

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Sistemica

Ciclo XX

**POLIMORFISMI DEL RECETTORE DEL FRAMMENTO
COSTANTE DELLE IMMUNOGLOBULINE G ED EFFICACIA
CLINICA DEL TRATTAMENTO CON TRASTRUZUMAB IN
PAZIENTI AFFETTE DA CARCINOMA MAMMARIO
METASTATICO HER-2 POSITIVO**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Ezio Musso

Tutor:
Chiar.mo Prof. Cesare Bordi

Dottorando: Dr. Antonino Musolino

IV Anno 2008

RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE	6
1.1 IMMUNOLOGIA E TUMORI	6
1.2 TRASTUZUMAB: STATO DELL'ARTE	13
1.3 TRASTUZUMAB:MECCANISMI DI AZIONE	14
1.4 TRASTUZUMAB: MECCANISMI DI RESISTENZA	18
1.5 CLINICAL TRIALS	21
1.6 I RECETTORI DEL FRAMMENTO COSTANTE DELLE IMMUNOGLOBULINE	27
1.7 RECETTORI Fcγ ATTIVATORI	28
1.8 RECETTORI Fcγ INIBITORI	30
1.9 POLIMORFISMI DEI RECETTORI Fcγ	31
1.10 RECETTORI Fc E LORO RUOLO NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI	33
1.11 FcR e ARTRITI AUTOIMMUNI	35
1.12 FcR NELLE NEFRITI AUTOIMMUNI E NEL LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMICO	36
1.13 RECETTORI Fc E TERAPIA CON ANTICORPI MONOCLONALI	38
2 OBIETTIVI DI STUDIO	44
3 MATERIALI E METODI	45
3.1 TEST DI ADCC	46
3.2 ANALISI DEI POLIMORFISMI DI FcγRIIIa, FcγRIIa E FcγRIIB	47
3.3 ANALISI STATISTICA	49
4 RISULTATI	51
4.1.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	52
4.2 FREQUENZE GENOTIPICHE DEI POLIMORFISMI	52
4.3 RISPOSTA CLINICA A TRASTUZUMAB E POLIMORFISMI DEI RECETTORI Fcγ	54
4.4 SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE IN RELAZIONE AI POLIMORFISMI FcγR	55
4.5 ADCC MEDIATA DA TRASTUZUMAB E POLIMORFISMI FcγR	56
4.6 POLIMORFISMI FcγR E RISPOSTA AL TRATTAMENTO NELLA POPOLAZIONE DEI CONTROLLI	57
5 DISCUSSIONE	65
6 BIBLIOGRAFIA	90
7.1 TABLE 1	92
7.2 TABLE 2	93
7.2 TABLE 3	95
7.4 TABLE 4	96
7.5 TABLE 5	97
7.6 TABLE 6	98
8 FIGURE LEGEND	100
9 FIGURE 1 – 2	101
10 FIGURA 3	101

RIASSUNTO

Presupposti: Il farmaco Trastuzumab è un anticorpo monoclonale utilizzato nelle neoplasie mammarie che iperesprimono il recettore HER-2. In questa popolazione (circa il 20% dei ca mammari) tale farmaco si è dimostrato in grado di ridurre la mortalità cancro-correlata, sia in monosomministrazione che in combinazione con chemioterapici. La percentuale di risposte cliniche a Trastuzumab nel carcinoma mammario metastatico con amplificazione/iperespressione di HER-2 è comunque solo del 25-30% e non è conosciuto l'esatto meccanismo di azione *in vivo* del farmaco.

Trastuzumab è in grado di legarsi tramite la sua porzione Fc ai recettori per il frammento costante delle immunoglobuline (FcγRs) posti sulla membrana cellulare dei linfociti NK e dei monoliti/macrofagi. I geni codificanti per tali recettori sono polimorfici e tali polimorfismi (single nucleotide polymorphisms: SNPs) possono aumentare o ridurre l'affinità di legame di Trastuzumab agli FcγRs, interferendo con la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) delle cellule immunoeffettrici. Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare il ruolo dei polimorfismi degli FcγRIIa, IIIa e IIb nel predire l'efficacia clinica di Trastuzumab in pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo.

Metodi: è stata analizzata una popolazione di 54 pazienti affette da carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo trattate con

Trastuzumab. Le pazienti sono state genotipizzate per i polimorfismi: FcγRIIIa-158 valina(V)/fenilalanina(F), FcγRIIa-131 istidina(H)/arginina(R), e FcγRIIb-232 isoleucina(I)/treonina(T). L'attività ADCC mediata dai linfo-monociti delle pazienti è stata misurata *in vitro* attraverso un test di lisi al cromo radioattivo su una linea cellulare HER-2 positiva. E' stato utilizzato come gruppo di controllo una popolazione di 34 pazienti trattate con chemioterapia non contenente Trastuzumab.

Risultati: L'intera popolazione in studio è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg per i polimorfismi analizzati eccetto che per il polimorfismo FcγRIIb. Il genotipo FcγRIIIa-158 V/V si è dimostrato correlare in maniera statisticamente significativa con il tasso di risposte cliniche obiettive (ORR) e la sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) ottenuti dopo trattamento con Trastuzumab. Un analogo trend è stato osservato per il genotipo FcγRIIIa-131 H/H. La combinazione dei due polimorfismi "favorevoli" (VV e/o H/H) è risultata fattore predittivo indipendente per ORR e PFS rispetto ad altre combinazioni genotipiche e variabili cliniche. Il test ADCC effettuato ha confermato che i linfo-monociti con espressione del genotipo VV e/o H/H hanno una attività ADCC significativamente maggiore dei linfo-monociti con genotipo differente.

Conclusioni: questi dati supportano per la prima volta l'ipotesi che l'attività ADCC è un importante meccanismo di azione in vivo di Trastuzumab. Sono comunque necessari ulteriori studi prospettici per confermare il ruolo dei polimorfismi degli FcγRs nel predire

l'andamento clinico delle pazienti affette da carcinoma mammario
HER-2 positivo in trattamento con terapie contenenti Trastuzumab.

INTRODUZIONE

IMMUNOLOGIA E TUMORI

IMMUNOSORVEGLIANZA

Paul Ehrlich fu uno dei primi a concepire l'idea che il sistema immunitario potesse reprimere lo sviluppo di un potenziale tumore (1). L'ipotesi di un controllo immunitario del tumore non è stata però più approfondita fino alla metà del XX secolo. Nel 1950 il lavoro di Medawar chiarì l'importanza del ruolo delle cellule del sistema immunitario nel mediare il meccanismo di rigetto (2); in modo più specifico, sebbene fosse ormai nota la capacità del sistema immunitario di riconoscere e distruggere cellule tumorali trapiantate in topi, diventò presto chiaro che il meccanismo sottostante era rappresentato dal rigetto verso l' "allo" tessuto o tessuto "non self" piuttosto che da una risposta tumore-specifica. Successivamente, la dimostrazione che i topi potessero essere immunizzati contro tessuto tumorale singenico, trapiantato, indotto da sostanze chimiche, virus o altri fattori, stabilì l'esistenza di "antigeni tumore-specifici" (3,4) e definì l'ipotesi di un' "immunosorveglianza" del tumore. Chiaramente non sarebbe possibile un meccanismo di immunosorveglianza tumorale se sulle cellule neoplastiche non vi fossero specifiche strutture riconosciute dal sistema immunitario. Nel 1959 Thomas suggerì che la principale funzione delle cellule del sistema immunitario non fosse quella di promuovere il rigetto verso gli "allo" tessuti ma piuttosto quella di difendere l'organismo dalle malattie neoplastiche mantenendo così l'omeostasi cellulare dello stesso. (5). Burnet definì il concetto di immunosorveglianza come segue:

mutazioni genetiche ereditarie possono essere comuni nelle cellule somatiche ed una parte di queste può rappresentare un primo “step” verso la cancerogenesi; è quindi necessario che esista un meccanismo a carattere immunologico per l’eliminazione e l’inattivazione di cellule mutanti potenzialmente pericolose (6,7).

L’introduzione del concetto di immunosorveglianza comportò la nascita di numerosi esperimenti per valutare se un ospite affetto da immunodeficienza potesse essere più suscettibile allo sviluppo di tumori spontanei o chimicamente indotti (8). Divenne chiaro che i topi con immunodeficienza sviluppavano più facilmente tumori associati a virus e linfomi rispetto a topi sani. La maggiore frequenza di linfomi poteva essere attribuita ad una stimolazione immunitaria cronica dovuta ad un inefficace controllo di infezioni batteriche e virali in grado di comportare un aumento della proliferazione di linfociti, di mutazioni somatiche ed eventualmente lo sviluppo di linfomi (9,10). Questi studi si dimostrarono inconcludenti e non furono in grado né di confermare né di escludere l’ipotesi dell’immunosorveglianza (11).

Tra il 1970 e il 1990 la scoperta delle cellule Natural Killers (NK) comportò un notevole entusiasmo per la possibilità che queste potessero funzionare da cellule effettrici dei processi di immunosorveglianza. (12)

Tra il 1994 e il 1998 due importanti scoperte rinnovarono l’interesse nei confronti del processo di immunosorveglianza. Primo, si dimostrò che la produzione endogena di interferon γ (INF γ) proteggeva l’ospite dalla crescita di tumori trapiantati e dalla formazione di neoplasie spontanee o indotte. Utilizzando il trapianto di tumore, si dimostrò che

i fibrosarcomi crescevano più rapidamente e più efficacemente nei topi trattati con anticorpi monoclonali neutralizzanti INF γ (13).

Secondo, si osservò che i topi (129/SvEv) con deficit nella sintesi di perforina sviluppavano più facilmente tumori chimicamente indotti rispetto alla controparte wilde-type. La perforina è una proteina contenuta nei granuli intracellulari dei linfociti T e delle cellule NK e possiede una importante funzione nell'eliminazione di diverse cellule target tra cui le cellule neoplastiche (14,15). Questi studi non solo definivano l'importanza di un controllo immunitario sullo sviluppo dei tumori ma suggerivano anche l'esistenza di una doppia componente, innata e acquisita, nell'ambito dell'immunosorveglianza. Deficit genetici, immunochimici o funzionali di NK, delle cellule natural killer T (NKT), dei linfociti T $\gamma\delta$, dei linfociti T $\alpha\beta$, INF γ o dell'interleuchina 12 (IL12) conducevano ad un'aumentata suscettibilità dell'ospite allo sviluppo di tumori; tra i diversi studi, uno in particolare concentrava l'attenzione sulla popolazione dei linfociti T che giocano un importante ruolo nell'immunosorveglianza: il contributo determinato dai linfociti T $\gamma\delta$ e dai linfociti T $\alpha\beta$ era supportato dall'evidenza che topi con deficit nella sintesi della catena β o della catena δ del T cell receptor (TCR) mostravano un'aumentata incidenza di fibrosarcomi e carcinomi spinocellulari rispetto alla controparte wilde-type (16). Questi risultati suggeriscono che l'immunosorveglianza è rappresentata da un processo eterogeneo richiedente l'intervento di diversi effettori del sistema immunitario in relazione al tipo di cellule da cui origina il tumore, dal meccanismo di

trasformazione, dalla localizzazione anatomica e dai meccanismi immunologici di riconoscimento.

Se esiste un meccanismo di immunosorveglianza nei topi si può ipotizzare che lo stesso sia presente nell'uomo? La logica deduzione è che i soggetti con immunodeficienza o immunodepressione dovrebbero presentare un'aumentata suscettibilità ai tumori. Follow-up di pazienti trapiantati trattati con farmaci immunosoppressivi (17) o di pazienti affetti da immunodeficienza primaria (18) dimostrarono che questi presentano un rischio relativo significativamente più alto di sviluppare malattie neoplastiche. Studi a lungo-termini su pazienti evidenziarono che in parte l'aumento del rischio era associato allo sviluppo di tumori di origine virale (19). Per esempio nei registri dei trapianti di Cincinnati (19), Scandinavia (20), Australia e Nuova Zelanda (21) si è osservata una più alta incidenza di Linfoma di Hodgkin, sarcoma di Kaposi e carcinomi del tratto genitourinario e della regione ano-genitale. Questi tumori hanno in buona parte origine virale e sono correlati rispettivamente ad infezione di Epstein-Barr virus, herpes virus di tipo 8 e papilloma virus (22). Chiaramente la minore efficacia del meccanismo di immunosorveglianza in questi pazienti comporta una maggiore suscettibilità a infezioni virali endemiche o a riattivazioni virali; varie neoplasie non associate a virus possono comunque svilupparsi nei suddetti pazienti (23,24). L'ipotesi di un deficit di immunosorveglianza nei pazienti immunodepressi potrebbe essere avvalorata dalla dimostrazione che una neoplasia preesistente cresca con la terapia immunosoppressiva o che un tumore regredisca con la sospensione di tale terapia. (25).

Dimostrata l'esistenza di un'immunosorveglianza, perchè il cancro si sviluppa nei soggetti immunocompetenti? Si è a lungo pensato che una funzione del sistema immunitario durante la formazione del tumore fosse quella di selezionare varianti tumorali adatte a sopravvivere ad un'ambiente immunocompetente. Vari studi hanno dimostrato che l'assenza di un'efficiente risposta immunitaria favorisce la crescita di neoplasie altamente immunogeniche (26,27). I risultati ottenuti dai diversi studi dimostrano come i tumori siano influenzati dall'ambiente immunologico nel quale si formano. Questo processo di "imprinting" può risultare nello sviluppo di cellule neoplastiche in grado di sfuggire alla risposta immunitaria con l'eliminazione della componente più immunogenica e con la selezione di varianti con immunogenicità ridotta e quindi con maggiore possibilità di sopravvivere in un organismo immunocompetente. Poiché il sistema immunitario esercita sia una funzione di protezione dell'ospite verso il tumore sia un'azione di ridefinizione del tumore, il termine di immunosorveglianza tumorale non è apparso più sufficiente per descrivere le diverse fasi che la rappresentano; per cui è stato definito il termine più ampio di "immunoediting" per definire più appropriatamente la duplice funzione di prevenire ma anche di plasmare il tumore (28). Molti studi sono necessari per interpretare le dinamiche cellulari e molecolari dell'immunoediting; recenti dati l'hanno definita come il risultato di tre processi: quello di eliminazione rappresentato dall'immunosorveglianza, quello dell'equilibrio nel quale si osserva una selezione Darwiniana delle cellule neoplastiche e quello della "fuga" dal controllo immunitario

(escape) (29). Quando la prima fase dell'eliminazione ha successo, il sistema immunitario è in grado di bloccare la crescita del tumore ed eliminare le cellule mutanti; non si ha quindi il passaggio alle fasi successive. Qualora varianti cellulari riescano a sopravvivere, si determina una sorta di equilibrio tra il sistema immunitario dell'ospite e le cellule mutate che può persistere per diversi anni; durante tale periodo di selezione Darwiniana molte cellule vengono distrutte ma si formano nel contempo varianti più resistenti. L'equilibrio si rompe (escape) quando si selezionano attraverso mutazioni genetiche ed epigenetiche cellule in grado di espandersi in modo non controllato diventando insensibili alla risposta immunitaria: il tumore diventa allora clinicamente evidente (29).

IMMUNOTERAPIA ATTIVA E PASSIVA

L'immunoterapia, come terapia alternativa per il cancro, ha subito un'importante sviluppo nell'ultima decade; diversamente dagli altri concetti terapeutici, l'immunoterapia vuole prevenire la disseminazione metastatica del tumore e migliorare la qualità di vita del paziente. Gli obiettivi dell'immunoterapia sono quelli di stimolare il sistema immunitario attraverso la liberazione di citochine, l'attivazione di linfociti T o attraverso la somministrazione di anticorpi diretti contro antigeni tumorali (30). Lo sviluppo tumorale frequentemente correla con mutazioni di geni codificanti proteine coinvolte nella crescita cellulare (31). A causa della loro instabilità genetica, le cellule neoplastiche esprimono proteine alterate, dette antigeni associati al tumore che non sono espresse o lo sono in minima

entità sulle cellule normali (32). Gli antigeni tumore-associati (TAAs) espongono nuovi epitopi che sono riconosciuti dal sistema immunitario; la risposta immunitaria verso tali epitopi però ha solo effetti marginali sul tumore (33). Durante la progressione neoplastica, si è dimostrato che la risposta immunitaria citotossica è inibita e i linfociti T infiltranti il tumore e le cellule presentanti l'antigene (APCs) spesso sembrano non essere efficaci (34). Inoltre si è osservato che le stesse cellule neoplastiche sono in grado di ridurre la risposta immunitaria favorendo la secrezione di fattori immunosoppressivi come interleuchina 10 (IL10) o il fattore di crescita trasformante β (TGF β) (35).

L'immunoterapia mira a rinforzare la risposta del sistema immunitario verso il tumore. L'obiettivo dell'immunoterapia attiva è di indurre una risposta immunitaria (preventiva o terapeutica) endogena e a lungo termine verso le cellule neoplastiche (36); a tale scopo vengono usati TAAs o materiale ottenuto da biopsie su tessuto tumorale, "vaccini antitumorali" (32,37). La risposta immunitaria può ulteriormente essere stimolata in modo aspecifico usando agenti modificatori della risposta biologica (es. le citochine). D'altra parte invece, l'immunoterapia passiva stimola una risposta immunitaria antigene-specifica utilizzando elevate quantità di effettori molecolari come gli anticorpi antigene specifici o effettori cellulari come il linfociti T citotossici. A differenza dell'immunoterapia attiva, quella passiva è di breve durata e necessita di ripetute somministrazioni (36). Gli anticorpi, coordinatori della risposta umorale, riconoscono le strutture antigeniche neutralizzandole o mediando importanti funzioni come la

citotossicità cellulare anticorpo dipendente (ADCC) o la citotossicità complemento mediata (CDC) (38)

Immunoterapia Attiva

Recenti studi hanno dimostrato come il sistema immunitario possa essere efficacemente stimolato a controllare la crescita tumorale o anche a eradicare un tumore solido esistente (39). Si è inoltre osservato che il sistema immunitario è in grado di attaccare le cellule neoplastiche se immunogene; il processo di presentazione degli TAAs da parte delle cellule APCs dell'ospite ai linfociti T sembra giocare un ruolo essenziale nel riconoscimento degli antigeni tumorali piuttosto che nell'attivazione diretta dei linfociti T (40). I vaccini contro il cancro possono essere suddivisi in vaccini contenenti proteine o polipeptidi, contenenti intere cellule tumorali o vaccini costituiti da vettori virali (41,42). Nella maggior parte dei casi l'antigene deve essere combinato con agenti adiuvanti (es. BCG) (43) o citochine (IL-2, GM-CSF o IL-12) per indurre una risposta immunitaria più efficace (44). La stimolazione in vitro delle cellule dendritiche (DCs), una importante popolazione cellulare di APCs, e la loro reinfusione nell'organismo è alla base della vaccinazione con DCs (45). I vaccini tumorali, inducendo una risposta immunitaria contro definiti antigeni tumorali, potrebbero rappresentare i candidati ideali per la terapia del cancro. Un vaccino ideale dovrebbe indurre una risposta immunitaria a carattere preventivo in grado di combinare sia la risposta dei linfociti T specifici sia la risposta umorale con anticorpi diretti contro gli antigeni neoplastici. Inoltre, è necessario che la risposta immunitaria

indotta sia a lungo termine, quindi l'attivazione dei linfociti T e il livello di anticorpi dovrebbero persistere a livelli protettivi per mesi o per anni. Uno dei vantaggi dei vaccini è che sono sufficienti quantità da tre a cinque volte inferiori di quelle richieste dall'immunoterapia passiva (38).

