

R. Colomer^a,
S. Montero^a,
S. Ropero^a,
J.A. Menéndez^a,
H. Cortés Funes^a,
M. Solanas^b,
E. Escrich^b

^aServicio de Oncología Médica.
Hospital Universitario 12 de Octubre.
Madrid.

^bDepartamento de Biología Celular,
Fisiología e Inmunología. Facultad de
Medicina. Universidad Autónoma de
Barcelona.

El oncogén *HER2* como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en cáncer de mama

The *HER2* oncogene as an example of diagnostic and therapeutic progress in breast cancer

INTRODUCCIÓN

El oncogén *HER2* fue descrito por primera vez en 1984 en tumores cerebrales inducidos por carcinógeno en ratas. Este oncogén se llamó *neu* y tenía la característica de presentar una mutación en la zona que correspondía al dominio de transmembrana de la proteína. En 1985 se identificó el mismo gen en células de cáncer humanas. El gen se llamó *erbB-2* y pronto se hizo evidente que la alteración genética predominante en tumores humanos era la amplificación del gen (y no mutaciones puntuales). El oncogén *HER2* (*erbB-2/neu*) codifica una proteína de 185 kDa que se localiza en la membrana de las células y que tiene estructura de receptor de factores de crecimiento, presentando un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa. La amplificación de *erbB-2* produce una sobreexpresión de la oncoproteína, que pasa de los niveles normales de 30.000 receptores por célula hasta niveles de 1 millón de receptores por célula. La transmisión de señales de la oncoproteína *HER2* se produce mediante la formación de dímeros entre *HER2* y otros receptores de factores de crecimiento, sobre todo

*HER3*¹, pero también *HER4* y, en menor medida, *HER1*: los factores de crecimiento, sobre todo la Heregulina y el factor de diferenciación de *neu*², al unirse a *HER3*, inducen la formación de un dímero *HER3/HER2*, iniciándose la cascada de transmisión de señales al núcleo a partir del dominio tirosina-quinasa¹. A continuación, se activan los genes específicos y se estimula la división celular.

El oncogén *HER2* se encuentra amplificado (y sobreexpresado a niveles muy altos) en aproximadamente el 20% de los carcinomas de mama¹. También está amplificado en un porcentaje similar de otros adenocarcinomas humanos, como los cánceres de ovario, páncreas, vejiga o pulmón. La amplificación del oncogén *HER2* puede analizarse mediante Southern blot o FISH. La sobreexpresión de la oncoproteína *HER2* puede determinarse utilizando técnicas de inmunohistoquímica, Western blot o ELISA. Además, el dominio extracelular de *HER2* puede hallarse en el suero de los pacientes con metástasis mediante ELISA.

Dos de las aplicaciones clínicas de *HER2* son su valor pronóstico y su valor predictivo. En este artículo se revisarán las evidencias de que *HER2* puede utilizarse como factor pronóstico y como factor predictivo en cáncer de mama (fig. 1). Una tercera aplicación de *HER2* es su papel como diana terapéutica para los nuevos tratamientos que están dirigidos contra la proteína o el propio gen *HER2*^{1,3}. En la última parte del artículo se discutirá el papel de *HER2* como diana terapéutica y se mostrará la utilidad del anticuerpo monoclonal dirigido contra *HER2* llamado trastuzumab (Herceptin), junto con otros fármacos nuevos para el cáncer de mama.

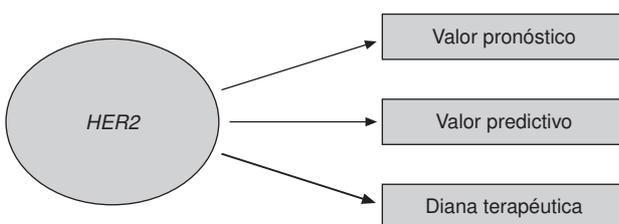


Fig. 1. Utilidad clínica de *HER2*.

TABLA 1
RELACIÓN ENTRE EL VALOR PRONÓSTICO DE *HER2* Y EL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE *HER2*

Método	Años de publicación	Número de estudios/pacientes	Número con valor pronóstico de <i>HER2</i> (%)
Southern blot/slot blot	1987-1993	12/2.736	8 (80%)
Inmunohistoquímica	1988-1997	30/11.630	26 (87%)
ELISA/Western blot	1990-1997	6/1.075	6 (100%)
FISH	1996-1998	4/730	4 (100%)

Modificada de Ross y Fletcher¹.

HER2 COMO FACTOR PRONÓSTICO

Un factor pronóstico es aquel que, independientemente del tratamiento que se utilice, indica una evolución clínica mejor o peor. Un ejemplo tradicional de factor pronóstico en cáncer de mama primario es la afectación ganglionar axilar. Tras la operación quirúrgica, las pacientes con afectación ganglionar tienen un pronóstico peor que las pacientes sin afectación ganglionar. La afectación ganglionar tiene valor pronóstico en las pacientes que no reciben tratamiento adyuvante, y sigue teniéndolo en las pacientes que se tratan con quimioterapia u hormonoterapia adyuvantes. En el cáncer metastásico de mama se utilizan diversos indicadores pronósticos, entre ellos el lugar de afectación metastásica inicial (visceral frente a partes blandas) o el número de localizaciones metastásicas.

