

Tesi di laurea: “Inibitori delle CDK4/6 nel trattamento del carcinoma metastatico della mammella ER⁺/HER2⁻: l’impatto sul sistema immunitario del paziente correla con la prognosi” (Sintesi)

Autore: C. Silvestri

Relatore: A. Rughetti

Introduzione

Il carcinoma della mammella luminale ER⁺/HER2⁻ è il sottotipo più frequente di carcinoma della mammella avanzato¹. Il setting metastatico di questo istotipo tumorale è caratterizzato da infiammazione cronica e un microambiente fortemente immunosoppressorio².

L’immunosoppressione è un complesso sistema di interazioni che inibisce e rende inefficace l’azione dei meccanismi immunitari anti-tumorali e permette la crescita e lo sviluppo della neoplasia. L’immunosoppressione è clinicamente associata ad una prognosi negativa e alla resistenza alla maggior parte delle terapie antineoplastiche. Gli effettori cellulari e i meccanismi molecolari che mediano l’immunosoppressione sono considerati possibili target terapeutici³.

Attualmente, secondo le linee guida dell’European Society for Medical Oncology (ESMO), la prima linea di trattamento nelle pazienti affette da carcinoma della mammella metastatico (mBC) ER⁺/HER2⁻ è la combinazione di terapia ormonale e inibitori delle chinasi ciclina dipendenti 4 e 6 (CDK4/6i)¹. I CDK4/6i agiscono bloccando la progressione del ciclo delle cellule tumorali dalla fase G1 alla fase S, con conseguente arresto della proliferazione. È stato però dimostrato in modelli murini che, oltre all’effetto *on target* sulle cellule tumorali, i CDK4/6i hanno anche effetti *off target* sul sistema immunitario^{4, 5}. Questi farmaci

possono infatti avere un’azione su tutte le cellule che utilizzano le chinasi CDK4/6 per la progressione del proprio ciclo cellulare. Nell’adulto, le cellule a funzione immunosoppressoria come i linfociti T regolatori (Treg) e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs) utilizzano selettivamente il *pathway* molecolare CDK4/6 (in particolare CDK6), mentre effettori immunitari anti-tumorali come i linfociti T citotossici (CD3⁺CD8⁺) ed i linfociti T helper (CD3⁺CD4⁺), e altre cellule immunitarie con attività anti tumorale utilizzano altri meccanismi molecolari proliferativi (Fig. 1)⁶.

Numerosi studi preclinici su modelli murini hanno dimostrato che il trattamento con i CDK4/6i riduce selettivamente i linfociti Treg^{4, 5}. Questa popolazione di linfociti ha un’azione soppressiva della risposta immunitaria antitumorale, favorendo la crescita e lo sviluppo tumorale. I linfociti Treg sono infatti in grado di inibire in modo efficace la risposta dei linfociti attivati contro gli antigeni associati al tumore (TAA), promuovendo così l’immunosoppressione nel microambiente tumorale⁷. I livelli di cellule Treg circolanti sono più alti nei pazienti affetti da carcinoma rispetto alla media della popolazione sana, ed è stata dimostrata una correlazione inversa tra i livelli di Treg nel tumore e la sopravvivenza dei pazienti⁸. Le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) sono invece cellule soppressorie che originano dalla componente mieloide con un ruolo immunoregulatorio in diverse condizioni