Immunoterapia Passiva

L'immunoterapia passiva determina un legame tra TAAs e la risposta immunitaria attraverso un'immunoglobulina (Ig) antigene specifica, il cui frammento costante Fc interagisce con il sistema immunitario dell'ospite. Gli effetti biologici della somministrazione di anticorpi monoclonali (mAb) sono molteplici e includono il meccanismo di agglutinazione, di neutralizzazione delle proteine di segnale o di blocco del sito di legame dei recettori cellulari (46). Per esempio bloccando il legame di fattori di crescita con il loro recettore attraverso mAb si previene la crescita delle cellule neoplastiche (47). Un altro meccanismo di azione degli mAb è quello di eliminare le cellule neoplastiche attraverso la CDC e ADCC (46). L'immunoterapia passiva comunque richiede un'elevata quantità di mAb antigene specifici e, a differenza dell'immunoterapia attiva, è di breve durata. La terapia con mAb è associata ad una significativa risposta clinica nelle malattie ematologiche così come nei tumori solidi; nelle neoplasie ematologiche le cellule presentano numerosi recettori ancorati alla superficie di membrana o clusters di differenziazione, come CD20, CD22, CD52 che sono solitamente utilizzati come targets di mAb. Rituximab è stato il primo mAb ad

essere stato approvato dalla Food and Drugs Administration per il trattamento dei Linfomi non Hodgkin a basso grado. Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico umano/murino, composto da una IgG umana specifica per CD20, il quale regola il processo di inizio del ciclo cellulare e la differenziazione (48). Rituximab causa la lisi dei linfociti B attivando la cascata del complemento (CDC) e le cellule effettrici (ADCC) e inducendo così l'apoptosi cellulare. Comunque una perdita dell'espressione di CD20 sulla superficie dei linfociti B è stata riportata dopo trattamento prolungato con Rituximab (49) indicando la presenza di un meccanismo di escape del tumore.

Tositumomab (50), un anticorpo monoclonale coniugato con radionuclidi, è stato approvato per il trattamento dei pazienti affetti da Linfoma non Hodgkin follicolare CD20+, refrattari alla terapia con Rituximab, recidivati dopo trattamento chemioterapico. Alemtuzumab è un mAb ricombinante umanizzato di origine murina diretto contro CD52, che è espresso sulla superficie dei linfociti B e T normali e maligni, NK, monociti, macrofagi e sulle cellule del sistema riproduttivo maschile (51). Alemtuzumab è stato approvato per il trattamento della leucemia linfatica cronica.

A differenza delle neoplasie ematologiche, i tumori solidi esprimono un numero ridotto di targets sulla superficie cellulare. Trastuzumab, che lega l'antigene HER2/neu, è il primo mAb umanizzato approvato per il trattamento del carcinoma mammario metastatico HER2+ (52). Cetuximab è un mAb chimerico specifico per EGFR1 ed è approvato per il trattamento del carcinoma del colon-retto avanzato (53).

L'immunoterapia dovrebbe tener conto dell'instabilità genetica delle cellule tumorali poiché queste rapidamente si adattano all'ambiente circostante. Terapie in grado di riconoscere un solo epitopo possono non essere efficaci per una protezione a lungo termine poiché le cellule attivano meccanismi di fuga dal sistema immunitario come la riduzione dell'espressione degli antigeni targets (54). Una terapia multi-targets o una combinazione di immunoterapia attiva e passiva potrebbe ridurre efficacemente l'invasione delle cellule metastatiche ed eventualmente prevenire l'escape tumorale (55).

TRASTUZUMAB E CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO: STATO DELL'ARTE

Il gene her-2 (cerbB2/neu) codifica per un recettore, correlato ad una tirosin-chinasi, facente parte della famiglia dei recettori del fattore di crescita epidermoidale (EGFR). HER-2 è iperespresso nel 20-25% dei carcinomi mammari metastatici (56,57). L' iperespressione di HER-2 è determinata principalmente dall'amplificazione del gene her-2 ed è associata ad una prognosi sfavorevole (56,58) e alla resistenza a specifici farmaci chemioterapici (59). HER-2 è diventato un importante target terapeutico per diverse ragioni: 1) i livelli di HER-2 correlano fortemente con la patogenesi e la prognosi del carcinoma mammario. 2) Il livello di HER-2 nelle cellule neoplastiche con amplificazione del gene è molto più alto che nelle cellule dei tessuti normali, riducendo così la tossicità dei farmaci che utilizzano come target HER-2. 3) HER-2 è presente in un'elevata percentuale di cellule tumorali (60) e i tumori con elevata espressione di HER-2 (es. IHC:

3+) (61) spesso mostrano una colorazione all'immunistoichimica uniforme e intensa (62) suggerendo che una terapia anti-HER-2 potrebbe agire sulla maggior parte delle cellule in un paziente. 4) L'iperpressione di HER-2 si ritrova sia nel tumore primitivo che nei siti metastatici (63) indicando che la terapia anti-HER2 può essere efficace su tutti i siti neoplastici.

TRASTUZUMAB: MECCANISMI DI AZIONE

Herceptin (Trastuzumab) è un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante (mAb) diretto contro il dominio extracellulare della proteina HER-2; esso è costituito da una regione complementare determinante di un anticorpo murino (clone 4D5) integrata nella struttura di una IgG1 umana (64). Sebbene il meccanismo attraverso cui Herceptin induca una regressione dei tumori con iperpressione di HER-2 non sia completamente conosciuto, diversi effetti molecolari e cellulari sono stati osservati in sperimentazioni con modelli in vivo e in vitro.

HER-2 attiva molteplici vie di segnale intracellulari, incluse quelle che coinvolgono fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato chinasi (PI3K) e MAP chinasi (MAPK). Herceptin riduce la trasmissione di segnale attraverso queste vie, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. La riduzione del segnale attivato dal recettore può condurre ad una internalizzazione dello stesso mediata da Herceptin e a una sua successiva degradazione (65,66). Comunque, non è chiaro se Herceptin determini una riduzione dell'espressione di HER-2 sulla superficie cellulare poiché si è dimostrato che i livelli del recettore

non si modificano in risposta al trattamento con Herceptin (67). Un meccanismo attraverso cui l'anticorpo può bloccare la via di segnale di PI3K è stato recentemente descritto da Nagata et al (68): PTEN (MMAC1/TEP) è una fosfatasi che defosforila in posizione D3 di membrana il PI3 che è il sito di ancoraggio del dominio plecstrina-omologo di akt alla membrana cellulare (69). Poiché la PI3K catalizza la produzione di PI3, PTEN antagonizza l'azione di PI3K e regola negativamente l'attività di akt. Herceptin attiva la fosfatasi PTEN risultando in una rapida defosforilazione di akt e conseguente inibizione del ciclo cellulare (68).

Le cellule trattate con Herceptin quindi, vanno incontro all'arresto del ciclo cellulare in G1 con concomitante riduzione della proliferazione. L'arresto del ciclo cellulare è accompagnato dalla riduzione di espressione di proteine coinvolte nel sequestro dell'inibitore delle chinasi ciclino-dipendenti (cdk) p27^{kip1}, inclusa la ciclina D1. Tutto questo comporta il rilascio di p27^{kip1} permettendo a questa di legare e inibire il complesso ciclina E/cdk2 (66,70). Il trattamento con Herceptin comporta anche un accumulo intracellulare di p27^{kip1}; questo sembra essere secondario alla formazione del complesso p27^{kip1}cdk2, dovuto alla ridotto sequestro di p27^{kip1} da parte del proteosoma (71)

L'Herceptin come singolo agente può ridurre drasticamente le dimensioni del tumore in pazienti con carcinoma mammario metastatico con iperespressione di HER2. Se ciò sia dovuto ad un effetto citotossico diretto sulle cellule tumorali o se sia dovuto ad un meccanismo indiretto (es: attività anti-angiogenica o stimolazione

della risposta immunitaria) non è ancora ben definito. Studi in vivo indicano che Herceptin può indurre l'apoptosi delle cellule nel carcinoma mammario. Chang et al trattarono preoperatoriamente pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato con Herceptin e analizzarono il tessuto tumorale prima e dopo il trattamento: i dati preliminari ottenuti dimostrarono che Herceptin è in grado di comportare un significativo incremento dell'apoptosi nelle cellule tumorali mentre non si osservarono cambiamenti nell'espressione di Ki67 (72). Gennari et al (73) hanno condotto uno studio simile usando Trastuzumab in fase preoperatoria in pazienti con carcinoma mammario operabile HER2+: tale studio ha evidenziato che il trattamento con trastuzumab non comporta alterazioni nell'espressione di HER2. Altri studi sono necessari per caratterizzare con precisione i diretti effetti citotossici di Herceptin sulle cellule tumorali.

L'iperespressione di HER2 è associato ad un incremento del processo di angiogenesi e dell'espressione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (74). Recenti studi hanno dimostrato che il trattamento con trastuzumab dei tumori mammari HER2+ comporta la riduzione delle dimensioni tumorali, della densità dei piccoli vasi in vivo (75) e la migrazione delle cellule neoplastiche in vitro (76); inoltre tali studi hanno dimostrato che la sintesi di fattori pro-angiogenici è ridotta mentre aumenta la produzione di fattori anti-angiogenici in pazienti trattati con trastuzumab rispetto ai controlli (75, 76). Inoltre, è stato possibile osservare che la combinazione di Herceptin e paclitaxel è in grado di inibire gli eventi correlati

all'angiogenesi in modo più efficace della terapia con il solo Herceptin (76).

Modelli in vivo e diversi studi clinici hanno dimostrato che Trastuzumab possiede un'attività citotossica. Questa capacità di blocco della proliferazione e di induzione della morte cellulare può essere in parte correlata alla stimolazione della risposta immunitaria. Herceptin è in grado di attivare la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) in diverse linee cellulari di carcinoma mammario (64,77). Le cellule NK, principalmente coinvolte nell'ADCC, esprimono il recettore per Fc γ attraverso il quale legano alla componente Fc di Herceptin con conseguente lisi cellulare.

Le cellule NK e ADCC sono importanti effettori della citotossicità di Trastuzumab ma non sono i soli responsabili di tale attività. Nello studio di Gennari et al (73) in tutti i pazienti trattati con Herceptin preoperatorio si è osservato un importante infiltrato linfoide del tumore nonché una correlazione tra ADCC e risposta clinica. Repka et al (76) hanno trattato pazienti affetti da carcinoma mammario HER2+ progrediti a diverse precedenti linee chemioterapiche con interleuchina 2 (IL-2) ed Herceptin, osservando che IL-2 incrementa il numero di NK e migliora l'efficacia di ADCC. In questa piccola coorte di pazienti non si è dimostrata però una correlazione tra risposta clinica e incremento di NK così come tra risposta clinica e ADCC. Sono necessari ulteriori studi per approfondire il ruolo di ADCC nel mediare la risposta a Trastuzumab.

Studi in vitro hanno mostrato una sinergia tra Herceptin e diversi farmaci chemioterapici (79); sebbene non tutti i meccanismi di

sinergia siano conosciuti, si suppone che esista una correlazione tra il danno causato al DNA dai farmaci chemioterapici e il blocco della riparazione del danno suddetto da parte di Trastuzumab. Inoltre si è notato che Herceptin è in grado di promuovere la rottura del legame di DNA nelle cellule che iperesprimono HER2 (80) e di modulare la trascrizione di geni i cui prodotti sono coinvolti nella riparazione del DNA (81). Attualmente Herceptin è somministrato in associazione con chemioterapici come paclitaxel o docetaxel che migliorano la risposta alla terapia, il tempo alla progressione e la sopravvivenza globale rispetto alla monoterapia con Trastuzumab (82, 83)

TRASTUZUMAB: MECCANISMI DI RESISTENZA

Mutazioni somatiche nella regione del gene *egfr* codificante per il dominio tirosin-chinasico correlano con la risposta all'inibitore tirosin-chinasico gefitinib nei pazienti affetti da neoplasia polmonare (84). In modo simile, mutazioni nella regione codificante per il dominio extracellulare (ECD) possono essere presenti nel gene *her-2* impedendo il legame di trastuzumab a HER-2. Inoltre, l'interazione tra anticorpo e recettore può venir meno se i livelli di HER-2 si riducono nel tempo. Studi immunocistochimici hanno comunque dimostrato che l'iperpressione di HER-2 è generalmente mantenuta nelle cellule neoplastiche mammarie ottenute da pazienti recidivati dopo completa risposta patologica al trattamento con Herceptin (73). Recenti studi hanno suggerito che l'intensificazione del segnale mediato da PI3K contribuisce a indurre resistenza alla terapia con

Trastuzumab. Nagata et al (68) hanno osservato che la riduzione di espressione di PTEN blocca l'inibizione della proliferazione cellulare mediata da Herceptin nelle cellule di carcinoma mammario, che iperesprimono HER-2, caratterizzate da un aumento del segnale attivato da PI3K. Gli autori hanno inoltre dimostrato che nei pazienti con espressione ridotta di PTEN le risposte cliniche a trastuzumab sono significativamente ridotte rispetto a quelle ottenute in pazienti esprimenti PTEN; la perdita di funzione di PTEN può essere associata a mutazioni riportate in circa il 5-10% dei tumori mammari umani così come un'aploinsufficienza di PTEN dovuta alla perdita di eterozigosi a livello del locus genico può essere riscontrata in circa il 50% dei carcinomi mammari (85); è stata riportata inoltre una "mutazione" epigenetica di PTEN (86). Gli autori infine suggeriscono che in pazienti resistenti ad Trastuzumab per una ridotta espressione di PTEN potrebbero essere vantaggiosi farmaci capaci di inibire PI3K.

Herceptin aumenta l'emivita di p27^{kip1} riducendo la fosforilazione della stessa mediata dal complesso ciclica E/cdk2 e bloccando conseguentemente la sua degradazione ubiquitino-dipendente (67). Herceptin aumenta anche l'associazione di p27^{kip1} e cdk2 comportando l'arresto del ciclo cellulare in G1 (70). E' stato recentemente osservato che linee cellulari SKBR3 resistenti ad Herceptin dopo esposizione continua al farmaco esprimono livelli ridotti di p27^{kip1} con elevata attività di cdk2: la transfezione di p27^{kip1} o l' induzione farmacologica di p27^{kip1} comporta nuovamente la sensibilità cellulare al Trastuzumab, confermando che p27^{kip1} è un mediatore critico della risposta ad Herceptin (87) e che può servire quindi come marcatore di risposta al

Trastuzumab o come target terapeutico in quel sottogruppo di pazienti affetti da carcinoma mammario progrediti durante terapia con Herceptin.

Il fattore di crescita insulino simile (IGF) e il suo recettore (IGF-IR) risultano frequentemente iperespressi e coinvolti nella proliferazione cellulare, trasformazione e metastatizzazione (88). Alti livelli di IGFs prevengono l'apoptosi indotta da chemioterapici e radiazioni. L'iperattivazione della via di segnale coordinata da IGF-IR è associata a resistenza a Trastuzumab nelle cellule mammarie tumorali HER-2+. Lu et al hanno dimostrato che l'arresto della crescita cellulare mediato da Herceptin è perso nelle cellule che iperesprimono IGF-IR ma tale effetto viene annullato se nel mezzo della coltura cellulare si aggiunge la proteina 3 in grado di inibire IGF, ligando di IGF-IR (89).

Un altro potenziale meccanismo di resistenza è l'accumulo a livello cellulare della forma troncata di HER-2, generalmente conosciuta come p95HER-2 o frammento C-terminale; tali frammenti sono frequentemente ritrovati nei tumori mammari esprimenti HER-2 (90) e originano da una proteolisi, ad opera di una ancora non ben definita metallo proteasi, del dominio extracellulare di HER-2 (91) o da un inizio alternativo di traduzione da due residui di metionina (611 e 687) che sono localizzati prima e dopo il dominio transmembrana, rispettivamente (92). La funzione biologica di p95HER-2 non è completamente nota sebbene si è dimostrato che la sua iperespressione conduce a crescita tumorale nei topi (92). Il fatto che il recettore troncato possieda attività tirosin-chinasica in assenza del legame tra Trastuzumab e dominio extracellulare conduce ad ipotizzare che i

tumori esprimenti p95HER-2 siano resistenti a Trastuzumab ma possano essere sensibili ad altre molecole in grado di inibire l'attività tirosin-chinasica di HER-2 come il lapatinib. Scaltriti et al (93) hanno creato cellule di carcinoma mammario trasfettate con HER-2 e p95HER-2 ed esaminato gli effetti determinati da Trastuzumab e Lapatinib sull'attivazione del recettore e sulle crescita di queste cellule in vitro e dei tumori da esse derivati in vivo. Essi hanno osservato che Lapatinib è in grado di inibire la fosforilazione di entrambe le forme di HER-2, mentre Trastuzumab non ha effetti sulla fosforilazione di p95HER-2. Inoltre solo uno su nove dei pazienti, esprimenti la forma troncata, trattati con Trastuzumab ha avuto una risposta clinica (parziale) al farmaco, mentre in 19 dei 37 pazienti (51,4%) che esprimevano la forma completa di HER-2 si sono osservate 5 risposte complete e 14 risposte parziali (P=0,29), dimostrando l'espressione di p95HER-2 comporta resistenza alla terapia con Herceptin.

