

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Fc γ RIII EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA HER2+ EN TRATAMIENTO NEOADYUVANTE CON QUIMIOTERAPIA MÁS TRASTUZUMAB Y PERTUZUMAB

Ayelen I. Pesce Viglietti*, María Belén Bordignon*, Alexis Ostinelli, Gerardo Cueto, María Belén Sánchez, Florencia Perazzo, Mora Amat, Federico Coló, María Victoria Costanzo, Adrián Nervo, Jorge Nadal, Gabriel Crimi, Ignacio Mc Lean, Eunice Amancay, José Mordoh, Estrella M. Levy

Centro de Investigaciones Oncológicas FUCA-Fundación Cáncer, Buenos Aires, Argentina

*Estas autoras contribuyeron igualmente en la confección del trabajo

Dirección postal: Dra. Estrella M. Levy, Centro de Investigaciones Oncológicas, FUCA-Fundación Cáncer, Conesa 1003, 1426 Buenos Aires, Argentina
e-mail: estrellamlevy@yahoo.com.ar

Resumen

Trastuzumab (TRZ) fue el primer anticuerpo monoclonal (AcM) IgG humanizado aprobado para el tratamiento del cáncer de mama (CM). Desde su aprobación en 1998, se estima que se ha administrado a más de 2.5 millones de mujeres en todo el mundo y se encuentra en la lista de medicamentos esenciales de la OMS. TRZ ha revolucionado la terapia del CM HER2+. Tanto los mecanismos no inmunológicos como los inmunomediados explican la actividad clínica de TRZ.

La asociación entre el polimorfismo del Fc γ RIIIa y la eficacia terapéutica de los AcM se ha comprobado en varios modelos. Los pacientes con los genotipos F/V y V/F presentan una mejor respuesta clínica cuando son tratados con diferentes anticuerpos. Sin embargo, existen datos controvertidos sobre la asociación con el polimorfismo Fc γ RIIIa y la actividad del TRZ.

En este trabajo evaluamos las variantes del polimorfismo Fc γ RIIIa en pacientes con CM HER2+ en terapia neoadyuvante (NA) compuesta de quimioterapia (QT) basada en taxanos y platino en combinación con TRZ y pertuzumab (PER).

Si bien nuestro estudio no logró identificar ninguna asociación genética de los distintos alelos

del Fc γ RIIIa con la respuesta al tratamiento neoadyuvante de quimioterapia en combinación con TRZ, quizás debido al bajo número de pacientes que no presentaron respuesta patológica completa (RPC), estos resultados no excluyen un papel para los Fc γ R.

Palabras clave: Fc γ RIIIa, polimorfismo, cáncer de mama HER2+, trastuzumab

Abstract

Trastuzumab (TRZ) was the first humanized IgG mAb approved for the treatment of breast cancer. Since its approval in 1998, it is estimated that it has been administered to more than 2.5 million women worldwide and is on the WHO list of essential medicines. TRZ has revolutionized HER2+ breast cancer therapy. Both non-immune and immune-mediated mechanisms explain the clinical activity of TRZ.

The association between the Fc γ RIIIa polymorphism and the therapeutic efficacy of monoclonal antibodies (mAb) has been verified in several models. Patients with the F/V and V/F genotypes have a better clinical response when treated with different antibodies. However, there is controversial data on the association with the Fc γ RIIIa polymorphism and TRZ activity.

In this study we evaluated the variants of the Fc γ RIIIa polymorphism in patients with HER2+ breast cancer on neoadjuvant therapy (NA) composed of taxane and platinum-based chemotherapy (QT) in combination with TRZ and pertuzumab (PER).

Although our study did not identify any genetic association of the different Fc γ RIIIa alleles with response to NA QT in combination with TRZ, perhaps due to the low number of patients who did not present pathological complete response, these results do not exclude a role for Fc γ R.

Key words: Fc γ RIIIa, polymorphism, HER2+ breast cancer, trastuzumab

Introducción

La amplificación de HER2 está presente entre el 15-20% de los tumores de pacientes con cáncer de mama (CM), y se relaciona con una enfermedad más agresiva y de peor pronóstico¹⁻³. Sin embargo, desde la aplicación de la terapia dirigida contra este receptor, el panorama clínico de las pacientes ha cambiado de forma relevante, mejorando notablemente los resultados de supervivencia^{4,5}. Trastuzumab (TRZ) fue el primer AcM IgG humanizado aprobado para el tratamiento del cáncer de mama. Desde su aprobación en 1998, se estima que se ha administrado a más de 2.5 millones de mujeres en todo el mundo y se encuentra en la lista de medicamentos esenciales de la OMS. TRZ ha revolucionado la terapia del CM HER2+^{4,5}. Tanto los mecanismos no inmunes como los inmunomediados explican la actividad clínica de TRZ. TRZ induce la muerte celular mediante la inhibición directa de la señalización de HER2⁶.