La primera utilidad clínica descrita del oncogén *HER2* fue su valor pronóstico. Muy poco tiempo después de la descripción inicial del oncogén, Slamon halló que, en 189 casos de cáncer de mama primario en los que se determinó la amplificación del gen *HER2* mediante Southern blot, las pacientes con más de 3 copias del *HER2* tenían un tiempo a la recaída y una supervivencia global peores que las pacientes sin amplificación³. En una revisión reciente se han analizado 47 estudios clínicos en los que se evaluó la expresión de *HER2* en más de 15.000 pacientes¹. En 41 de los estudios se confirmó que *HER2* se asociaba a un valor pronóstico adverso. El método de estudio y el año de publicación tuvieron importancia en los resultados. Mientras que los estudios de Southern blot, los más antiguos, hallaron valor pronóstico a *HER2* en el 80% de los casos, los estudios de FISH, más modernos, han hallado una asociación pronóstica en el 100% de los casos (tabla 1). En una serie propia de 412 pacientes con cáncer de mama en las que *HER2* se evaluó con ELISA, observamos también que la sobreexpresión de *HER2* tenía valor pronóstico adverso (fig. 2).

Los resultados de los diversos estudios no son uniformes debido a que existen variaciones importantes en los métodos de determinación analítica y en los métodos de la evaluación clínica de las pacientes. En la detección de *HER2* mediante inmunohistoquímica, la técnica más frecuentemente empleada, se han utilizado multitud de anticuerpos monoclonales de reactividad diversa con *HER2*⁵, y muestras de tumores de mama con diferentes procedimientos de fijación y conservación. Por otro lado, muchos de los estudios publicados tienen períodos de seguimiento relativamente cortos, o emplean grupos de pacientes en las que el número de eventos es pequeño para hallar diferencias (como en muchos de los estudios en pacientes sin afectación ganglionar).

En la actualidad existe el consenso de que la expresión de *HER2* en carcinomas de mama tiene un valor pronóstico adverso, que en general es de menor importancia que el valor pronóstico que confieren indicadores clásicos como el tamaño tumoral o el número de ganglios axilares afectados. Una de los posibles motivos por los que *HER2* tiene valor pronóstico es que tenga relación con una resistencia a los tratamientos que se administran. En el siguiente apartado se discutirá el papel de *HER2* como factor predictivo.

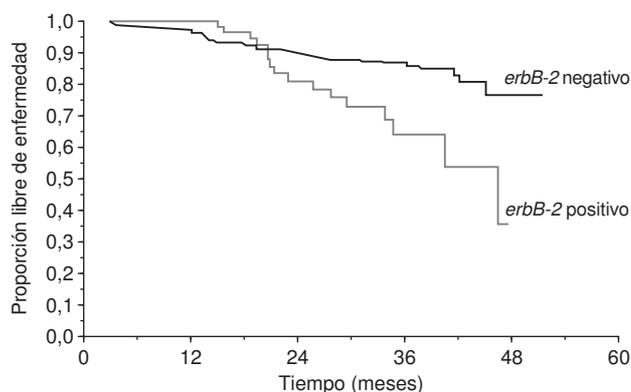


Fig. 2. Valor pronóstico de *HER2* (serie Hospital Universitario 12 de Octubre).

HER2 COMO FACTOR PREDICTIVO

La predicción de la eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer, como la quimioterapia o la hormonoterapia, es otra de las posibles aplicaciones de *HER2*. Varios estudios han investigado la relación entre la expresión de *HER2* y la respuesta al tratamiento en cáncer de mama. Algunos de estos estudios han evaluado la eficacia del tratamiento adyuvante y otros la eficacia del tratamiento en la enfermedad metastásica. Los estudios adyuvantes emplean, como parámetros de estudio, variables dependientes del tiempo (como la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global), mientras que los estudios en enfermedad avanzada pueden además evaluar directamente la respuesta clínica objetiva (lo cual también ocurre con los tratamientos preoperatorios, en los que se valora la respuesta en el cáncer primario de mama). En los estudios adyuvantes se puede realizar solamente una estimación indirecta de la relación entre la eficacia del tratamiento y la expresión de *HER2*, mientras que los estudios en cáncer metastásico permiten estudiar directamente esta asociación y, por tanto, son metodológicamente más apropiados.

Se ha estudiado por separado la relación entre *HER2* y la eficacia de los tratamientos de hormonoterapia y de quimioterapia.