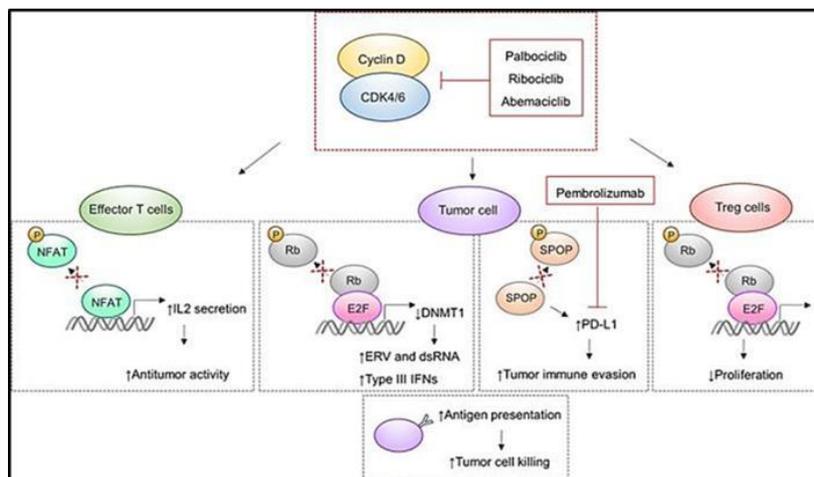


Fig. 1. Effetti dei CDK4/6i sul sistema immunitario in modello murino. I CDK4/6i promuovono l'attività del fattore nucleare dei linfociti T attivati NFAT, causando un aumento della loro proliferazione e della secrezione di IL-2. A livello delle cellule tumorali, invece, causano un aumento della presentazione antigenica tramite la riduzione dei livelli di DNA metiltransferasi (DNMT1) e l'aumento di produzione di elementi retrovirali endogeni (ERV), associata ad un aumento dell'espressione di PD-L1. Infine, i CDK4/6i causano una riduzione della proliferazione delle cellule T regolatorie⁶.

patologiche, tra cui il cancro. Si dividono in due grandi gruppi: le MDSC polimorfonucleate (PMN-MDSC), simili ai neutrofili e le MDSC monocitiche (M-MDSC). Queste due sottoclassi di MDSCs giocano un ruolo cruciale nella induzione e nel mantenimento dell'immunosoppressione sia a livello tumorale che sistemico, contribuendo significativamente alla progressione tumorale e all'insorgenza di metastasi. Nei pazienti oncologici, queste cellule infiltrano il letto tumorale e i livelli di MDSCs circolanti sono aumentati rispetto a quelli riscontrati nei donatori sani^{9, 10}.

Lo scopo di questo progetto è quello di analizzare gli effetti dei CDK4/6i sul sistema immunitario delle pazienti e valutare l'associazione di questa immunomodulazione con la risposta clinica al trattamento. La comprensione dei meccanismi d'interazione tra terapie, sistema immunitario e cellule tumorali è infatti di fondamentale importanza per l'individuazione di bio-marcatori di risposta che permettano una medicina sempre più personalizzata e lo sviluppo di combinazioni terapeutiche sempre più razionali ed efficaci per la cura del paziente.

Materiali e metodi

In questo studio sono state reclutate 50 pazienti donne affette da tumore mammario metastatico (mBC) ER⁺/HER2⁻. Tutte le pazienti sono state trattate con un CDK4/6i (palbociclib, ribociclib, abemaciclib). Sulla base della miglior risposta clinica secondo i criteri RECIST e PERCIST, le pazienti sono state divise in pazienti responder (R), pazienti con malattia stabile (SD) e pazienti in progressione (PD). Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da campioni di sangue periferico di 20 donatori sani (HD) e delle pazienti prima dell'inizio del trattamento con i CDK4/6i (T0) ed entro sei mesi di trattamento, prima della rivalutazione radiologica (>T0). La modulazione di distinte popolazioni leucocitarie è stata valutata in citofluorimetria a flusso utilizzando marcatori fenotipici specifici (Fig. 2). In particolare sono state caratterizzate le seguenti popolazioni: linfociti T regolatori (Treg), cellule soppressorie di derivazione mieloide monocitiche e polimorfonucleate (M-MDSC e PMN-MDSC), linfociti T circolanti sia CD4⁺ e CD8⁺, caratterizzati dall'espressione del marcatore CD137 (CD137⁺). Per la popolazione dei linfociti Treg sono state poi analizzate anche le sottopopolazioni di linfociti Treg effettori, Treg naïve e Treg non attivati. Questo studio è stato condotto in

conformità con la Dichiarazione di Helsinki. Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale dell’Azienda Ospedaliera Policlinico Umberto I e dell’Azienda Ospedaliera Sant’Andrea - Sapienza Università di Roma (Approvazione del Comitato Etico, protocollo n° 805/16, RIF. CE: 4181). Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti al momento dell’adesione allo studio.

Risultati

Dalle analisi effettuate si osserva che la percentuale dei linfociti Treg totali (identificati dall’espressione simultanea dei marcatori CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) è significativamente più alta nelle pazienti al T0 rispetto ai donatori sani e che nelle pazienti questa popolazione si riduce in modo significativo dopo la somministrazione dei CDK4/6i (T>0), tornando a livelli medi simili a quelli osservati nei donatori sani (Fig. 3 A). In particolare, la riduzione risulta essere a carico della sottopopolazione dei Treg effettori che svolgono effettivamente la