Pertuzumab (PER) es un AcM que se une a un epítopo diferente del dominio extracelular de HER2 y, en combinación con TRZ, potencia la muerte de las células tumorales, lo que confiere una mejora significativa en los resultados clínicos de las pacientes previniendo la aparición de resistencia al bloqueo anti-HER2^{7,8}.

Ambos AcMs dirigidos contra HER2, también pueden vigorizar el sistema inmunitario para inducir respuestas inmunitarias antitumorales. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC, de su sigla en inglés *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*) es una respuesta inmunitaria mediante la cual las células inmunitarias provocan la muerte celular cuando anticuerpos específicos se adhieren a la membrana de la célula blanco^{9,10}. Es uno de los diversos mecanismos por el cual los anticuerpos pueden confinar y contener una infección^{11,12}. Normalmente, la ADCC implica la activación de células inmunitarias llamadas *Natural Killer* (NK) por anticuerpos que se unen a receptores del fragmento cristalizante (RFc) de un Ac. El RFc más caracterizado de la membrana de las células NK es el CD16 o Fc γ RIII. Una vez que el RFc se une al fragmento Fc de una IgG, las células NK liberan diferentes moléculas citotóxicas que provocan la muerte de la célula blanco¹³. Experimentos realizados en ratones *knockout* apoyan el rol de las células NK y a la red de monocitos que también expresan CD16 en la función efectora contra tumores en la ADCC mediada por TRZ¹⁴.

Además, la estimulación de ADCC por TRZ contra células de CM HER2+ se demostró en ensayos *ex vivo* utilizando células mononucleares de sangre periférica humanas o células NK de pacientes con CM HER2+ tratadas con TRZ¹⁵.

El gen Fc γ RIIIa codifica dos variantes que difieren en la posición 158, una valina (Val-V158) o una fenilalanina (Phe-F158)¹⁶. Este polimorfismo genético influye enormemente en la afinidad de la IgG1 por el receptor Fc γ ^{17,18}. Los haplotipos V/V y V/F se asocian a una mayor afinidad de la IgG1 con el Fc γ R y, en consecuencia, una mayor capacidad para realizar ADCC. La asociación entre el polimorfismo del Fc γ RIIIa y la eficacia terapéutica de los AcMs se ha comprobado en varios modelos. Los pacientes con los genotipos F/V y V/F presentan una mejor respuesta clínica cuando son tratados con rituximab y cetuximab, respectivamente. Sin embargo, existen datos controvertidos sobre la asociación con el polimorfismo Fc γ RIIIa y la actividad del TRZ¹⁹⁻²⁴.

En este trabajo evaluamos las variantes del polimorfismo Fc γ RIIIa en pacientes con CM HER2+ en terapia NA compuesta de QT basada en taxanos y platino en combinación con TRZ y PER, provenientes de tres centros de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

Materiales y métodos

Población de estudio

En el presente estudio se evaluaron muestras de 59 pacientes mayores de 18 años de sexo femenino con CM HER2+. Con tumores >2 cm y/o axila positiva en plan de QT NA más TRZ/PER provenientes del Instituto Alexander Fleming, CEMIC y Hospital Austral (Tabla 1). Previo al inicio del primer ciclo de QT se tomaron 20 ml de sangre periférica para los análisis correspondientes. Las pacientes iniciaron el tratamiento que consistió en 6 ciclos, 1 ciclo cada 3 semanas, de QT NA (combinación de platino y taxano) más TRZ/PER, hasta completarlo con seguimientos habituales. Finalizada la QT, se realizó el procedimiento quirúrgico definido por el mastólogo y se realizó el informe patológico a partir de cortes seriados totales del lecho post tratamiento, según las pautas de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* 8va edición²⁵ para definir la RPC, de modo que, si existe lesión *in situ*, sin importar la extensión sin evidencia de componente infiltrante se considera como respuesta completa. Si hubiera embolias vasculares neoplásicas, aun sin presencia de lesión infiltrante se considera como enfermedad residual.

Tabla 1. Características de las pacientes del estudio INMUNOHER

Características	N (%)
N	59
Edad Md (RIC)	50 (41-59)
Histología	
NST	55 (93.6)
Lobulillar	2 (3.2)
Otro	2 (3.2)
Grado histológico	
1	1 (1.7)
2	26 (44)
3	24 (40.7)
NS	8 (13.55)
Estadio	
1	6 (10)
2	39 (66)
3	14 (24)
Luminal/Her2	32 (54.2)
Her2 enriquecido	27 (45.8)
Ki67 Md (RIC)	40 (25-45)
>20%	46 (78)

El *Residual cancer burden calculator* se utilizó para la definición.

