de les guies ESMO, vam considerar hormonosensibles, aquelles pacients que no havien rebut cap tractament hormonal previ per malaltia metastàtica o amb progressions més enllà dels 12 mesos de finalitzar el tractament adjuvant amb hormonoteràpia (28). Aquesta població suposava un 43% de la nostra sèrie, constituint una població àmpliament representada als estudis PALOMA-2, MONEELES-2, o MONARCH-3 (65, 70, 74). El 57% de la nostra cohort es considerava hormonosistent, i és important remarcar que el 23% de les pacients de la cohort van rebre el iCDK4/6 després de quimioteràpia per CMM; aquesta és una població més representada a l'estudi clínic fase II, MONARCH-1 (209).

Si avaluem les dades d'eficàcia, la mediana de la SLP de la nostra cohort de 100 pacients va ser de 13,7 mesos, fet que considerant les característiques de la població inclosa està en la línia amb l'esperable, sent lleugerament inferior a les reportades als estudis MONARCH-2 (16.9 mesos) i MONALEESA-3 (14.6 mesos) que inclouen població menys pretractada, i una mica superior a la reportada al PALOMA-3 (9.5 mesos) que inclou població més pretractada i amb criteris d'hormonosistència (68, 72, 210). No obstant, quan vam avaluar les malalties tractades en primera línia, que constitueixen un 60% de la cohort, la mediana de SLP va ser de 30.4 mesos, lleugerament superior als resultats dels estudis pivotals com PALOMA-2, MONALEESA-2 o MONARCH-3, que van reportar medianes de 24.8, 25.3, i 28.2 mesos, respectivament (62, 65, 72). Altres estudis d'evidència de la pràctica diària, també mostren SLP en primera línia semblants al nostre, amb dades superiors al 20 mesos, mimetitzant el resultat de cada població representada en els principals estudis i amb un benefici a favor de la combinació amb

iCDK4/6 i HT en totes les pacients, independentment de les característiques clíniques (211, 212).

Centrant-nos amb les pacients tractades en segona línia, la SLP es reduïa a 12 mesos, en línia amb els resultats observats en la cohort de segona línia de l'estudi MONALEESA-3 (14.6 mesos) (76). Finalment, les pacients tractades en línies avançades (més de 2 línies prèvies per CMM) van obtenir una SLP de 8.7 mesos, resultats similars als de l'estudi PALOMA-3 o PEARL, amb medianes de 9.5 mesos i 7.5 mesos, respectivament, on s'inclouïa una població més pretractada (63, 80). També, l'ús previ de tractament amb quimioteràpia en situació metastàtica es va associar a una reducció del benefici dels iCDK4/6, on vam detectar una SLP de 8.7 mesos en la nostra cohort, comparable a l'observada a l'estudi MONARCH-1 (6,0 mesos) (213, 214). En resum, els resultats d'eficàcia de la nostra cohort van ser coherents amb els resultats en estudis amb poblacions similars, i reforcen la idea que el màxim benefici d'aquestes teràpies està en la primera línia de tractament.

Un altre factor rellevant en la SLP de les pacients tractades amb iCDK4/6 + HT, i que condiona la SLP, és la sensibilitat hormonal (215). Així els malalts tractats en primera línia presentaven diferents medianes de SLP, arribant a 35.9 en situacions de màxima hormonosensibilitat, mentre que no superaven els 10.1 en les més hormonosensibles, coincidint també amb els resultats publicats als estudis pivotals (216). Malgrat això, tot i que el benefici absolut canvia en funció de l'estat d'hormonosensibilitat i la línia de tractament, es manté el benefici relatiu de la combinació dels iCDK4/6 + HT respecte la HT en monoteràpia (217).

A nivell pronòstic, l'evidència publicada conclou que la localització metastàtica juga un paper important, sent tant la localització visceral com l'hepàtica, la que presenta un pitjor pronòstic, i per contra, la localització metastàtica exclusivament òssia s'ha associat a un factor pronòstic favorable (20, 21). En la nostra experiència, l'afectació hepàtica es va associar a medianes de SLP de 18.1 mesos, davant els 30.4 mesos en cas d'afectació exclusiva òssia. Les nostres dades són comparables a les reportades en els sub-anàlisis dels estudis PALOMA-2 i -3, on les pacients amb afectació visceral presentaven medianes de SLP en primera línia de fins 19.3 mesos, en comparació als 36.2 mesos dels casos amb afectació òssia exclusiva; mentre que en línies posteriors els resultats eren de 9.2 i 14.3, respectivament. (21). Malgrat el pitjor pronòstic de la malaltia visceral, el benefici d'afegir el iCDK4/6 a la HT es manté en aquesta població en els principals estudis fase III. Recentment, l'estudi fase II RIGHT Choice, ha mostrat una superior SLP en primera línia de tractament amb ribociclib + HT (mediana de 24 mesos) respecte al tractament amb quimioteràpia (mediana de 12.3 mesos) en malalties amb CMM RH+ amb presència de metàstasis viscerals al diagnòstic(213).

Finalment, al moment de l'anàlisi de supervivència, el seguiment de la nostra sèrie de CMM RH+/HER2- encara era insuficient tenint en compte les dades de SG reportades en aquesta població de pacients (66), fet que provoca que les dades de SG siguin encara immadures en el moment d'aquest anàlisi. Malgrat això, la mediana de SG del global de la cohort va ser 42.8 mesos, lleugerament superior als estudis amb pacients hormonoresistents com el PEARL (32.6 mesos) o el PALOMA3 (34.8 mesos) i més semblants als estudis MONARCH-2 (46.7 mesos) que no permetia quimioteràpia prèvia o MONALEESA-3 (40.2 mesos) considerant els pacients amb progressió a HT (73, 76, 80, 218). Els factors pronòstics que impactaven en la SLP, també condicionaven la SG, tot i les limitacions pel temps de seguiment. Així doncs, en la nostra sèrie l'afectació hepàtica es relacionava amb una reducció de més de 20 mesos en SG, i una tendència a un millor pronòstic en les pacients amb només afectació òssia exclusiva (no ha arribat a la significança en SG). També, l'estat de resistència hormonal o el tractament amb quimioteràpia prèvia, s'associaven a un pitjor pronòstic i una reducció de la SG en la nostra cohort. Aquestes troballes, van en consonància amb els resultats del principal estudi on l'afectació visceral i l'estat de sensibilitat prèvia, reduïa tant la SLP com la SG, però es mantenia en tots els subgrups, és a dir, que es manté el benefici de la combinació dels iCDK4/6 amb la HT en totes les pacients independentment de les característiques clíniques (214, 215).

Per últim, tot i que l'estudi de la toxicitat no era un objectiu del nostre treball, vàrem considerar rellevant avaluar el percentatge de pacients que van suspendre el tractament per toxicitat, essent aquest d'un 7%, sense detectar cap mort associada al tractament. Les troballes de toxicitat al nostre estudi s'assemblen a les identificades en els estudis clínics fase III, ja que per exemple en els estudis PALOMA2-3, MONALEESA-2 o MONARCH-2 i 3 es reporta un percentatge d'abandonament de 8.3%, 7.5% i 9-15%(219-221). A la nostra cohort, destaquem la presència d'un cas de pneumonitis G4 secundària a palbociclib que va ser publicada (191); sent un tipus de toxicitat inicialment no reportada als estudis PALOMA, el qual sí que s'ha reportat amb l'increment de l'experiència amb el fàrmac (191, 222). També és de destacar, un cas de toxicitat hepàtica G4 secundària a ribociclib, toxicitat reportada amb tots els iCDK4/6 però més freqüent amb aquest fàrmac (223). Tot i la facilitat de manejar les diferents toxicitats que apareixen en curs dels iCDK4/6, i la bona qualitat de vida que presenta en comparació a altres fàrmacs orals com la capecitabina (80), segueix existint un percentatge de pacients (7% en la nostra sèrie) que deixen la medicació per mala tolerància, sobretot per astènia o símptomes digestius en el cas d'abemaciclib (224).

En resum, els iCDK4/6 s'han convertit en l'estàndard de tractament en gairebé totes les situacions del CMM RH+/HER2-, i rebre'ls en línies precoces millora de forma més

rellevant tant la SLP com la SG. El metanàlisis dels diferents estudis presentats amb palbociclib, abemaciclib i ribociclib, confirma aquesta afirmació, tot i que cal destacar que ribociclib i abemaciclib són els que han demostrat un benefici en SG en els estudis clínics propis, a diferència de palbociclib que no arriba a la significança en SG (225). Així mateix, els registres internacionals dels últims anys confirmen que les pacients fora d'assaig, des de l'entrada dels iCDK4/6 a la seqüència de tractament de les pacients amb CMM RH+/HER2- ha incrementat la SG (208). La nostra sèrie reflexa el canvi de pràctica clínica que ha suposat el disposar d'aquests fàrmacs. Es una sèrie heterogènia, però en la que podem definir clarament diferents poblacions pronòstiques, amb resultats clínics i d'eficàcia comparables als reportats a la literatura.

Subtipus intrínsecs en CM metastàtic RH+/HER2-

L'avaluació dels subtipus intrínsecs en la població de CMM RH+/HER2-, ha estat objecte d'estudis retrospectius. Així, sis publicacions recullen dades de 8 estudis fase III (EGF30008, BOLERO-2, PALOMA-2,3, MONALEESA-2,3,7 i PEARL) els quals han avaluat patrons d'expressió gènica en el càncer de mama amb RH+ HER2-, tres d'ells en pacients tractats amb iCDK4/6, identificant també en aquesta població els anomenats subtipus intrínsecs, com són els clàssics luminal A i B, però també un cert percentatge de tumors no luminals (5.8%-34.2%) classificats com a HER2-E i basal-like. Aquests estudis han mostrant també el valor pronòstic d'aquesta classificació (91, 226-228). En la nostra sèrie, es van avaluar els subtipus intrínsecs per PAM50 a través de la plataforma BC360 (on no s'inclou el subtipus normal) en 55 casos, en un 56% en mostres de tumor primari i en un 44% en mostres del teixit metastàtic. Globalment 38% de casos van ser classificats com a luminal A, 47% com a luminal B, 11% com a HER2-E, i 4% com a basal; percentatges molt semblant als publicats a l'anàlisi retrospectiva dels tres estudis MONALEESA, on amb 72% de tumors primaris i 28% de metastàtics, i fent servir 36 els 50 gens inclosos al panell PAM50® (95), es classificava els pacients en luminal A en un 46.7%, luminal B en un 24%, normal en un 14%, HER2-E en un 12.7%, i en basal en un 2.8% (95). També a l'estudi PALOMA-3 (91), utilitzant, PAM50 i avaluant mostres en un 53% de tumor primari i en un 47% de metastàtic, i a l'estudi PALOMA-2, fent servir el algoritme AIMS, "the absolute intrinsic molecular subtyping", els malalts van ser classificats en un 44% i 50.3% com a luminals A, en un 31% i 29.7% com a luminals B, en un 20% i 18% com a HER2-E, en un 2.4% i 0.9% com a normals, i en un 1.7 i 0.5 % com a basals, respectivament. Finalment, l'estudi PEARL(229)(fent servir l'algoritme AIMS, i amb 72% de mostres de primari i 28% de metastàtic) va classificar 51% com a luminal A, 42% com a luminal B, 6.4 com a HER2-E, i 0.4% com a basal.

Les nostres dades, en línia amb els estudis publicats permeten afirmar que els subtipus luminals són la proporció més important (62–85%). D'altra banda, en la nostra experiència, els subtipus luminals s'associen també a un millor pronòstic on s'observa una millora de la SLP, i amb dades encara immadures de seguiment per a poder valorar l'impacte en la SG, fet també observat en l'anàlisi dels estudis PALOMA-2 i 3 MONALEESA 2,3 i 7 i PEARL. Alhora, de forma similar als estudis pivotals, el subtipus HER2-E s'associa a una pitjor SLP. Finalment, el subtipus basal-like, no s'ha pogut analitzar en el nostre estudi en primera línia conseqüència del limitat nombre de pacients identificats amb aquest subtipus. Per tant, les nostres dades, estan en consonància a les reportades sobre el valor pronòstic dels subtipus intrínsecs en aquesta població; però no permeten afegir dades sobre el seu valor predictiu, un tema que requereix de major investigació.

De forma similar al nostre estudi, els estudis fase III que han avaluat els subtipus intrínsecs en població CMM HR+HER2-, inclouen majoritàriament mostres del tumor primari i minoritàriament biòpsies de les metàstasis. Un estudi publicat el 2017, comparava l'anàlisi de PAM50 en mostres de tumor primari versus metastàtic, en 123 pacients amb càncer de mama avançat. Si bé aquest estudi no es centrava en població RH+/HER2-, els resultats van mostrar un 100% de concordança en cas del subtipus basal, un 76.9% en HER2-E, un 70% en luminal B. En cas del subtipus luminal A, un 44.7% mantenien el subtipus luminal A, mentre que un 40.4% canviava a luminal B, i un 14.9% canviava a HER2-E. En el nostre cas, tot i les limitacions pel petit nombre de casos, de les 8 pacients estudiades per PAM50 en les quals es disposava de mostra aparellada de primari i de metàstasi, l'anàlisi concorda amb els resultats reportats, sent els tumors luminals A els que presenten un major percentatge de canvis (25% es mantenien com a luminal A, 50% passaven a luminal B, 25% passaven a HER2-E). També vam observar canvis en tumors luminals B, tot i que un 67% es mantenien com a luminal B, el 33% van passar a HER2-E. Finalment, en l'únic cas de subtipus HER2-E en el tumor primari es va observar un canvi a luminal B en la malaltia metastàtica. De forma similar a la nostra cohort l'estudi PEARL va comparar mostres de primari i metastàtic, observant un major enriquiment de subtipus no luminals a les biòpsies de metàstasis (14%) respecte a la dels primaris (4%) (229). Aquestes dades, obren l'interrogant de com haurien estat els resultats dels estudis fase III si la signatura s'hagués realitzat sobre la mostra metastàtica, pregunta que requereix de futurs estudis. En la mateixa línia, l'estudi AURORA va revelar una conversió de subtipus intrínsecs del voltant del 36%, amb un canvi dels tumors luminals en primaris a no luminals en metàstasis del 17.9%, semblant a la nostra cohort (230).