HER2 y tratamiento hormonal

Se ha descrito que, en cáncer de mama, existe una regulación cruzada entre los sistemas de crecimiento relacionados con el receptor de estrógeno y *HER2*⁶. La Heregulina, el factor de crecimiento relacionado con

HER2, induce una disminución de los niveles de receptor estrogénico, y modula su actividad en células de cáncer de mama^{7,8}. La transfección del oncogén *HER2* en células de cáncer de mama dependientes de estradiol hace que adquieran la independencia hormonal *in vitro* e *in vivo*^{9,10}. Por otra parte, el estradiol reduce la expresión de *HER2 in vitro*, mientras que el tamoxifeno la induce¹¹. Por tanto, parece que los tratamientos dirigidos contra el receptor de estrógeno (como el tamoxifeno) estimularían el sistema de *HER2*. Los tratamientos contra *HER2* (como el anticuerpo monoclonal Herceptin), por su parte, estimulan el sistema de crecimiento relacionado con el receptor de estrógeno.

Algunos estudios han mostrado que la eficacia del tamoxifeno adyuvante en el cáncer de mama operado se ve comprometida en las pacientes con expresión de *HER2*^{12,13}. Otros estudios no han observado esta asociación¹⁴, aunque en un contexto metodológico cuestionable.

Se han publicado 7 estudios en cáncer avanzado de mama que correlacionan la eficacia del tratamiento hormonal con la expresión de *HER2*. Cinco de estos estudios han evaluado *HER2* mediante inmunohistoquímica en muestras tumorales, y 2 estudios han estudiado los niveles de *HER2* en el suero mediante ELISA. En la tabla 2 se muestran de manera resumida¹⁵⁻²¹. Aunque algunas de estas investigaciones se han realizado en el marco de estudios prospectivos de tratamiento, ninguno de los estudios ha realizado las determinaciones de *HER2* de manera prospectiva, y por lo tanto la interpretación está sujeta al influjo de posibles sesgos. Es destacable que todos los estudios clínicos, salvo uno, han mostrado que existe una asociación entre la expresión de *HER2* y la eficacia de los tratamientos hormonales.

TABLA 2
EFICACIA DEL TRATAMIENTO HORMONAL EN CÁNCER AVANZADO DE MAMA EN RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE *HER2*

Referencia	Nº	Muestra	Fármaco	Respuesta clínica		Significación de positividad
				HER2 negativo	HER2 positivo	
Wright	72	Tumor	Tamoxifeno	37 %	7 %	Peor respuesta
Newby	34	Tumor	Tamoxifeno	40 %	0 %	Peor respuesta
Houston	241	Tumor	Tamoxifeno y otros	56 %	38 %	Peor respuesta
Klijn*	292	Tumor	Tamoxifeno	43 %	12 %	Peor respuesta
Elledge	205	Tumor	Tamoxifeno	57 %	54 %	No
Leitzel	300	Suero	Megestrol o Fadrozol	41 %	21 %	Peor respuesta
Yamauchi	122	Suero	Droloxifeno	56 %	10 %	Peor respuesta
Colomer	275	Suero	Letrozol	—	—	Pendiente

*Datos no publicados.

La diferencia entre la respuesta clínica al tamoxifeno es, en general, dramática, y en varios de los estudios clínicos la eficacia de la hormonoterapia en las pacientes con sobreexpresión de *HER2* es de la mitad o menos de la mitad que en las pacientes sin sobreexpresión de *HER2*. Recientemente, un grupo cooperativo español en el que han participado 40 centros, ha finalizado el reclutamiento de más de 275 pacientes en un estudio prospectivo de cohortes que definirá el valor de *HER2* en las pacientes tratadas con letrozol.

HER2 y quimioterapia

Los primeros estudios publicados sobre la relación entre *HER2* y la resistencia a la quimioterapia se realizaron en muestras de pacientes tratadas de manera adyuvante con quimioterapia tipo CMF^{13,22-24}. Estos estudios demostraron que el CMF es menos eficaz en las pacientes que tienen sobreexpresión de *HER2* respecto a las pacientes sin sobreexpresión. Una publicación reciente ha mostrado que la expresión de *HER2* indica un peor pronóstico en todas las pacientes, se traten con quimioterapia o no. En este estudio, en el que se aleatorizaron 274 pacientes tras la cirugía a recibir CMF o no, la supervivencia mediana de las pacientes tratadas con CMF fue de 6,1 años en las pacientes *HER2* positivo frente a 21,7 años en las *HER2* negativo. En el grupo control, la supervivencia mediana fue de 4,4 años en las *HER2* positivo y de 7,3 años en las *HER2* negativo²⁵. Estas diferencias fueron muy significativas. Otra interpretación de estos mismos datos muestra que el CMF produjo un be-

neficio terapéutico en todas las pacientes, aunque fue más marcado en las pacientes *HER2* negativo. Por tanto, parece que el tratamiento con CMF no debe dejar de emplearse en el contexto del tratamiento adyuvante del cáncer de mama en función de *HER2*.