Los datos clínico-patológicos fueron recolectados de las historias clínicas de las pacientes, previa firma de consentimiento informado correspondiente, tanto para el acceso a sus datos clínicos como a la toma de muestra de sangre.

Se excluyeron pacientes con enfermedad metastásica o sincrónica.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares (MN) se aislaron mediante un gradiente de densidad de Ficoll- Paque Plus (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de muestras de sangre entera de pacientes con CM HER2+. Se separó un *pellet* de 1×10^6 de células MN a partir del cual se realizó la extracción de ADN y análisis del polimorfismo FcγRIIIA.

Análisis del polimorfismo

Al *pellet* de células MN obtenido se le agregó 1ml de DNazol (DNazol™ Reagent, ThermoFisher Scientific) y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos y luego se llevó a -20°C hasta el momento de la extracción para la cual se agregaron 500 μl de etanol (EtOH) 100%. Luego de resuspender, se centrifugó y se removió el sobrenadante. Se repitió el proceso 2 veces con 1 ml de EtOH 75%. Por último, se realizó un lavado con EtOH 5% y se incubó a 37°C por 10 minutos. Se eliminó todo el sobrenadante y se dejó secar. Se lo resuspendió en hidróxido de sodio (NaOH) 8mM y se incubó a 37°C toda la noche. La cantidad de ADN extraído se cuantificó mediante Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) utilizando como blanco NaOH 8mM.

El análisis del polimorfismo FcγRIIIA se realizó mediante PCR de punto final (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems). Los *primers* utilizados fueron los siguientes: FCGR3A Fw: cctggggtgtctgtgtcttt; Rw: ctgcaaacctaccctgcaat. Como control se utilizó la expresión del gen de actina y los *primers* utilizados fueron ACTB Fw: ccagaggcgtacaggatag; Rw: ccaccgcgagaagatga.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%. Una vez confirmada la presencia de los productos de PCR, se enviaron a secuenciar a un servicio

externo (Macrogen). El análisis de las secuencias se realizó mediante el *software* Mutation Surveyor (SoftGenetics) donde se comparó la secuencia obtenida contra la secuencia de referencia (WT) para ubicar el cambio de base.

Estadística

Los análisis estadísticos y los gráficos correspondientes fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 9.0. En todos los casos los resultados fueron sometidos al test estadístico χ^2 . En las figuras y tablas los valores informados son los de p donde $p < 0.05$ se consideró significativo.

Aprobación ética

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por los Comité de Ética Institucionales del Instituto Alexander Fleming (Resoluciones 945/2017 y 1230-5/2019) y CEMIC (folio 1130, del 22 dic 2017). Todas las pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Resultados

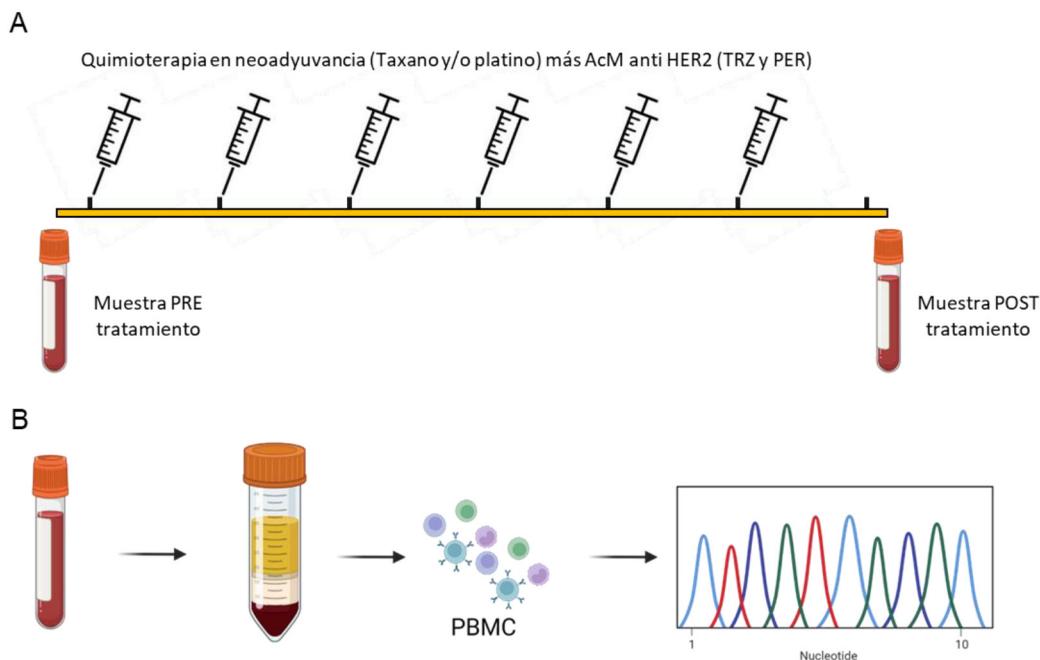
El estudio prospectivo INMUNOHER consistió en una cohorte de 59 pacientes con CM HER2+ tratadas en NA con 6 ciclos de QT sumado al tratamiento con los AcMs anti HER2, TRZ y PER (Figura 1A).