CLINICAL TRIALS

Il primo studio clinico di fase II con Trastuzumab ha coinvolto 46 donne trattate con l'anticorpo al dosaggio di 250 mg (dose d'attacco) seguiti d 100 mg alla settimana per 10 settimane per mantenere una concentrazione sierica del farmaco di più di 10 µg per millimetro (94). Le pazienti hanno ricevuto il trattamento fino a tossicità o a progressione di malattia; le risposte al trattamento sono state osservate nel 12% dei pazienti. Uno studio multicentrico di fase II ha ottenuto risultati simili (95). Diversi fattori possono spiegare le modeste

percentuali di risposta ottenute in questi primi studi: le numerose linee di chemioterapia a cui sono state sottoposte le pazienti prima del trattamento con Herceptin e l'inclusione di pazienti con tumore in cui l'analisi immunohistochimica per HER2 risultava solo 2+ (61).

La dose attualmente utilizzata e la schedula di somministrazione sono state successivamente stabilite da studi prospettici randomizzati. La variazione di dose non ha comportato un miglioramento della risposta in uno studio in cui le 114 pazienti ricevevano o Trastuzumab alla dose d'attacco di 4 mg/kg seguita da 2 mg/kg alla settimana o il doppio di tale dose con la stessa frequenza settimanale (96). La percentuale di risposta (35%) in queste pazienti che non hanno ricevuto precedenti trattamenti chemioterapici è risultata migliore di quella ottenuta negli studi precedenti sebbene alcune delle 114 pazienti siano state sottoposte a precedente endocrinoterapia per la malattia metastatica. Questi risultati suggeriscono che Trastuzumab può essere utilizzato come singolo agente prima della convenzionale chemioterapia in pazienti con malattia metastatica.

Uno studio clinico di fase II ha testato una dose di attacco di 8mg/kg seguito da 6 mg/kg e.v. per 90' ogni tre settimane mostrando che i livelli sierici sono sovrapponibili a quelli ottenuti con le somministrazioni settimanali (97). Lo studio pilota, randomizzato che ha mostrato l'efficacia della combinazione Trastuzumab-chemioterapia ha arruolato 469 pazienti non precedentemente trattate, HER2+, con carcinoma mammario metastatico (98). Le pazienti hanno ricevuto la 1° linea di chemioterapia da sola o in combinazione con l'anticorpo: quelle che non avevano ricevuto una precedente

terapia a base di antracicline sono state trattate con doxorubicina o epirubicina combinata con ciclofosfamide; a coloro che avevano già ricevuto antracicline è stato somministrato paclitaxel. Al momento della progressione, alle pazienti riceventi solo chemioterapia è stato permesso di iniziare la terapia con Trastuzumab e per quelle che già erano sottoposte a terapia con l'anticorpo era possibile continuare con la stessa terapia a discrezione del clinico.

L'obiettivo primario era rappresentato dal tempo alla progressione di malattia che era aumentata di 4.6 mesi nelle pazienti sottoposte alla sola chemioterapia e di 7.4 mesi nelle pazienti trattate con la combinazione ($P < 0.001$). La terapia con trastuzumab era anche associata ad un incremento nella percentuale di risposta (50% vs 32%, $P < 0.001$) e ad una maggiore durata della risposta (mediana, 9.1 vs 6.1 mesi; $P < 0.001$). A differenza delle pazienti che ricevevano Trastuzumab come terapia di "salvataggio" dopo diverse linee di chemioterapia, nelle pazienti che ricevevano Trastuzumab associato ad una prima linea di chemioterapia per una malattia metastatica, la percentuale di mortalità ad un anno risultava significativamente più bassa (22% vs 33%, $P = 0.008$) con una sopravvivenza mediana più lunga (25.1 vs 20.3 mesi; $P = 0.046$) con un 20% di riduzione del rischio di morte.

Uno studio clinico successivo, randomizzato che utilizzava docetaxel da solo o docetaxel + trastuzumab ha dato risultati sovrapponibili (99). Vari studi non randomizzati hanno dimostrato efficacia della terapia con Trastuzumab in associazione a diversi farmaci chemioterapici utilizzati abitualmente nella terapia del carcinoma mammario. Non è

ancora chiaro se vi sia un farmaco chemioterapico o una classe la cui associazione con l'anticorpo sia più efficace rispetto alle altre (99).

Quando Trastuzumab è utilizzato in monoterapia raramente sono state riportate mielosoppressione, nausea, emesi e alopecia. Una reazione acuta d'ipersensibilità si può verificare in meno del 10% casi (100). Sono stati riportati sporadici casi di scompenso cardiaco nei primi studi con Trastuzumab ma un'associazione tra riduzione della frazione di eiezione ventricolare sinistra e terapia con Trastuzumab è diventata evidente nello studio randomizzato condotto da Slamon et al. (98): il 27% delle pazienti trattate con trastuzumab e antracicline, 13% delle pazienti trattate con trastuzumab e paclitaxel e 5% di quelle trattate con solo trastuzumab hanno manifestato tossicità cardiaca. L'assenza di rilevanti modelli animali e la scarsità di biopsie cardiache delle pazienti con tossicità cardiologia ha limitato la comprensione del meccanismo di cardiotossicità di trastuzumab (101); alcuni studi suggeriscono un ruolo di HER2 nell'embriogenesi e nella prevenzione della cardiomiopatia dilatativa (102). Inoltre la via di segnale attivata da HER2 sembra importante per la riparazione del danno sui miociti indotto dalle antracicline (103). Non vi è tuttora uno screening valido per la cardiomiopatia indotta da trastuzumab: sono necessarie terapie e sorveglianza individuale. Sebbene non ci sia un approccio univoco per monitorare l'insufficienza cardiaca, la maggior parte degli studi clinici randomizzati coinvolgenti pazienti con malattia metastatica hanno incluso uno studio di base della funzione ventricolare seguito da monitoraggio periodico ogni 8-16 settimane (104).

L'efficacia di Trastuzumab nel trattamento della malattia mammaria metastatica HER2+ e la sua ridotta tossicità hanno stimolato lo studio di tale anticorpo nel trattamento adiuvante. Quattro studi ampi, multicentrici, randomizzati e diversi studi più piccoli hanno recentemente dimostrato il beneficio dell'associazione di trastuzumab alla terapia adiuvante e neoadiuvante.

In due studi dell'America del Nord i pazienti hanno ricevuto terapia con doxorubicina e ciclofosfamide seguita da paclitaxel con o senza trastuzumab per un anno (105). Lo studio North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) Intergroup N-9831 (106) ha differito leggermente dallo studio National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-31 (105) per la schedula di somministrazione di paclitaxel. Inoltre nello studio N-9831 un terzo gruppo di pazienti ha ricevuto Trastuzumab solo dopo il termine del trattamento chemioterapico. In entrambi gli studi la maggior parte delle pazienti presentava linfonodi positivi alla diagnosi ma nello studio N-9831 le pazienti con linfonodi negativi, ad alto rischio di recidiva sono state considerate eleggibili. Il trattamento adiuvante con trastuzumab somministrato in associazione a paclitaxel per un anno confrontato con la sola chemioterapia ha comportato un significativo incremento nella sopravvivenza libera da malattia (85% vs 67%) e nella sopravvivenza globale (91% vs 87%)

I risultati dello studio Herceptin Adjuvant (HERA) sono sovrapponibili a quelli degli studi precedenti (107,108) . Più di 5000 donne affette da carcinoma mammario HER2+ dopo aver completato il trattamento chemioterapico adiuvante, sono state randomizzate alla

sola osservazione o a ricevere 1 o 2 anni di trastuzumab trisettimanale. I dati riportati sono quelli relativi ad un anno di terapia con trastuzumab: è stata osservata una riduzione del rischio di recidiva del 36% e una riduzione del rischio di morte del 34% dopo una mediana di 2 anni di follow-up. La durata ottimale del trattamento con herceptin non è conosciuta: un ulteriore studio randomizzato ha mostrato risultati simili con sole nove settimane di terapia con trastuzumab combinata con una chemioterapia senza antracicline (percentuale di sopravvivenza libera da malattia pari al 89% con chemioterapia e trastuzumab vs 78% con la sola chemioterapia; HR per la mortalità: 0.42; P=0.01) (109). Sulla base dei dati attuali il National Comprehensive Cancer Network suggerisce che il trattamento con trastuzumab dovrebbe iniziare dopo il termine del trattamento chemioterapico con antracicline (se usate) e somministrato sia in associazione ai taxani sia come singolo agente per un anno (110). Nello studio Breast Cancer International Research Group 006 (111) sono state randomizzate più di 3200 donne con carcinoma mammario HER2+ e assegnate a tre bracci di trattamento: un gruppo ha ricevuto doxorubicina e ciclofosfamide seguito dal solo docetaxel. Il secondo gruppo ha ricevuto doxorubicina e ciclofosfamide seguito dal docetaxel e trastuzumab e il terzo gruppo ha ricevuto trastuzumab in associazione a carboplatino e docetaxel. L'associazione di trastuzumab alla chemioterapia ha migliorato la sopravvivenza libera da malattia nel gruppo ricevente antracicline del 51% e ridotto il rischio di morte del 41%; nel gruppo trattato con carboplatino e docetaxel si è osservato un incremento della sopravvivenza libera da

malattia del 39% e un incremento della sopravvivenza totale pari al 34%.

Un importante limitazione della terapia con trastuzumab è l'incapacità dell'anticorpo a superare la barriera emato-encefalica: l'encefalo appare come un santuario farmacologico, con un'elevata percentuale di ripresa di malattia encefalica (106); si deduce pertanto, che per il trattamento delle localizzazioni cerebrali da tumore mammario HER2 positivo sono necessari nuovi approcci terapeutici.

I RECETTORI DEL FRAMMENTO COSTANTE DELLE IMMUNOGLOBULINE

Il recettore della componente Fc delle IgG fu identificato 35 anni fa, quando si osservò che gli anticorpi possono essere citofilici per i macrofagi funzionando da opsonine sulla superficie dei globuli rossi (RBCs) (112). Questa capacità legante delle IgG è indipendente dalla loro regione ipervariabile F (ab) e dipende unicamente dalla interazione con la componente Fc. Successivamente in vitro diversi studi hanno stabilito il ruolo di questi recettori nella mediazione della risposta immunitaria come la fagocitosi dei macrofagi, l'ADCC mediata da NK, l'attivazione dei neutrofili e la paradossale inibizione dell'attivazione delle linfociti B da parte dei complessi immunitari IgG (113,114). I recettori Fc delle IgG espressi sui leucociti vengono suddivisi in tre classi: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16); nell'uomo le ultime due classi sono ulteriormente suddivise in Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb. In base alla loro funzione invece, sono distinti in recettori attivatori, caratterizzati dalla presenza

di una sequenza ITAM (immunoreceptor-tyrosine-based activation motif) a livello citoplasmatico ad essi associata, e quelli inibitori, caratterizzati dalla presenza di una sequenza ITIM (immunoreceptor-tyrosine-based inhibitory motif)(115). E' importante considerare che la presenza di differenze strutturali determinate da diversi patterns di glicosilazione può comportare differenti proprietà di legame con IgG e quindi influenzare la funzione di Fc γ R. Per esempio l'affinità per Fc γ RIIIa per IgG monometriche è correlata ad un pattern specifico di glicosilazione: infatti la glicosilazione da parte di numerosi residui di mannosio e oligosaccaridi complessi risulta in una più alta affinità di legame del recettore con IgG monometriche sulle cellule NK rispetto ai monociti. In modo simile, Fc γ RIIIb esprime pattern di glicosilazione individuo-specifici comportando variazioni di affinità per IgG1 e IgG3 tra i vari individui (116). Queste due tipi di recettori cooperano e sono di solito co-espressi sulla superficie cellulare. Poiché tali molecole legano le IgG con affinità e specificità simile (117), si ha il coinvolgimento di entrambe le vie di segnale determinando così la regolazione della risposta immunitaria.

RECETTORI Fc γ ATTIVATORI

Queste molecole sono caratterizzate dalla presenza di una sequenza ITAM sia intrinseca al recettore, come nel caso di Fc γ RIIa (un recettore non riscontrato nei topi) o più comunemente come parte di una subunità associata, catena γ o ζ , come nel caso dei recettori Fc γ RI e Fc γ RIIIa, ritrovati sia nei topi che nell'uomo (115,117). Esiste inoltre nell'uomo un recettore presente sulla superficie dei neutrofili,

FcγRIIIb, privo di dominio transmembrana, che lega gli immunocomplessi IgG senza comportare attivazione cellulare. I recettori attivatori legano IgG monomeriche sia con relativamente alta affinità, $K_a = 10^{-9}$, come nel caso di FcγRI (grazie alla presenza di tre domini extracellulari) o con bassa affinità, $K_a = 10^{-6}$, come nel caso di FcγRIIa e FcγRIIIa che possono solo interagire efficacemente con i complessi immunitari multimerici (117). Il legame tra dominio extracellulare di FcR e il ligando comporta una fosforilazione su residuo di tirosina della sequenza ITAM da parte dei membri della famiglia delle chinasi src, con successivo reclutamento di SH2, contenente molecole di segnale che legano ITAM fosforilata. In base al tipo di cellula attivata da FcR, vengono coinvolte nelle vie di segnale intracellulare differenti proteine chinasi. Le vie di segnale conseguenti all'attivazione di FcR sono simili a quelle osservate per altri recettori contenenti sequenze ITAM come nel caso del recettore dei linfociti B (BCR) o del recettore dei linfociti T (TCR) (118). Eventi precoci includono l'attivazione di PIP₃ chinasi, la cui attività enzimatica comporta la formazione di PIP₃ e il reclutamento del dominio PH, contenente molecole come Tec chinasi e PLCγ, attraverso l'interazione del dominio PH con PIP₃ (119). Infine, l'attivazione di PLCγ comporta la generazione di IP₃, DAG e la mobilizzazione del calcio intracellulare. L'attivazione del recettore Fc determina a livello fenotipico degranulazione, fagocitosi, ADCC, trascrizione di gene codificanti per citochine e rilascio di mediatori dell'infiammazione. Questi recettori quindi svolgono un ruolo centrale nel mediare la risposta immunitaria (113,114). I recettori attivatori

sono espressi sulla superficie della maggior parte delle cellule effettrici del sistema immunitario soprattutto su monociti, macrofagi, eosinofili, neutrofili, mast cells e piastrine mentre sono assenti sui linfociti. Le cellule NK esprimono solo il recettore a bassa affinità Fc γ RIIIa. Generalmente i recettori attivatori e inibitori sono co-espressi sulle stesse cellule, in tal modo le IgG “ingaggiano” entrambi i recettori; l’intensità di espressione di questi due opposte vie di segnale determina la risposta cellulare. Non sorprende quindi che l’espressione di tali recettori sia modulata durante la differenziazione e lo sviluppo delle cellule effettrici (120)

RECETTORI Fc γ INIBITORI

Sia nei topi che nell’uomo esiste un solo gene per un Fc γ R, Fc γ RIIB, che codifica per una singola catena glicoproteica caratterizzata da un dominio extracellulare altamente omologo alla controparte attivatoria, pur contenendo la sequenza inibitoria ITIM ne dominio citoplasmatico. Fc γ RIIb lega IgG monomeriche con bassa affinità, $K_a = 10^{-6}$ (120) e interagisce anch’esso efficacemente con immunocomplessi multimerici; è inoltre espresso come unico recettore Fc sulla superficie dei linfociti B. Fc γ RIIb è presente anche sulla superficie cellulare di macrofagi, neutrofili, mast cells ma non sui linfociti T nè sulle cellule NK (117, 120). Fc γ RIIB possiede tre attività inibitori distinte, due delle quali dipendono dall’attivazione della sequenza ITIM e una da essa indipendente. La co-attivazione di Fc γ RIIB e di un recettore Fc contenente la sequenza ITAM conduce ad una fosforilazione su residuo di tirosina di ITIM da parte di lyn

chinasi, il reclutamento di SHIP e l'inibizione della mobilitazione del calcio e della proliferazione cellulare favorita invece dalla via di segnale correlata ad ITAM (121). I processi dipendenti dalla mobilitazione del calcio come la degranulazione, la fagocitosi, il rilascio di citochine, ADCC, l'attivazione di fattori proinfiammatori vengono quindi inibiti. La terza attività inibitoria di Fc γ RIIB invece dipende dalla omo-aggregazione del recettore: conseguentemente si determina un segnale proapoptotico attraverso una sequenza transmembrana. Questo segnale proapoptotico è bloccato dal reclutamento di SHIP che avviene in seguito al legame di Fc γ RIIB con BCR. Quest'ultima attività è stata osservata solo nei linfociti B e si ipotizza che rappresenti un meccanismo importante per mantenere la tolleranza periferica delle cellule B che sono sottoposte a ipermutazione somatica (122).

POLIMORFISMI DEI RECETTORI Fc γ

Nell'uomo tutte e tre le classi di Fc γ presentano polimorfismi geneticamente determinati: i polimorfismi maggiormente studiati sono quelli che coinvolgono i cambiamenti nei domini extracellulari, contenenti i siti di legame, che determinano l'affinità verso gli immunocomplessi. La frequenza di tali polimorfismi varia tra le diverse etnie.

Fc γ IIa presenta due diverse forme all'allele: HR (high responders) e LR (low responders); questa definizione dipende dalla capacità delle cellule T di proliferare in risposta agli anticorpi monoclonali (IgG1) anti-CD3 di origine murina in presenza di monociti HR o LR. Gli

alleli HR e LR sono co-dominanti. FcγIIa negli HR presenta un residuo di arginina (R) in posizione 131 e possiede una bassa affinità per tutte le sottoclassi di IgG, soprattutto per le IgG2; negli LR invece FcγIIa presenta in posizione 131 un residuo di istidina (H) e lega le IgG2 e IgG3 con alta affinità. La popolazione asiatica è caratterizzata da un'elevata frequenza di omozigoti H/H se paragonati con la quella caucasica (123).