Un estudio adyuvante del grupo cooperativo americano CALGB sugirió la posible relación entre la expresión de *HER2* y la sensibilidad a la adriamicina²⁶. Esta investigación se realizó en 397 pacientes de las 1.572 que participaron en un estudio que comparaba tres dosis de FAC (estándar, dosis bajas y dosis muy bajas). Los resultados de esta evaluación parcial de los casos sugirieron que en las pacientes *HER2* positivo, el tratamiento con dosis muy bajas de FAC era inferior al tratamiento con dosis estándar. Esta diferencia no se observó en los casos *HER2* negativo. El mismo grupo de investigación, sin embargo, no ha validado estos resultados en una muestra independiente de 595 pacientes extraídas del mismo estudio clínico, aunque aparentemente esto se debió a un desajuste de factores pronósticos²⁷. La interpretación de los resultados se complica aún más debido a que 1.012 pacientes recibieron tamoxifeno de una manera no reglada. Otro estudio de quimioterapia adyuvante con adriamicina ha sugerido también que puede existir una relación entre la sensibilidad a la adriamicina y la expresión de *HER2*²⁸. Sin embargo, no puede afirmarse con estos datos sobre CMF y CAF, que la expresión de *HER2* pueda ni deba ser un factor de selección de los fármacos de quimioterapia en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama.

Las investigaciones realizadas en cáncer de mama primario o metastásico sugieren que *HER2* puede tener

TABLA 3
EFICACIA DE LA QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER AVANZADO O PRIMARIO DE MAMA EN RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE *HER2*

Referencia	Nº	Muestra	Fármaco	Respuesta clínica		Significación de positividad
				<i>HER2</i> negativo	<i>HER2</i> positivo	
<i>Cáncer primario de mama</i>						
Rozan	167	Tumor	FAC	20 %	31 %	No
Makris	90	Tumor	Mitoxantrona, metotrexate	93 %	57 %	Peor respuesta
Vargas-Roig	60	Tumor	FAC, FEC	62 %*	11 %*	Peor respuesta
<i>Cáncer metastásico de mama</i>						
Seidman	126	Tumor	Taxanos	39 %	59 %	Mejor respuesta
Wright	66	Tumor	Mitoxantrona	58 %	50 %	No
Fehm	80	Suero	CNF	59 %	29 %	Peor respuesta
Colomer	55	Suero	Taxol, adriamicina	78 %	64 %	Peor respuesta
Colomer**	41	Suero	Taxol, gemcitabina	85 %	40 %	Peor respuesta

*Expresado en porcentaje libre de enfermedad; **datos publicados en los Proceedings de ASCO 2000 (#373).

valor predictivo de resistencia a la quimioterapia. En la tabla 3 se resumen los resultados de diversos estudios clínicos²⁹⁻³⁷. En general, las investigaciones muestran que la expresión de *HER2* se asocia con la resistencia al tratamiento de quimioterapia. Solamente un estudio retrospectivo que se realizó en pacientes tratadas con taxanos sugiere lo contrario. La asociación de *HER2* con la resistencia a la quimioterapia es especialmente notable en tres estudios que se han realizado en pacientes con cáncer avanzado de mama, en las que se ha evaluado la expresión del dominio extracelular de *HER2* (*HER2 ECD*), y que han mostrado que la eficacia de la quimioterapia puede verse reducida a menos de la mitad en los casos con *HER2 ECD* positivo. En nuestros ensayos clínicos, la relación entre *HER2 ECD* y la eficacia del tratamiento era uno de los objetivos de los estudios descritos en el texto original del protocolo, y la extracción de sangre para determinar *HER2 ECD* se realizó de manera prospectiva. Además de mostrar la reducción significativa en el porcentaje de respuestas objetivas, también hemos observado que, en las pacientes que responden, la duración de la respuesta es significativamente inferior en los casos *HER2* positivos (7,5 meses frente a 11 meses, $p = 0,03$)³⁷.

La especificidad de la relación entre *HER2* y la quimiorresistencia, sin embargo, puede no ser una relación causa-efecto. Se ha descrito que la resistencia a la quimioterapia asociada a la sobreexpresión de *HER2* es independiente del gen de multiresistencia farmacológica *mdr-1*³⁸. Además, estudios en animales empleando células transfectadas con *HER2* han sugerido que la falta de respuesta a la quimioterapia de los tumores *HER2* positivo está relacionada con la rápida proliferación de las células tumorales que sobreviven a la quimioterapia, y no con una resistencia intrínseca a la quimioterapia³⁹. Confirmando estas observaciones, una investigación reciente, en la que se midieron los índices apoptóticos en carcinomas de mama primarios antes y 24 horas después de recibir un régimen de quimioterapia con adriamicina, ha demostrado que los tumores *HER2* positivo tienen una respuesta apoptótica reducida a la quimioterapia. Por tanto, la expresión de *HER2* puede no indicar una resistencia pleiotrópica a la quimioterapia, sino más bien representar una ventaja para el crecimiento celular, al permitir el recrecimiento de las células tumorales tras el tratamiento⁴⁰.