Las pacientes fueron clasificadas en dos grupos de acuerdo a su mejor respuesta clínica: el grupo respondedor (R) comprendió 49 pacientes con respuesta patológica completa (RPC), mientras que el grupo no respondedor (NR) comprendió diez pacientes que no alcanzaron respuesta patológica completa (noRPC) tras el tratamiento neoadyuvante.

Posteriormente al diagnóstico y previo al tratamiento, se tomó una muestra de sangre periférica de la cual se purificaron células MN y se extrajo ADN para realizar una secuenciación y determinar el dimorfismo alélico CD16A (Fc γ RIIIA) 158V/F (Figura 1B).

Para la determinación del polimorfismo se utilizó el método de secuenciación de Sanger. En el caso

Figura 1. Esquema del tratamiento y toma de muestras realizado en las pacientes (A). Esquema de aislamiento de células MN para la determinación del polimorfismo Fc γ RIIIa (B)



de que se obtuviera una timidina se forma el codón TTT que da como resultado el aminoácido F mientras que en los casos en los que se hallara una guanina se forma el codón GTT dando como resultado una V en la posición 158 (Figura 2).

De las 59 pacientes evaluadas, 7 (12%) fueron homocigotas VV, 45 (76%) fueron heterocigotas FV y 7 (12%) homocigotas FF (Figura 3A). El análisis

de las frecuencias alélicas y genotípicas observadas mostró desvío significativo de las proporciones esperadas por Hardy-Weinberg ($p < 0.001$).

Evaluación del polimorfismo FcγRIIIa y la respuesta al tratamiento

Un total de 49/59 (84%) pacientes alcanzaron RPC evaluada en la cirugía al finalizar el tratamiento.

Figura 2. Ejemplo de los tres tipos de genotipos: Homocigota WT: TTT (F/F); Heterocigota (F/V); Homocigota para el polimorfismo GTT (V/V). F = Fenilalanina; V = Valina

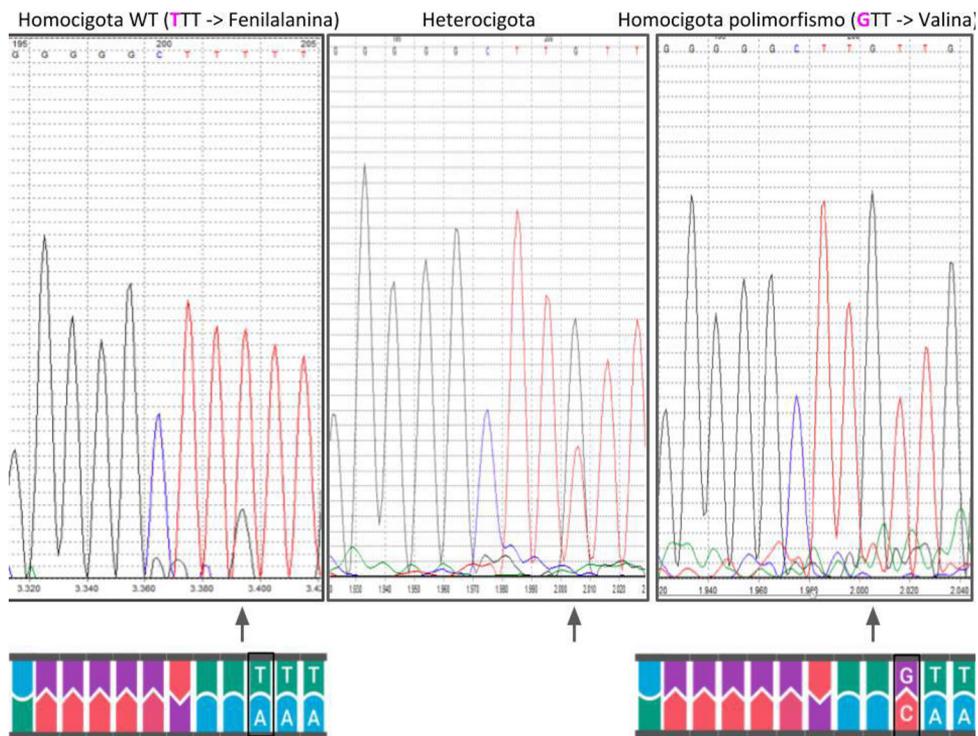
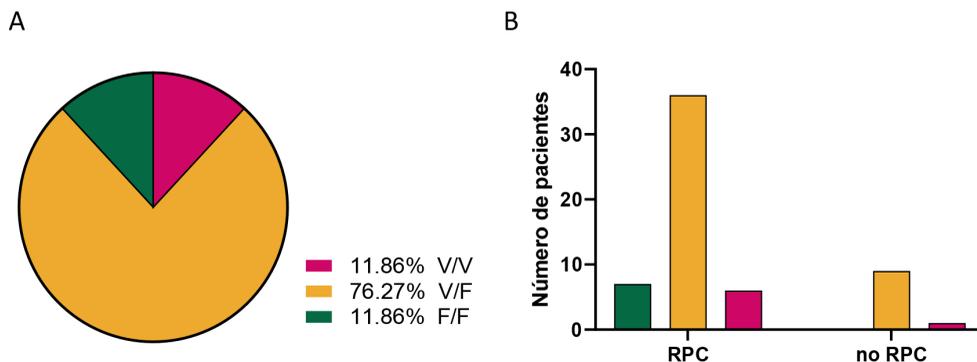