maggiore funzione soppressiva. Si riducono inoltre entrambi i subset soppressori M-MDSC e PMN-MDSC (Fig. 3 B). Di contro, il trattamento con i CDK4/6i è associato ad un aumento dei livelli di linfociti T CD3⁺CD8⁺CD137⁺, caratterizzati da specifica attività antitumorale (Fig. 4). Questi dati sono stati interpolati con la risposta clinica delle pazienti. Da questa analisi risulta che la riduzione dei linfociti Treg è significativamente maggiore nelle pazienti che rispondono alla terapia, rispetto a quelle con malattia stabile o in progressione (Fig. 5). Da un’ulteriore analisi statistica multivariata emerge infatti che i livelli di linfociti Treg sono un fattore predittivo di risposta al trattamento con i CDK4/6i, valutati, rispettivamente, prima dell’inizio del trattamento ed entro sei mesi dalla prima somministrazione¹¹. Risulta quindi che la riduzione dei Treg può essere considerata un biomarcatore immunitario dell’efficacia del trattamento CDK4/6i.

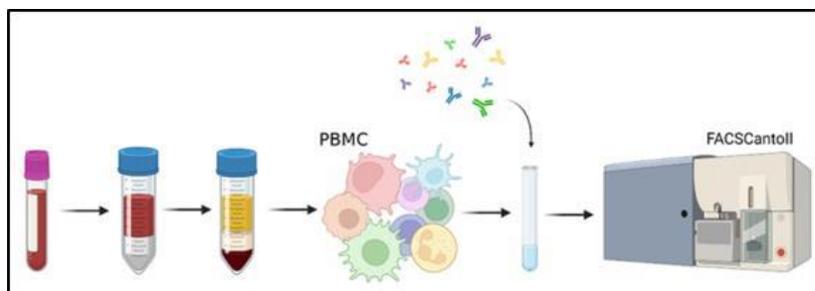


Fig. 2. Processamento dei prelievi di sangue. I PBMC sono stati isolati tramite stratificazione con Fycoll-Hypaque. Sono poi stati marcati con specifici anticorpi coniugati a fluorocromi, acquistati con il citofluorimetro FACSCantoll (BD Biosciences). Figura creata con BioRender.com.

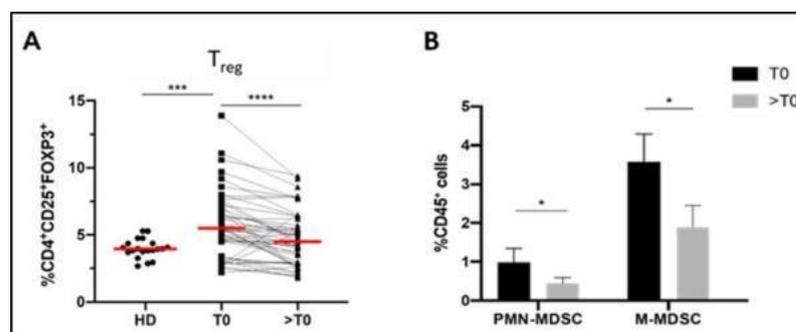


Fig. 3. Il trattamento con i CDK4/6i riduce le cellule dell’immunità soppressoria. (A) Il trattamento con i CDK4/6i riduce i livelli di linfociti Treg circolanti. (B) Il trattamento con i CDK4/6i causa una riduzione delle cellule mieloidi immunosoppressive PMN-MDSC e M-MDSC¹⁰.

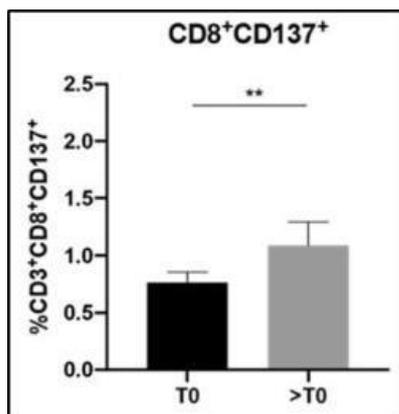


Fig. 4. Il trattamento con i CDK4/6i favorisce la risposta antitumorale specifica. I livelli di linfociti T CD3+CD8+CD137+ aumentano durante il trattamento¹⁰.

dipendente dalle chinasi CDK4/6, ma la loro sensibilità al trattamento con i CDK4/6i era finora stata studiata solo in modelli murini⁶. I nostri dati dimostrano inoltre che la riduzione durante il trattamento è decisamente più marcata nella popolazione dei linfociti Treg effettori, che sono la sottopopolazione di linfociti Treg attivamente responsabili dell'azione immunosoppressiva.