HER2 COMO DIANA TERAPÉUTICA

De una serie de más de 100 anticuerpos monoclonales que se generaron contra *HER2* mediante la inmunización de ratones con células NIH3T3 que expresaban niveles elevados del producto del oncogén *HER2*²⁹, uno de ellos se seleccionó para su caracterización posterior. Este anticuerpo se llamó 4D5, y reaccionaba con el dominio extracelular de la proteína *HER2*. El anticuerpo 4D5 reconocía específicamente *HER2* y no reaccionaba de manera cruzada con el receptor de EGF o con otras proteínas.

El anticuerpo de origen murino 4D5 producía una inhibición del crecimiento de tipo citostático en las células SK-BR-3 y otras células de adenocarcinoma humano que sobreexpresaban *HER2*⁴². Resultados parecidos se vieron en ensayos a agar⁴³. El anticuerpo 4D5 sensibilizó a células de cáncer de mama con sobreexpresión de *HER2* a los efectos citotóxicos del TNF- α ⁴². La combinación del agente quimioterápico cisplatino con 4D5^{44,45}, así como la combinación del antiestrógeno tamoxifeno con 4D5⁴⁶ resultaron en una potenciación del efecto inhibitor del crecimiento del 4D5 en células de cáncer de mama.

En estudios preclínicos, el anticuerpo 4D5 inhibió el crecimiento de células de cáncer de mama con sobreexpresión de *HER2* en ratones desnudos⁴⁵. Se observó un aumento sinérgico en su eficacia cuando el 4D5 se administraba conjuntamente con cisplatino⁴⁵, lo cual era consistente con los estudios *in vitro*. En otro estudio, el anticuerpo 4D5 inhibió el crecimiento de células de cáncer gástrico que sobreexpresaban *HER2* implantadas en ratones SCID. El anticuerpo 4D5 también inhibió la aparición de metástasis pulmonares y aumentó la supervivencia en estos ratones SCID⁴⁷.

Mecanismo de acción del anticuerpo 4D5

El anticuerpo 4D5 regula negativamente los niveles de la proteína *HER2*⁴² y también inhibe el crecimiento de las células de cáncer de mama que sobreexpresan *HER2*. Además de estos efectos antagonistas, el 4D5 tiene también algunos efectos agonistas^{48,49}. El tratamiento de células con el anticuerpo resulta en la internalización de *HER2* y del anticuerpo y la estimulación de la fosforilación de *HER2*⁴⁸. También se fosforila en tirosina una proteína de 56 kDa⁴⁹. La exposición a corto plazo a 4D5 produce muchos efectos celulares, entre los que se encuentran la estimulación de la hidrólisis de los lípidos inositol como se demuestra por los niveles in-

tracelulares aumentados de polifosfatos inositol (InsP) y diacilglicerol⁴⁸. También ocurren el aumento de actividad de fosfatidil inositol 4-quinasa y de inositol 1,4,5-trifosfato 3'-quinasa⁴⁹. También se han observado la inducción del RNAm de *c-fos*⁴⁹, y de *RAR- α* ⁵⁰. La exposición más larga al anticuerpo produce una disminución de la fosforilación de HER2⁵¹ y la regulación negativa de la señalización de HER2⁴⁸, así como una inducción de la transcripción de las moléculas de adhesión cadherina-E y la subunidad B₂ de la integrina, bloqueando además la interacción de HER2 con la proteína GRB2/Sem5⁵². El tratamiento de células con sobreexpresión de *HER2* con 4D5 resulta en una reducción dosis-dependiente de la producción de la proteína VEGF⁵³, lo cual sugiere que el 4D5 puede inhibir la angiogénesis.

Humanización del anticuerpo murino 4D5

Al inhibir el anticuerpo 4D5 específicamente el crecimiento de las líneas tumorales que sobreexpresaban *HER2 in vitro e in vivo* en ratones desnudos, se pensó que el 4D5 era potencialmente útil para ser empleado en la clínica en carcinomas que tuvieran sobreexpresión de *HER2*.

Un problema importante para el uso clínico de los anticuerpos monoclonales murinos es la respuesta inmunitaria que produce anticuerpos humanos anti-ratón. Para disminuir la respuesta inmune humana a los anticuerpos de ratón, y para potenciar la actividad citotóxica mediada por el anticuerpo, una posible solución es construir anticuerpos quiméricos mediante el acoplamiento de los dominios variables murinos de unión al antígeno (V) a los dominios humanos constantes (C)²³⁻²⁵. Los isotipos de los dominios humanos C pueden variarse para dirigir al anticuerpo quimérico en la actividad citotóxica mediada por el anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Sin embargo, un 30% de las moléculas quiméricas siguen siendo secuencias murinas, por lo que en la actualidad, la humanización de los anticuerpos monoclonales murinos, con la retención de la mayor parte de su actividad de unión al antígeno es un procedimiento de rutina²⁶. Los anticuerpos monoclonales murinos recombinantes humanizados se construyen habitualmente mediante el trasplante de la región determinante complementaria (CDR), la cual comprende las partes hipervariables implicadas en la unión al antígeno, del anticuerpo murino a los dominios humanos^{47,48,50}.