Figura 3. Distribución de las frecuencias alélicas para la población de estudio. WT: TTT (F/F); Heterocigota (F/V); Homocigota para el polimorfismo GTT (V/V). (A). Estudio de las distribuciones alélicas en los distintos grupos de respuesta al tratamiento. Respuesta patológica completa (RPC)(B)



Siete pacientes resultaron homocigotas F/F, seis V/V y 36 heterocigotas F/V (Figura 3B).

De aquellas que no alcanzaron RPC solo una es homocigota V/V y el resto heterocigotas (Figura 3B). Estos resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos de respuesta (Tabla 2).

Por otra parte, se evaluó si existe un vínculo entre el polimorfismo del receptor CD16 y otras variables clínicas (Tabla 2). En todos los casos analizados el polimorfismo FcγRIIIa no se asoció a ninguna de las variables.

Discusión

En este estudio evaluamos la asociación del polimorfismo del receptor CD16 de pacientes con CM HER2+ en estadio temprano tratados con quimioterapia en combinación con TRZ y PER. Las frecuencias alélicas observadas en la población estudiada mostraron desviaciones significativas de las proporciones esperadas. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los grupos de respuesta al tratamiento con respecto a los polimorfismos evaluados como así tampoco una asociación con las variables clínicas estudiadas. Este resultado concuerda con los de algunos otros grupos^{21,26}; en donde tampoco se logró ver una asociación entre los polimorfismos de FcγRIIIa y el resultado clínico en pacientes tratadas con TRZ. De todos modos, los datos siguen siendo

controvertidos ya que algunos estudios han podido demostrar una relación positiva entre el genotipo homocigota FcγRIIIa-158V y la respuesta al tratamiento^{19,27}.

Los receptores Fcγ (FcγR), el grupo más grande de FcR, se expresan en las células inmunitarias, y se unen a la porción Fc de IgG y comprenden varios subtipos. Los FcγR de baja afinidad son mediadores importantes de las funciones de los anticuerpos *in vivo* incluida la ADCC, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y la inducción de citoquinas y quimioquinas. Los FcγR de baja afinidad incluyen dos receptores activadores, FcγRIIIa (CD16A) y FcγRIIa (CD32A), así como el único receptor inhibitorio, FcγRIIb (CD32B)²⁸, para los que se han identificado numerosos polimorfismos y variaciones alélicas^{20,30}. Los polimorfismos alélicos de FcγRIIa y FcγRIIIa generan variantes que se unen al Fc de la IgG con diferentes afinidades que se correlacionan con la potencia relativa de ADCC. FcγRIIa 131H (histidina) y FcγRIIIa 158V tienen una mayor afinidad por el Fc, en comparación con FcγRIIa 131R (arginina) y FcγRIIIa 158F, respectivamente³¹. Los monocitos, macrófagos y células dendríticas expresan tanto FcγR activadores de baja afinidad como el FcγR inhibitorio. Otras células sanguíneas circulantes generalmente expresan repertorios más limitados de FcγRs^{32,33}. Las células NK en particular expresan principalmente FcγRIIIa, y prácticamente no expresan la contraparte inhibitoria. Los neutrófilos expresan altos niveles de FcγRIIb (CD16B), un receptor ligado a glicosilfosfatidil-inositol que carece de motivos de señalización intracelular y probablemente sirve como receptor señuelo³⁴, y también expresan FcγRI, FcγRIIa y niveles bajos de FcγRIIIa³⁵. Las plaquetas expresan FcγRIIIa³⁶ y las células B expresan principalmente el receptor inhibitorio FcγRIIb. Si bien las células T vírgenes no expresan FcγR, los subconjuntos de células T CD4+ activadas pueden expresar FcγRIIIa, FcγRIIa y FcγRIIb^{37,38} y los subconjuntos de células T CD8+ de memoria activadas pueden expresar FcγRIIb³⁹. Las células T NK que expresan FcγRIIIa y las células Tγδ que expresan FcγRIIa y FcγRIIIa⁴⁰ son capaces también de mediar en la ADCC. Estos pequeños subconjuntos de células T que expresan FcγR podrían influir potencialmente en el vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Tabla 2. Distribución de las frecuencias alélicas evaluadas en distintas variables clínicas. Respuesta patológica completa (RPC), receptor hormonal (RH), ganglio con células tumorales (G)