Aquestes dades, reforcen la idea de la plasticitat tumoral i la necessitat de realitzar noves biòpsies en cas de recidiva, per tal de decidir el millor abordatge de les progressions metastàtiques. Fins i tot seria necessari, segurament, la revaloració de les característiques del tumor durant l'evolució de la malaltia metastàtica, si no és possible amb re-biòpsies de teixit tumoral a través d'altres tècniques menys invasives com biòpsia líquida.

En resum, els resultats de la nostra sèrie estan en línia amb els estudis reportats, donant robustesa a la mateixa per a la posterior avaluació de marcadors immunològics d'eficàcia al tractament.

Categorització segons l'eficàcia clínica permet identificar dos grups

Com a conseqüència de l'heterogeneïtat de la població d'estudi, per tal de poder abordar la identificació de marcadors biològics de resposta als iCDK4/6, calia definir dos poblacions amb diferent benefici clínic però alhora amb característiques clíniques i biològiques comparables, per evitar biaixos en l'avaluació dels possibles biomarcadors. Amb aquest objectiu, es va classificar la cohort de pacients en dos grups categòrics segons el temps de SLP en mesos i ajustat a la situació clínica en què rebien els iCDK4/6 (sensibilitat hormonal, quimioteràpia prèvia i número de línia), en comparació als principals estudis pivotals amb abemaciclib, palbociclib i ribociclib. Alguns estudis també han abordat la categorització de la cohort, per tal de poder fer comparacions de característiques moleculars entre grups, de forma semblant al nostre plantejament, altres de manera més directe, separant la cohort en quartils segons la SLP (229).

La nostra variable categòrica obtinguda per aquesta classificació (bona o mala eficàcia), va permetre estratificar la població en dos grups amb una SLP molt diferenciada (30.4 mesos vs. 5.6 mesos) i també una SG significativament diferent (NA vs. 29.7 mesos). D'aquesta manera, es va classificar la cohort en dos grups ben balancejats, amb distribució homogènia de totes les característiques que impacten la SLP com el número de línia, la sensibilitat hormonal, el subtipus intrínsec o la localització de la malaltia metastàtica. Així doncs, la nova variable categòrica d'eficàcia clínica va permetre obtenir dos grups de pacients amb característiques clíniques comparables però amb una evolució de la malaltia clarament distinta, representant un eina imprescindible per a portar a terme els anàlisis biològics comparatius posteriors.

Mutacions detectades en plasma (ctDNA) i el seu paper en CMM en tractament amb iCDK4/6.

Actualment, no hi ha cap biomarcador en biòpsia líquida clínicament validat que permeti predir *a priori* el benefici al tractament amb iCDK4/6. Tot i això, l'estudi de les mutacions

al ctDNA està obtenint poc a poc més interès clínic com a conseqüència dels canvis evolutius de la malaltia metastàtica derivats de la pressió dels diferents tractaments o pròpia evolució de la malaltia, a més de la dificultat d'obtenir mostres seriades de biòpsies tumorals (231).

Així, a la nostre sèrie es van determinar les mutacions presents al ctDNA de 49 pacients, exclusivament a la mostra basal, fet que fa que només podem generar hipòtesis sobre biomarcadors pronòstics o de resistència primària. A la nostra cohort, les mutacions més freqüentment identificades van ser *ESR1*, *PIK3CA*, *DNMT3A*, *TP53* i *TET2* per aquest ordre (36.7%, 32.7%, 32.7%, 28.6, i 22.4%, respectivament), proporcions similars amb les reportades en estudis amb pacients amb CMM després de progressió hormonal, amb mutacions a *ESR1* al voltant del 20-35%, *PIK3CA* 25-35% i *TP53* amb 20-30% (232); població comparable a la nostra, on el 67% de les 49 pacients amb anàlisis de ctDNA eren considerades hormono-resistents.

Un dels principals factors estudiats en les pacients amb CMM RH+, són les **mutacions de *ESR1***, descrites com a resistència hormonal i principalment identificades per la pressió del tractament amb IA (37, 233). En la nostra cohort, la presència de mutacions de *ESR1* (36,7% de les pacients) s'associava tant a una reducció de la SLP com SG de forma significativa independent de la resposta a iCDK4/6, confirmant el valor pronòstic d'aquesta mutació ja descrit a la literatura. Amb la mateixa tendència, l'anàlisi de ctDNA del PALOMA-3, va reportar que les mutacions basals de *ESR1* en ctDNA condicionaven una SLP significativament pitjor, però només en el grup tractat amb HT en monoteràpia, considerant-lo principalment com un factor de resistència hormonal (233, 234) i no com un biomarcador predictiu del benefici dels iCDK4/6. Posteriorment, analitzant mostres basals i la progressió en el propi estudi PALOMA-3, es va observar que les mutacions de *ESR1* podien desaparèixer durant el tractament però també aparèixer, tant en presència de iCDK4/6 + HT, com en el grup de només HT, remarcant la importància de *ESR1* com a biomarcadors de resistència hormonal (235).

Així, l'estudi PADA-1 recentment reportat, plantejava el canvi de tractament hormonal a Fulvestrant en el moment d'aparició de mutacions de *ESR1* a biòpsia líquida en pacients tractades amb palbociclib + IA en primera línia, mantenint el tractament amb iCDK4/6. Recentment ja han reportat un benefici major a 6 mesos amb el canvi de HT (11.9 mesos vs. 5.7 mesos, $p=0.004$) al moment d'aparició de mutacions de *ESR1*(236); resultats que reforcen el valor pronòstic i de resistència hormonal d'aquest biomarcador, no aportant informació del benefici de tractament amb iCDK4/6. En aquest sentit, existeix evidència amb nous tractaments hormonals amb major capacitat d'eficàcia en mutacions concretes de resistència hormonal, com l'elacestrant, que obtingut l'aprovació de la FDA per pacients amb tumors amb mutació de *ESR1*(49).

Un altre cas important per freqüència i impacte, es tracta de **les mutacions de PIK3CA**. PIK3CA té un rol rellevant en la regulació del cicle cel·lular, a través de l'activació de la via PI3K/AKT/mTOR i la seva interacció amb els RE, fet que ha comportat que se n'avalués el seu impacte sobre la resistència als iCDK4/6, trobant resultats que apunten a un valor pronòstic i de resistència hormonal, més que no pas un paper concret en la resistència a iCDK4/6 (81). En la nostra sèrie, un 32% de les pacients presentaven mutacions a PIK3CA, correlacionant-se amb una reducció significativa de la SLP en primera línia amb iCDK4/6 i una tendència de reducció de la SG, sense arribar a la significança. En la mateixa línia, s'ha descrit que les pacients amb mutació de *PIK3CA* presenten una reducció de la SLP amb el tractament amb palbociclib o ribociclib, en comparació a aquelles sense mutació (237). Tot i així, tant l'anàlisi de ctDNA del PALOMA-3 i MONARCH-2, descriuen que les pacients amb mutacions basals de *PIK3CA* també es beneficiaven de rebre el iCDK4/6, amb increment de la SLP (234, 238). Aquest fet, sumat a l'aparició de mutacions de PIK3CA en el PALOMA-3 en les dues branques de tractament (7.6% tant amb fulvestrant com amb fulvestrant + palbociclib), suggereix que les mutacions de *PIK3CA* estan en relació amb la resistència hormonal (235). L'anàlisi de ctDNA del MONALEESA-7, apunta a un major benefici de ribociclib en les pacients sense mutació de *PIK3CA*, tot i que les diferències no arriben a la significança (239), apuntant altre cop a un paper pronòstic.

Aquestes troballes han reforçat la idea d'una triple combinació terapèutica, incloent iCDK4/6 en combinació amb HT i inhibidors de *PIK3CA* podria millorar els resultats en primera línia per pacients amb mutacions de PIK3CA; aquesta combinació s'està avaluant en diferents estudis. Inicialment, els primers estudis amb la triple combinació, van demostrar un increment de toxicitat inacceptable (240); la incorporació de nous inhibidors de *PIK3CA* més selectius i amb un perfil de toxicitat, ha permès el disseny de nous estudis de triple combinació que per intentar avaluar la seva eficàcia en pacients que presenten la mutació (NCT03439046, NCT05708235)(241).

Finalment, mutacions a **KRAS** i **FGFR4** tot i que identificades amb molta menor freqüència, també es van associar a un impacte directe sobre la supervivència a la nostra cohort. La presència de mutacions i l'activació de la via de FGFR s'ha relacionat amb una sobre-expressió de *CCND1* i l'activació de MAPK, contribuint a la resistència dels iCDK4/6 (81). Alguns treballs de seqüenciació, identifiquen el percentatge de mutacions de FGFR4 al voltant del 3.5%, primordialment en tumors d'histologia lobel·lar (242) i l'activació de la via FGFR s'ha relacionat també amb l'activació de la via AKT/ERK i la promoció de resistència a palbociclib en tumors luminals A (243). A nivell de ctDNA, tant l'estudi del MONALEESA-2 com en el PALOMA-3, associaven les alteracions de la via *FGFR* (amplificacions o mutacions) amb una reducció de la SLP en ambdós grups,

considerant que també podria relacionar-se amb resistència hormonal o considerar-se un biomarcadors pronòstic (94, 234). Cal ressaltar que actualment tenim inhibidors de FGFR4 en fases precoces de desenvolupament en diferents tumors (244). En models xenografts derivats de pacients amb mutacions de *FGFR4* i resistència a iCDK4/6, s'ha aconseguit revertir aquesta resistència afegint inhibidors de FGFR4 (245).

En la nostra experiència, la mutació al gen *KRAS* reduïa la SLP fins a 3.7 mesos, en comparació als 11.7 mesos assolits a les pacients que no la presentaven. Igualment, la mutació oncogènica de *KRAS* en càncer de mama s'ha relacionat amb la transició epiteli-mesènquima, l'activació de la via de senyalització MAPK/ERK i una major inestabilitat genòmica que es podria relacionar amb resistència a iCDK4/6 (246). Això s'ha confirmat en estudis on s'objectiva la correlació de la presència de mutacions en *KRAS* i ràpida progressió a iCDK4/6 + HT; per exemple un estudi amb 106 pacients va observar que totes les pacients amb mutacions a *KRAS* havien progressat abans dels 18 mesos de tractament en primera línia, però cap de les del grup sense mutacions a *KRAS* (247). A més, també s'ha identificat major presència de mutacions *KRAS* en aquelles pacients amb resistència primària i una progressió en primera línia menor a 6 mesos amb palbociclib + HT (247).

Altres mutacions detectades a ctDNA s'han relacionat amb la resistència a iCDK4/6; així, les mutacions a *RB1* s'han postulat com a un biomarcador predictiu del benefici del iCDK4/6. Aquestes dades provenen de l'anàlisi seriada en sang de la presència o aparició de mutacions en el decurs del tractament a les dues branques de l'estudi PALOMA-3, on les mutacions de *RB1* van aparèixer exclusivament a la branca amb palbociclib (83, 234). D'altra banda, l'anàlisi dels estudis MONALEESA2,3 i 7 no mostra benefici de l'adició de ribociclib a la HT en les pacients amb mutacions de *RB1* (248). Ara bé, la seva baixa freqüència de detecció (1-4%), el fa un biomarcador dèbil per a la pràctica clínica. En la nostra cohort, només 1 pacient presentava mutacions en *RB1* previ al tractament, fet que impossibilita l'anàlisi estadístic. Altres alteracions pronòstiques descrites i identificades per ctDNA en diversos treballs, són les mutacions de *TP53*, alteracions a *CCND1* o alteracions de *MYC*. Malgrat el nostre treball no les va identificar com factors amb impacte sobre la supervivència, sí que s'han associat a una reducció significativa de la SLP en els dos grups de tractament en els estudis fase III, tant el grup de iCDK4/6 i HT com el grup de HT sola, considerant-los biomarcadors pronòstic (234, 239).

Les plataformes que utilitzen la NGS en plasma per detectar múltiples alteracions genòmiques del ctDNA, també permeten detectar el valor de TMB (200), un factor rellevant per la resposta als ICIs, ja que alts nivells de TMB s'han utilitat com biomarcadors predictiu de resposta, també en CMM RH+, tot i que amb resultats

modestos (249, 250). Els alts nivells de TMB, podrien associar-se amb mutacions en la maquinària de la presentació d'antígens, fet que s'ha proposat com a mecanisme d'immunoevasió i (251), i podria explicar el pitjor pronòstic observat en la nostre sèrie per al les malalties amb alt TMB, que presentaven una tendència a menor SLP i SG, no significativa pel baix poder estadístic del tamany mostral.