Nella coorte di pazienti in esame abbiamo osservato inoltre che la riduzione dei linfociti Treg è associata alla risposta clinica. Alla valutazione a sei mesi dall'inizio della terapia, le pazienti che rispondono alla terapia (R) sono quelle in cui c'è una maggiore

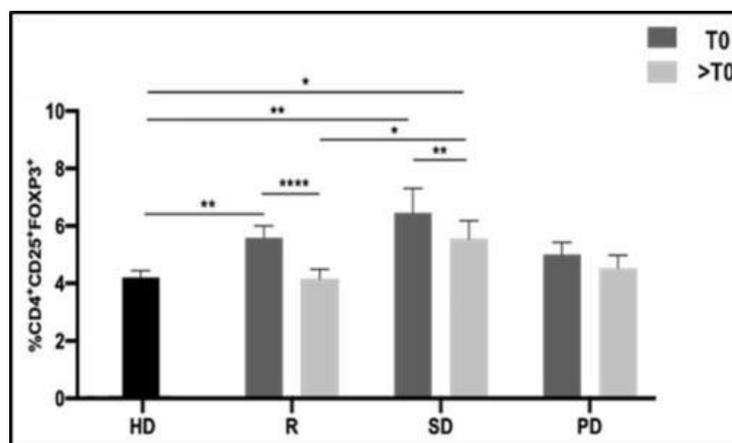


Fig. 5. I livelli di linfociti Treg correlano con la risposta clinica delle pazienti. Le pazienti sono state divise in base alla risposta clinica in pazienti responder (R), pazienti con malattia stabile (SD) e pazienti in progressione (PD). Dopo la somministrazione del trattamento con CDK4/6i (>T0), si osserva una riduzione dei livelli di linfociti Treg totali circolanti in particolare nelle pazienti responder ed in misura minore nelle pazienti con SD, mentre la riduzione è assente nelle pazienti con progressione di malattia¹⁰.

Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta la correlazione *in vivo* tra il trattamento con i CDK4/6i e la modulazione del sistema immunitario nelle pazienti affette da mBC ER⁺/HER2⁻. In particolare, nelle pazienti trattate con i CDK4/6i (abemaciclib, ribociclib e palbociclib) abbiamo osservato una riduzione significativa dei livelli di linfociti Treg circolanti totali durante il trattamento. La progressione del ciclo cellulare di queste cellule è infatti

riduzione dei linfociti Treg circolanti durante il trattamento. Questa riduzione è soprattutto a carico della sottopopolazione di Treg effettori che sono gli effettivi mediatori dell'immunosoppressione. Inoltre, in queste pazienti, i livelli di Treg circolanti, che prima del trattamento sono più alti rispetto ai controlli, tornano a livelli paragonabili a quelli osservati nei donatori sani. Una riduzione meno marcata, ma comunque significativa, si osserva invece nelle pazienti con malattia

stabile (SD). Nelle pazienti in cui la malattia progredisce (PD) non c'è alcuna riduzione dei livelli di linfociti Treg. Da un'ulteriore analisi statistica multivariata risulta che i livelli di linfociti Treg effettori e Treg totali sono predittori affidabili della risposta clinica ai CDK4/6i. Questo è un dato di grande rilevanza se si considera l'urgente necessità di identificare precocemente le pazienti che possono beneficiare dei CDK4/6i, e quelle per cui invece questo trattamento non rappresenta l'opzione migliore. I livelli di Treg circolanti potrebbero essere un fondamentale fattore di predizione della risposta ai CDK4/6i e del suo monitoraggio nel tempo.

Anche le MDSC hanno un'azione cruciale nell'inibizione dell'immunità innata e specifica contro il tumore, e livelli elevati di questa popolazione caratterizzano le pazienti con mBC⁹. È noto inoltre in letteratura che il ciclo cellulare di queste cellule è dipendente dalla chinasi CDK6¹². In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che il trattamento con i CDK4/6i è associato ad una riduzione delle MDSC circolanti in pazienti con mBC ER⁺/HER2⁻. Questi risultati indicano che i CDK4/6i non hanno solo un'azione di blocco sulla proliferazione dei linfociti Treg, ma causano in modo più ampio una modulazione del microambiente immunosoppressorio. Tuttavia, perché la risposta anti-tumore sia efficace occorre che la riduzione dei meccanismi dell'immunosoppressione accompagni l'attivazione ed il mantenimento delle cellule effettrici della risposta immunitaria. I linfociti T CD3⁺CD8⁺CD137⁺ hanno un ruolo fondamentale nell'immunità anti-tumore: l'espressione del CD137 non solo è biomarcatore dello stato di linfociti T attivati, ma è associata positivamente alla sopravvivenza dei pazienti trattati con immunoterapia¹³. Durante il trattamento con i CDK4/6i, abbiamo osservato un incremento dei linfociti T CD3⁺CD8⁺CD137⁺ circolanti cioè di quella sottopopolazione effettrice dell'azione citotossica sulle cellule tumorali.