	F/F	F/V	V/V	p
RPC	7	36	6	0.4145
no RPC	0	9	1	
RH+	4	26	2	0.3484
RH-	3	19	5	
Ki>20	5	37	3	0.0936
Ki<20	2	6	3	
Estadio I	0	7	0	0.4259
Estadio II	5	26	6	
Estadio III	3	12	1	
G+	4	30	7	0.1537
G-	3	15	0	

La ADCC es un mecanismo mediado por los receptores FcγRIIIa expresados por las células inmunitarias^{41,42} que se unen a las regiones Fc de los anticuerpos unidos al tumor para formar sinapsis inmunológicas, lo que desencadena la secreción de perforinas y granzimas que inducen la muerte de las células tumorales. Diversos AcMs terapéuticos, dirigidos a CD20, HER2 y al receptor del factor de crecimiento epidérmico, tales como rituximab, ofatumumab, veltuzumab, ocrelizumab, TRZ y cetuximab han demostrado actividad de ADCC mediada por células mononucleares de sangre periférica humana o células NK *in vitro*⁴³⁻⁴⁵.

Margetuximab es un AcM quimérico que comparte la especificidad por HER2 del TRZ, pero con la porción Fc diseñada. Las propiedades directas (independientes de Fc) de margetuximab son similares a las de TRZ. Sin embargo, las propiedades dependientes de Fc de margetuximab son mayores en comparación con las de TRZ; margetuximab se une a FcγRIIIa-158F con mayor afinidad que la afinidad con la que TRZ se une a FcγRIIIa-158V⁴⁶⁻⁴⁸.

Por lo mencionado anteriormente, una asociación positiva de las variantes genéticas de los FcγR con el resultado clínico en pacientes tratados con AcMs de tipo IgG1 respaldaría el uso de la genotipificación para preseleccionar a los pacientes con mayor probabilidad de responder a los distintos tratamientos y una mayor ingeniería de anticuerpos monoclonales con mayor afinidad por los FcγR.

En nuestro país existen escasos estudios donde se evaluó el polimorfismo de los FcγR. Cuello y col. evaluaron la capacidad de unión e inducción de ADCC *in vitro* entre un producto bioterapéutico similar (PBS) denominado RTX83 y rituximab. Sus resultados evidenciaron una eficacia equivalente entre el PBS y rituximab. Adicionalmente, los resultados también confirmaron una inducción mayor de la respuesta de ADCC para el genotipo V/V frente al F/F³⁹.

Si bien nuestro estudio no logró identificar ninguna asociación genética de los distintos alelos del *FcgRIIIa* con la respuesta al tratamiento NA de QT en combinación con TRZ, quizás debido al bajo número de pacientes que no presentaron RPC, estos resultados no excluyen un papel para los FcγR. La importancia de estos estudios radica en la posible implementación de nuevas terapias como margetuximab con mayor afinidad

por la variante FcγRIIIa-158F. Por lo que la genotipificación permitiría seleccionar la terapia más conveniente para el paciente teniendo en cuenta el polimorfismo para el *FcgRIIIa*.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 1866-2018; PICT 3347-2020, Fundación Sales, Fundación Contra el Cáncer, Fundación Pedro F. Mosoteguy, Argentina. G. C., J. M. y E. M. L. son miembros del CONICET. A.P.V, M.B.B y M.B.S. son becarios del CONICET.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Tapia C, Savic S, Wagner U, et al. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R31. doi: 10.1186/bcr1676
2. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Nov 29;9(11):16-32. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.177.
3. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2018 Jun;27(6):619-626. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0627. Epub 2018 Mar 28.
4. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011 Oct 6;365(14):1273-83. doi: 10.1056/NEJMoa0910383. PMID: 21991949; PMCID: PMC3268553.
5. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783-92. doi: 10.1056/NEJM200103153441101. PMID: 11248153.
6. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell.* 2009 May 5;15(5):429-40. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.020.
6. Koutras A, Lazaridis G, Koliou GA, et al. Evaluation of the prognostic value of all four HER family receptors in patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *PLoS One.* 2018;13:e0207707. doi: 10.1371/journal.pone.0207707.
7. Agus DB, Akita RW, Fox WD, et al. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell.* 2002 Aug;2(2):127-37. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00097-1.