En definitiva, els resultats obtinguts en aquest treball i el conjunt d'informació dels estudis amb anàlisis del ctDNA, suggereixen que les mutacions identificades al ctDNA, essent les més freqüents en *ESR1* i *PIK3CA*, tenen baix potencial d'esdevenir biomarcadors de resposta a iCDK4/6, ja que es relacionen primordialment a resistència hormonal, constituint un marcador de mal pronòstic però no un marcador predictiu del benefici dels iCDK4/6. Podem concloure doncs, que difícilment una alteració genòmica concreta i única servirà com a marcador pronòstic o predictiu de l'eficàcia als iCDK4/6. Per tant, per avaluar tot el ventall de complexitat dels mecanismes sensibilitat o resistència als iCDK4/6, i des de la perspectiva dels mecanismes d'acció dels iCDK4/6 sobre el cicle cel·lular però també sobre el sistema immunològic. Per tant, caldria estudiar de forma conjunta les alteracions de la cèl·lula tumoral i els canvis al sistema immune de l'hoste, fet que s'ha abordat al llarg d'aquesta tesis i es discutirà en els següents apartats.

Immunogenicitat tumoral i l'impacte de la funció immunològica al microambient com a determinants de la resposta al tractament amb iCDK4/6.

Per tal de conèixer l'impacte del sistema immunològic en la resposta al tractament amb iCDK4/6 **s'ha caracteritzat el microambient tumoral** per conèixer la interacció entre el sistema immunològic i el tumoral a més de **caracteritzar el sistema immunològic de l'hoste** a través del fenotip de les cèl·lules immunològiques circulants en sang perifèrica i la quantificació de diferents factors immunològics solubles; tot relacionant-ho amb l'eficàcia clínica i la supervivència de les pacients.

És conegut que el perfil immunològic circulant i del microambient tumoral mantenen una estreta relació i que per tant, l'anàlisi del perfil immunològic en sang perifèrica dels pacients podria ser una eina rellevant d'ajuda per a decisions terapèutiques d'immunomodulació (252, 253). Tanmateix, també va guanyant pes la importància de considerar els canvis immunològics que provoca al tumor a nivell sistèmic, tant en sang perifèrica com en òrgans limfoides distants i en expressió de factors solubles circulants que faciliten la progressió tumoral i l'aparició de metàstasis (254). De fet, l'increment de rellevància de l'estudi sistèmic de les pacients amb càncer ha fet que s'hagin descrit diferents senyals de factors solubles desregulats en sang perifèrica que podrien predir

l'evolució clínica del càncer de mama (255), però actualment, no es disposa de cap evidència pel que fa al tractament amb iCDK4/6.

L'estudi presentat es basa en les mostres basals disponibles en la cohort clínica de 100 pacients incloses, amb un seguiment encara limitat per tenir uns resultats conclouents per a SG, però suficientment sòlids per a la comparació dels grups de bona i mala eficàcia per la valoració de la SLP. Així, l'avaluació de la funció immunològica associada a la progressió tumoral s'ha realitzat a partir de dues aproximacions complementàries: l'anàlisi transcripcional en teixit tumoral i l'estudi de la funció immune perifèrica a partir de la determinació de factors solubles i l'immunofenotip de cèl·lules sanguínies.

En primer lloc, l'anàlisi d'expressió gènica a les mostres tumorals demostra la influència del sistema immunològic davant la resposta als iCDK4/6. Tant a partir de les signatures preestablertes de Nanostring, com de l'anàlisi més genèric a partir d'una modificació de GSEA, es va constatar la implicació de vies implicades amb la resposta immunològica antitumoral com a possibles factors determinants de l'evolució de la malaltia. Així, fixant-nos en la signatures de Nanostring, 4/5 signatures que identificaven de forma independent poblacions amb diferent SLP en primera línia, estaven relacionades amb el sistema immunològic. Aquestes signatures inclouen Treg, IFN-Gamma, TIS i PD-1, a part de la signatura BCp53, la qual *a priori* no es relaciona directament amb el microambient tumoral. En aquest sentit, l'anàlisi de la funció immune circulant ens va permetre l'estudi de processos relacionats, permetent formular i contrastar hipòtesis de manera integrada, tenint en compte els processos immunològics intra i extra-tumorals. Començant per l'única signatura no relacionada amb la funció immunològica, la signatura BCp53 permet categoritzar l'estat de p53 com a tipus mutant (mutant-like) o tipus no mutant (wild-type-like) en base a una signatura de 48 gens (256). En la nostra cohort, vam objectivar que les pacients amb alta expressió d'aquesta signatura (4 pacients de 37) presentaven una significant reducció de la SLP en primera línia, amb major presència de resistències primàries i una mediana de SLP menor a 6 mesos. Altres estudis també han utilitzat signatures semblants a la presentada en el treball i relacionades amb l'estat mutacional de p53 que també permeten identificar unes pacients amb un pitjor pronòstic i una menor SG (257, 258).

Pel que fa a les **signatures relacionades amb sistema immunològic**, aquestes es poden agrupar en 2 grans grups teòrics, aquelles relacionades amb la resposta immune antitumoral inflamatòria i/o d'infiltració limfocitària, com serien **IFNGamma o TIS**, i les relacionades amb mecanismes d'immunoevasió o d'immunotolerància, com són **Treg o PD1**. Cal remarcar que les signatures preestablertes de Nanostring són representatives de les vies de senyalització corresponents, però presenten una gran variabilitat tant pel que fa al nombre com el tipus de gens que les componen. A més, la selecció i contribució

relativa de cadascun dels gens al valor de la signatura, és també diversa i una funció preestablerta de la companyia, fet que pot dificultar la correlació amb paràmetres del sistema immunològic perifèric avaluats en aquest treball i la comparació amb altres estudis similars.

En línies generals, s'observa que la major expressió de la majoria de signatures immunològiques s'associa a un pitjor pronòstic. Així, valors elevats de les signatures **IFNGamma** (composta pels gens STAT1, CXCL9 i CXL10) i **la signatura TIS** (en anglès "tumour infiltration signature", composta per més de 18 gens), les quals informen de l'activitat anti-tumoral del sistema immunològic, s'han identificat com a factors pronòstic independents de pacients tractades amb iCDK4/6. IFN Gamma es va relacionar amb una reducció estadísticament significativa de la SLP en primera línia. Aquesta significança estadística es perdia a nivell de SG final, tot i que mantenia la mateixa tendència, amb menor SG en les pacients amb major expressió de la signatura IFN Gamma.

La signatura TIS mesura la presència del sistema immunològic adaptatiu en el tumor i s'ha establert com a possible predictor de teràpies anti-PD1 (259). La signatura TIS del panell BC360® està constituïda per gens relacionats amb la resposta a IFN, la presentació d'antígens, de cèl·lules NK, cèl·lules T i senyals inhibidors del sistema immune (per exemple PDL-1, LAG3 o IDO1). Per tant, és una signatura que indica infiltració intratumoral però d'una forma molt heterogènia.

Originalment, es va descriure la pèrdua de senyalització de IFN com un mecanisme de carcinogènesis i una resposta immunològica antitumoral deficitària (260). Fins i tot en alguns treballs es va combinar IFN β amb tamoxifè per revertir la resistència endocrina en càncer de mama, observant algunes respostes gràcies a l'activació de la resposta del sistema adaptatiu immunològic, amb increment de l'activitat de les cèl·lules NK i els limfòcits T citotòxics (261). En canvi, al TME, IFN γ és principalment alliberat pels limfòcits T citotòxics, estimulants per tant, la presentació antigènica i per tant, afavorint una resposta immunològica antitumoral eficaç. Ara bé, l'exposició crònica de IFN γ indueix l'expressió de factors immunosupressors com PD-L1 en macròfags i en cèl·lules tumorals, fet que condueix a un esgotament de les cèl·lules T i a un estat immunosupressor del TME, afavorint la immuno-evasió tumoral (260, 262). Per altra banda, i en contra del descrit en altres subtipus del càncer de mama, algun estudis han suggerit que els limfòcit intratumorals (TILs) promouen una ambient intra-tumoral indicatiu de mala resposta a la HT en pacients amb càncer de mama RH+(263), fet que aniria en concordança amb els nostres resultats de la signatura TIS.

Malgrat que esta força acceptat que la resposta dels iCDK4/6 va lligada a l'estimulació de la via IFN, la reducció de les cèl·lules Treg i a l'activació de cèl·lules T (178, 180),

dos estudis de neoadjuvència amb iCDK4/6 suggereixen que l'increment de senyalització de IFN γ s'associa a una resistència intrínseca i adquirida a iCDK4/6 (97, 264). Així doncs, a part de l'efecte antitumoral, l'increment de la via de senyalització d'IFN en càncer de mama RH+ també s'ha relacionat amb un TME favorable a resistència tractaments, a un major creixement tumoral i a la disseminació metastàtica. A més, l'activació de la via de IFN avaluat per signatures gèniques (265, 266), incloent la signatura relacionada amb resistència a palbociclib coneguda com IRPS (96) també s'ha associat a un increment d'expressió de checkpoint immunològics i esgotament de cèl·lules T, increment de cèl·lules Treg, increment de macròfags associats al tumor del tipus fenotip immunosupressor com els M2-like i a fibroblast associats al càncer, promovent l'estat d'evasió immunològica (267).

En línia amb aquesta observació, el nostre estudi va identificar també que la major expressió de la **signatura Treg** (basada amb l'expressió del gen FOXP3) es relacionava amb una menor SLP i SG en primera línia. La presència de cèl·lules T reguladores al microambient tumoral s'associa generalment a mecanismes de tolerància immunitària, amb un menor reconeixement d'antígens tumorals per part de les cèl·lules del sistema immunològic i la consegüent menor resposta del sistema immune, fet que s'ha relacionat amb una menor supervivència en pacients amb càncer de mama (268, 269).

Les cèl·lules T reguladores es caracteritzen per una alta expressió del receptor de membrana CD25, que s'uneix a la citocina IL2, i és aquesta disminució de IL2 al microambient tumoral la que modula la diferenciació de les cèl·lules T, disminuint les cèl·lules T efectores i provocant una tolerància immunitària. En aquest sentit, alguns autors han relacionat els nivells de citocina IL-2 a sang perifèrica com un possible factor pronòstic en càncer de mama (270), fet que en el nostre anàlisi no s'ha pogut confirmar, principalment per la baixa sensibilitat en la detecció de nivells plasmàtics de IL-2 de les tècniques utilitzades en aquesta tesi per la detecció de citocines.

Ara bé, sí que vam estudiar la representació de Treg circulants en sang perifèrica, malgrat la rellevància de les cèl·lules Treg al microambient tumoral, els nostres resultats no van poder relacionar la presència de Treg circulants com un factor de mal pronòstic, ja que no vam observar diferències de representació d'aquest subgrup (caracteritzades per expressió de CD3, CD4, CD25 i FOXP3) en els grups de mala i bona eficàcia, ni tampoc l'expressió de FOXP3 en limfòcits circulants, s'associés a una diferència en SLP o SG. Davant la rellevància de les cèl·lules Treg en el càncer i també com un mecanisme d'acció dels iCDK4/6 (179), la seva presència i impacte ha estat estudiat. Per exemple, s'ha descrit que les pacient afectes de CMM RH+, presenten un major número de cèl·lules Treg circulants en comparació un grup control de persones sense càncer(271). A més a més, les pacients totes les pacients en tractament amb iCDK4/6, els nivells de

Treg circulants es veuen reduïts durant el transcurs del tractament, una reducció més marcada en les pacients que presenten major resposta clínica (271).

Així doncs, tot i les evidències de la literatura i el valor pronòstic observat entre l'expressió de Treg basals a nivell intratumoral, aquestes observacions no s'han pogut confirmar en sang perifèrica en el nostre estudi. No obstant, l'anàlisi longitudinal de les mostres de la cohort serà clau per a donar resposta a aquest punt, ja que la reducció dels nivells de Treg durant el tractament amb iCDK4/6 postulada en estudis preclínic, sí que podria permetre identificar les pacients amb bona resposta el tractament, sent així un biomarcador de resposta.

Tanmateix, es fa molt difícil establir una relació directa entre un marcador immunològic únic i una resposta/evolució tumoral diferencial, conseqüència directa de la complexitat inherent del sistema immune, el qual compta amb múltiples mecanismes i vies estretament relacionades i de complexa regulació, la qual cosa implica que la funció d'un subtipus cel·lular sigui diversa en funció del moment i ambient concret. En aquest sentit, en el CMM, s'han descrit interaccions entre el RE i la via de IFN, a través d'efectes pleiotròpics del RE sobre el TME, induint la producció d'IFN γ a les cèl·lules T helper tipus 1 (Th1), promovent l'expansió de les cèl·lules Treg mitjançant checkpoints immunològics com PD-1 i CTLA-4, i reprimint l'expressió MHC de classe II induïda per IFN γ a les cèl·lules tumorals ER+. En aquest context, l'activació de diferents factors de transcripció tals com FOXA1 i el RE, conjuntament amb l'activació de gens transcrits a través de la via mitjançada per IFN i controlada per NF-KB, resulta en un augment de citocines proinflamatòries com IL-8 i IL-1, que també contribueixen a l'esgotament de les cèl·lules T i al reclutament de cèl·lules immunosupressores com les MDSC al TME(272-275). Així doncs, en termes generals, la senyalització sostinguda d'IFN en tumors RH+ podria promoure un TME esgotat i immunosupressor de cèl·lules T susceptible d'escapament immune de cèl·lules tumorals, supervivència i creixement agressiu en càncer de mama avançat RE + resistent a la teràpia.

En aquesta línia, el nostre anàlisi de factors solubles circulants no va observar diferències en els nivells basals de IFN γ , ni en la proporció de cèl·lules MDSC circulants mesurades per citometria de flux. Cal destacar un treball recent en el qual s'ha descrit una reducció en dels nivells de Mo-MDSC i PMN-MDSC durant el tractament en els pacients amb bona resposta a iCDK4/6 (271), per tant, serà rellevant l'anàlisi de les mostres longitudinals per observar biomarcadors de resposta dinàmics.