El anticuerpo humanizado anti-HER2, rhuMAb HER2 (Herceptin) tiene una afinidad mayor por el dominio extracelular de HER2 que el anticuerpo murino original 4D5 (Kd = 0,1 nM), y es más potente que el 4D5 en el bloqueo de la proliferación de células de cáncer de mama con sobreexpresión de *HER2*⁵⁴⁻⁵⁵. Tanto el anticuerpo quimérico 4D5 como el 4D5 "humanizado", en combinación con células mononucleares humanas, han mostrado respuestas citotóxicas dependientes de anticuerpo (ADCC), que siguen a los niveles de expresión de *HER2*⁴³.

Estudios preclínicos con 4D5 humanizado

Una manera para optimizar la eficacia de los anticuerpos anti-HER2 es administrándolos en combinación con citoquinas, radioterapia, quimioterapia o tratamientos hormonales. Estudios con citoquinas como el interferón alfa, interferón gamma y TNF- α han demostrado un aumento de los efectos inhibidores del crecimiento de los anticuerpos anti-HER2⁵⁶. Un estudio reciente ha empleado la combinación del anticuerpo anti-HER2 con un inhibidor de la proteasa lisosómica y ha mostrado una inhibición del crecimiento mayor que el anticuerpo solo en la línea celular SK-Br-3, que sobreexpresa *HER2*, pero no en la línea MCF-7, que expresa niveles bajos de *HER2*⁵⁶. Otros estudios con rhuMAb HER2 han mostrado un aumento en la actividad anti-tumoral del cisplatino en xenotrasplantes de cáncer humano⁵⁷. El paclitaxel y la adriamicina son dos de los agentes quimioterápicos más activos para el tratamiento del cáncer de mama. El rhuMAb HER2 aumenta los efectos citotóxicos del paclitaxel de una manera dosis-dependiente en cultivos de células de cáncer que sobreexpresan *HER2*, y en xenotrasplantes de cáncer de mama en ratones desnudos. El rhuMAb HER2 también aumenta, aunque en un grado menor, la actividad antitumoral *in vivo* de la adriamicina⁵⁸.

El Herceptin normalmente no aumenta su eficacia en modelos celulares al incrementar su concentración en el medio de cultivo por encima de 10 μ g/ml. Estudios preliminares de nuestro laboratorio demuestran que la adición de algunos ácidos grasos como el alfa-linolénico al medio de cultivo produce una potenciación de la eficacia del Herceptin, que es dependiente de la dosis de Herceptin (fig. 3). La asociación de Herceptin y ácido alfa-linolénico posiblemente afecta a los mecanismos fisiológicos de internalización del complejo anticuerpo-HER2, y merecerá un desarrollo más amplio en el futuro.

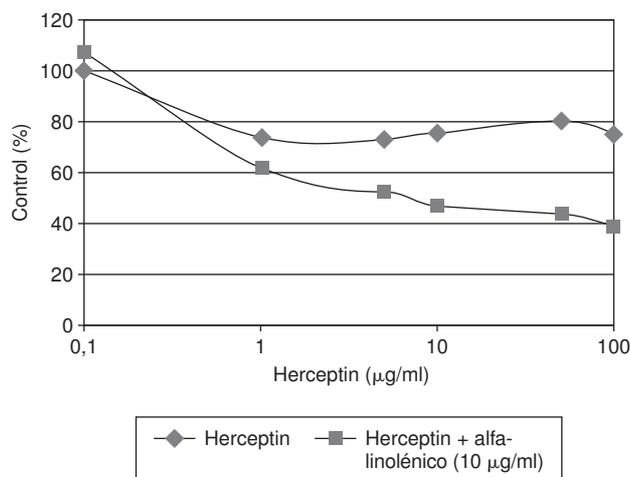


Fig. 3. Potenciación del efecto inhibitorio del crecimiento del Herceptin por el ácido alfa-linolénico en células de cáncer de mama con sobreexpresión de *HER2*.

Herceptin. Estudios clínicos

El Herceptin (Trastuzumab) fue aprobado por la FDA norteamericana en septiembre de 1998. Es un anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido contra el dominio extracelular de la oncoproteína *HER2* (*HER2*). El Trastuzumab es una IgG1, que contiene las regiones de determinación antigénica del anticuerpo murino 4D5, que son las que se unen a *HER2*, y el resto es componente humano.