8. Franklin MC, Carey KD, Vajdos F, Leahy DJ, de vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):317-28. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00083-2.
9. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res*. 2009 Dec 15;69(24):9330-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4597.
10. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro FL, Schillaci R. Emerging targeted therapies for HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 26;15(7):1987. doi: 10.3390/cancers15071987.
11. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275. PMID: 11244038.
12. Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, Alter G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 2018 Jan;18(1):46-61. doi: 10.1038/nri.2017.106. Epub 2017 Oct 24. PMID: 29063907; PMCID: PMC6369690.
13. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990 Dec 15;76(12):2421-38. PMID: 2265240.
14. Shi Y, Fan X, Deng H, Brezski RJ, Ryczyn M, Jordan RE, Strohl WR, Zou Q, Zhang N, An Z. Trastuzumab triggers phagocytic killing of high HER2 cancer cells in vitro and in vivo by interaction with Fcγ receptors on macrophages. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4379-86. doi: 10.4049/jimmunol.1402891. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25795760.
15. Pegram MD. Antibody dependant cell-mediated cytotoxicity in breast cancer patients in phase II clinical trials of a humanized anti-HER2 antibody. *En Proc Am Assoc Cancer Res, Annu Meet*. 1997. p. A4044.
16. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4220-32. PMID: 10590067.
17. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):1109-14. PMID: 9242542.
18. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604. doi: 10.1074/jbc.M009483200. Epub 2000 Nov 28. PMID: 11096108.
19. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789-96. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8957. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18347005.
20. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, et al. FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol*. 2011 Jun;22(6):1302-1307. doi: 10.1093/annonc/mdq585. Epub 2010 Nov 25. PMID: 21109570.
21. Hurvitz SA, Betting DJ, Stern HM, Quinaux E, Stinson J, Seshagiri S, et al. Analysis of Fcγ receptor IIIa and IIa polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3478-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2294. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22504044; PMCID: PMC3821872.
22. Norton N, Olson RM, Pegram M, et al. Association studies of Fcγ receptor polymorphisms with outcome in HER2+ breast cancer patients treated with trastuzumab in NCCTG (Alliance) Trial N9831. *Cancer Immunol Res*. 2014 Oct;2(10):962-9. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0059. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24989892; PMCID: PMC4215796.
23. Gavin PG, Song N, Kim SR, et al. Association of polymorphisms in FCGR2A and FCGR3A with degree of trastuzumab benefit in the adjuvant treatment of ERBB2/HER2-positive breast cancer: Analysis of the NSABP B-31 trial. *JAMA Oncol*. 2017 Mar 1;3(3):335-341. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4884. PMID: 27812689; PMCID: PMC5344747.
24. Mahaweni NM, Olieslagers TI, Rivas IO, et al. A comprehensive overview of FCGR3A gene variability by full-length gene sequencing including the identification of V158F polymorphism. *Sci Rep*. 2018 Oct 29;8(1):15983. doi: 10.1038/s41598-018-34258-1. PMID: 30374078; PMCID: PMC6206037.
25. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi, G.N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jul;25(7):1783-1785. doi: 10.1245/s10434-018-6486-6. Epub 2018 Apr 18.
26. Musolino A, Naldi N, Dieci MV, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and efficacy of preoperative chemotherapy plus trastuzumab and lapatinib in HER2-positive breast cancer. *Pharmacogenomics J*. 2016 Oct;16(5):472-7. doi: 10.1038/tpj.2016.51. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27378608.
27. Cuello HA, Segatori VI, Alberto M, Pesce A, Alonso DF, Gabri MR. Comparability of antibody-mediated cell killing activity between a proposed biosimilar RTX83 and the originator rituximab. *BioDrugs*. 2016 Jun;30(3):225-31. doi: 10.1007/s40259-016-0171-8. PMID: 27053342.
28. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*. 2006 Jan 30;94(2):259-67. doi: 10.1038/sj.bjc.6602930. PMID: 16404427; PMCID: PMC2361112.
29. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):34-47. doi: 10.1038/nri2206. PMID: 18064051.