Ara bé, respecte a l'expressió de factors solubles circulants, hem identificat una població de pacients amb alts nivells de IL8 basals, els quals presentaven una SLP i SG reduïda. A més a més, els nivells de IL10 basals també tenen un impacte sobre SLP en el model conjunt de regressió logística de la nostra cohort. En concordança amb les nostres

troballes, nivells alts de IL8 i L10 s'han reportat com a rellevants en la predicció de SLP i SG en càncer de mama (276).

Davant la complexitat del sistema immunològic i de la multitud de factors que poden variar l'expressió de les diferents citocines a sang perifèrica, molts estudis han valorat la predicció del pronòstic de les pacients amb CMM en base a un conjunt de citocines. En la majoria de casos, i en concordança amb els nostres resultats, IL6, IL8, IL10 o IFN γ intervenen en el model establert, trobant que una major expressió dels mateixos predisposa a una reducció de la SG (277, 278).

Finalment, **la signatura PD1** també es va identificar com a factor pronòstic. Aquesta signatura es basa únicament amb el gen *PDCD1* (programmed cell death 1) que transcriu la proteïna PD1 o CD279 i es troba expressada sobretot en limfòcits. L'alta expressió d'aquesta proteïna és un regulador negatiu de l'activació de la resposta immunològica prevenint la proliferació i secreció de citocines. A més, l'expressió de PD1 al microambient tumoral s'ha associat amb la presència de cèl·lules T específiques de tumor. El valor pronòstic de l'eix PD1/PDL1 en pacients amb CMM, també ha estat força discutit, amb resultats que relacionen una alta expressió de PD1 amb una pitjor SG (279). En contraposició, altres estudis més focalitzats en el microambient tumoral, han reportat una correlació entre l'alta expressió del gen *PDCD1* amb una millora en el temps de recaiguda i la SG en malaltia localitzada (280).

El nostre estudi de biòpsia líquida, també considerava les diferents proteïnes checkpoint immunològiques que representen un sistema immunològic exhaust com són CTLA-4, PD-1, LAG3 i TIM3. Aquestes proteïnes s'han relacionat en càncer de mama amb la supressió de la resposta immunològica en tumors localitzats (281). En el nostre estudi, l'expressió en sang perifèrica de IL10, TIM3, PD-1, CTLA-4 i LAG3 va permetre desenvolupar un model predictiu de bona o mala eficàcia independent de la línia de tractament. Altres treballs, han buscat fórmules semblants intentant predir la SG als 5 anys basats en l'expressió de citocines en sang perifèrica, creant models predictius a partir de diferents factors solubles i amb resultats anàlegs al nostre (282). En concordança amb tot l'anterior i el descrit prèviament, l'anàlisi multivariat de SLP i SG de la nostra cohort independentment de la línia de tractament, identifica un grup de pacients amb alta expressió de TIM3 soluble en sang que presenten mala evolució clínica i una reducció estadísticament significativa de SLP i SG.

Finalment, i reforçant el paper dels checkpoint immunològics en el CMM RH+ i l'eficàcia dels iCDK4/6, el nostre estudi, estableix que una determinació basal de les cèl·lules immunològiques pot permetre predir una resposta immunològica millorada al tractament amb iCDK4/6. Així doncs, **l'expressió de CTLA4 en limfòcits T** es va observar sobreexpressada en el grup de pacients definits com a mala resposta clínica independentment

de la línia. En consonància amb aquestes dades, també vam identificat grups de pacients amb mal pronòstic segons la seva expressió de PD-1 o CTLA-4 en limfòcits T CD4 circulants. En concret, les pacients amb alta expressió de CTLA-4 o PD-1 (menys representat), van presentar menor benefici clínic al tractament amb iCDK4/6 amb una reducció de SLP, i en el cas d'alta expressió de CTLA-4, també en SG, considerant que les pacients amb un sistema immunològic circulant exhaust, presenten una menor capacitat de resposta a iCDK4/6 i un pitjor pronòstic.

En termes generals les nostres dades, confirmarien la sospita de l'estudi RIBBECA, on també s'analitzava el benefici immunomodulador de ribociclib i descriuen els canvis del repertori i la clonalitat de les cèl·lules T durant el tractament, observant que ribociclib més letrozol, promou una resposta del sistema immunològic adaptatiu preexistent més que no pas una inducció d'una resposta *de novo* (283). Aquest mateix estudi, també descriu la sobrerregulació de diferents signatures relacionades amb el sistema adaptatiu (IFN tipus I i II, i l'increment de la presentació d'antígens), la disminució de senyalització de citocines immunosupressores (CCL2, CCL7 i CCL22 relacionades amb Treg i macròfags M2-like) i la reducció de la poblacions de cèl·lules Treg (CD4+FOXP3+CD25+) que tenen lloc durant el tractament amb iCDK4/6(283), observacions en general, alineades amb les nostres troballes.

Per tant, podem concloure que per a una millor eficàcia al tractament amb iCDK4/6 en combinació amb hormonoteràpia, les característiques immunològiques de la pacient prèvies a l'inici d'aquest són rellevants; fet relacionat a l'existència d'un sistema immunològic competent. Evidències inicials indiquen que aquestes característiques concretes es podrien determinar en sang perifèrica basant-se amb l'expressió de CTLA-4 i PD-1 en els limfòcits CD4 circulants de la pacient i una combinació de factors solubles circulants que inclouria diferents molècules del checkpoint immunològic i IL10.

En definitiva, la identificació de paràmetres relacionats amb la resposta immunològica que prediuen l'evolució del iCDK4/6 en les pacients amb CMM RH+ obre les portes a possibilitat d'identificar quines pacients es podrien beneficiar de noves estratègies immunològiques per tal d'optimitzar les respostes al tractament.

Inhibidors de CDK, funció immunològica i opcions d'optimitzar-ne l'eficàcia.

Donada la interacció entre el sistema immune i la funció dels iCDK4/6, ja sigui com a immunomoduladors o com a potenciadors de la resposta immunològica, diferents estudis han intentat testar la sinèrgia de combinacions de iCDK4/6 amb immunoteràpia amb possible benefici en estudi preliminar (284, 285). Així doncs, i també amb concordança amb resultats presentats en models animals (181), s'ha testat la combinació dels iCDK4/6 i anti-PD-1 en persones. Per exemple, en un estudi fase Ib es

combinava abemaciclib i pembrolizumab, malauradament la combinació va mostrar un increment de la toxicitat hepàtica (G3: 42.2% vs. 16.8%) i de pneumonitis tòxica (G3 7.7% vs. 1.2%) en comparació amb els estudis MONARCH-3 sense immunoteràpia; a més, la combinació tampoc afegia benefici ni en SLP ni en SG, fet possiblement degut al número de discontinuacions del tractament (286). Per això, els autors no recomanaven seguir desenvolupant recerca clínica amb aquesta combinació. Ara bé, assumint l'increment de toxicitat per la major activació del sistema immunològic, caldria identificar quines pacients presenten un sistema immunològic exhaust i es beneficiarien clínicament de la combinació de iCDK4/6 i anti-PD-1, intentant identificar combinacions amb una menor toxicitat.

La hipòtesi de que les pacients amb un sistema immunològic concret es beneficien de la combinació, també ha estat abordada en un treball on les pacients amb CMM RH+ politractades, rebien pembrolizumab + HT amb o sense palbociclib. Les pacients que presentaven resposta al tractament en el grup del triplet, presentaven basalment, un major nombre de cèl·lules T *effector memory*, fet que no s'observava en pacients amb resposta al grup tractat amb pembrolizumab + HT, sense iCDK4/6 (287). Això suggereix la necessitat pre-existent en l'hoste de cèl·lules T circulants amb capacitat per induir la resposta immunològica dels inhibidors de CDK4/6, en la mateixa línia que els resultats obtinguts a la nostra població.

Així, la nostra observació referent a l'alta expressió de CTLA-4 en limfòcits T observada en sang perifèrica en les pacients amb mal pronòstic, suggereix la necessitat de valorar l'opció de combinació de iCDK4/6 amb anti-CTLA-4. És conegut que CTLA-4, expressat a les cèl·lules T, bloqueja CD80 i CD86 de les cèl·lules dendrítiques i inhibeix la resposta immunològica de les cèl·lules T (288). Alguns dels inhibidors de CTLA-4 (tremelimumab i ipilimumab) han estat avaluats en càncer de mama, per exemple tremelimumab en un estudi fase I va obtenir uns resultats modestos amb malaltia estable com a millor resposta, però una SG de 50.8 mesos (289). De moment, només estudis *in vitro* o en models animals, han demostrat sinèrgia la combinació de iCDK4/6 amb anti-CTLA-4, però no hi ha dades de seguretat ni eficàcia de la combinació en pacients amb CMM(183).

L'estat immunosupressor del TME en les pacient amb CMM, observat amb l'increment de la signatura Treg al TME de les pacients amb pitjor pronòstic a la nostra cohort, també s'ha intentat abordar terapèuticament. Una opció seria la utilització de tractament dirigit contra el checkpoint immunològic LAG-3, el qual presenta alts nivells d'expressió tant en cèl·lules Treg com en limfòcits T desactivats. Per tant, els anticossos anti-LAG-3 permetrien, no només inhibir l'activitat immunosupressora de les Treg sinó també activar les cèl·lules T efectores. L'estudi fase I en pacients amb càncer de mama, tractats amb

anti-LAG3 + paclitaxel, va demostrar activitat (290) i en els pròxims anys segurament serà avaluat en estudis en fases més avançades (NCT05747794); fins i tot avaluant-lo de combinar-lo amb iCDK4/6 en aquelles pacients amb desregulació immunològica observada tant el TME o en cèl·lules circulants.

En el mateix sentit, anticossos anti-CD25, marcador expressat a la membrana de les cèl·lules Treg s'han testat en combinació amb anti-PD-1, demostrant sinèrgia en models animals (291). Aquesta podria ser una estratègia prèvia per tal de millorar la resposta a iCDK4/6 en les pacients amb desregulació immunològica com demostra el nostre estudi.

L'altre factor rellevant observat al nostre treball, és la desregulació crònica **de IFN al TME**, i que també s'ha associat a resistència a palbociclib + HT (96). Tenint en compte que la via de senyalització de IFN pot induir canvis en l'expressió de proteïnes de punt de control com PD-L1, CTLA-4 o LAG-3, incrementar la infiltració al TME de cèl·lules Treg i provocar canvis de fenotip als macròfags (cap a M2-like), guanya pes la idea de combinar tractament de regulació del sistema immunològic amb iCDK4/6, no només per millorar l'eficàcia dels iCDK4/6, sinó també per revertir o prevenir-ne la resistència.

Aquests canvis al microambient tumoral, probablement són els observats a nivell perifèric amb canvis d'expressió de CTLA-4 o PD-1 a cèl·lules T circulants, o fins i tot en els nivells de IL-8 i TIM3 en el nostre estudi. Tot i això, com a conseqüència de la disponibilitat de mostres o de la falta de seguiment en alguns casos, no disposem de suficient nombre de mostres amb tots els paràmetres ben estudiats, fet que no ens permet correlacionar els paràmetres pronòstics independents identificats (nivells de TIM3 solubles, CTLA4 en limfòcits circulants i signatures genètiques en el TME).

Malgrat els punts dèbils del treball com: i) l'heterogeneïtat de les característiques de les pacients, ii) els diferents iCDK4/6 estudiats, els quals malgrat tenir un mecanisme d'acció comú a nivell de cicle cel·lular, tenen diferències significatives pel que fa a la seva capacitat immunomoduladora, iii) el tamany reduït de la mostra i la participació d'un sol centre en l'estudi, iv) biòpsies de teixit tumoral primari i metastàtic, que poden comportar canvis en l'evolució tumoral i immunoevasió, v) falta d'anàlisi longitudinal de les mostres durant el tractament i a la progressió i vi) falta d'anàlisi exhaustiu de totes les tècniques en les mateixes pacients; **el nostre estudi identifica una població de pacients amb CMM RH+ amb desregulació del sistema immunològic a nivell del TME i també en factors immunològics circulants en sang perifèrica, fet que implica una mala evolució al tractament amb iCDK4/6 i HT, a més d'un pitjor pronòstic** (Figura 47). Aquestes resultats, plantegen la hipòtesi que aquestes pacients es podrien beneficiar d'un abordatge immunomodulador previ a l'inici d'un iCDK4/6, ja sigui via inhibició d'algun checkpoint immunològic o altres canvis en el sistema immunològic, fet que permetria optimitzar el seu tractament i evolució.