Un polimorfismo in un singolo nucleotide nel gene FcγIIB comporta la sostituzione di una isoleucina con una treonina in posizione 232 nella regione transmembrana; FcγIIB-232 treonina ha una più efficace capacità inibitoria sulla trasmissione del segnale intracellulare nei linfociti B se paragonato FcγIIB-232 isoleucina (124).

FcγIIa presenta invece due forme alleliche che differiscono per un amminoacido in posizione 158: un residuo di valina (V) o di fenilalanina (F). La variante 158V è caratterizzata da una più alta affinità per le IgG1, IgG3 e IgG4 della variante 158F (123).

RECETTORI Fc E LORO RUOLO NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

Lo sviluppo delle malattie autoimmuni è complesso e dipende sia da molteplici geni sia da fattori ambientali. Topi con deficit delle catene di FcγR o alterazione nella funzione di FcγR attivanti sono resistenti all'induzione o allo sviluppo spontaneo di varie malattie autoimmuni e a reazioni di ipersensibilità (125). Questi risultati suggeriscono che un ampio range di malattie autoimmuni, come le vasculiti, glomerulonefriti e l'anemia emolitica possono essere

mediate da Fc γ R e non come precedentemente pensato da fattori del complemento, sebbene in diverse reazioni infiammatorie e di ipersensibilità è dimostrata una interazione tra fattori del complemento ed FcR (126). Al contrario, alterazioni specifiche di Fc γ RIIb nei topi comporta un'accentuazione delle risposte, come un elevato livello di Ig in risposta sia ad antigeni timo-dipendenti sia ad antigeni timo-indipendenti, o come una intensificazione di reazioni cutanee passive o anafilattiche così come ad un'accentuazione delle risposte immunitarie mediate da immunocomplessi, (127) indicando che Fc γ RIIb agisce come regolatore negativo della risposta umorale e dell'attivazione di immunocomplessi. In particolare, tale recettore potrebbe determinare la suscettibilità e la severità di alcune malattie autoimmuni come le collagenopatie.

La porpora trombotica idiopatica è una reazione autoimmune di ipersensibilità tipo II causata da autoanticorpi che inducono la distruzione delle piastrine. Infatti le piastrine che legano agli autoanticorpi IgG sono fagocitate dalle cellule del sistema reticolo-istocitario del fegato e della milza attraverso un meccanismo FcR-mediato. In giovani pazienti con porpora trombotica idiopatica è stata osservata una maggiore frequenza dell'omozigosi Fc γ RIIIB-NA1, dell'eterozigosi Fc γ RIIIA-V158/F158 e dell'omozigosi Fc γ RIIA-H131/H131 (128). La granulomatosi di Wegener è una vasculite autoimmune sistemica causata da autoanticorpi anti citoplasma dei neutrofili. Questa classe di autoanticorpi induce la formazione di granulomi infiammatori nelle vie respiratorie superiori e inferiori e nei reni. Il coinvolgimento di Fc γ R da parte degli autoanticorpi determina

il rilascio da parte dei monociti di IL-8, un fattore chemotattico per i neutrofili, e di ione superossido prodotto dai neutrofili. Pazienti con genotipo FcγRIIA-R131/R131 e FcγRIIIA-F158/F158 sono maggiormente a rischio di recidiva di malattia (129). La miastenia gravis è una malattia autoimmune associata alla produzione di anticorpi diretti contro i recettori dell'acetilcolina a livello della giunzione neuromuscolare, causando debolezza muscolare e distruzione delle sinapsi neuromuscolari. E' stata riportata l'associazione tra FcγRIIA-H131 e la suscettibilità alla miastenia gravis (130). Le patologie demielinizzanti come la sclerosi multipla sembrano essere associate all'allele FcγRIIA-R131 (che ha una ridotta affinità per IgG) ed FcγRIIIB-NA2 (che ha ridotta capacità di indurre la fagocitosi) (131). La clearance inefficace degli autoanticorpi IgG nella sclerosi multipla conduce ad una reazione infiammatoria perivascolare con successiva formazione di multiple placche di sclerosi nel parenchima cerebrale che causano danno mielinico ed assonale.

FCR E ARTRITI AUTOIMMUNI

Gli FcγR attivanti giocano un ruolo importante nell'indurre o esacerbare la risposta infiammatoria in presenza o assenza di componenti attivanti il complemento mentre FcγRIIb rappresenta uno degli elementi principali nella soppressione di cellule B autoreattive e nel mantenimento della tolleranza periferica. Uno squilibrio nella funzione dei recettori attivanti e inibitori comporta lo sviluppo di malattie autoimmuni. La delezione di FcγRIIb nei topi conduce ad un

significativo aumento nella produzione di autoanticorpi dovuta alla perdita del feed-back negativo sulla regolazione delle cellule B e ad un incremento della risposta immunitaria, ed è sufficiente per permettere lo sviluppo di malattie autoimmuni indotte o spontanee (132). L'artrite autoimmune nel topo, corrispettiva dell'artrite reumatoide nell'uomo, può essere indotta con l'immunizzazione del collagene tipo II. La suscettibilità è controllata da specifici geni che codificano per MHC di II classe, come A^q, che legano peptidi immunodominanti derivati dal collagene tipo II, i quali attivano i linfociti T specifici. Negli studi, i topi deficitari di Fc γ R risultavano protetti dall'artrite autoimmune rispetto alla controparte wilde-type sebbene entrambi i gruppi producessero livelli simili di IgG anti collagene tipo II, suggerendo il ruolo significativo delle cellule effettrici nell'esacerbazione dell'infiammazione (133). I risultati indicano chiaramente che lo sviluppo di artrite autoimmune dipende dalla presenza di FcR attivanti, come Fc γ RI e/o Fc γ RIII ed è negativamente regolato da Fc γ RIIb che ha attività inibitoria sia sulle cellule B che sulla risposta mediata dalle altre cellule effettrici. Un ruolo soppressivo simile di Fc γ RIIb può essere riscontrato in numerose altre malattie autoimmuni come la sindrome di Goodpasture, in cui si osservano lo sviluppo di glomerulonefrite e polmonite emorragica rapida e progressiva con esito spesso fatale, dovute in parte alla produzione di autoanticorpi anti-collagene tipo IV che comportano il deposito di immunocomplessi sulla membrana basale degli alveoli polmonari e dei glomeruli renali (134). L'immunizzazione di topi deficitari di Fc γ RIIb con collagene di tipo

IV comporta emorragia polmonare e glomerulonefrite, condizione che non si osserva invece nella controparte wilde-type e nei topi con normale produzione di Fc γ RIIb, suggerendo che il recettore e la via di segnale da esso attivata giocano un ruolo fondamentale nell'eziologia delle malattie autoimmuni. Nei pazienti affetti da artrite reumatoide l'espressione di Fc γ RII e Fc γ RIII risulta aumentata nei monociti circolanti o nelle culture di macrofagi ottenute da pazienti affetti e i livelli di Fc γ RIII sono più elevati nei pazienti con malattia attiva (135). E' possibile che l'espressione alterata di Fc γ R sui monociti e sui macrofagi sia coinvolta nella patogenesi dell'artrite reumatoide.

FCR NELLE NEFRITI AUTOIMMUNI E NEL LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMICO

L'alterata espressione di Fc γ R risulta in un disequilibrio tra formazione e deposito di immunocomplessi e nello spontaneo sviluppo di nefrite lupica nei topi (136). Topi deficitari di Fc γ R generano e depositano immunocomplessi ma non sviluppano una severa nefrite, indicando che l'attivazione delle cellule effettrici attraverso Fc γ R è importante per lo sviluppo della malattia. Inoltre Fc γ Rs giocano un ruolo pilota nello sviluppo della glomerulonefrite indotta da anticorpi anti membrana basale glomerulare (137). Il lupus eritematosus sistemico (LES) è caratterizzato da autoanticorpi anti-nucleo e da lesioni infiammatorie in più organi. Recenti studi hanno suggerito che le alterazioni correlate all'apoptosi e/o alla clearance delle cellule apoptotiche giocano un ruolo importante nell'induzione e nel mantenimento della produzione di autoanticorpi (138). Topi con

deficit di Fc γ RIIb sviluppano anticorpi e glomerulonefriti autoimmuni (139).

Un recente studio ha dimostrato l'associazione tra il noto polimorfismo nel gene Fc γ RIIB, che comporta la sostituzione di una isoleucina con una treonina in posizione 232 nella regione transmembrana e lo sviluppo di LES nella popolazione giapponese: in particolare è stata riscontrata una significativa associazione del genotipo 232 T/T e lo sviluppo di LES, mentre la positività per l'allele 232I era ridotta nei pazienti arruolati nello studio. Anche il polimorfismo nel gene Fc γ RIIIA V/F è risultato significativamente associato allo sviluppo di tale patologia autoimmune (140). Gli anticorpi anti-DNA appartengono principalmente alle sottoclassi IgG1 e IgG3 suggerendo un'importante funzione dell'allele Fc γ RIIIA -158F, che ha una bassa affinità verso IgG1 e IgG3, nella clearance di immunocomplessi contenenti anticorpi anti-DNA.

In base a studi in vivo e in vitro che hanno chiaramente dimostrato un ruolo di Fc γ RIIB1 come regolatore negativo delle cellule B (141) è stato ipotizzato che il polimorfismo Fc γ RIIB-232 I/T possa essere correlato ad una ridotta funzione di Fc γ RIIB1, permettendo così la produzione degli autoanticorpi caratteristici del LES (140); una possibilità è che il polimorfismo Fc γ RIIB-232 I/T possa alterare il segnale pro-apoptotico, permettendo la sopravvivenza di linfociti B che producono autoanticorpi e conducendo quindi all'espressione della malattia autoimmune. Una ipotesi alternativa riguarda la funzione dell'allele Fc γ RIIB-232T, che potrebbe ridurre l'attività

degli immunorecettori attivanti nei monociti. Uno studio recente ha mostrato che durante l'infusione endovenosa di immunoglobuline G, un incremento dell'espressione sulla superficie cellulare di Fc γ RIIb è responsabile dell'inibizione della fagocitosi indotta da Fc γ R attivanti (142). Il polimorfismo Fc γ RIIB-232 I/T, inoltre, potrebbe alterare l'equilibrio tra Fc γ R attivanti e inibitori e condurre allo sviluppo di malattie autoimmuni sia attraverso un indebolimento della risposta immunitaria sia attraverso una riduzione dell'attività di fagocitosi. In conclusione si può ipotizzare che sia Fc γ RIIB sia Fc γ RIIA contribuiscano ad una suscettibilità genetica per lo sviluppo di LES nella popolazione giapponese. L'associazione del genotipo Fc γ RIIB 232 T/T sembra essere più forte di Fc γ RIIA-158F.

RECETTORI Fc E TERAPIA CON ANTICORPI MONOCLONALI

Gli anticorpi monoclonali sono stati negli ultimi anni al centro dell'attenzione come potenziali farmaci antitumorali. L'uso iniziale di anticorpi murini per il trattamento nell'uomo è stato comunque complicato a causa della loro forte immunogenicità e del loro inefficace reclutamento di effettori umani attivanti vie di segnale intracellulare. Grazie alla produzione di anticorpi umanizzati molti di questi ostacoli sono stati superati (143). Inoltre gli anticorpi sono stati successivamente associati a ioni radioattivi o coniugati con tossine dirette a specifici target sul tessuto tumorale (144).

Tra gli antigeni target riconosciuti da anticorpi monoclonali vi sono i fattori di crescita come la famiglia del fattore di crescita dell'endotelio

vascolare, vi sono antigeni leucocitari come CD20 o CD22 e molecole che modulano l'immunità cellulare come CD40 o CTLA-4 (145). Combinando questi anticorpi con il trattamento chemioterapico o con altri anticorpi tumore-specifici si può migliorare la risposta clinica migliorando la risposta immunitaria. Inoltre si è ipotizzato che gli anticorpi in grado di bloccare i fattori di crescita, indispensabili alla cellula per il processo di proliferazione e la crescita cellulare potessero essere validi strumenti per ridurre lo sviluppo del tumore (145). Si è dimostrato che anticorpi che riconoscono come target la famiglia dei recettori del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), come cetuximab e panitumumab, sono in grado di bloccare il legame con EGF o la dimerizzazione del recettore, condizioni indispensabili per la trasduzione del segnale intracellulare (146). E' chiaro che la sola modulazione dei segnali intracellulari regolatori della proliferazione e della sopravvivenza cellulare non è sufficiente per eliminare le cellule tumorali ed è quindi di grande importanza il reclutamento di effettori immunitari cellulari secondari per rendere efficace l'azione degli anticorpi monoclonali. Tra questi meccanismi la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC) è uno dei fattori principali. Durante una reazione di ADCC gli anticorpi legano le cellule tumorali reclutando le cellule effettrici dell'immunità cellulare che esprimono sulla loro superficie i recettori per la componente Fc, regione costante degli anticorpi, comportando l'attivazione della fagocitosi, il rilascio di sostanze citotossiche e di mediatori dell'infiammazione (147).

Studi su topi deficitari di Fc γ R hanno mostrato il coinvolgimento dei differenti Fc γ R nei meccanismi di azione in vivo dei due anticorpi monoclonali più frequentemente utilizzati, Rituximab e Trastuzumab. Questi anticorpi citotossici diretti contro il tumore coinvolgono sia i recettori attivanti (Fc γ RIIIa e Fc γ RIIa) il recettore inibitore (Fc γ RIIb) espressi sulle cellule mieloidi. In questi studi si è osservata una regressione del tumore più pronunciata nei topi con deficit del recettore inibitore rispetto alla controparte wilde-type, mentre i topi con deficit di Fc γ RIII erano incapaci di bloccare la crescita tumorale in presenza di anticorpi monoclonali (148). Infine è stato dimostrato che la deplezione dei linfociti B mediata da anticorpi anti CD20 è dipendente da Fc γ RI ed Fc γ RIII (149). Uno studio recente nell'uomo ha mostrato che il polimorfismo di Fc γ RIIIa è associato ad efficacia terapeutica di Rituximab (IgG umana chimerica) in pazienti affetti da Linfoma Non Hodgkin. Infatti nei pazienti omozigoti per l'allele Val 158 (che lega con elevata affinità IgG1) si è osservata una maggiore risposta clinica rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele 158F (con debole capacità di legame a IgG1) (150). In accordo con tali risultati, una migliore risposta clinica ed un maggiore tempo alla progressione sono stati ulteriormente dimostrati in pazienti affetti da linfoma follicolare trattati con Rituximab, quando questi erano omozigoti per gli alleli Fc γ RIIIa-V158 e Fc γ RIIa-H131: infatti la migliore affinità di legame con IgG1 dei suddetti alleli si traduce in una migliore attivazione delle cellule effettrici e in una più efficace ADCC (151).

Ulteriormente, si è dimostrato come Fc γ RIIIa 158V/V sia predittivo di risposta al trattamento secondo schema CHOP+ Rituximab nei pazienti affetti da Linfoma B diffuso a grandi cellule, sebbene non sia stata però trovata correlazione con la sopravvivenza (152). Altri anticorpi monoclonali sono stati studiati in associazione ai polimorfismi. Per esempio è stata osservata un'associazione tra Fc γ RIIIa 158 V/V e la riduzione del valore della proteina C-reattiva dopo infliximab (IgG1 anti TNF- α) nella malattia di Crohn (153). Si è ulteriormente osservata una correlazione tra Fc γ RIIa e beneficio correlato a terapia con IgG3 anti-GC2 murino e fattore stimolante le colonie di macrofagi e granulociti nei pazienti affetti da neuroblastoma (154). I pazienti affetti da carcinoma del colon-retto metastatico, portatori dell'allele Fc γ RIIIa 158 V mostrano una migliore risposta clinica e una differenza significativa nella progressione libera da malattia quando trattati con Cetuximab (IgG1 chimerica anti EGFR) se confrontato con i portatori dell'allele Fc γ RIIIa 158 F/F (155).

Considerata l'importanza di Fc γ RIIb come regolatore negativo della maturazione delle cellule dendritiche e dell'attività degli anticorpi citotossici, dovrebbe essere studiata in vivo una strategia per ottenere una risposta immunitaria più efficace, per produrre anticorpi che possiedono una maggiore attività citotossica e per "raggirare" l'attività di Fc γ RIIb. Risultano, da diversi recenti studi, evidenze che questo potrebbe essere possibile. Si è osservato infatti che la delezione del gene per il recettore inibitore in vivo ed in vitro nelle cellule

dendritiche si ottiene un'intensificazione della risposta immunitaria (156). Diversi gruppi inoltre hanno cercato di ottenere varianti di anticorpi monoclonali che possiedono una affinità specifica per il recettore attivante FcγRIIIa. Per generare questi anticorpi sono state utilizzate due strategie. Nella prima sono state selezionate mutazioni che comportano la variazione di una selezionata sequenza amminoacidica: in questo modo sono stati selezionati anticorpi con maggiore affinità verso FcγRIIIa e con minore affinità verso FcγRIIb, che hanno dimostrato maggiore efficacia sulle cellule tumorali sia in vitro che su modello animale (157). Con la seconda strategia invece sono state identificate varianti anticorpali con differenti processi di glicosilazione. La rimozione di un residuo di fucosio nella catena oligosaccaridica legata in posizione Asn-297 risulta in un incremento dell'attività citotossica nel topo e di tutti gli isotipi di IgG umane (158). La delezione della catena oligosaccaridica annulla l'incremento di affinità comportato dalla perdita del residuo di fucosio. Inoltre la perdita del residuo di acido sialico nella catena suddetta comporta una maggiore attività citotossica degli anticorpi sia nel modello animale sia nell'uomo (159). E' importante sottolineare però che la perdita del residuo di fucosio migliora l'affinità degli anticorpi verso FcγRIIIa ma non verso FcγRIIa che gioca comunque un ruolo importante nell'attivazione delle cellule effettrici. L'ottimizzazione quindi dell'immunoterapia attiva e passiva combinate con un meno tossico trattamento chemioterapico e, se possibile, la rimozione chirurgica del tumore rappresentano i nuovi obiettivi per il futuro trattamento del cancro.