30. Gillis C, Gouel-Chéron A, Jönsson F, Bruhns P. Contribution of human FcγRs to disease with evidence from human polymorphisms and transgenic animal studies. *Front Immunol.* 2014 May 30;5:254. doi: 10.3389/fimmu.2014.00254. PMID: 24910634; PMCID: PMC4038777.
31. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature.* 2000 Jul 20;406(6793):267-73. doi: 10.1038/35018508. PMID: 10917521.
32. Vogelpoel LT, Baeten DL, de Jong EC, den Dunnen J. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol.* 2015 Feb 24;6:79. doi: 10.3389/fimmu.2015.00079. PMID: 25759693; PMCID: PMC4338787.
33. Teige I, Mårtensson L, Frendeus BL. Targeting the antibody checkpoints to enhance cancer immunotherapy-focus on FcγRIIB. *Front Immunol.* 2019 Mar 12;10:481. doi: 10.3389/fimmu.2019.00481. PMID: 30930905; PMCID: PMC6423481.
34. Treffers LW, van Houdt M, Bruggeman CW, et al. FcγRIIB restricts antibody-dependent destruction of cancer cells by human neutrophils. *Front Immunol.* 2019 Jan 30;9:3124. doi: 10.3389/fimmu.2018.03124. PMID: 30761158; PMCID: PMC6363688.
35. Golay J, Valgardsdottir R, Musaraj G, Giupponi D, Spinelli O, Introna M. Human neutrophils express low levels of FcγRIIIA, which plays a role in PMN activation. *Blood.* 2019 Mar 28;133(13):1395-1405. doi: 10.1182/blood-2018-07-864538. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30655272; PMCID: PMC6484458.
36. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIIa as the ITAM-bearing receptor mediating alphaIIb beta3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood.* 2008 Oct 1;112(7):2780-6. doi: 10.1182/blood-2008-02-142125. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18641368; PMCID: PMC2556613.
37. Chauhan AK. Human CD4(+) T-cells: A role for low-affinity Fc receptors. *Front Immunol.* 2016 Jun 1;7:215. doi: 10.3389/fimmu.2016.00215. PMID: 27313579; PMCID: PMC4887501.
38. Holgado MP, Sananez I, Raiden S, Geffner JR, Arruvito L. CD32 ligation promotes the activation of CD4+ T cells. *Front Immunol.* 2018 Nov 30;9:2814. doi: 10.3389/fimmu.2018.02814. PMID: 30555482; PMCID: PMC6284025.
39. Farley CR, Morris AB, Tariq M, Bennion KB, Potdar S, Kudchadkar R, Lowe MC, Ford ML. FcγRIIB is a T cell checkpoint in antitumor immunity. *JCI Insight.* 2021 Feb 22;6(4):e135623. doi: 10.1172/jci.insight.135623. PMID: 33616086; PMCID: PMC7934918.
40. Wieckowski S, Avenal C, Orjalo AV Jr, Gyax D, Cymer F. Toward a better understanding of bioassays for the development of biopharmaceuticals by exploring the structure-antibody-dependent cellular cytotoxicity relationship in human primary cells. *Front Immunol.* 2020 Oct 29;11:552596. doi: 10.3389/fimmu.2020.552596. PMID: 33193318; PMCID: PMC7658677.
41. Ben Mkaddem S, Benhamou M, Monteiro RC. Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: From mechanisms to new therapeutic tools. *Front Immunol.* 2019 Apr 12;10:811. doi: 10.3389/fimmu.2019.00811. PMID: 31057544; PMCID: PMC6481281.
42. Benonisson H, Sow HS, Breukel C, et al. High FcγR Expression on intratumoral macrophages enhances tumor-targeting antibody therapy. *J Immunol.* 2018 Dec 15;201(12):3741-3749. doi: 10.4049/jimmunol.1800700. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30397036.
43. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):443-6. doi: 10.1038/74704. PMID: 10742152.
44. Negri FV, Musolino A, Naldi N, et al. Role of immunoglobulin G fragment C receptor polymorphism-mediated antibody-dependant cellular cytotoxicity in colorectal cancer treated with cetuximab therapy. *Pharmacogenomics J.* 2014 Feb;14(1):14-9. doi: 10.1038/tpj.2012.54. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23296156.
45. Robak T, Robak E. New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *BioDrugs.* 2011 Feb 1;25(1):13-25. doi: 10.2165/11539590-000000000-00000. PMID: 21090841.
46. Liu L, Yang Y, Burnset R, et al. Margetuximab mediates greater Fc-dependent anti-tumor activities than trastuzumab or pertuzumab in vitro. *Cancer Res.* 2019, vol. 79, no 13. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-1538>.
47. Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R123. doi: 10.1186/bcr3069. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22129105; PMCID: PMC3326565.
48. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8882-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0696. Erratum in: *Cancer Res.* 2008 Sep 15;68(18):7692. Vijn, Sujata [added]. PMID: 17875730.