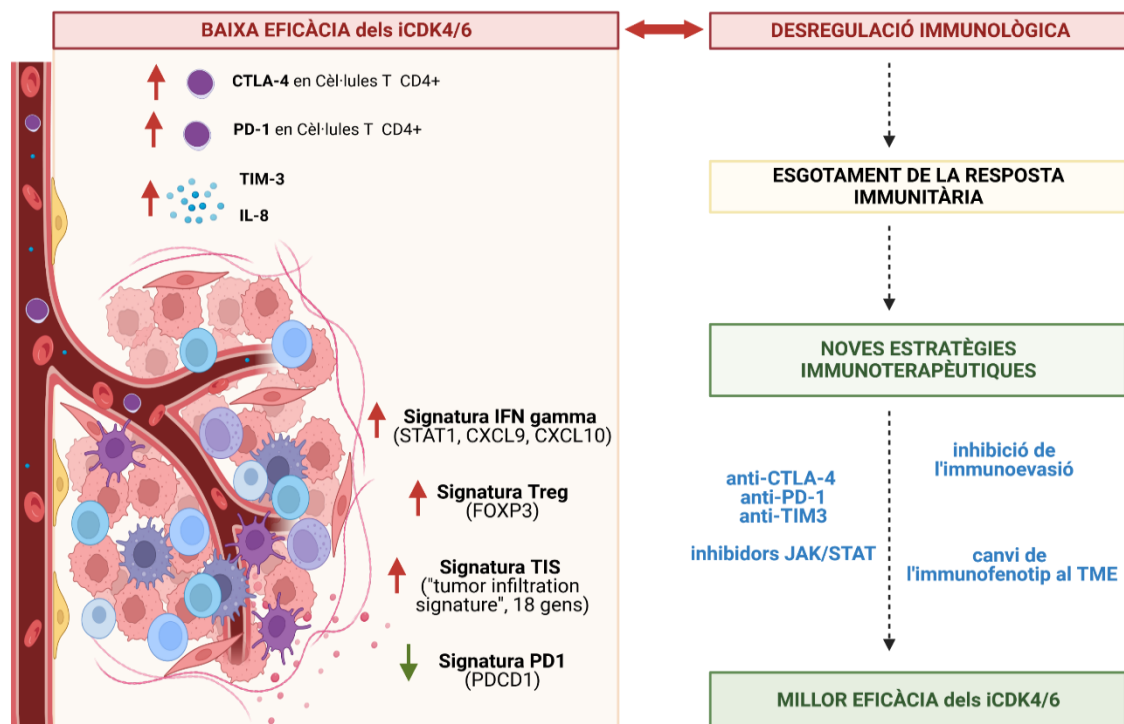


Figura 47. Representació resum de les troballes en sang i al TME del grup de pacients amb menor eficàcia als iCDK4/6. Les pacients que han demostrat menor eficàcia als iCDK4/6 presenten un increment d'expressió de CTLA4 i PD1 en limfòcits T CD4+ circulants, a més d'uns nivells de TIM-3 i IL-8 elevats en plasma. A nivell de TME, s'ha objectivat també una major expressió de signatures com IFNgamma, Treg o TIS. Aquests fenòmens són indicatius de una desregulació del sistema immunitari com a mecanisme de resistència. Aquestes característiques suggereixen un esgotament del sistema immunitari, el qual es podria abordar mitjançant noves estratègies immunomoduladores per optimitzar l'eficàcia del iCDK4/6 en pacients amb CMM RH+.

7. CONCLUSIONS

- 1- Les pacients tractades amb iCDK4/6 en la pràctica assistencial obtenen un benefici similar al reportat. L'afectació visceral, l'afectació òssia exclusiva, la QT prèvia per CMM i l'hormona-resistència s'identifiquen com a factors pronòstics clínics.
- 2- Tot i que el subtipus intrínsec tumoral i/o la presencia de mutacions a ctDNA permeten identificar grups amb pitjor pronòstic, aquestes troballes no expliquen l'eficàcia del tractament amb iCDK4/6.
- 3- La categorització de dos grups clínica i biològicament ben balancejats en funció de la SLP dels estudis pivotals, ha permès l'avaluació de paràmetres immunològics d'eficàcia al tractament amb iCDK4/6.
- 4- L'anàlisi transcriptòmic dels tumors identifica l'elevada expressió de signatures immunològiques com factor de mal pronòstic, confirmant la rellevància del sistema immunitari en el mecanisme d'acció i resistència dels iCDK4/6.
- 5- La caracterització de la funció immunològica mitjançant l'avaluació de factors solubles i subtipus de cèl·lules circulants, apunta a una desregulació indicativa d'esgotament immunològic (augment dels checkpoint immunològics i la població de limfòcits CD4+CTLA-4+) com a determinant de pitjor pronòstic.

8. FUTURES LÍNIES

Aquest projecte ha posat les bases per iniciar una línia de recerca dedicada a la immunitat en el càncer de mama gràcies a la col·laboració del grup clínic especialitzat del càncer de mama de l'Institut Català d'Oncologia de Badalona i el grup de recerca bàsica en immunologia d'interacció Virus-Hoste (ViHIT) de l'Institut de Recerca IrsiCaixa. Al llarg de la tesis s'han mostrat els resultats obtinguts en mostres basals, però a partir de la cohort presentada en aquesta tesis, que encara segueix en reclutament, i gràcies al seguiment tant clínic com en l'obtenció de mostres biològiques al llarg del tractament, es realitzarà l'estudi longitudinal. Això permetrà observar els canvis en sang perifèrica dels diferents factors solubles, analitzant els canvis en els nivells de les diferents citocines i *checkpoints* immunològics solubles durant el tractament, per tal d'observar els canvis produïts pels iCDK4/6 sobre el sistema immunològic i la correlació d'aquests canvis amb el pronòstic de l'eficàcia. Així mateix, també s'estudiarà l'immunofenotip en mostres de seguiment, per tal de confirmar l'alta expressió de CTLA-4 en limfòcits CD4+ circulants com un factor d'esgotament immunològic i d'incapacitat d'activació de la resposta immunològica per part dels iCDK4/6.

Les mostres a la progressió, tant a nivell tumoral com en sang perifèrica, permetran aprofundir en els mecanismes de resistència secundària que poden aparèixer o tanmateix confirmar alguns dels marcadors ja observats en les mostres basals, com serien els de la signatures de mala resposta presentades en els resultats d'aquest treball (alta expressió de la signatura BCp53, IFN γ , TIS o Treg, i la baixa expressió de PD1).

Per tal d'ampliar el coneixement de l'impacte del sistema immunològic en les pacients amb CMM RH+, s'utilitzaran les mateixes mostres de PBMCs de la cohort i es realitzarà un anàlisi transcriptòmic de cèl·lula única (single cell, scRNA) amb mostres prèvies al tractament, als 3 mesos i a la progressió, en pacients de bona eficàcia i de mala eficàcia. L'anàlisi de scRNA, amb la seqüenciació de 10.000 cèl·lules en cada pacient i diferents punt de tall, permetrà obtenir una informació molt més detallada dels canvis d'expressió de les cèl·lules circulants tant en les pacients amb bona com mala resposta, a més dels canvis induïts pel propi tractament. Això permetrà obrir noves hipòtesis sobre mecanismes de sensibilitat o resistència en relació a la resposta immunològica dels iCDK4/6 i hormonoteràpia.

Les observacions actuals, juntament amb les futures dels anàlisis de mostres longitudinals i del single cell, necessitaran una validació funcional per tal de confirmar la seva activitat biològica. Així doncs, es preveu iniciar un projecte paral·lel d'obtenció de material en fresc de tumor per la realització d'organoides derivats de tumor de pacients. Aquest model, juntament amb l'obtenció de cèl·lules sanguínies autòlogues, ens

permetrà dissenyar estudis funcionals per validar les observacions obtingudes de l'estudi de la cohort clínica, a més de disposar d'un model validat on proposar i estudiar noves estratègies terapèutiques que permetin millorar l'eficàcia del iCDK4/6, com per exemple la combinació amb inhibidors del *checkpoint* immunològic (ICIs) com anti-CTLA-4 o anti-PD-1.

Finalment, com a objectiu a mig termini, ens proposem establir una línia de recerca estable encaminada a l'estudi de la funció immunològica en càncer de mama, amb la missió final de proporcionar bases biològiques que permetin avançar cap a l'aplicació de la immunoteràpia en càncer de mama, malaltia en la qual els resultats actuals són subòptims i que de ben segur permetrà dissenyar noves estratègies de tractament per millorar l'esperança de vida de les pacients amb CMM.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
2. Organization WH. International Agency for Research on cancer. : WHO; 2022 [Available from: <https://www.iarc.fr/>].
3. (SEOM). SEOM. Las cifras de cáncer en España 2022. 2022.
4. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 2000;152(10):950-64.
5. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):48-65.
6. Land CE, Tokunaga M, Koyama K, Soda M, Preston DL, Nishimori I, et al. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiat Res*. 2003;160(6):707-17.
7. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):651-72.
8. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*. 2007;25(11):1329-33.
9. Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(3):1125-30.
10. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, Morreau H, Klijn JG, Hoogerbrugge N, et al. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer Res*. 2003;63(23):8153-7.
11. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 1994;139(8):819-35.
12. Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, et al. Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control*. 2002;13(8):741-51.
13. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(3):227-36.
14. Elkin EB, Klem ML, Gonzales AM, Ishill NM, Hodgson D, Ng AK, et al. Characteristics and outcomes of breast cancer in women with and without a history of radiation for Hodgkin's lymphoma: a multi-institutional, matched cohort study. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2466-73.
15. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist*. 2003;8(4):326-34.
16. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(4):290-303.
17. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
18. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-220.
19. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 2014;384(9938):164-72.
20. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2147-59.
21. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-28.

22. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(25):2394-405.
23. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54(1):8-29.
24. Biganzoli L, Battisti NML, Wildiers H, McCartney A, Colloca G, Kunkler IH, et al. Updated recommendations regarding the management of older patients with breast cancer: a joint paper from the European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA) and the International Society of Geriatric Oncology (SIOG). *Lancet Oncol*. 2021;22(7):e327-e40.
25. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018;391(10125):1023-75.
26. Malmgren JA, Mayer M, Atwood MK, Kaplan HG. Differential presentation and survival of de novo and recurrent metastatic breast cancer over time: 1990-2010. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;167(2):579-90.
27. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, Andre F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020;31(12):1623-49.
28. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, de Azambuja E, DeMichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2021;32(12):1475-95.
29. Dieci MV, Griguolo G, Bottosso M, Tsvetkova V, Giorgi CA, Vernaci G, et al. Impact of estrogen receptor levels on outcome in non-metastatic triple negative breast cancer patients treated with neoadjuvant/adjuvant chemotherapy. *npj Breast Cancer*. 2021;7(1).
30. Paakkola NM, Karakatsanis A, Mauri D, Foukakis T, Valachis A. The prognostic and predictive impact of low estrogen receptor expression in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *ESMO Open*. 2021;6(6):100289.
31. Prat A, Tsai YH, Pascual T, Paré L, Adamo B, Vidal M, et al. A Prognostic Model Based on PAM50 and Clinical Variables (PAM50MET) for Metastatic Hormone Receptor-positive HER2-negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(23):6141-8.
32. Burstein HJ. Systemic Therapy for Estrogen Receptor–Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(26):2557-70.
33. Glück S. Consequences of the Convergence of Multiple Alternate Pathways on the Estrogen Receptor in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2017;17(2):79-90.
34. Hoefnagel LDC, Moelans CB, Meijer SL, Van Slooten H-J, Wesseling P, Wesseling J, et al. Prognostic value of estrogen receptor α and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Cancer*. 2012;118(20):4929-35.
35. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45(12):1439-45.
36. Turner NC, Swift C, Kilburn L, Fribbens C, Beaney M, Garcia-Murillas I, et al. ESR1 Mutations and Overall Survival on Fulvestrant versus Exemestane in Advanced Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: A Combined Analysis of the Phase III SoFEA and EFECT Trials. *Clin Cancer Res*. 2020;26(19):5172-7.
37. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(313):313ra182.
38. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2406-13.
39. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4452-61.

40. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):802-7.
41. Sabine VS, Crozier C, Brookes CL, Drake C, Piper T, van de Velde CJ, et al. Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):2951-8.
42. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929-40.
43. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(6):520-9.
44. Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttitta F, Pellegrini S, Barbazza R, et al. Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression. *Int J Cancer*. 1997;74(2):171-4.
45. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1996;69(2):92-9.
46. Jirström K, Stendahl M, Rydén L, Kronblad A, Bendahl PO, Stål O, et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res*. 2005;65(17):8009-16.
47. Finn RS, Aleshin A, Slamon DJ. Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):17.
48. Akli S, Keyomarsi K. Low-molecular-weight cyclin E: the missing link between biology and clinical outcome. *Breast Cancer Res*. 2004;6(5):188-91.
49. Zhang Y, Moerkens M, Ramaiahgari S, de Bont H, Price L, Meerman J, et al. Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res*. 2011;13(3):R52.
50. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91.
51. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):518-28.
52. Gutierrez-Chamorro L, Felip E, Ezeonwumelu IJ, Margelí M, Ballana E. Cyclin-dependent Kinases as Emerging Targets for Developing Novel Antiviral Therapeutics. *Trends Microbiol*. 2021;29(9):836-48.
53. Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 22):5171-80.
54. Nemet J, Jelacic B, Rubelj I, Sopta M. The two faces of Cdk8, a positive/negative regulator of transcription. *Biochimie*. 2014;97:22-7.
55. Stephenson JJ, Nemunaitis J, Joy AA, Martin JC, Jou YM, Zhang D, et al. Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;83(2):219-23.
56. Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4215-24.
57. Yu Q, Sicinska E, Geng Y, Ahnström M, Zagozdzon A, Kong Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell*. 2006;9(1):23-32.
58. Goel S, Decristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in Cell Biology*. 2018;28(11):911-25.
59. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(11):1427-38.
60. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, Del Prado M, Lallena MJ, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent

anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs*. 2014;32(5):825-37.

61. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):25-35.

62. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(20):1925-36.

63. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im S-A, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(4):425-39.

64. Turner NC, Slamon DJ, Ro J, Bondarenko I, Im S-A, Masuda N, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(20):1926-36.

65. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(7):1541-7.

66. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap Y-S, Sonke GS, Hart L, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(10):942-50.

67. Im SA, Lu YS, Bardia A, Harbeck N, Colleoni M, Franke F, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Endocrine Therapy in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(4):307-16.

68. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Fasching PA, De Laurentiis M, Im SA, et al. Phase III Randomized Study of Ribociclib and Fulvestrant in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: MONALEESA-3. *J Clin Oncol*. 2018;36(24):2465-72.

69. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Jerusalem G, De Laurentiis M, Im S, et al. Ribociclib plus fulvestrant for postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer in the phase III randomized MONALEESA-3 trial: updated overall survival. *Ann Oncol*. 2021;32(8):1015-24.

70. Johnston S, Martin M, Di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2019;5:5.

71. Goetz M.P. MT, J. Huober, J. Sohn, O. Tredan, I.H. Park, M. Campone, S.C. Chen, L.M. Manso Sanchez, S. Paluch-Shimon, G. van Hal, A. Shahir, H. Iwata, S. Johnston. Abstract LBA15 - MONARCH 3: Interim overall survival (OS) results of abemaciclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor (NSAI) in patients (pts) with HR+, HER2- advanced breast cancer (ABC). *Annals of Oncology* (2022) 33 (suppl_7): S808-S869 101016/annonc/annonc10892022.

72. Sledge GW, Jr., Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, et al. MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2875-84.

73. Sledge GW, Jr, Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, et al. The Effect of Abemaciclib Plus Fulvestrant on Overall Survival in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Breast Cancer That Progressed on Endocrine Therapy—MONARCH 2: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*. 2020;6(1):116-24.

74. Finn RS, Rugo HS, Dieras VC, Harbeck N, Im S-A, Gelmon KA, et al. Overall survival (OS) with first-line palbociclib plus letrozole (PAL+LET) versus placebo plus letrozole (PBO+LET) in women with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative

advanced breast cancer (ER+/HER2- ABC): Analyses from PALOMA-2. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA1003-LBA.

75. Goetz MP, Toi M, Huober J, Sohn J, Tredan O, Park IH, et al. LBA15 - MONARCH 3: Interim overall survival (OS) results of abemaciclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor (NSAI) in patients (pts) with HR+, HER2- advanced breast cancer (ABC). 2022.

76. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Fasching PA, De Laurentiis M, Im S-A, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(6):514-24.

77. Lu YS, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Cardoso F, et al. Updated Overall Survival of Ribociclib plus Endocrine Therapy versus Endocrine Therapy Alone in Pre- and Perimenopausal Patients with HR+/HER2- Advanced Breast Cancer in MONALEESA-7: A Phase III Randomized Clinical Trial. *Clin Cancer Res*. 2022;28(5):851-9.

78. Sledge GW, Jr., Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, et al. The Effect of Abemaciclib Plus Fulvestrant on Overall Survival in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Breast Cancer That Progressed on Endocrine Therapy-MONARCH 2: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(1):116-24.

79. Park YH, Kim TY, Kim GM, Kang SY, Park IH, Kim JH, et al. Palbociclib plus exemestane with gonadotropin-releasing hormone agonist versus capecitabine in premenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer (KCSG-BR15-10): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(12):1750-9.

80. Martin M, Zielinski C, Ruiz-Borrego M, Carrasco E, Turner N, Ciruelos EM, et al. Palbociclib in combination with endocrine therapy versus capecitabine in hormonal receptor-positive, human epidermal growth factor 2-negative, aromatase inhibitor-resistant metastatic breast cancer: a phase III randomised controlled trial-PEARL. *Ann Oncol*. 2021;32(4):488-99.

81. Álvarez-Fernández M, Malumbres M. Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. *Cancer Cell*. 2020;37(4):514-29.

82. Goetz M, O'Shaughnessy J, Sledge G, Jr., Martin M, Lin Y, Forrester T, et al. Abstract GS6-02: The benefit of abemaciclib in prognostic subgroups: An exploratory analysis of combined data from the MONARCH 2 and 3 studies. *Cancer Research*. 2018;78(4_Supplement):GS6-02-GS6-.

83. Condorelli R, Spring L, O'Shaughnessy J, Lacroix L, Bailleux C, Scott V, et al. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(3):640-5.

84. Turner NC, O'Leary B, Cutts R, Liu Y, Hrebien S, Huang X, et al. Genetic landscape of resistance to CDK4/6 inhibition in circulating tumor DNA (ctDNA) analysis of the PALOMA3 trial of palbociclib and fulvestrant versus placebo and fulvestrant. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):1001-.

85. Wander SA, Cohen O, Gong X, Johnson GN, Buendia-Buendia JE, Lloyd MR, et al. The Genomic Landscape of Intrinsic and Acquired Resistance to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Patients with Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discov*. 2020;10(8):1174-93.

86. Finn R, Liu Y, Martin M, Rugo H, Dieras V, Im S-A, et al. Abstract P2-09-10: Comprehensive gene expression biomarker analysis of CDK 4/6 and endocrine pathways from the PALOMA-2 study. *Cancer Research*. 2018;78(4_Supplement):P2-09-10-P2-09-10.

87. Yang C, Li Z, Bhatt T, Dickler M, Giri D, Scaltriti M, et al. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene*. 2017;36(16):2255-64.

88. Li Z, Razavi P, Li Q, Toy W, Liu B, Ping C, et al. Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell*. 2018;34(6):893-905.e8.

89. Gong X, Litchfield LM, Webster Y, Chio LC, Wong SS, Stewart TR, et al. Genomic Aberrations that Activate D-type Cyclins Are Associated with Enhanced Sensitivity to the CDK4 and CDK6 Inhibitor Abemaciclib. *Cancer Cell*. 2017;32(6):761-76.e6.

90. Dean JL, Thangavel C, McClendon AK, Reed CA, Knudsen ES. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene*. 2010;29(28):4018-32.
91. Turner NC, Liu Y, Zhu Z, Loi S, Colleoni M, Loibl S, et al. Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(14):1169-78.
92. Finn RS, Liu Y, Zhu Z, Martin M, Rugo HS, Diéras V, et al. Biomarker Analyses of Response to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibition and Endocrine Therapy in Women with Treatment-Naïve Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(1):110-21.
93. Vijayaraghavan S, Karakas C, Doostan I, Chen X, Bui T, Yi M, et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers. *Nat Commun*. 2017;8:15916.
94. Formisano L, Lu Y, Servetto A, Hanker AB, Jansen VM, Bauer JA, et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun*. 2019;10(1):1373.
95. Prat A, Chaudhury A, Solovieff N, Paré L, Martinez D, Chic N, et al. Correlative Biomarker Analysis of Intrinsic Subtypes and Efficacy Across the MONALEESA Phase III Studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(13):1458-67.
96. De Angelis C, Fu X, Cataldo ML, Nardone A, Pereira R, Veeraraghavan J, et al. Activation of the IFN Signaling Pathway is Associated with Resistance to CDK4/6 Inhibitors and Immune Checkpoint Activation in ER-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2021;27(17):4870-82.
97. De Angelis C, Fu X, Cataldo ML, Nardone A, Pereira R, Veeraraghavan J, et al. Activation of the IFN Signaling Pathway is Associated with Resistance to CDK4/6 Inhibitors and Immune Checkpoint Activation in ER-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2021.
98. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*: Elsevier; 2021.
99. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
100. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
101. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
102. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-65.
103. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, et al. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res*. 2000;60(13):3333-7.
104. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3937-47.
105. Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol*. 2012;2012:181987.
106. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *Jama*. 2001;285(13):1736-45.
107. Jacobs EJ, Newton CC, Gapstur SM, Thun MJ. Daily aspirin use and cancer mortality in a large US cohort. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(16):1208-17.
108. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(6):345-59.
109. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016;164(6):1233-47.
110. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3338-46.
111. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4410-7.
112. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399-416.

113. Gonzalez H, Robles I, Werb Z. Innate and acquired immune surveillance in the postdissemination phase of metastasis. *Febs j.* 2018;285(4):654-64.
114. Zhang QW, Liu L, Gong CY, Shi HS, Zeng YH, Wang XZ, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012;7(12):e50946.
115. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-55.
116. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol.* 2013;4:129.
117. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52-67.
118. Srivastava K, Hu J, Korn C, Savant S, Teichert M, Kapel SS, et al. Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth. *Cancer Cell.* 2014;26(6):880-95.
119. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, et al. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell.* 2016;29(4):587-601.
120. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
121. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res.* 2016;76(6):1367-80.
122. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med.* 2016;8(361):361ra138.
123. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(3):200-7.
124. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183-94.
125. Wang TT, Zhao YL, Peng LS, Chen N, Chen W, Lv YP, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut.* 2017;66(11):1900-11.
126. Casbon AJ, Lohela M, Werb Z. Delineating CSF-1-dependent regulation of myeloid cell diversity in tumors. *Oncoimmunology.* 2015;4(6):e1008871.
127. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):112-23.
128. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91-128.
129. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88(3):577-83.
130. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(12):940-52.
131. Liu RB, Engels B, Arina A, Schreiber K, Hyjek E, Schietinger A, et al. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors. *Cancer Res.* 2012;72(8):1964-74.
132. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014;40(5):642-56.
133. Beer TM, Bernstein GT, Corman JM, Glode LM, Hall SJ, Poll WL, et al. Randomized trial of autologous cellular immunotherapy with sipuleucel-T in androgen-dependent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4558-67.

134. Donadon M, Hudspeth K, Cimino M, Di Tommaso L, Preti M, Tentorio P, et al. Increased Infiltration of Natural Killer and T Cells in Colorectal Liver Metastases Improves Patient Overall Survival. *J Gastrointest Surg.* 2017;21(8):1226-36.
135. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol.* 2006;18(11):1591-602.
136. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996;77(7):1303-10.
137. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity.* 2000;13(2):265-76.
138. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
139. Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clin Transl Immunology.* 2017;6(9):e154.
140. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009;206(13):3015-29.
141. Campbell DJ. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *J Immunol.* 2015;195(6):2507-13.
142. Metelli A, Wu BX, Fugle CW, Rachidi S, Sun S, Zhang Y, et al. Surface Expression of TGF β Docking Receptor GARP Promotes Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(24):7106-17.
143. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):137-48.
144. de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell.* 2005;7(5):411-23.
145. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 2011;71(10):3505-15.
146. Andreu P, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, et al. FcR γ activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2010;17(2):121-34.
147. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol.* 2005;26(12):668-75.
148. Showalter A, Limaye A, Oyer JL, Igarashi R, Kittipatarin C, Copik AJ, et al. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine.* 2017;97:123-32.
149. Frydrychowicz M, Boruckowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. The Dual Role of Treg in Cancer. *Scand J Immunol.* 2017;86(6):436-43.
150. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):599-611.
151. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CM, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell.* 2014;26(5):623-37.
152. Chia S, Bedard PL, Hilton J, Amir E, Gelmon K, Goodwin R, et al. A Phase Ib Trial of Durvalumab in Combination with Trastuzumab in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer (CCTG IND.229). *Oncologist.* 2019;24(11):1439-45.
153. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im S-A, Yusof MM, Gallardo C, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2022;387(3):217-26.

154. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(11):2598-608.
155. Thomas A, Routh ED, Pullikuth A, Jin G, Su J, Chou JW, et al. Tumor mutational burden is a determinant of immune-mediated survival in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7(10):e1490854.
156. Shi LZ, Fu T, Guan B, Chen J, Blando JM, Allison JP, et al. Interdependent IL-7 and IFN- γ signalling in T-cell controls tumour eradication by combined α -CTLA-4+ α -PD-1 therapy. *Nat Commun*. 2016;7:12335.
157. Nakayama Y, Mimura K, Tamaki T, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, et al. Phospho-STAT1 expression as a potential biomarker for anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy for breast cancer. *International Journal of Oncology*. 2019.
158. Badr NM, Berditchevski F, Shaaban AM. The Immune Microenvironment in Breast Carcinoma: Predictive and Prognostic Role in the Neoadjuvant Setting. *Pathobiology*. 2020;87(2):61-74.
159. Yu X, Zhang Z, Wang Z, Wu P, Qiu F, Huang J. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(5):497-506.
160. Vihervuori H, Autere TA, Repo H, Kurki S, Kallio L, Lintunen MM, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8(+) T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(12):3105-14.
161. Park JH, Jonas SF, Bataillon G, Criscitiello C, Salgado R, Loi S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1941-9.
162. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(7):559-69.
163. Loi S, Salgado R, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor infiltrating lymphocyte stratification of prognostic staging of early-stage triple negative breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2022;8(1).
164. de Jong VMT, Wang Y, Ter Hoeve ND, Opdam M, Stathonikos N, Józwiak K, et al. Prognostic Value of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Young, Node-Negative, Triple-Negative Breast Cancer Patients Who Did Not Receive (neo)Adjuvant Systemic Therapy. *J Clin Oncol*. 2022;40(21):2361-74.
165. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(22):2108-21.
166. Emens LA, Adams S, Barrios CH, Diéras V, Iwata H, Loi S, et al. First-line atezolizumab plus nab-paclitaxel for unresectable, locally advanced, or metastatic triple-negative breast cancer: IMpassion130 final overall survival analysis. *Ann Oncol*. 2021;32(8):983-93.
167. Miles D, Gligorov J, André F, Cameron D, Schneeweiss A, Barrios C, et al. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2021;32(8):994-1004.
168. Shah AN, Flaum L, Helenowski I, Santa-Maria CA, Jain S, Rademaker A, et al. Phase II study of pembrolizumab and capecitabine for triple negative and hormone receptor-positive, HER2-negative endocrine-refractory metastatic breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1).
169. Pérez-García JM, Llombart-Cussac A, M GC, Curigliano G, López-Miranda E, Alonso JL, et al. Pembrolizumab plus eribulin in hormone-receptor-positive, HER2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer (KELLY): An open-label, multicentre, single-arm, phase II trial. *Eur J Cancer*. 2021;148:382-94.