El Herceptin está indicado para su uso como agente único en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína *HER2*, y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para la enfermedad avanzada. El Herceptin también se aprobó, en combinación con taxol, para el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico de mama cuyos tumores sobreexpresan la proteína *HER2* y que no han recibido quimioterapia para la enfermedad avanzada.

El Herceptin ejerce su acción antineoplásica mediante una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), que se ejerce con preferencia en las células que sobreexpresan *HER2*. Además, tiene un efecto citostático directo, que ocurre en las células que sobreexpresan *HER2*.

Herceptin como tratamiento de segunda línea

El Herceptin es un tratamiento útil en el cáncer avanzado de mama que sobreexpresa *HER2*. Un estudio clínico multicéntrico en 222 pacientes que habían recibido uno o dos regímenes previos, ha demostrado que la respuesta objetiva, evaluada por observadores independientes, fue del 15%⁶². La duración de las respuestas fue de 8 meses. Solamente 2 pacientes abandonaron el tratamiento debido a efectos secundarios. Se detectó una reducción asintomática de la fracción de eyección en 6 pacientes, y sintomática en tres.

Herceptin como tratamiento de primera línea

Se ha realizado un ensayo clínico de Herceptin en primera línea de cáncer metastásico de mama. En este estudio multicéntrico de fase II se trataron 114 pacientes con cáncer de mama avanzado y sobreexpresión de *HER2*. La mayoría de las pacientes habían recibido quimioterapia adyuvante y tenían enfermedad visceral⁶³.

Las pacientes se randomizaron a recibir bien la dosis estándar de Herceptin (2 mg/kg/semana, precedido de una dosis de 4 mg/kg), o bien una dosis mayor (4 mg/kg/semana, precedido de una dosis de 8 mg/kg). El tratamiento con las dosis más altas se asoció a una mayor incidencia de efectos secundarios, aunque la mayoría fueron leves. Dos pacientes desarrollaron cardiotoxicidad. La incidencia de leucopenia, trombopenia o estomatitis fue menor del 1%. El índice de respuestas con Herceptin en primera línea fue de 26%, y un 10% adicional de pacientes presentó una estabilización de más de 6 meses. No hubo diferencias de eficacia entre la dos dosis de Herceptin.

Este estudio ha demostrado que el Herceptin en primera línea de tratamiento tiene una eficacia mayor que en segunda línea, y que la toxicidad es leve y manejable.

Herceptin en combinación con quimioterapia

Un estudio multicéntrico randomizado⁶⁵ evaluó Herceptin en combinación con quimioterapia en el tratamiento de primera línea del cáncer metastásico de mama. Las pacientes recibieron adriamicina (o epirrubicina) más ciclofosfamida (AC) si no habían recibido previamente antraciclina en el tratamiento postoperatorio (aproximadamente el 60% de las pacientes), o bien taxol (175 mg/m²). Las pacientes se randomizaron a reci-

TABLA 4
RESULTADOS DEL ESTUDIO MULTICÉNTRICO DE HERCEPTIN CON QUIMIOTERAPIA

	Pacientes	Respuestas (%)	Tiempo al fallo del tratamiento (meses)
Quimioterapia	234	29	4,5
Quimioterapia + Herceptin	235	45**	7,2*
Taxol	96	15	2,5
Taxol + Herceptin	92	38**	6,7*
AC	138	38	5,7
AC + Herceptin	143	50	7,6*

*p < 0,001 por *log-rank*; **p < 0,001 por χ^2 . AC: adriamicina/ciclofosfamida.

bir Herceptin (2 mg/kg/semana, precedido por una dosis de 4 mg/kg), o no tratamiento con Herceptin. Un comité independiente evaluó la eficacia del tratamiento. Se observaron unos índices de respuesta más altos con la combinación de Herceptin y quimioterapia (tabla 4). La diferencia en la eficacia con la combinación fue más marcada en el caso del taxol. El uso de Herceptin más taxol produjo un índice de respuestas del 38%, frente al 15% obtenido con taxol solo, mientras que la combinación de Herceptin más AC produjo un 50% de respuestas, frente al 38% de AC solo. Estos hallazgos sugieren una interacción entre el Herceptin y la quimioterapia, especialmente el taxol. El tiempo al fallo del tratamiento fue más largo en las pacientes tratadas con Herceptin más quimioterapia que con quimioterapia sola. Se observó un aumento en la toxicidad cardíaca en las pacientes que se trataron con Herceptin más AC, como se mostrará más adelante.

Por tanto, la administración simultánea de Herceptin más quimioterapia es más activa que la quimioterapia sola en el cáncer de mama avanzado.

Predictores de respuesta

El índice de respuestas al Herceptin fue mayor en las pacientes con expresión 3+, que eran aproximadamente el 75% de los casos, que en las 2+. En los ensayos de Herceptin como agente único en primera y segunda línea, la eficacia fue del 31% y del 17% en las pacientes 3+, mientras que fue del 0% y del 4% en las pacientes 2+, respectivamente. Esto indica que una selección más restrictiva de los casos puede optimizar la eficacia del Herceptin (tabla 5).