OBIETTIVI DI STUDIO

L'obiettivo del nostro studio è quello di dimostrare l'esistenza di una correlazione tra polimorfismi del recettore Fcγ (RIIa, RIIIa, RIIb) e

l'efficacia clinica di trastuzumab in pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico HER2/neu positivi. Abbiamo inoltre ricercato attraverso il test di ADCC in vitro la presenza di una correlazione tra i polimorfismi del recettore FcγR e l'efficacia del meccanismo di ADCC.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE DEI PAZIENTI

Questo studio ha coinvolto 54 pazienti con carcinoma mammario metastatico, trattati con trastuzumab e taxani (docetaxel e paclitaxel)

nelle Unità di Oncologia Medica di Parma e Reggio Emilia tra maggio 2001 e ottobre 2006. Tali pazienti sono stati selezionati in base alla disponibilità del pezzo tumorale, di campioni di sangue periferico e alla conoscenza della loro risposta clinica alla terapia con trastuzumab. E' stata rivalutata la iperespressione di HER-2 in tutti i pazienti, mediante la tecnica di ibridizzazione in situ con immunofluorescenza (FISH). Come controlli, abbiamo valutato 34 pazienti affetti da carcinoma mammario metastatico, non selezionati in base ad amplificazione di c-erbB2/neu, trattati con taxani ma non con trastuzumab. La risposta clinica è stata valutata dopo 2 o 3 mesi dall'inizio del trattamento e poi ogni 2 mesi con gli stessi esami strumentali utilizzati per determinare l'estensione iniziale della malattia. Per la valutazione della risposta sono stati usati i criteri RECIST (160). I polimorfismi del recettore FcγR sono stati analizzati in tutti gli 88 pazienti (54 pazienti dello studio e 34 i controlli). Inoltre, le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) dei pazienti trattati con trastuzumab sono state utilizzate per il test di ADCC in vitro. Questo studio è stato condotto in accordo con un protocollo approvato dal comitato etico ed è stato richiesto un consenso firmato a tutti i pazienti per l'uso dei campioni di tessuto e per l'analisi delle informazioni cliniche.

TEST DI ADCC

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state isolate attraverso la centrifugazione di sangue eparinizzato secondo gradiente di Ficoll. Al fine di valutare la frequenza delle cellule NK, le cellule

mononucleate sono state marcate attraverso specifici anticorpi: CD3_FITC (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), CD16-PE (PharMingen BD Biosciences, Necton Dickinson, San Jose, CA), e CD8-PerCP (Necton Dickinson, San Jose, CA) e CD56-APC (Pharmigen BD Biosciences).

L'ADCC è stata valutata in base all'entità di rilascio del cromo-51 (^{51}Cr) in un periodo di 4 ore usando come target una linea di cellule di carcinoma mammario HER2/neu positive (MDA-MB-361) e come effettori le cellule mononucleate ottenute dal sangue periferico dei pazienti. Le cellule tumorali venivano incubate con 100 μCi di ^{51}Cr (GE healthcare, UK) per un'ora alla temperatura di 37 °C, con una percentuale di CO_2 del 5%. Le cellule venivano lavate con la soluzione di Hank e quindi incubate per 30 minuti a 37°C, con il 5% di CO_2 , con 1 $\mu\text{g/mL}$ di trastuzumab o di rituximab (anticorpo monoclonale di controllo), oppure nel mezzo da sole. L'eccesso di anticorpo veniva rimosso attraverso il lavaggio con soluzione di Hank. 5000 cellule MDA-MB-361 marcate con ^{51}Cr e le cellule effettrici venivano coincubate con rapporti di concentrazione (Effector:Target ratio[E:T]) differenti (12.5:1; 25:1; 50:1; 100:1) in 200 μL di RPMI-1640 più siero bovino fetale al 10% sul fondo di 96 piastre per 4 ore a 37°C con CO_2 al 5%. Venivano quindi raccolti 25 μL di supernatante da ogni piastra, seminati in piatti per scintillazione e contati con il contatore TopCount NXT gamma (Packard-PerkinElmer, Boston, MA, USA). Il rilascio spontaneo di ^{51}Cr veniva determinato con o senza anticorpo monoclinale attraverso ripetuti cicli di congelamento-scongelo delle cellule target. La percentuale di citolisi era

calcolata sulla base della seguente formula: citotossicità (%): [(conta di rilascio ottenuta per minuto (cpm) – rilascio spontaneo cpm) / (massimo rilascio cpm- spontaneo rilascio cpm)] x 100. L'ADCC veniva calcolata secondo la seguente formula: ADCC (%)= citotossicità (%) – citotossicità cellulare antigene-indipendente (AICC; %), dove AICC rappresenta la citotossicità non specifica in assenza di anticorpo. Per comparare i differenti campioni, l'ADCC era normalizzata dividendo le specifiche lisi dalla frequenza delle cellule CD16 positive calcolata sul totale delle cellule mononucleate del sangue periferico.

ANALISI DEI POLIMORFISMI DI FcγRIIIA, FcγRIIA E FcγRIIB

La genotipizzazione del locus di FcγR è complessa in considerazione dell'alto livello di omologia strutturale tra i recettori di classe II (FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc) e i recettori di classe III (FcγRIIIa, FcγRIIIb) (161).

Campioni di RNA e DNA. Tutto l'RNA veniva purificato dalle cellule mononucleate del sangue periferico con il metodo di Chomczynski e Sacchi (162) usando il reagente TRI (Sigma) e trascrivendo il relativo cDNA attraverso un apposito kit [Gene AMP RNA PCR Control Kit (Applied)]. Il DNA genomico era quindi purificato usando il kit di estrazione del DNA (QIAmp DNA blood Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA).

Tipizzazione genica di FcγRIIa utilizzando il DNA genomico. Sono stati scelti i primers di oligonucleotidi in grado di amplificare in modo

selettivo il gene FcγRIIa e non i geni altamente omologhi dei recettori FcγRIIb e FcγRIIc (**163**). È stato utilizzato un primer di senso localizzato nel secondo dominio extracellulare (IIaS). Il primer antisenso (IIaAS) era localizzato nell'introne immediatamente successivo al secondo dominio extracellulare dove le sequenze per FcγRIIa, FcγRIIb e FcγRIIc divergono. Il prodotto risultante dalla PCR (277 bp) è stato purificato e genotipizzato attraverso un sequenziamento diretto in entrambi i sensi. I primers erano i seguenti: IIaS 5' CTG GTC AAG GTC ACA TTC TTC 3'; IiaAS 5' CAA TTT TGC TGC TAT GGG C 3'.

Tipizzazione genica di FcγRIIb 232 I/T utilizzando cDNA. Il cDNA di FcγRIIb è stato amplificato attraverso PCR (**164**) usando 2 set di primer: il primo primer (IIbS: 5'GAG AAG GCT GTG ACT GCT GT 3' e IIbAS: 5'CGG GTG CAT GAG AAG TGA AT 3') determinava l'amplificazione di un frammento di cDNA di 944 bp. Questo frammento amplificato veniva quindi usato come base per la seconda PCR, che utilizzava il secondo primer (IIb2S: 5'TCC AAG CTC CCA GCT CTT CA 3' e IIb2AS: 5'TGG TTT CTC AGG GAG GGT CT 3') determinando l'amplificazione di un frammento di 176 bp. Questo ultimo frammento è stato analizzato per definire il genotipo del recettore FcγRIIb 232 I/T con un sequenziamento diretto in entrambi i sensi (3'→5'; 5'→3').

Tipizzazione genica di FcγRIIIa utilizzando il DNA genomico. Per sequenziare FcγRIIIa è stato utilizzato un approccio basato su PCR (**165**). Un frammento di DNA di 1.7-kb, contenente il sito

polimorfico, è stato amplificato dalla prima PCR usando i due seguenti primers: IIIaS: 5' ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG 3'; IIIaAS1: 5'GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA 3'. Una seconda PCR è stata ottenuta con 1 µL del frammento amplificato usando lo stesso primer di senso ed un secondo primer antisenso IIIaAS2: 5' TAG CTA CCC CAA AAG AAT GG 3'. Il prodotto di PCR ottenuto di 368 bp è stato sequenziato direttamente in entrambi i sensi.

Il sequenziamento dei prodotti di PCR ottenuti è stato effettuato mediante un Sequenziatore Beckman Coulter CEQ™ 2000XL. I dati molecolari sono stati interpretati in maniera indipendente da due biologi ignari dell'evoluzione clinica dei pazienti.

ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche cliniche e la risposta al trattamento dei pazienti sono stati confrontati in base ai genotipi dei polimorfismi, utilizzando il test esatto di Fisher (166). Un'analisi logistica di regressione che includeva l'età (<60 vs >60), lo stato menopausale, il grado tumorale (G1-2 vs G3), la frazione di crescita Ki 67 (<15% vs >15%), lo stato dei recettori ormonali (HR), il performance status (ECOG 0-1 vs ≥ 2) e il genotipo dei recettori FcγRIIIa, FcγRIIa e FcγRIIb è stata utilizzata per identificare variabili prognostiche indipendenti in grado di influenzare la risposta clinica. Odds Ratio e l'intervallo di confidenza al (95% CI) sono stati calcolati con l'analisi di regressione logistica. La sopravvivenza è stata calcolata usando il metodo di Kaplan-Meier (167). La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è stata misurata dalla data di inizio del trattamento alla data della

diagnosi di progressione di malattia o di morte per carcinoma mammario. Le differenze nella sopravvivenza libera da malattia in relazione ai polimorfismi del recettore Fc γ R sono state valutate in base al log rank test (**168**). Sono state usate le stesse variabili utilizzate per la regressione logistica per l'analisi multivariata necessaria per definire i fattori prognostici indipendenti per PFS; per l'esecuzione dell'analisi multivariata si è utilizzato il modello di Cox (**169**). Sono stati inoltre valutati hazard ratio (HR) e 95% CI.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti trattati con trastuzumab e dei pazienti trattati solo con taxani sono illustrate nella Tabella 1. Le caratteristiche dei pazienti e dei tumori sono adeguatamente bilanciate tra i due gruppi, ad eccezione dello stato di HER2/neu, che è positivo in tutti i casi dello studio ma solo in 4 dei

controlli (12%): questa discrepanza è dovuta all'utilizzo nella pratica clinica di trastuzumab, che ha portato ad una ridotta percentuale di casi HER-2 positivi nel gruppo di controllo. 35 pazienti (65%) hanno ricevuto trastuzumab come prima linea di terapia. Tra i 19 pazienti che trattati con chemioterapia prima di trastuzumab, 9 hanno ricevuto il trattamento chemioterapico almeno trenta giorni prima della prima somministrazione dell'anticorpo. 40 pazienti (74%) sono stati trattati con trastuzumab combinato con paclitaxel e 14 pazienti (26%) con trastuzumab associato a docetaxel. Le schedule di chemioterapia somministrate sono descritte nella Tabella 2. Per tutti i pazienti trastuzumab è stata somministrata una dose iniziale di 4mg/kg e.v. seguita da una dose di 2 mg/kg con frequenza settimanale fino a progressione di malattia.

FREQUENZE GENOTIPICHE DEI POLIMORFISMI

Le frequenze genotipiche dei recettori Fc γ non differiscono significativamente tra i casi e i controllo (Tabella 3). Tali frequenze inoltre, non differiscono significativamente da quello che ci si sarebbe aspettato se ogni gruppo fosse in equilibrio di Hardy-Weinberg, ad eccezione del polimorfismo Fc γ RIIb nei pazienti trattati con trastuzumab (Tabella 3). In base alle analisi di linkage disequilibrium nel locus-2 tra i polimorfismi dei tre Fc γ R, non è stato osservato un

linkage tra FcγRIIa e FcγRIIIa, FcγRIIa e FcγRIIb, tra FcγRIIIa e FcγRIIb (Tabella 3).

RISPOSTA CLINICA A TRASTUZUMAB E POLIMORFISMI DEI RECETTORI Fcγ

Le caratteristiche dei pazienti in relazione ai polimorfismi dei recettori Fcγ sono illustrate nella Tabella 4. Non ci sono differenze significative per i polimorfismi di FcγRIIIa V/V, V/F, F/F. In modo analogo, non vi erano differenze significative tra i diversi polimorfismi di FcγRIIa e FcγRIIb.

La percentuale di risposta totale alla terapia con trastuzumab è stata del 48% (6 le risposte complete [RC], 20 le risposte parziali [RP]) (Tabella 1). La percentuale di risposta obiettiva (ORR) in relazione ai polimorfismi FcγR è presentata nella Tabella 5. La percentuale di risposta nei pazienti con FcγRIIIa 158 V/F è simile a quella riscontrata nei pazienti 158 F/F. Conseguentemente per l'analisi statistica, i pazienti 158 V/F e 158 F/F sono stati riuniti sotto il nome di gruppo "F carrier". Una differenza significativa di risposta obiettiva è stata riscontrata tra i pazienti 158 V/V e il gruppo F carrier (82% [CR+PR] vs 40%; $P=0.03$). Sebbene non sia risultato statisticamente significativo, i pazienti con FcγRIIa 131 H/H hanno mostrato una percentuale di risposta più alta rispetto agli altri due gruppi combinati (70% per H/H vs 40% per H/R e R/R [R carrier]; $P = 0.17$). Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nella risposta clinica al trattamento con trastuzumab in relazione al polimorfismo FcγRIIb 232 I/T (Tabella 5).

Come dimostrato dai dati precedentemente riportati sui pazienti affetti da linfoma trattati con rituximab (151), la possibilità di un'associazione dei genotipi FcγRIIIa e FcγRIIa nel predire la risposta clinica al trattamento con trastuzumab è stata esaminata analizzando la combinazione di 158 V/V e/o 131 H/H in relazione alla risposta al trattamento (Tabella 5). Pazienti con i polimorfismi 158 V/V e/o 131 H/H (17 pazienti in totale) hanno ottenuto una percentuale di risposta al trattamento significativamente più alta rispetto alle altre combinazioni genotipiche (71% vs 38%; $P = 0.04$)

Dall'analisi di regressione logistica, la combinazione dei due genotipi favorevoli di FcγRIIIa e FcγRIIa (158 V/V e/o 131 H/H) rappresenta il solo fattore prognostico indipendente per la risposta al trattamento (OR 8.7; 95% CI, 1.4-53.8; $P = 0.02$)

SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE IN RELAZIONE AI POLIMORFISMI FcγR

Con un follow-up mediano di 25.1 mesi (range 7.4-72.5), si è osservata progressione di malattia in 32 pazienti trattati con trastuzumab (59%) e la mortalità è stata del 24% (13/54). La mediana di PFS è stata di 16.8 mesi (mo). La PFS stimata dei pazienti con FcγRIIIa 158 V/V si è dimostrata significativamente più lunga di quella osservata nei pazienti con 158 V/F, 158 F/F, o "F carriers" (Figura 1A). La mediana di PFS non è stata raggiunta per i pazienti 158 V/V; per ogni altro gruppo è stata invece rispettivamente di 15, 11.1 e 12.9 mesi.

La mediana di PFS è stata di 29.5 mesi per i pazienti con FcγRIIa 131 H/H, 16.8 per H/R, 10.0 per R/R, e 13.4 for R carriers. Non si riscontra una differenza statisticamente significativa in PFS per i pazienti 131 H/H se confrontati con i pazienti portatori degli altri genotipi, eccetto per 131 R/R ($P = 0.04$) (Figura 1B). Nella nostra popolazione di pazienti trattati con trastuzumab, non è stata ottenuta una correlazione tra il polimorfismo FcγRIIb 232 I/T e la PFS. La mediana di PFS per i pazienti 232 I/I, I/T, e T/T è stata rispettivamente di 15, 22, e 9 mesi (log rank, $P = 0.98$).

Calcolando la PFS in relazione alla combinazione dei due genotipi FcγRIIIa e FcγRIIa, si osserva che la PFS stimata per i pazienti con 158 V/V e/o 131 H/H è significativamente più lunga rispetto ai pazienti con gli altri genotipi ($P = 0.01$), con una mediana di 30.3 mesi e 12.8 mesi, rispettivamente (Figura 2). Come già osservato nell'analisi di regressione logistica per la risposta clinica, l'analisi multivariata di Cox dimostra che la combinazione 158 V/V e/o 131 H/H rappresenta il solo fattore prognostico indipendente per la PFS (HR 5.3; 95% CI, 1.6-16.9; $P = 0.005$).

ADCC MEDIATA DA TRASTUZUMAB E POLIMORFISMI FcγR

Le cellule mononucleate del sangue periferico di tutti i 54 casi dello studio sono state utilizzate per il test di ADCC in vitro. La citotossicità è stata misurata incubando cellule effettrici, cellule target con trastuzumab, rituximab (anticorpo monoclonale IgG1 di controllo), o nel mezzo da sole. Come ci si aspettava, l'anticorpo monoclonale rituximab non è stato in grado di mediare il meccanismo

di ADCC nelle cellule di carcinoma mammario cerB2 positive. Il valore medio di ADCC mediata da trastuzumab (E:T=25:1) è stata di 32.6%+/- 17.8 deviazioni standard, mentre il valore medio di AICC (E:T=25:1) è stato di 1.5% +/- 1.8. Valutando l'ADCC in relazione ai polimorfismi FcγR, il genotipo FcγRIIIa 158 V/V si è dimostrato essere associato ad un meccanismo di ADCC più efficace rispetto ai genotipi 158 V/F e F/F ($P = 0.04$) (Figura 3A).

Anche il genotipo 131 H/H correla con una migliore ADCC rispetto ai genotipi H/R e R/R, sebbene non si sia osservata una differenza statisticamente significativa (Figura 3B). In modo analogo a quanto osservato per la risposta clinica e PFS, l'analisi di ADCC evidenzia che la combinazione 158 V/V e/o 131 H/H risulta in una citotossicità mediata da trastuzumab significativamente più efficace rispetto agli altri genotipi ($P = 0.04$) (Figura 3C). È interessante notare che l'ADCC mediata dalle cellule mononucleate del sangue periferico in vitro correla con la risposta a trastuzumab in vivo ($P = 0.02$) (Figura 3D).