Inoltre, il rapporto tra i linfociti T effettori CD3⁺CD8⁺CD137⁺ e i linfociti Treg totali aumenta significativamente durante il trattamento, i.e. alla diminuzione dei Treg corrisponde un incremento dei linfociti CD3⁺CD8⁺CD137⁺, a dimostrazione della correlazione tra riduzione dell'immunosoppressione e ri-attivazione dell'immunità antitumorale.

Questi risultati evidenziano un importante effetto *off target* dei CDK4/6i sul sistema immunitario. La riduzione dell'immunosoppressione indotta dal trattamento con questi farmaci permette la riattivazione della risposta antitumorale e potrebbe essere molto importante nel modulare il microambiente nei tumori immunologicamente "freddi", cioè di quei tumori caratterizzati da un infiltrato immunitario soppressivo e/o ridotto.

Il microambiente immunosoppressorio è una delle principali cause del fallimento del trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari, come gli anticorpi anti PD1 e PDL1 che sono attualmente terapie di elezione in diversi setting tumorali^{3, 14, 15}. In diversi studi preclinici, la combinazione di CDK4/6i e anti PD1/PDL1 si è dimostrata particolarmente efficace, inducendo una maggiore stimolazione dei linfociti B e T, la regressione tumorale e la generazione di una memoria immunologica¹⁶. Questo dimostra l'importanza della conversione dell'infiltrato immunosoppressorio, e l'efficacia dei CDK4/6i nella modulazione della risposta immunitaria.

In conclusione, questo studio dimostra che i CDK4/6i modulano il sistema immunitario, causando una riduzione di due componenti fondamentali del microambiente immunosoppressorio: i linfociti Treg e le MDSC. Al contempo, questa azione è accompagnata da un'attivazione dell'immunità antitumorale, come dimostrato dall'aumento dei linfociti T CD3⁺CD8⁺CD137⁺. La modulazione

immunitaria è inoltre strettamente correlata con la risposta al trattamento: ad una riduzione dell'immunosoppressione si associa la risposta clinica delle pazienti, mentre la mancata riduzione è associata alla progressione della malattia. Nell'ottica di una personalizzazione della terapia, la quantificazione dei linfociti Treg prima e durante il trattamento, risulta essere un marcatore prognostico affidabile della risposta alla terapia e del suo monitoraggio nel tempo. Infine, la conversione del microambiente immunosoppressorio è un elemento chiave nel trattamento di tumori in fase di evasione dal sistema immunitario, e gli effetti *off target* dei CDK4/6i potrebbero costituire il rationale scientifico per l'utilizzo di questi farmaci in combinazione/sequenza con l'immunoterapia.

BIBLIOGRAFIA

- Gennari A, André F, Barrios CH, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2021; 32: 1475-95.
- Dieci MV, Griguolo G, Miglietta F, Guarneri V. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? *Cancer Treat Rev* 2016; 46: 9-19.
- Bruni D, Angell HK, Galon J, Angell HK. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 662-80.
- Deng J, Wang ES, Jenkins RW, et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. *Cancer Discov* 2018; 8: 216-33.
- Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nat Publ Gr* 2017; 548: 471-5.
- Nebenfuehr S, Kollmann K, Sexl V. The role of CDK6 in cancer. *Int J Cancer* 2020; 147: 2988-95.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 295-307.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-9.
- Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* 2016; 37: 208-20.
- Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age review-article. *Nat Immunol* 2018; 19: 108-19.
- Scirocchi F, Scagnoli S, Botticelli A, 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.
- Ameratunga M, Kipps E, Okines AFC, Lopez JS. To Cycle or Fight-CDK4/6 Inhibitors at the Crossroads of Anticancer Immunity. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 21-8.
- Zizzari IG, Filippo A Di, Botticelli A, et al. Circulating CD137 β T Cells Correlate with Improved Response to Anti-PD1 Immunotherapy in Patients with Cancer. *Clin Cancer Res* 2022; 28: 1027-37.
- Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics* 2021; 11: 5365-86.
- Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017; 541: 321-30.
- Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, 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: 2978-94.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 20 giugno 2022

Dott.ssa Cecilia Silvestri, Facoltà di Medicina e Odontoiatria, Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

Prof.ssa Aurelia Rughetti, Dipartimento di Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

Per la corrispondenza:
ceciliasilvestri23@gmail.com