170. Laphanuwat P, Jirawatnotai S. Immunomodulatory Roles of Cell Cycle Regulators. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:23.
171. Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 2004;118(4):493-504.
172. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell.* 2004;118(4):477-91.
173. Sicinska E, Lee YM, Gits J, Shigematsu H, Yu Q, Rebel VI, et al. Essential role for cyclin D3 in granulocyte colony-stimulating factor-driven expansion of neutrophil granulocytes. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):8052-60.
174. DeMichele A, Clark AS, Tan KS, Heitjan DF, Gramlich K, Gallagher M, et al. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):995-1001.
175. Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, et al. A Phase I Study of the Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) in Patients with Advanced Solid Tumors and Lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2016;22(23):5696-705.
176. Hu MG, Deshpande A, Enos M, Mao D, Hinds EA, Hu GF, et al. A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2009;69(3):810-8.
177. Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, et al. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell.* 2003;4(6):451-61.
178. Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, BrinJones H, Sceneay J, Li BB, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature.* 2017;548(7668):471-5.
179. Petroni G, Formenti SC, Chen-Kiang S, Galluzzi L. Immunomodulation by anticancer cell cycle inhibitors. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(11):669-79.
180. Deng J, Wang ES, Jenkins RW, Li S, Dries R, Yates K, et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. *Cancer Discov.* 2018;8(2):216-33.
181. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, et al. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep.* 2018;22(11):2978-94.
182. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
183. Teo ZL, Versaci S, Dushyanthen S, Caramia F, Savas P, Mintoff CP, et al. Combined CDK4/6 and PI3K α Inhibition Is Synergistic and Immunogenic in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(22):6340-52.
184. Zhang J, Bu X, Wang H, Zhu Y, Geng Y, Nihira NT, et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature.* 2018;553(7686):91-5.
185. Pujol JL, Vansteenkiste J, Paz-Ares Rodríguez L, Gregorc V, Mazieres J, Awad M, et al. Abemaciclib in Combination With Pembrolizumab for Stage IV KRAS-Mutant or Squamous NSCLC: A Phase 1b Study. *JTO Clin Res Rep.* 2021;2(11):100234.
186. Jerusalem G, Prat A, Salgado RF, Reinisch M, Saura C, Ruiz Borrego M, et al. 92MO Neoadjuvant nivolumab (NIVO) + palbociclib (PALBO) + anastrozole (ANA) for estrogen receptor-positive (ER+)/human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) primary breast cancer (BC): CheckMate 7A8. *Annals of Oncology.* 2022;33:S165-S6.
187. Yuan Y, Lee JS, Yost SE, Frankel PH, Ruel C, Egelston CA, et al. Phase I/II trial of palbociclib, pembrolizumab and letrozole in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Eur J Cancer.* 2021;154:11-20.
188. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160-7.
189. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.

190. Reimand J, Isserlin R, Voisin V, Kucera M, Tannus-Lopes C, Rostamianfar A, et al. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc.* 2019;14(2):482-517.
191. Felip E, Llobera L, Perez-Mañá C, Quintela D, Guasch I, Margelí M, et al. New Drugs, Old Toxicities: Pneumonitis Related to Palbociclib - A Case Report. *Breast Care (Basel).* 2020;15(5):548-52.
192. Finn RS, Cristofanilli M, Ettl J, Gelmon KA, Colleoni M, Giorgetti C, et al. Treatment effect of palbociclib plus endocrine therapy by prognostic and intrinsic subtype and biomarker analysis in patients with bone-only disease: a joint analysis of PALOMA-2 and PALOMA-3 clinical trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;184(1):23-35.
193. Jørgensen CLT, Larsson AM, Forsare C, Aaltonen K, Jansson S, Bradshaw R, et al. PAM50 Intrinsic Subtype Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer Show a Significant Shift toward More Aggressive Subtypes with Prognostic Implications. *Cancers (Basel).* 2021;13(7).
194. Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Paluch-Shimon S, Huober J, et al. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35(32):3638-46.
195. Sant M, Bernat-Peguera A, Felip E, Margelí M. Role of ctDNA in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(2).
196. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Medicine.* 2018;10(1).
197. Muiños F, Martínez-Jiménez F, Pich O, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. In silico saturation mutagenesis of cancer genes. *Nature.* 2021;596(7872):428-32.
198. Kim ES, Velcheti V, Mekhail T, Yun C, Shagan SM, Hu S, et al. Blood-based tumor mutational burden as a biomarker for atezolizumab in non-small cell lung cancer: the phase 2 B-F1RST trial. *Nat Med.* 2022;28(5):939-45.
199. Schuurbiens M, Huang Z, Saelee S, Javey M, de Visser L, van den Broek D, et al. Biological and technical factors in the assessment of blood-based tumor mutational burden (bTMB) in patients with NSCLC. *J Immunother Cancer.* 2022;10(2).
200. Qiu P, Poehlein CH, Marton MJ, Laterza OF, Levitan D. Measuring Tumor Mutational Burden (TMB) in Plasma from mCRPC Patients Using Two Commercial NGS Assays. *Sci Rep.* 2019;9(1):114.
201. Riviere P, Goodman AM, Okamura R, Barkauskas DA, Whitchurch TJ, Lee S, et al. High Tumor Mutational Burden Correlates with Longer Survival in Immunotherapy-Naïve Patients with Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(10):2139-45.
202. Zhang H, Liu Y, Wang B, Wang C. Interleukin 20 receptor subunit beta (IL20RB) predicts poor prognosis and regulates immune cell infiltration in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Genomic Data.* 2022;23(1).
203. Kariri YA, Alsaleem M, Joseph C, Alsaheed S, Aljohani A, Shiino S, et al. The prognostic significance of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;185(2):293-305.
204. Yamashita N, Fushimi A, Morimoto Y, Bhattacharya A, Hagiwara M, Yamamoto M, et al. Targeting MUC1-C Suppresses Chronic Activation of Cytosolic Nucleotide Receptors and STING in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(11).
205. Lee YS, Cho YB. CCL7 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1231:33-43.
206. Liu P, Liu Y, Chen L, Fan Z, Luo Y, Cui Y. Anemoside A3 Inhibits Macrophage M2-Like Polarization to Prevent Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Molecules.* 2023;28(4).
207. Zhou Y, Xiao D, Jiang X, Nie C. EREG is the core onco-immunological biomarker of cuproptosis and mediates the cross-talk between VEGF and CD99 signaling in glioblastoma. *Journal of Translational Medicine.* 2023;21(1).

208. Meegdes M, Geurts SME, Erdkamp FLG, Dercksen MW, Vriens BEPJ, Aldering KNA, et al. Real-world time trends in overall survival, treatments and patient characteristics in HR+/HER2- metastatic breast cancer: An observational study of the SONABRE Registry. *The Lancet Regional Health - Europe*. 2023;100573.
209. Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, Cortés J, Diéras V, Patt D, et al. MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(17):5218-24.
210. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(4):425-39.
211. Zhong B, Zhang J, Wu J, Sun L, Li S, Zeng X, et al. Efficacy and safety of palbociclib plus endocrine therapy for patients with HR+/HER2- advanced breast cancer in real-world clinical practice. *Annals of Translational Medicine*. 2022;10(6):362-.
212. Knudsen ES, Schultz E, Hamilton D, Attwood K, Edge S, O'Connor T, et al. Real-World Experience with CDK4/6 Inhibitors for Metastatic HR+/HER2- Breast Cancer at a Single Cancer Center. *The Oncologist*. 2022;27(8):646-54.
213. Lu YS ME, Azim H, et al. . Primary results from the randomized phase II RIGHT Choice trial of premenopausal patients with aggressive HR+/HER2- advanced breast cancer treated with ribociclib + endocrine therapy vs physician's choice combination chemotherapy. . Presented at SABCS 2022 December 6-10, 2022.2022.
214. Dai Q, Wang Y, Liao M, Chen H. Efficacy and safety of CDK4/6 inhibitors combined with endocrine therapy versus endocrine therapy alone in hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2022;11(12):3727-42.
215. Rugo HS, Cristofanilli M, Loibl S, Harbeck N, DeMichele A, Iwata H, et al. Prognostic Factors for Overall Survival in Patients with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: Analyses From PALOMA-3. *Oncologist*. 2021;26(8):e1339-e46.
216. Albanell J MM, Ramos-Vásquez M et al. GEIMAC and CANCER TRIAL IRELAND. GEICAM/2014-12 (FLIPPER) study: First analysis from a randomized phase II trial of fulvestrant (F)/palbociclib (P) versus (vs.) F/placebo (PL) as first-line therapy in postmenopausal women with HR (Hormone Receptor)+/HER2- endocrine sensitive advanced breast cancer (ABC). . Presented at: 2020 European Society of Medical Oncology Virtual Congress: Virtual. Abstract LBA19; 2020.
217. Janni W, Alba E, Bachelot T, Diab S, Gil-Gil M, Beck TJ, et al. First-line ribociclib plus letrozole in postmenopausal women with HR+ , HER2- advanced breast cancer: Tumor response and pain reduction in the phase 3 MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;169(3):469-79.
218. Cristofanilli M, Rugo HS, Im SA, Slamon DJ, Harbeck N, Bondarenko I, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Women with HR+/HER2- ABC: Updated Exploratory Analyses of PALOMA-3, a Double-blind, Phase III Randomized Study. *Clin Cancer Res*. 2022;28(16):3433-42.
219. Diéras V, Rugo HS, Schnell P, Gelmon K, Cristofanilli M, Loi S, et al. Long-term Pooled Safety Analysis of Palbociclib in Combination With Endocrine Therapy for HR+/HER2- Advanced Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(4):419-30.
220. Hortobagyi GN. Ribociclib for the first-line treatment of advanced hormone receptor-positive breast cancer: a review of subgroup analyses from the MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res*. 2018;20(1):123.
221. Martin M, Garcia-Saenz JA, Manso L, Llombart A, Cassinello A, Atienza M, et al. Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor for the treatment of metastatic breast cancer. *Future Oncol*. 2020;16(33):2763-78.

222. Mathew N, Joel A, Andrews AG, Oommen John A, Singh A. CDK 4/6 inhibitor induced lung injury: a case report and review of literature. *ecancermedicallscience*. 2021;15.
223. Onesti CE, Jerusalem G. CDK4/6 inhibitors in breast cancer: differences in toxicity profiles and impact on agent choice. A systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2021;21(3):283-98.
224. Cazzaniga ME, Danesi R, Girmenia C, Invernizzi P, Elvevi A, Ugucioni M. Management of toxicities associated with targeted therapies for HR-positive metastatic breast cancer: a multidisciplinary approach is the key to success. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2019;176(3):483-94.
225. Huang T, He Y, Yu C, Mao F, Si Y. The effect and safety of CDK4/6 inhibitors combined endocrine therapy on HR+, HER2-breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endokrynol Pol*. 2023;74(1):89-105.
226. Prat A, Brase JC, Cheng Y, Nuciforo P, Paré L, Pascual T, et al. Everolimus plus Exemestane for Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A PAM50 Intrinsic Subtype Analysis of BOLERO-2. *Oncologist*. 2019;24(7):893-900.
227. Prat A, Cheang MC, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol*. 2016;2(10):1287-94.
228. Cejalvo JM, Martínez de Dueñas E, Galván P, García-Recio S, Burgués Gasió O, Paré L, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*. 2017;77(9):2213-21.
229. Guerrero-Zotano Á, Belli S, Zielinski C, Gil-Gil M, Fernandez-Serra A, Ruiz-Borrego M, et al. CCNE1 and PLK1 mediates resistance to palbociclib in HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2023.
230. Aftimos P, Oliveira M, Irrthum A, Fumagalli D, Sotiriou C, Gal-Yam EN, et al. Genomic and Transcriptomic Analyses of Breast Cancer Primaries and Matched Metastases in AURORA, the Breast International Group (BIG) Molecular Screening Initiative. *Cancer Discov*. 2021;11(11):2796-811.
231. Decker T, Bichler M, Birtel A, Fischer G, Geiger K, Gaenger S, et al. Clonal Evolution in Patients with Hormone Receptor Positive, HER-2 Negative Breast Cancer Treated with Chemotherapy or CDK4/6 Inhibitors. *Oncol Res Treat*. 2022;45(5):248-53.
232. Chin YM, Shibayama T, Chan HT, Otaki M, Hara F, Kobayashi T, et al. Serial circulating tumor DNA monitoring of CDK4/6 inhibitors response in metastatic breast cancer. *Cancer Sci*. 2022;113(5):1808-20.
233. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(25):2961-8.
234. O'Leary B, Cutts RJ, Huang X, Hrebien S, Liu Y, André F, et al. Circulating Tumor DNA Markers for Early Progression on Fulvestrant With or Without Palbociclib in ER+ Advanced Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(3):309-17.
235. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer Discov*. 2018;8(11):1390-403.
236. Berger F, Marce M, Delalogue S, Hardy-Bessard AC, Bachelot T, Bièche I, et al. Randomised, open-label, multicentric phase III trial to evaluate the safety and efficacy of palbociclib in combination with endocrine therapy, guided by ESR1 mutation monitoring in oestrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer patients: study design of PADA-1. *BMJ Open*. 2022;12(3):e055821.
237. Del Re M, Crucitta S, Lorenzini G, De Angelis C, Diodati L, Cavallero D, et al. PI3K mutations detected in liquid biopsy are associated to reduced sensitivity to CDK4/6 inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Pharmacol Res*. 2021;163:105241.