POLIMORFISMI FcγR E RISPOSTA AL TRATTAMENTO NELLA POPOLAZIONE DEI CONTROLLI

Nei 34 pazienti trattati con i soli taxani non si è osservata alcuna correlazione tra polimorfismi FcγR e la risposta clinica né tra gli stessi polimorfismi e la PFS (Tabella 6). Questi dati dimostrano che i polimorfismi FcγR non predicono l'efficacia clinica dei taxani ma specificatamente quella a trastuzumab.

DISCUSSIONE

Questo studio ha dimostrato che il polimorfismo FcγRIIIa 158 V/V è predittivo di risposta clinica al trattamento con trastuzumab in pazienti con carcinoma mammario metastatico HER-2 positivo. Il genotipo FcγRIIIa 158 V/V da solo o in combinazione con il genotipo FcγRIIa 131 H/H (FcγRIIIa 158 V/V e/o 131 H/H) è significativamente associato ad una migliore percentuale di risposta e PFS al trattamento con trastuzumab rispetto agli altri genotipi. Non è stato riscontrato alcun impatto clinico dei polimorfismi FcγR nei pazienti che hanno ricevuto la sola chemioterapia.

Studi precedenti hanno riportato l'influenza del genotipo FcγRIIIa 158 V/V sull'affinità delle IgG1 umane al recettore per la componente

Fc γ (165) mentre non è dimostrata relazione tra il genotipo 158 V/V e il numero dei linfomonociti circolanti o la densità di Fc γ R sulla superficie cellulare (170,171). E' stato osservato come la differenza tra Fc γ RIIIa ad elevata affinità di legame (158 V/V) e quelli a bassa affinità di legame (158 F/F) comporta dirette conseguenze cliniche. Uno studio su 200 pazienti affetti da Lupus Eritematosus Sistemico ha evidenziato una forte associazione con il fenotipo a bassa affinità di legame e la malattia, in particolare con il rischio di sviluppare nefrite lupica (172). Per quanto riguarda Fc γ R e gli anticorpi monoclonali, si è dimostrato che le cellule effettrici che esprimono l'allele Fc γ RIIIa 158 V mediano il meccanismo di ADCC più efficacemente rispetto alle cellule portatrici dell'altro allele (158 F) (173). Esperimenti in vitro dimostrano che le cellule mononucleate sono i principali effettori del meccanismo di ADCC indotto da trastuzumab (174); inoltre due studi, che valutavano la risposta immunitaria a trastuzumab neoadiuvante (con o senza chemioterapia) in pazienti affette da carcinoma mammario HER-2 positivo, hanno dimostrato che il trattamento con trastuzumab è associato ad un incremento significativo dei linfomonociti peritumorali rispetto ai controlli (73,175). E' interessante notare che in questi studi, non veniva riscontrata una riduzione dell'espressione cellulare di HER-2 (73) suggerendo una scarsa capacità da parte di trastuzumab nell'indurre l'internalizzazione del recettore in vivo. Diversi studi hanno considerato la possibilità di un'associazione tra efficacia clinica del trattamento con anticorpi monoclonali ed i polimorfismi Fc γ R. Tra questi uno studio retrospettivo di Foster et al, in contrasto con le

nostre osservazioni, non ha dimostrato una correlazione tra il polimorfismo tra Fc γ RIIIa e la risposta obiettiva a trastuzumab nel tumore mammario metastatico (176). Alcune differenze con il nostro studio potrebbero comunque spiegare i diversi risultati ottenuti: innanzitutto, Foster et al hanno valutato il ruolo dei polimorfismi di Fc γ RIIIa in una sottopopolazione di 63 pazienti arruolati nello studio H0649g, dove i pazienti ricevevano trastuzumab come singolo agente dopo una o due linee di chemioterapia per la malattia metastatica (incluse antracicline e taxani). Nel nostro studio invece il 65% dei pazienti ha ricevuto trastuzumab come prima linea di trattamento e sempre in associazione ai taxani; è importante considerare che non può essere esclusa la presenza di un sinergismo tra terapia con anticorpo monoclonale e chemioterapia nella presentazione degli antigeni tumorali, nella chemiotassi delle cellule del sistema immunitario e in altri meccanismi immunitari che comportano un potenziamento del meccanismo di ADCC. Secondo, nello studio H0649g lo stato di HER-2 era definito con la tecnica di immunohistochimica (IHC) e non con la tecnica di ibridizzazione in situ con immunofluorescenza (FISH) come nel nostro studio. In una successiva analisi retrospettiva con tecnica FISH sulla popolazione di pazienti dello studio H0649g (177), l'esame FISH mostrava un'amplificazione di HER-2/neu nel 92% dei tumori con IHC 3+ ma solo del 39% nei tumori IHC 2+. Per tutti i pazienti dello studio suddetto la percentuale di risposta era del 15% ma per quei pazienti i cui tumori erano FISH negativi la percentuale di risposta era pari allo 0% mentre per quelli FISH positivi la risposta risultava essere del

19%. Il differente stato FISH tra i responders e i non responders nello studio di Foster potrebbe aver determinato un bias nell'analisi dell'efficacia clinica della terapia con trastuzumab in relazione ai polimorfismi FcγR. Terzo, la popolazione di Foster non rispettava l'equilibrio di Hardy-Weinberg per i genotipi FcγR; risultava infatti un numero di omozigoti F/F più elevato rispetto agli attesi ($\chi^2= 8.3$; $P=0.016$). Queste considerazioni associate all'osservazione di un eccesso di responders nella sottopopolazione di Foster rispetto alla percentuale di risposta riscontrata dall'analisi di tutti i pazienti dello studio H0649g (43% vs 15%) non permettono di tradurre l'analisi dei polimorfismi riportata per i 63 pazienti all'intera popolazione di pazienti. Nel nostro studio, analogamente ai dati riportati da Weng et al nei pazienti affetti da linfoma, trattati con rituximab (151), è stato osservato un trend verso una migliore risposta clinica e una maggiore PFS al trattamento con trastuzumab nei pazienti con genotipo FcγRIIa 131 H/H. Nell'analisi multivariata, la combinazione di FcγRIIIa 158 V/V e/o FcγRIIa 131 H/H è risultata essere nel nostro studio, l'unico fattore prognostico indipendente nella valutazione dell'efficacia clinica della terapia con trastuzumab. Questi risultati non sono comunque dovuti alla presenza di un linkage disequilibrium tra i polimorfismi FcγRIIIa e FcγRIIa (Tabella 3). Vi è infatti, una distribuzione random delle combinazioni delle varianti genotipiche di FcγRIIIa e FcγRIIa nella popolazione normale (178). Come già accennato in precedenza il recettore umano (h)FcγRIIa lega le IgG sotto forma di immunocomplessi con una specificità per hIgG1 e hIgG3. Il legame a hIgG2 e a IgG1 murino dipende dal polimorfismo

suddetto: se Fc γ RIIa HR (Fc γ R 131 R/R) o Fc γ RIIa LR (Fc γ R 131 H/H) (**123**). Si è dimostrato che la maggiore affinità di Fc γ RIIa 131 H/H per hIgG2 determina una risposta infiammatoria più intensa nei pazienti con predisposizione a definite infezioni batteriche e a patologie come la sindrome di Guillan-Barre (**179,180**). Una differente affinità delle due forme alleliche di Fc γ RIIa per hIgG1 non è ancora stata chiaramente dimostrata. Alcuni studi sono comunque a favore di questa ipotesi: cellule transfettate esprimenti Fc γ RIIa 131 R/R sono in grado di legare a complessi hIgG1 meno efficacemente delle cellule transfettate con la forma all'allelica di Fc γ RIIa 131 H/H (**181**). Una maggiore frequenza genica dell'allele Fc γ RIIa 131 H è stata osservata in pazienti con trombocitopenia indotta da eparina (HIT), e le piastrine omozigoti per 131 H/H mostravano una reattività maggiore verso il siero contenente anticorpi HIT della sottoclasse IgG1 (**182**). La spiegazione biologica dell'associazione osservata tra i polimorfismi Fc γ RIIa e l'attività di trastuzumab rimane comunque da approfondire. Non può essere esclusa la possibilità che esistano altri polimorfismi genici non noti legati al locus 131 H/R e responsabili dell'associazione tra il polimorfismo suddetto e l'efficacia clinica del trastuzumab.

In accordo con studi precedenti su pazienti trattati con rituximab e con vaccini (**151, 183**) il nostro studio ha mostrato che i pazienti con genotipo Fc γ RIIIa 158 V/F hanno risposta simile ai pazienti con 158 F/F. Risultati sovrapponibili sono stati osservati tra i pazienti eterozigoti Fc γ RIIa 131 H/R e gli omozigoti 131 R/R. La spiegazione biologica di questo fenomeno non è chiara poiché ci si potrebbe

aspettare che i pazienti eterozigoti abbiano un decorso clinico intermedio. E' possibile che esista una specifica soglia richiesta affinché il segnale trasmesso da FcγR attivi pienamente le cellule effettrici e che tale soglia non possa essere raggiunta in caso di compresenza di entrambi gli alleli V o H. Comunque è anche possibile che la differente risposta tra questi genotipi sia da attribuirsi oltre che ai polimorfismi ad altri fattori individuali capaci di determinare l'efficacia dell'ADCC come per esempio l'eterogeneità nella proporzione delle cellule NK oppure potrebbero intervenire altri meccanismi in vivo come la citotossicità complemento-dipendente o l'induzione dell'apoptosi) (66).

FcγRIIb è il solo gene tra la famiglia di FcγR che codifica per un recettore tirosinchinasico associato alla sequenza ITIM e che ha la capacità di trasmettere un segnale inibitorio nelle cellule B e nei mielomonociti (141). Come è stato già accennato, topi con deficit di FcγRIIb presentano una maggiore rischio di essere affetti da artriti autoimmuni (133), sindrome di Goodpasture (134) e glomerulonefriti (137) così come un recente studio ha dimostrato che in pazienti giapponesi affetti da LES la frequenza del genotipo 232 T/T era significativamente maggiore rispetto agli individui sani (140). Si è osservato come trastuzumab e rituximab siano in grado di legare il recettore inibitorio FcγRIIb sulle cellule mieloidi e, nei topi con deficit di tale recettore, il meccanismo di ADCC risulta più efficace rispetto ai controlli wild-type (148). Nel nostro studio, il polimorfismo FcγRIIb 232 I/T non correla con l'efficacia clinica delle terapia con trastuzumab. Comunque, la frequenza genotipica osservata di FcγRIIb

non risultava essere in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg (tabella 3), non permettendo di traslare nella popolazione generale i risultati ottenuti dall'analisi effettuata sulla nostra popolazione. È interessante notare che la frequenza dell'allele FcγRIIb 232T nella nostra popolazione è del 13%, considerevolmente più bassa di quella riscontrata nella popolazione giapponese (25%) ma simile alla frequenza osservata nella popolazione tedesca (10.5%) (140). Le differenze raziali nella frequenza del polimorfismo di FcγRIIb rende difficile estendere le osservazioni riportate da una alle altre popolazioni. Al contrario i polimorfismi di FcγRIIIa e FcγRIIa sembrano avere la stessa distribuzione nelle varie etnie inclusi Afro-Americani e Giapponesi (178).

Per confermare il ruolo dell'ADCC nel meccanismo d'azione di trastuzumab e il ruolo dei polimorfismi FcγR nel mediare l'ADCC, abbiamo testato in vitro l'attività antitumorale delle cellule mononucleate dei pazienti dello studio incubandole con trastuzumab e con cellule di carcinoma mammario HER-2/neu positive marcate con ⁵¹Cromo. Al pari di quanto osservato per la risposta clinica e la PFS, l'analisi di ADCC ha dimostrato che le cellule mononucleate 158 V/V e/o 131 H/H possiedono una citotossicità mediata da trastuzumab significativamente più alta delle cellule mononucleate esprimenti gli altri genotipi (Figura 4C). Inoltre, l'attività ADCC in vitro è correlata con la risposta a trastuzumab (Figura 4D). Comunque, il fatto che trastuzumab mantenga circa il 40% della sua attività antitumorale nei topi deficitari di FcγR^{-/-} se confrontato con la controparte wild-type (148), indica che in parte gli effetti biologici degli anticorpi

monoclonali possono essere indipendenti dai recettori Fc γ . Il meccanismo di azione “in vivo” di trastuzumab oltre che l’ADCC può coinvolgere quindi altri meccanismi come la citotossicità complemento-mediata (**184, 185**) e/o l’apoptosi (**66, 186**). L’ADCC può quindi essere considerata come un ulteriore meccanismo nella risposta a trastuzumab che è particolarmente efficace nei pazienti con genotipo Fc γ RIIIa 158 V/V e/o Fc γ RIIa 131 H/H.

In conclusione, il presente studio supporta per la prima volta l’ipotesi che il meccanismo di ADCC giochi un ruolo importante nel determinare l’efficacia clinica di trastuzumab. I nostri dati suggeriscono che i polimorfismi Fc γ R sono coinvolti nell’ADCC mediata da trastuzumab e nel predire la risposta clinica al farmaco in pazienti con carcinoma mammario. In considerazione del disegno retrospettivo del nostro studio sono richieste ulteriori indagini sulle varianti all’alleleliche di Fc γ RIIIa, Fc γ RIIa e Fc γ RIIb nell’ambito di studi prospettici.

Una delle conseguenze dei risultati da noi ottenuti è la possibilità di sviluppare anticorpi monoclonali adatti al genotipo dei differenti pazienti. I siti di legame sulle IgG1 umane per Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb e Fc γ RIIIa sono stati mappati (**173,187**) e molti dei residui di IgG1 che sono coinvolti nel legame con i recettori Fc γ sono differenti. Di conseguenza è possibile generare varianti di IgG1 con differenti caratteristiche di legame per Fc γ R (migliori o peggiori). Ad esempio, modificando diversi residui nella regione costante delle IgG1, Shields et al hanno ottenuto IgG1 mutanti capaci di legarsi più intensamente a Fc γ RIIIa 158 F rispetto alle IgG1 native. Anticorpi monoclonali IgG1

con variazioni nella componente Fc che migliorano il legame a Fc γ RIIIa 158 F, almeno fino a valori di affinità simili a quelli osservati con Fc γ RIIIa 158 V, potrebbero determinare un notevole vantaggio terapeutico nella maggior parte della popolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Enrich, P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. Ned. Tijdschr. Geneeskd 5: 273- 290, 1909
2. Silverstein, A. M. A History of immunology. Academic, San Diego CA 1989
3. Old, L.J. Boyse E.A. Immunology of experimental tumors. Annu. Rev. Med 15: 167-186, 1964
4. Klein G. Tumor antigens. Annu. Rev. Microbiol. 20: 223-252, 1966
5. Thomas L. In cellular and Humoral Aspects of the Hipersensitive states (ed. Lawrence H.S) 529-532,1959
6. Burnet F.M: The concept of immunological surveillance. Prog. Exp. Tumor Res.13: 1-27, 1970

7. Burnet F.M: Immunological factors in the process of carcinogenesis. Br. Med. Bull 20: 261-422, 1964
8. Kaplan H.S. Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: some facts and facies. Br. J. Cancer 25: 620-634,1971
9. Stutman, O. Immunodepression and malignancy. Adv Cancer Res 22: 261-422, 1975
10. Klein G. Immunological surveillance against neoplasia. Harvey Lect 71-102, 1973
11. Stutman O. In the nude mouse in experimental and clinical research 411-435 (Academic New-York), 1978
12. Herberman R.B. and Holden H.T. Natural cell-mediated immunity. Adv. Cancer Res. 27: 305-377, 1978
13. Dighe A.S. Richard E, Old L.J, Schreiber R.D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative INF γ receptors. Immunity 1: 447-456, 1994
14. Russel J H, Ley T J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu . Rev. Immunol. 20: 323-370, 2002
15. van de Broek, M. F et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J. Exp. Med. 184: 1781-1790, 1996
16. Girardi, M. et al. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. Science 294: 605-609, 2001
17. Penn, I. Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients. (Sprinter-Verlag, New-York), 1970
18. Gatti, R.A, Good, R.A. Occurence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature rewiew. Cancer 28: 89-98, 1971

19. Penn, I. Posttransplant malignancies. *Transplant Proc.* 31: 1260-1262, 1999
20. Birkeland, S.A. et al Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int. J. Cancer* 60: 183-189, 1995
21. Sheil, A. G.R. in *Kidney transplantation* (ed. Morris, P.J) 558-57 (Saunders, Philadelphia), 2001
22. Boshoff, C. and Weiss, R. AIDS-related malignancies. *Nature Rev. Cancer* 2: 373-382, 2002
23. Buell, J.F., Gross, T.G. and Woodle, E.S.. Malignancy after transplantation. *Transplantation.* 80: S254-S264, 2005
24. Penn, I. 1988. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu. Rev. Med.* 39: 63-73, 1988
25. Swann JB and Smyth MJ . Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* 117: 1137-1146, 2007
26. Uyttenhove, C., Van Snick, J. and Boon, T. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815. I. rejection by syngenic mice. *J. Exp. Med.* 152: 1175-1183, 1980
27. Urban, J.L., Holland, J.L., Kripke, M.L. and Schreiber, H. Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 156: 1025-1041, 1982
28. Dunn, P.G, Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. 3: 991-998, 2002
29. Dunn, G. P., Old, L.J. and Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22 : 329-360, 2004

30. Scuhster M, Nechansky A, Loibner H, Kircheis R. Cancer Immunotherapy. *Biotechnol. J.* 1: 138-147, 2006
31. Qiu, W., Schonleben, F., Shaker, H.M., Goggins, M. Su, G.H. A novel mutation of STK11/LKB1 gene leads to the loss of cell growth inhibition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2006
32. Keog, E., Fikes, J., Southwood, S., Celis, E., Chesnut, R. et al. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigen: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. *J. Immunol.* 167: 787-796, 2001
33. Maecker, B., von Bergwelt-Baildon, M.S., Anderson , K.C. et al. Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumor antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients. *Clin. Exp. Immunol.* 141: 558-562, 2005
34. Radoja, S., Frey, A.B., Cancer induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumore escape immuno-mediated killing. *Mol. Med.* 6: 465-479, 2000
35. Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjoberg. J. Et al Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol. Immunother.* 48: 353-362, 1999
36. Bertolaccini, L., Oliviero, G. Cancer immunotherapy. A future therapeutical choice? *Minerva Chir.* 56: 183-191, 2001
37. . Rosenberg, S.A., Cancer vaccines based on the identification of gene encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* 18: 175-182, 1997
38. Schuster, M., Umana, P., Ferrara , C., Bunker, P., Gerdes, C. et al. Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis y-

- specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res.* 65, 7934-7941, 2005
39. Coley, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 3-11, 1991
40. Huang, A.Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., et al. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264: 961-965, 1994
41. Renard, V., Sonderbye, L., Ebbehøj, K., Rasmussen, P.B., Gregorius, K. et al. HER-2 DNA and protein vaccines containing potent Th cell epitopes induce distinct protective and therapeutic antitumor responses in HER-2 transgenic mice. *J. Immunol.* 171: 1588-1595, 2003
42. Zeng, Y., Graner, M.W., Thompson, S., Marron, M., Katsanis, E. Induction of BCR-ABL specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL + tumor cells. *Blood* 105: 2016-2022, 2005
43. Habal, N., Gupta, R.K., Bilchik, A.J., Yee, R., Leopoldo, Z. et al. CancerVax, an allogenic tumor cell vaccine, induce specific humoral and cellular immune responses in advanced colon cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 8: 839-401, 2001
44. Pardoll, D.M. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 399-415, 1995
45. den Brok, M.H., Nierkens, S., Figdor, C.G., Ruers, T.J., Adema, G.J. Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination. *Expert. Rev. Vaccines.* 4: 6451-6458, 2001

46. Mellstedt, H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)* 39 Suppl. C, 1-16, 2003
47. Gong, S.J., Jin, C. J., Rha, S.Y., Chung, H.C., Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett.* 214: 215-224, 2004
48. Plosker, G.L., Figgitt, D.P., Rituximab: a review of its use in non Hodgkin's Lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63: 803-843, 2003
49. Davis, T.A., Czerwinski, D.K., Levy, R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin. Cancer. Res.* 5: 611-615, 1999
50. Rajendran, J.G., Fisher, D.R., Gopal, A.K., Durak, L.D., Press, O.W. et al. High dose (131)I-tositumomab (anti-CD20) radioimmunotherapy for non Hodgkin's lymphoma: adjusting radiation absorbed dose to actual organ volumes. *J. Nucl. Med.* 45: 1059-1064, 2004
51. Campbell, P., Marcus, R. Monoclonal antibody therapy for lymphoma. *Blood. Rev.* 17: 143-152, 2003
52. Hortobagay, G.N. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 353: 1734-1736, 2005
53. Harding, J., Burtness, B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 41: 107-127, 2005
54. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., Ferrone, S., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanism and functional significance. *Adv. Immunol.* 74: 181-273, 2000

55. Mathiassen, S., Lauemoller, S.L., Ruhwald, M., Claesson, M.H., Buus, S. Tumor-associated antigens identified by mRNA expression profiling induce protective anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* 31: 1239-1246, 2001
56. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235: 177-182, 1987
57. Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer and ovarian cancer, *Science* 244: 707-712, 1989
58. Depowski, P., Mulford, D., Minot, D., Bourne, P., McCabe, C., McHugh, L., Comparative analysis of HER-2/neu protein overexpression in breast cancer using paraffin-embedded tissue and cytologic specimens, *Mod. Pathol.* 15: 70A, 2002
59. Muss, H.B., Thor, A.D., Berry, D.A., Kute, T., Liu, E.T., Koerner, F., et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer, *New Engl. J. Med.* 330: 1260-1266, 1994
60. Eceles, S.A., The role of c-erbB-e/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis, *J.Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 6: 393-406, 2001
61. Wolff, Ac., Hammond, ME, Schwartz, JN., Hagerty, KL., Allred, DC., Cote, RJ., Dowsett, M., Fitzgibbons, PL., Hanna, WM., Langer, A., McShane, LM, Paik, S, Pegram, MD, Perez, EA., Press, MF., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, SE., Tubbs, R., Vance, GH., van de

- Vijver, M., Wheeler, T.M., Hayes, D.F.; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologist. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 25(1): 118-45, 2007
62. Paik, S., Hazan, R., Fisher, E.R., Sass, R.E., Fisher, B., Redmond, C., et al. Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project: prognostic significance of cerbB-2 protein overexpression in primary breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 8: 103-112, 1990
63. Niehans, G.A., Singleton, T.P., Dykoski, D., Kiang, D.T. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple multiple metastatic sites, *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1230-1235, 1993
64. Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L. et al Humanization of an anti-p185her2 antibody for human cancer therapy, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289, 1992
65. Baselga, J., Albanell, J., Molina, M.A., Arribas, J. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update, *Semin. Oncol.* 28: 4-11, 2001
66. Sliwkowsky, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D. Hotaling, T.E., Fendly, B.M., Fox, J.A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin), *Semin. Oncol.* 26: 60-70, 1999
67. Le, X.F., Claret, F.X., Lammayot, A., Tian, L., Deshpande, D., Lapushin, R. et al The role of cyclin-dependent kinase inhibitor

- p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition, *J. Biol. Chem.* 278: 23441-23450, 2003
68. Nagata, Y., Lan, KH. Zhou, X., Tan, M., Esteva F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., Hortobagy, G.N., Hung, MC., Yu, D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 6: 117-127, 2004
69. Parson, R., Simpson, L. PTEN and cancer. *Methods Mol. Biol.* 222: 147-166, 2003
70. Lane H.A., Beuvink, I., Motoyama, A.B., Daly, J.M., Neve, R.M. Hynes, N.E. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip 1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency, *Mol. Cell Biol.* 20: 3210-3223, 2000
71. Lane H.A., Motoyama, A.B., Beuvink, I., Hynes, N.E. Modulation of p27(Kip 1)-Cdk2 complex formation through 4D5 mediated inhibition of HER2 receptor signaling, *Ann. Oncol.* 12: 21-22, 2001
72. Chang, J.C., Mohsin, S., Weiss, H., Hilsenbeck, S.G., Gutierrez, C., Lucci, A. et al Induction apoptosis without change in cell proliferation in primary breast cancer with neoadjuvant trastuzumab. *Breast Cancer Res. Treat.* 82: 24, 2003
73. Gennari, R., Menare, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2, *Clin. Cancer Res.* 10: 5650-5655, 2004

74. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., Semenza, G.L.
HER2 (neu) signaling increase the rate of hypoxia-inducible factor 1
alpha (HIF-1 alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated
vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* 21:
3995-4004, 2001
75. Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., Jain, R.K. Tumor
biology: Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail, *Nature* 416:
279-280, 2002
76. Klos, K.S., Zhou, X., Lee, S., Zhang, L., Yang, W., Nagata, Y., et al.
Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-
2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective
inhibition of akt than either treatment alone, *Cancer* 98: 1377-1385,
2003
77. Cooley, S., Burn, L.J., Repka, T., Miller, J.S., Natural killer cell
cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct
mechanisms of antibody dependent cellular cytotoxicity against LFA-
3 and HER-2/neu, *Exp. Hematol.* 27: 1533-1541, 1999
78. Repka, T., Chiorean, E.G., Gay, J., Herwig, K.E., Khol, V.K., Yee, D.,
et al. Trastuzumab and Interleukin-2 in HER-2 positive metastatic
breast cancer: a pilot study, *Clin. Cancer Res.* 9: 2440-2446, 2003
79. Pegram, M.D., Konecny, G.E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras,
R., Slamon, D.J., Rational combinations of trastuzumab with
chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer, *J. Natl
Cancer Inst.* 96: 739-749, 2004

80. Mayfield, S., Vaughn, J.P., Kute T. E., DNA strand breaks and cell cycle perturbation in Herceptin treated breast cancer cell lines, *Breast Cancer Res. Treat.* 70: 123-129, 2001
81. Kauraniemi, P., Hautaniemi, S., Autio, R., Astola, J., Monni, O., Elkhoulou, A. et al. Effects of Herceptin treatment on global gene expression patterns in HER2-amplified and nonamplified breast cancer cell lines, *Oncogene* 23: 1010-1013, 2004
82. Esteva, F.J., Valero, V., Booser, D., Guerra, L.T., Murray, J.L., Puztai, L., et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 20: 1800-1808, 2002
83. Seidman. A.D., Fornire, M., Esteva, F.J., Tan, L., Kaptain, S., Bach, A. et al, Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification, *J. Clin. Oncol.* 19: 2587-2595, 2001
84. Paez, J.G. Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S. et al, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science* 304: 1497-1500, 2004
85. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanin, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaris, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947, 1997
86. Mutter, G.L., Lin, M.C., Fitzgerald, J.T., Kum, J.B., Baak, J.P., Lees, J.A., Weng, L.P., and Eng, C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl cancer Inst.* 92: 924-930, 2000

87. Natha, R., Takahashi, T., Ueno, N.T., Hung, M.C., Esteva, F.J. P27(kip1) down-regulation is associated with Trastuzumab resistance in breast cancer cells, *Cancer Res.* 64: 3981-3986, 2003
88. Yee, D. The insuline-like growth factor system as treatment target in breast cancer. *Semin. Oncol.* 29: 86-95, 2002
89. Lu, Y.H., Zi, X.L, Zao, I.H., Mascharenas, D., Pollak, M., Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to Trastuzumab (Herceptin), *J. Natl Cancer Inst.* 93: 1852-1857, 2001
90. Molina, M.A., Saez, R., Ramsey, E.E., Garcia-Barchino, M.J., Rojo,F., Evans, A.J. et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-lenght receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 8: 347-353, 2002
91. Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J., et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res.* 58: 5123-9, 1998
92. Anido, J., Scaltriti, M. Bech Serra, J.J., Santiago Josef B., Todo, F.R., Baselga, J., et al. Biosynthesis of tumorigenic HER-2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J.* 25: 3234-3244, 2006
93. Scaltriti, M. Rojo, F., Ocana, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon, S. et al Expression of p95HER-2, a truncated form of the HER-2 receptor, and response to anti-HER-2 therapies in breast cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 99: 1-11, 2007
94. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2

- monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 14: 737-44, 1996
95. Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have Her2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin Oncol* 17: 2639-48, 1999
96. Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., et al. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 21: 719-26, 2002
97. Baselga, J., Carbonell, X., Castaneda Soto, N.J., et al. Phase II study of efficacy, safety and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on 3-weekly schedule. *J. Clin. Oncol* 23: 2162-71, 2005
98. Slamon, D.J., 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.* 344: 783-92, 2001
99. Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of Trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first line treatment: the M77001 Study Group. *J. Clin. Oncol* 23: 4265-74, 2002
100. Herceptin (trastuzumab): full prescribing information. South San Francisco, CA: genetech, 2004
101. Klein, P.M., Dybdal, N., Trastuzumab and cardiac dysfunction: update on preclinical studies. *Semin. Oncol.*30: Suppl16: 49-53, 2003

102. Negro.A.,Brar, B.K., Lee, K.F. Essential roles of Her2/erb2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* 59: 1-12, 2004
103. Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., et al. ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 8: 459-65, 2002
104. Burstein, H.J., Harris, L.N., Marcom, P.K., et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors and cardiac surveillance algorithm. *J. Clin. Oncol.* 21: 2889-95, 2003
105. Romond E.H., Perez, E.A., Bryant, J., et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Eng. J. Med* 353: 1673-84, 2005
106. Perez, E.A., Suman, V.J., Davidson, N., Martino, S., Kaufman, P. NCCTG N9831, May 2005 update. Presented at the 45th annual meeting of American Society of Clinical Oncology, Orlando, F.L. May 16, 2005
107. Smith, I., Procter, M., Gelber, L.D., et al 2-Year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *Lancet* 369: 29-36, 2007
108. Piccart-Gebhart, MJ., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, CH., Steger, G., Huang, CS., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Lang, I et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Eng J Med.* 353(16): 1659-72, 2005

109. Joensuu, H., Kellokumpu-Lehtinen, P.L., Bono, P., et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbina with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 354: 809-20, 2006
110. Carlson, R.W., Brown, E., Burstein, H.J. et al. NCCN task force report: adjuvant therapy for breast cancer. *J. Natl Compr Canc Netw* 4: Suppl 1:S1-26, 2006
111. Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC→T) with doxorubicina and cyclophosphamide followed docetaxel and trastuzumab (AC→TH) with docetaxel, carboplatino and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 94(suppl 1): S5, 2005
112. Berken, A., Benacerraf, B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J. Exp. Med.* 123: 119-44, 1966
113. Anderson, CL., Shen, L., Eicher, DM., Wewers, MD., Gill, JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fcγ receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* 171: 1333-45, 1990
114. Titus, JA., Perez, P., Kaubish, A., Garrido, MA, Segal, DM. Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *J. Immunol.* 139: 3153-58, 1987
115. Daeron, M. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-34, 1997
116. Jefferis, R., Lund, J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett* 82: 57, 2002

117. Hulett, MD., Hogarth, PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* 57: 1-127, 1994
118. Weiss, A. Littman, DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263-74, 1994
119. Falasca, M., Logan, SK, Lehto, VP., Baccante, G., Lemmon, MA., Schlessinger, J. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J.* 17: 414-22, 1998
120. Ravetch, JV., Kinet, JP. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9 : 457-92,1991
121. Daeron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., Fridman, WH. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR- and FcR-dependent cell activation *Immunity* 3: 635-46, 1995
122. Pearse, RN., Kawabe, T. Bolland, S., Guinamard, R., Kurosaki, T. SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity* 10: 753-60, 1999
123. Takai T: Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 25: 1-17, 2005
124. Li, X., Wu, J., Carter, RH., Edberg, JC., Su, K., Cooper, GS, Kimberly, RP: a novel polymorphism in the Fc γ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum* 48: 3242, 2003

125. Takai, T., Li, M., Silvestre, D., Clynes, R., Ravetch, JV: FcR γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76: 519-529, 1994
126. Godau, J., Heller, T., Hawlisch, h., Trappe, M. et al: C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis. *J. Immunol* 173: 3437-3445, 2004
127. Takai T, Ono, M., Hikida, m. Ohmori, h. Ravetch, JV: Augmented humoral and anaphylactic response in Fc γ RII-deficient mice. *Nature* 379: 346-349, 1996
128. Williams, Y., Lynch, S., McCann, S., Smith, O. et al: Correlation of platelet Fc gamma RIIA polymorphism in refractory idiopathic (immune) thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 101: 779, 1998
129. van der Pol , WL., van de Winkel, JG: IgG receptor polymorphism: risk factors for disease. *Immunogenetics* 48: 222, 1998
130. Raknes, G., Skeie, GO., Gilhus, NE., Aadland, S., Vedeler, C: Fc gamma RIIA and Fc gamma RIIIB polymorphism in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 81: 173, 1998
131. Myhr, KM., Raknes, G., Nyland, H., Vedeler, C: immunoglobulin G Fc-receptor (Fc γ R) IIA e IIIB polymorphism related to disability in MS. *Neurology* 52: 1771, 1999
132. Takai, T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2: 580-592, 2002
133. Kleinau, S., Martinsson, P., Heyman, B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc γ receptors. *J Exp Med* 191: 1611-1616, 2000

134. Kalluri R: Goodpasture syndrome. *Kidney Int* 55: 1120-1122, 1999
135. Hepburn AL, Mason, JC, Davies, KA: expression of Fc γ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythemayosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatol (Oxford)* 43: 547-554, 2004
136. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV: uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 279: 1052-1054, 1998
137. Suzuki, Y., Shirato, I., Okumura, K., Ravetch, JV., Takai, T et al: Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int* 54: 1166-1174,1998
138. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M et al: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304: 1147-1150, 2004
139. Yajima, K., Nakamura, A., Sugahara, A., Takai, T. Fc γ RIIb deficiency with Fas mutation is sufficient for the development of systemic autoimmune disease. *Eur J Immunol* 33: 1020-1029, 2003
140. Kyogoku, C., Dijstelbloem, HM., Tsuchiya, N., Hatta, Y., Kato, H., Yamaguchi, A. et al: Fc γ R receptor gene polymorphism in Japanese patients with systemic lupus eritematosus. 46: 1242-1254, 2002
141. Ravetch, JV., Lanier, LL. Immune inhibitory receptors. *Science*; 290: 84-9, 2000

142. Samuelsson, A., Towers, TL., Ravetch, JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 291: 484-6, 2001
143. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 6: 1117-25, 2006
144. Carter, PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6: 343-357, 2006
145. Adams, GP, Weiner, LM: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23: 1147-57, 2005
146. Li, S., Schimtz, KR., Jeffrey, PD., Wiltzius, JJ., Kussie, P., Ferguson, KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer cell* 7: 301-311, 2005
147. Ravetch, JV. Fc receptors. In *fundamental Immunology* edn5. edited by Paul WE. Lippincott-Raven; 685-700, 2003
148. Clynes, RA., Towers, TL., Presta, LG., Ravetch, JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6: 443-6, 2000
149. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, JA., et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*; 199: 1659-69, 2004
150. Carton, G., Dacheux, L., salles, G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood*; 99: 754-8, 2002

151. Weng, W-K., Levy, R. Immunoglobulin G Fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 21: 3940-47, 2003
152. Kim, DH., Jung, HD., Kim, JC., Lee, J-J., Jang, D-H., Park, YH., Do, YR., Shin, HJ., Kim, MH., Hyun, MS., Sohn, SK. FcγRIIIa gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 108: 2720-5, 2006
153. Louis, EJ., Water, HE., Schreiber, S., Hampe, J., Taillard, F., Olson, A., Thorne, N., Zhang, H., Colombel, J-F. Polymorphism in IgG Fc receptor gene FCGR3A e risposta a infliximab in Crohn's disease: a subanalysis of the ACCENT I study
154. Cheung, N-K V., Sowers, R., Vickers, AJ., Cheung, IY., Kushner, B., Gorlick, R. FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 24: 2885-90, 2006
155. Zhang W., Gordon, M., Schultheis, AM., Yang, DY., Nagashima, F., Azuma, M., Chang, HM., Borucka, E., Lurje, G., Sherrod, AE., Iqbal, S., Groshen, S., Lenz, HJ. FCGR2A and FCGR3A polyorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol*. 25(24):3712-8, 2007
156. Boruchov, AM., Heller, G., Veri, MC., Bovini, E., Ravetch, JV., Young, JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 115: 2914-23, 2005

157. Lazar, GA., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, JS., Hyun, L., Chan, C., Chung, HS., Elvazi, A., Yoder, SC et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4005-10, 2006
158. Nimmerjahn, F., Ravetch, JV: Divergent Immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310: 1510-1512, 2005
159. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, JV: Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313: 670-673, 2006
160. Therase, P., Arbuck, SG., Eisenhauer, EA., Wanders, J., Kaplan, RS., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, AT., Christian, MC., Gwyther, SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92: 205-16, 2000
161. Morgan, AW., Barrett, JH, Griffiths, B., Subramanian, D., Robinson, JI., Keyte, VH, Ali, M., Jones, EA., Old, RW., Ponchel, F., Boylston AW, Situnayake, RD, Markham, AF, Emery, P., Isaacs, JD. Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther* 8(1): R5, 2006

162. Chomczynski, P., Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1):156-9, 1987
163. Norris, CF., Pricop, L., Millard, SS., Taylor, SM., Surrey, S., Schwartz, E., Salmon, JE., McKenzie, SE. A naturally occurring mutation in Fc gamma RIIA: a Q to K127 change confers unique IgG binding properties to the R131 allelic form of the receptor. *Blood*; 91 (2): 656-62, 1998
164. Kyogoku, C., Dijstelbloem, HM., Tsuchiya, N., Hatta, Y., Kato, H., Yamaguchi, A., Fukazawa, T., Jansen, MD., Hashimoto, H., van de Winkel, JGJ, Kallenberg, CGM, Tokunaga, K. Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* 46: 1242-1254, 2002
165. Koene, HR., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, AE., de Haas, M. Fc-gamma-RIIIa-158 V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc-gamma-RIIIa, independently of the Fc-gamma-FIIIIa-48 L/R/H phenotype. *Blood* 90: 1109-1114, 1997
166. Freeman. DH, *Applied categorical data analysis*. New York: Marcel Dekker, INC., 1987
167. Kaplan, EI., Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*; 53: 457-481, 1958
168. Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*; 50: 163-170, 1966

169. Cox, DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc*; 34: 187-220, 1972
170. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*; 64: 4664-4669, 2004
171. Jiang X-M, Arepally G, Poncz M, et al. Rapid detection of the Fc-gamma-RIIA-H/R¹³¹ ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 199: 55-59, 1996
172. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*; 100:1059-1070, 1997
173. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng G, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improves binding to the FcγR. *J Biol Chem* 9: 6591-6604, 2001
174. Stockmeyer B, Elsässer D, Dechant M, Repp R, Gramatzki M, Glennie MJ, van de Winkel JGJ, Valerius T. Mechanisms of G-CSF- or GM-CSF-stimulated tumor cell killing by Fc receptor-directed by specific antibodies. *J Immunol Methods*; 248: 103-111, 2001
175. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, Fermeaux V, Bertheau P, Garnier J, Jeannin J-F, Coudert B. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast

- cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*; 94: 259-267, 2006
176. Foster C, Harris K, Ostland M, Mass R, Chen R, Presta L, Chanock S. FCGR3A V/F polymorphism does not predict response to Herceptin monotherapy. ASCO 2002; abstr. 227
177. Vogel CL, Cobleigh M, Tripathy D, Mass R, Murphy M, Stewart SJ. Superior Outcomes with Herceptin (Trastuzumab) in Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)-Selected Patients. ASCO 2001; abstr. 86
178. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. Variant genotypes of the low-affinity Fc-gamma receptor in two control populations and a review of low-affinity Fc-gamma receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*; 94:4220-4232, 1999
179. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*; 76:231-248, 1998
180. Vedeler CA, Raknes G, Myhr KM, Nyland H. IgG Fc-receptor polymorphisms in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*; 55:705-707, 2000
181. Warmerdam PAM, VAN DE Winkel JGJ, Vlug A, Westerdaal NAC, Capel PJA. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc γ receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol*; 147:1338-1343, 1991
182. Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard J-A I, Warner MN, Kelton JG. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: An explanation for the predominance of the Fc γ RII1 "low responder" (his₁₃₁) gene in patients

- with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med*; 130:278-284, 1997
183. Weng W-K, Czerwinski D, Timmerman J, Hsu FJ, Levy R. Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J Clin Oncol*; 22:4717-4724, 2004
184. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*; 51:634-641, 2000
185. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*; 95:3900-3908, 2000
186. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother*; 48:673-683, 2000
187. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and Antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*; 277:26733-26740, 2002
188. 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*; 26: 1789-96, 2008

Table 1. Patient Characteristics and Pre-study Details

Parameter	<u>Study Cases*</u>		<u>Control Group*</u>	
	No	%	No	%
No. of patients	54	100	34	100
Median age — yrs (range)	59 (32-82)		61 (38-78)	
Menopausal status				
Pre-	9	17	6	18
Post-	45	83	28	82
Performance status				

Parameter	Study Cases*		Control Group*	
	No	%	No	%
0	40	74	24	71
1	13	24	8	23
≥ 2	1	2	2	6
Histological grade†				
1	3	6	3	9
2	16	29	12	35
3	32	59	17	50
Unknown	3	6	2	6
Estrogen receptor status†				
Positive	35	65	24	71
Negative	19	35	10	29
Progesterone receptor status†				
Positive	29	54	16	47
Negative	25	46	18	53
Proliferation rate†‡				
High	32	59	18	53
Low	19	35	14	41
Unknown	3	6	2	6
HER-2/neu status†§				
Positive	54	100	4	12
Negative			30	88
Previous adjuvant chemotherapy	37	69	20	59
Metastatic sites of disease				
Chest wall +/- regional lymph nodes	34	63	16	47
Visceral	35	65	20	59
Bone	23	43	16	47
Multiple sites	39	72	23	68
Trastuzumab and/or taxane as first-line therapy	35	65	23	68
Taxane administered (with				

Parameter	Study Cases*		Control Group*	
	No	%	No	%
or without trastuzumab)	40	74	21	62
Paclitaxel	14	26	13	38
Docetaxel				
Response to trastuzumab				
and/or taxane	6	11	2	6
Complete response	20	37	12	35
Partial response	23	43	12	35
Stable disease	5	9	8	24
Progressive disease				

Abbreviations: No, number; yrs, years; PFS, progression-free survival; mo, months.

*Study cases: metastatic breast cancers who had received trastuzumab + taxane, controls: patients treated with taxane without trastuzumab.

†Pathological features of primary breast tumors.

‡Proliferation rate was considered as “high” when 15% or more cells were stained by Ki 67 antibody.

§HER-2/neu status determined by FISH.

|| Visceral sites in order of frequency: liver, lung, pleura, peritoneum, CNS.

Table 2. Chemotherapy Schemes Administered with Trastuzumab

Type of Chemotherapy (No pts)	Dosage	Time Schedule
Weekly Paclitaxel (32)	90 mg/m ²	d 1 q 1 w
Tri-weekly Paclitaxel (8)	175 mg/m ²	d 1 q 3 w
Liposomal Doxorubicin and Docetaxel (7)	50 mg/m ² and 30 mg/m ²	d 1, 8 (docetaxel only) q 3 w
Tri-weekly Docetaxel (3)	100 mg/m ²	d 1 q 3 w
Weekly Docetaxel (2)	30 mg/m ²	d 1, 8, 15 q 4 w

Carboplatin and Paclitaxel (2)	AUC 2 and 80	d 1, 8, 15 q 4 w
mg/m ²		

Abbreviations: No, number; pts, patients; mg, milligrams; m², square meter; d, days; w, weeks; AUC, area under the curve.

Table 3. FcγRIIa, FcγRIIIa, and FcγRIIb Polymorphisms in Study Cases and Controls

	Study Cases (n = 54) n (%)	Controls (n = 34) N (%)	χ^2	<i>P</i> *
Genotype Frequency				
FcγRIIIa				
158 V/V	11 (32)	6 (18)	0.43	0.81
158 V/F	26 (48)	15 (44)		
158 F/F	17 (20)	13 (38)		
<i>H-W Equilibrium</i> — χ^2	0.03	0.21		
(<i>P</i>)	(0.98)	(0.90)		
FcγRIIa				

131 H/H	10 (18.5)	7 (21)	0.71	0.7
131 H/R	34 (63)	23 (67)		
131 R/R	10 (18.5)	4 (12)		
<i>H-W Equilibrium</i> — χ^2	3.63	4.49		
(<i>P</i>)	(0.16)	(0.10)		
FcγRIIb				
232 I/I	44 (82)	26 (76)	0.79	0.67
232 I/T	6 (11)	6 (18)		
232 T/T	4 (7)	2 (6)		
<i>H-W Equilibrium</i> — χ^2	13.91	2.99		
(<i>P</i>)	(0.001)	(0.22)		
	Study	X²(<i>P</i>)	Controls	χ^2(<i>P</i>)
	Cases		(n = 34)	
	(n = 54)			
LD Analysis	HF, %		HF, %	
IIa—IIIa				
131 H—158 V	25.5	5.56	22.6	3.07
131 H—158 F	24.8	(0.23)	30.9	(0.54)
131 R—158 F	29.7		27.5	
131 R—158 V	20.0		19	
IIa—IIb				
131 H—232 I	40.0	1.58	42.8	2.47
131 H—232 T	5.8	(0.81)	10.4	(0.65)
131 R—232 T	8.4		7.9	
131 R—232 I	45.8		38.9	
IIIa—IIb				
158 V—232 I	47.6	3.03	31.6	3.77
158 V—232 T	5.9	(0.55)	9.2	(0.44)
158 F—232 T	10.8		9.2	
158 F—232 I	35.7		50	

Abbreviations: n, number; Fc γ R, immunoglobulin G fragment C receptor; H, histidine allele; R, arginine allele; V, valine allele; F, phenylalanine allele; I, isoleucine allele; T, threonine allele; H-W, Hardy-Weinberg; LD, linkage disequilibrium; HF, haplotype frequency.

*By chi-square test with 3 x 2 contingency table (2 df).

Table 4. Patient Characteristics According to FcγR Polymorphisms*

Parameter	FcγRIIIa			FcγRIIa			FcγRIIb		
	V/V (n=11)	V/F (n=26)	F/F (n=17)	H/H (n=10)	H/R (n=34)	R/R (n=10)	I/I (n=44)	I/T (n=6)	T/T (n=4)
Median age, y(range)	64	60	57	58	61	57	59	60	55
Premenopausal status	2(18)	5(19)	2(12)	3(30)	4(12)	2(20)	7(16)	1(17)	1(25)
PS≥1	3(27)	7(27)	4(24)	2(20)	9(26)	3(30)	11(25)	1(17)	2(50)
ER Negative†	4 (36)	10(38)	5(29)	5(50)	9(26)	5(50)	16(36)	2(33)	1(25)
PR Negative†	5(45)	12(46)	8(47)	4(40)	17(50)	4(40)	20(45)	3(50)	2(50)
G3†‡	6(60)	15(60)	11(69)	5(50)	21(68)	6(60)	26(62)	3(60)	3(75)
High proliferation rate†‡§	5(50)	16(64)	11(69)	7(70)	19(59)	6(67)	26(63)	4(67)	2(50)
Visceral metastasis	7(64)	17(65)	11(65)	6(60)	21(62)	8(80)	28(64)	4(67)	3(75)
First-line trastuzumab	8(73)	18(69)	9(53)	7(70)	21(62)	7(70)	28(64)	5(83)	2(50)
Median time between diagnosis and treatment, yr	4.5	4	3.5	5	4	4.5	3	4.5	3

Abbreviations: FcγR, immunoglobulin G fragment C receptor; H, histidine allele; R, arginine allele; V, valine allele; F, phenylalanine allele; I, isoleucine allele; T, threonine allele.

*Values are the number (%).

†Pathological features of primary breast tumors.

‡ Percentages were calculated after exclusion of cases where data were unknown.

§ Proliferation rate was considered as “high” when 15% or more cells were stained by Ki 67 antibody

Table 5. Clinical Response to Trastuzumab Therapy According to FcγR Polymorphisms*

	V/V (n 11)	V/F (n = 26)	F/F (n = 17)	F carrier† (n = 43)	<i>P</i> ‡
CR + PR	9 (82)	11 (42)	6 (35)	17 (40)	0.03
SD + PD	2 (18)	15 (58)	11 (65)	26 (60)	
	H/H (n 10)	H/R (n = 34)	R/R (n = 10)	R carrier† (n = 44)	<i>P</i> ‡
CR + PR	7 (70)	15 (44)	4 (40)	19 (43)	0.15
SD + PD	3 (30)	19 (56)	6 (60)	25 (57)	
	I/I (n 44)	I/T (n = 6)	T/T (n = 4)	T carrier† (n = 10)	<i>P</i> ‡
CR + PR	24 (55)	1 (17)	1 (25)	2 (20)	0.61
SD + PD	20 (45)	5 (83)	3 (75)	8 (80)	

	V/V and/or H/H (n 17)	Others (n = 37)	P
CR + PR	12 (71)	14 (38)	0.04
SD + PD	5 (29)	23 (62)	

Abbreviations: n, number; FcγR, immunoglobulin G fragment C receptor; H, histidine allele; R, arginine allele; V, valine allele; F, phenylalanine allele; I, isoleucine allele; T, threonine allele; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

*Values are the number (%).

†F carrier (V/F + F/F); R carrier (H/R + R/R); T carrier (I/T + T/T).

‡Two-sided Fisher's exact test, comparing V/V, H/H, and I/I with F, R, and T carrier, respectively.

Table 6. FcγR Polymorphisms and Treatment Outcome in Control Patients

	V/V (n = 6)	V/F (n = 15)	F/F (n = 13)	P
CR + PR — n (%)	2 (33)	6 (40)	6 (46)	0.86
Median PFS — mo	5.82	17.11	11.40	0.47
	H/H (n = 7)	H/R (n = 23)	R/R (n = 4)	P
CR + PR — n (%)	2 (29)	10 (43)	2 (50)	0.72
Median PFS — mo	17.11	9.64	NR	0.66
	I/I (n = 26)	I/T (n = 6)	T/T (n = 2)	P
CR + PR — n (%)	12 (46)	2 (33)	0 (0)	0.40
Median PFS — mo	17.11	13.03	2.53	0.34

Abbreviations: n, number; mo, months; FcγR, immunoglobulin G fragment C receptor; H, histidine allele; R, arginine allele; V, valine allele; F, phenylalanine allele; I, isoleucine allele; T, threonine allele;

CR, complete response; PR, partial response; PFS, progression-free survival; NR, not reached.

Figure Legend

Figure 1. Kaplan-Meier estimates of progression-free survival (PFS) by immunoglobulin G fragment C receptor IIIa (FcγRIIIa) 158 valine (V)/phenylalanine (F) polymorphism. PFS curves were plotted by FcγRIIIa 158 V/F genotype on all 54 patients. F carriers represent patients with either 158 V/F or 158 F/F genotype.

Figure 2. Kaplan-Meier estimates of progression-free survival (PFS) by immunoglobulin G fragment C receptor IIa (FcγRIIa) 131 histidine (H)/arginine (R) polymorphism. PFS curves were plotted by FcγRIIa 131 H/R genotype on all 54 patients. R carriers represent patients with either 131 H/R or 131 R/R genotype.

Figure 3. Progression-free survival (PFS) by immunoglobulin G fragment C receptor IIIa (FcγRIIIa) 158 valine (V)/phenylalanine (F) and FcγRIIa 131 histidine (H)/arginine (R) polymorphisms. PFS curves were plotted by FcγRIIIa 158 V/F and FcγRIIa 131 H/R

genotype. Others represent patients without either FcγRIIIa 158 V/V or FcγRIIa 131 H/H genotype.

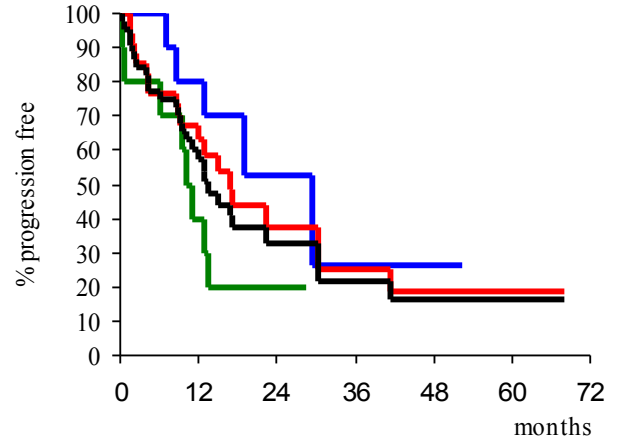
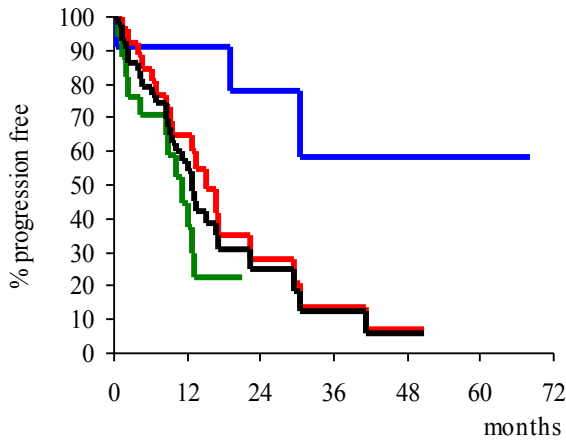
Figure 4. Trastuzumab-mediated ADCC of patients' PBMCs. **A**, ADCC by FcγRIIIa polymorphism (158 V/V vs F carrier genotype). **B**, ADCC by FcγRIIa polymorphism (131 H/H vs R carrier genotype). **C**, ADCC by FcγRIIIa and FcγRIIa polymorphism (158 V/V and/or 131 H/H vs others). **D**, ADCC by clinical response to trastuzumab (responders vs non-responders).

Student's *t* test (two-sided) was used to compare ADCC between groups. Means and standard errors are shown.

Figure 1

Figure 2

A



	Median (mo)
— V/V	Not Reached
— V/F	15.0 (p=0.008)
— F/F	11.1 (p=0.005)

	Median (mo)
— H/H	29.5
— H/R	16.8 (p=0.44)
— R/R	10.0 (p=0.04)

F carriers 12.9 (p=0.0035)

R carriers 13.4 (p=0.25)

Figure 3