238. Tolaney SM, Toi M, Neven P, Sohn J, Grischke EM, Llombart-Cussac A, et al. Clinical Significance of PIK3CA and ESR1 Mutations in Circulating Tumor DNA: Analysis from the MONARCH 2 Study of Abemaciclib plus Fulvestrant. *Clin Cancer Res.* 2022;28(8):1500-6.
239. Bardia A, Su F, Solovieff N, Im SA, Sohn J, Lee KS, et al. Genomic Profiling of Premenopausal HR+ and HER2- Metastatic Breast Cancer by Circulating Tumor DNA and Association of Genetic Alterations With Therapeutic Response to Endocrine Therapy and Ribociclib. *JCO Precis Oncol.* 2021;5.
240. Tolaney SM, Im YH, Calvo E, Lu YS, Hamilton E, Forero-Torres A, et al. Phase Ib Study of Ribociclib plus Fulvestrant and Ribociclib plus Fulvestrant plus PI3K Inhibitor (Alpelisib or Buparlisib) for HR(+) Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2021;27(2):418-28.
241. Juric D, Bedard PL, Cervantes A, Gambardella V, Oliveira M, Saura C, et al. Abstract P5-17-05: A phase I/Ib study of inavolisib (GDC-0077) in combination with fulvestrant in patients (pts) with PIK3CA-mutated hormone receptor-positive/HER2-negative (HR+/HER2-) metastatic breast cancer. *Cancer Research.* 2022;82(4_Supplement):P5-17-05-P5-17-05.
242. Levine KM, Ding K, Chen L, Oesterreich S. FGFR4: A promising therapeutic target for breast cancer and other solid tumors. *Pharmacol Ther.* 2020;214:107590.
243. Cheng Q, Ma Z, Shi Y, Parris AB, Kong L, Yang X. FGFR1 Overexpression Induces Cancer Cell Stemness and Enhanced Akt/Erk-ER Signaling to Promote Palbociclib Resistance in Luminal A Breast Cancer Cells. *Cells.* 2021;10(11).
244. Xu J, Cui J, Jiang H, Zeng Y, Cong X. Phase 1 dose escalation study of FGFR4 inhibitor in combination with pembrolizumab in advanced solid tumors patients. *Cancer Med.* 2023.
245. Chew NJ, Lim Kam Sian TCC, Nguyen EV, Shin SY, Yang J, Hui MN, et al. Evaluation of FGFR targeting in breast cancer through interrogation of patient-derived models. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):82.
246. van Weele LJ, Djomehri SI, Cai S, Antony J, Sikandar SS, Qian D, et al. Mesenchymal tumor cells drive adaptive resistance of Trp53(-/-) breast tumor cells to inactivated mutant Kras. *Mol Oncol.* 2022;16(17):3128-45.
247. Raimondi L, Raimondi FM, Pietranera M, Di Rocco A, Di Benedetto L, Miele E, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients with KRAS Mutated-Metastatic Breast Cancer and Resistance to CDK4/6 Inhibitors. *Cancers.* 2021;13(8):1928.
248. Bertucci F, Ng CKY, Patsouris A, Droin N, Piscuoglio S, Carbuccia N, et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature.* 2019;569(7757):560-4.
249. Barroso-Sousa R, Li T, Reddy S, Emens LA, Overmoyer B, Lange P, et al. Abstract GS2-10: Nimbus: A phase 2 trial of nivolumab plus ipilimumab for patients with hypermutated her2-negative metastatic breast cancer (MBC). *Cancer Research.* 2022;82(4_Supplement):GS2-10-GS2-.
250. Alva AS, Mangat PK, Garrett-Mayer E, Halabi S, Hansra D, Calfa CJ, et al. Pembrolizumab in Patients With Metastatic Breast Cancer With High Tumor Mutational Burden: Results From the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. *J Clin Oncol.* 2021;39(22):2443-51.
251. Voutsadakis IA. Polymerase epsilon mutations and concomitant β 2-microglobulin mutations in cancer. *Gene.* 2018;647:31-8.
252. Giraldo NA, Becht E, Vano Y, Petitprez F, Lacroix L, Validire P, et al. Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4416-28.
253. Zizzari IG, Di Filippo A, Botticelli A, Strigari L, Pernazza A, Rullo E, et al. Circulating CD137+ T Cells Correlate with Improved Response to Anti-PD1 Immunotherapy in Patients with Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022;28(5):1027-37.
254. Wang L, Simons DL, Lu X, Tu TY, Solomon S, Wang R, et al. Connecting blood and intratumoral T(reg) cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1220-30.

255. Wang L, Miyahira AK, Simons DL, Lu X, Chang AY, Wang C, et al. IL6 Signaling in Peripheral Blood T Cells Predicts Clinical Outcome in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(5):1119-26.
256. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:276.
257. Ishioka C, Takahashi S, Ishida T, Moriya T, Ohuchi N. Expression signature of p53 status (p53 signature) for the prediction of TP53 mutation and prognosis in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006;24(18_suppl):652-.
258. Spring L, Niemierko A, Juric D, Zangardi M, Abraham E, Dias-Santagata D, et al. Tumor genomics and response to CDK 4/6 inhibitors for patients with hormone receptor-positive (HR+) metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15_suppl):1046-.
259. Damotte D, Warren S, Arrondeau J, Boudou-Rouquette P, Mansuet-Lupo A, Biton J, et al. The tumor inflammation signature (TIS) is associated with anti-PD-1 treatment benefit in the CERTIM pan-cancer cohort. *Journal of Translational Medicine.* 2019;17(1).
260. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(3):131-44.
261. Nicolini A, Carpi A. Immune manipulation of advanced breast cancer: an interpretative model of the relationship between immune system and tumor cell biology. *Med Res Rev.* 2009;29(3):436-71.
262. Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell.* 2016;167(6):1540-54.e12.
263. Heindl A, Sestak I, Naidoo K, Cuzick J, Dowsett M, Yuan Y. Relevance of Spatial Heterogeneity of Immune Infiltration for Predicting Risk of Recurrence After Endocrine Therapy of ER+ Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(2).
264. Schuster EF, Xiao H, Lopez-Knowles E, Kilburn L, Rimawi M, Wheeler DA, et al. Abstract PS5-01: Biomarkers of resistance to palbociclib in ER+ primary breast cancer in the PALLET trial. *Cancer Research.* 2021;81(4_Supplement):PS5-01-PS5-.
265. Post AEM, Smid M, Nagelkerke A, Martens JWM, Bussink J, Sweep F, et al. Interferon-Stimulated Genes Are Involved in Cross-resistance to Radiotherapy in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(14):3397-408.
266. Weichselbaum RR, Ishwaran H, Yoon T, Nuyten DS, Baker SW, Khodarev N, et al. An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(47):18490-5.
267. Fu X, De Angelis C, Schiff R. Interferon Signaling in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer: A Revitalized Topic. *Endocrinology.* 2022;163(1).
268. Zhou Y, Shao N, Aierken N, Xie C, Ye R, Qian X, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J Cancer.* 2017;8(19):4098-105.
269. Stenström J, Hedenfalk I, Hagerling C. Regulatory T lymphocyte infiltration in metastatic breast cancer-an independent prognostic factor that changes with tumor progression. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):27.
270. Fasoulakis Z, Kolios G, Papamanolis V, Kontomanolis EN. Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus.* 2018;10(11):e3549.
271. Scirocchi F, Scagnoli S, Botticelli A, Di Filippo A, Napoletano C, Zizzari IG, et al. Immune effects of CDK4/6 inhibitors in patients with HR(+)/HER2(-) metastatic breast cancer: Relief from immunosuppression is associated with clinical response. *EBioMedicine.* 2022;79:104010.
272. Alfaro C, Teijeira A, Oñate C, Pérez G, Sanmamed MF, Andueza MP, et al. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin Cancer Res.* 2016;22(15):3924-36.
273. Fu X, Jeselsohn R, Pereira R, Hollingsworth EF, Creighton CJ, Li F, et al. FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(43):E6600-e9.

274. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev.* 2018;281(1):57-61.
275. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell.* 2008;14(5):408-19.
276. Gunnarsdottir FB, Bendahl PO, Johansson A, Benfeitas R, Rydén L, Bergenfelz C, et al. Serum immuno-oncology markers carry independent prognostic information in patients with newly diagnosed metastatic breast cancer, from a prospective observational study. *Breast Cancer Res.* 2023;25(1):29.
277. Paccagnella M, Abbona A, Michelotti A, Geuna E, Ruatta F, Landucci E, et al. Circulating Cytokines in Metastatic Breast Cancer Patients Select Different Prognostic Groups and Patients Who Might Benefit from Treatment beyond Progression. *Vaccines (Basel).* 2022;10(1).
278. Wang H, Yang X. Association between serum cytokines and progression of breast cancer in Chinese population. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(49):e8840.
279. Cirqueira MB, Mendonça CR, Noll M, Soares LR, De Paula Carneiro Cysneiros MA, Paulinelli RR, et al. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Invasive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers.* 2021;13(23):6090.
280. Yeong J, Lim JCT, Lee B, Li H, Ong CCH, Thike AA, et al. Prognostic value of CD8 + PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2019;7(1).
281. Mollavelioglu B, Cetin Aktas E, Cabioglu N, Abbasov A, Onder S, Emiroglu S, et al. High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2022;20(1):349.
282. Zhu Y, He Y, Chen C, Zhang J, Yang X, Lu Y, et al. Development of a nomogram based on serum cytokine-related riskscore in breast cancer. *Frontiers in Oncology.* 2023;13.
283. Peuker CA, Yaghobramzi S, Grunert C, Keilholz L, Gjerga E, Hennig S, et al. Treatment with ribociclib shows favourable immunomodulatory effects in patients with hormone receptor-positive breast cancer-findings from the RIBECCA trial. *Eur J Cancer.* 2022;162:45-55.
284. Tolaney SM, Kabos P, Dickler MN, Gianni L, Jansen V, Lu Y, et al. Updated efficacy, safety, & PD-L1 status of patients with HR+, HER2- metastatic breast cancer administered abemaciclib plus pembrolizumab. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(15_suppl):1059-.
285. Masuda J, Tsurutani J, Masuda N, Futamura M, Matsumoto K, Aogi K, et al. Abstract OT2-04-07: Phase II study of nivolumab in combination with abemaciclib plus endocrine therapy in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2 negative metastatic breast cancer (WJOG11418B, NEWFLAME trial). *Cancer Research.* 2020;80(4_Supplement):OT2-04-7-OT2--7.
286. Rugo HS, Kabos P, Beck JT, Jerusalem G, Wildiers H, Sevillano E, et al. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2- metastatic breast cancer: Phase 1b study. *NPJ Breast Cancer.* 2022;8(1):118.
287. Egelston C, Guo W, Yost S, Lee JS, Rose D, Avalos C, et al. Pre-existing effector T-cell levels and augmented myeloid cell composition denote response to CDK4/6 inhibitor palbociclib and pembrolizumab in hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2021;9(3).
288. Tekguc M, Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(30).
289. Jiang DM, Fyles A, Nguyen LT, Neel BG, Sacher A, Rottapel R, et al. Phase I study of local radiation and tremelimumab in patients with inoperable locally recurrent or metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 2019;10(31):2947-58.
290. Brignone C, Gutierrez M, Mefti F, Brain E, Jarcau R, Cvitkovic F, et al. First-line chemoimmunotherapy in metastatic breast carcinoma: combination of paclitaxel and IMP321 (LAG-3lg) enhances immune responses and antitumor activity. *J Transl Med.* 2010;8:71.

291. Solomon I, Amann M, Goubier A, Arce Vargas F, Zervas D, Qing C, et al. CD25-T(reg)-depleting antibodies preserving IL-2 signaling on effector T cells enhance effector activation and antitumor immunity. *Nat Cancer*. 2020;1(12):1153-66.

10. ANNEXES

10.1. Annex 1. Signatures del BC360® significatives en l'anàlisi multivariat i els gens implicats en la signatura segons Nanostring™.

Signatura BC360	Gens implicats
PD-1	PDCD1
Treg	FOXP3
IFN Gamma	STAT1, CXCL9, CXCL10
BCp53 Score	ADM, APH1B, ATAD2, AURKA, BTG2, CCNA2, CCND1, CDC25B, CDC25C, CDCA7L, CDK1, CDKN1A, CDKN3, CEP55, CKS1B, DDB2, FAM198B, FAM214A, FNBP1, FOM1, GATA3, GG7, KIAA0040, KIF23, KIFC1, LINC02381, MAD2L1, MAP2K4, MCM3, MIS18A, MIKI67, MYBL2, NCAPH2, NEO1, NPEPPS, NUDT1, POLD1, PREP, PTTG1, RFC4, RNF103, SLC39A6, TAP1, TCEAL1, TOP2A, TRIP13, TUBA4A, UBE2C.
TIS	CCL5, CD27, CD274, CD276, CD8, CMKLR1, CXCL9, CXCR6, HLA-DQA1, HLADRB1, HLA-E, IDO1, LAG3, NKG7, PDCD1LG2, PSMB10, STAT1, TIGIT

10.2 Annex 2. Finançament i institucions involucrades.

Aquesta tesi ha estat finançada parcialment per la beca Rio Hortega atorgada per l'Institut Carlos III els anys 2021 i 2022 (ISCIII CM20/00027). El projecte s'ha dut a terme gràcies a la col·laboració entre l'Institut Català d'Oncologia, l'Institut de Recerca IrsiCaixa i l'Hospital Germans Trias i Pujol.