Toxicidad

Los efectos secundarios más frecuentes del Herceptin son las reacciones en la infusión, que consisten en fiebre y escalofríos y ocurren en el 30% de las pacientes, sobre todo en el primer ciclo. Estas reacciones son generalmente leves o moderadas y se tratan con paracetamol o difenhidramina. El 25% de las pacientes tratadas con Herceptin como agente único tuvieron diarrea. La toxicidad hematológica es rara (1%). El uso de Herceptin solo no ha producido toxicidades grado 4.

La incidencia de disfunción cardíaca en pacientes tratadas con Herceptin como agente único fue del 4,7%. La mayoría de estas pacientes tenían factores de riesgo, como tratamiento previo con antraciclinas o irradiación de la pared torácica. Cuando el Herceptin se administró con antraciclinas, la incidencia de cardiotoxicidad fue del 27%.

Recientemente, se ha presentado una evaluación de la toxicidad cardíaca del Herceptin⁶⁷, realizado por un Comité de Evaluación y Revisión Cardíaca (CREC). En

TABLA 5
EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE *HER2* EN LA EFICACIA DEL HERCEPTIN (EN%)

	Nº	Expresión de <i>HER2</i> en el tumor primario	
		++	+++
Herceptin solo, segunda línea	222	4%	17%
Herceptin solo, primera línea	113	0%	31%
Herceptin + Paclitaxel	89	21%	44%
Herceptin + AC	146	40%	53%

AC: adriamicina/ciclofosfamida.

total, se analizaron 1.024 pacientes que recibieron Herceptin en distintos ensayos. Se observó algún grado de disfunción cardíaca en 97 pacientes (9,5%). La disfunción cardíaca fue más frecuente cuando se combinó Herceptin con quimioterapia. La asociación de Herceptin con AC fue especialmente cardiotoxica, y fue también más cardiotoxica que AC solo. La mayoría de pacientes respondieron al tratamiento médico estándar.

Se realizó un análisis multivariante para identificar los factores de riesgo de desarrollar cardiotoxicidad. Los factores de riesgo que se identificaron fueron edad mayor de 60 años, y uso concomitante de quimioterapia con antraciclinas. Ni el tratamiento previo con antraciclinas ni la dosis acumulada de antraciclinas previas fueron factores de riesgo independientes.

En las pacientes que recibieron Herceptin como agente único, la incidencia de disfunción cardíaca evaluada por el CREC fue del 4%. La toxicidad cardíaca de Herceptin en las pacientes del estudio de primera línea, sin embargo, fue de menos del 2%, lo cual puede reflejar una exposición menor a antraciclinas previas.

CONCLUSIÓN

La expresión del oncogén *HER2* en cáncer de mama operado se asocia con un peor pronóstico de las pacientes. Esto se debe en parte a que las pacientes que sobreexpresan *HER2* tienen una resistencia a los tratamientos hormonales y quizá también a la quimioterapia. Aunque en este momento no se pueden efectuar recomendaciones terapéuticas definitivas basadas en los datos de los que se disponen, sí debe recomendarse la participación de las pacientes con sobreexpresión de *HER2* en ensayos clínicos que investiguen el uso de los tratamientos estándar con o sin la adición de tratamientos adyuvantes dirigidos contra *HER2*, como el anticuerpo monoclonal Herceptin.

El Herceptin es un tratamiento nuevo y extremadamente prometedor para el tratamiento del cáncer metastásico de mama, solo o en combinación con quimioterapia, que pronto se estudiará además en el tratamiento adyuvante del cáncer de mama operado y en combinación con otros tratamientos en el cáncer metastásico de mama, como fármacos de tipo hormonal. Es el primer tratamiento contra el cáncer de mama que llega a la clínica desde el laboratorio, en un plazo de tiempo relativamente breve, y supone la primera demostración de que la inversión en biología molecular y ciencias básicas que se realizaron en los años ochenta ha valido la pena.

RESUMEN

La amplificación del oncogén *HER2* fue descrita en humanos en 1985; detectándose en el 20-30% de cánceres de mama. En 1987 se describió el valor pronóstico de la amplificación en cáncer de mama, y más tarde de la sobreexpresión del RNAm y de la proteína. Dos de las aplicaciones clínicas actuales del oncogén *HER2* son el valor pronóstico y el valor predictivo de la sobreexpresión del gen en cáncer de mama. Una tercera aplicación de la oncoproteína *HER2* es su papel como diana terapéutica para los nuevos tratamientos que están dirigidos contra la proteína *HER2*.

En la actualidad existe el consenso de que la expresión de *HER2* en carcinomas de mama tiene un valor pronóstico adverso, aunque en general es de menor importancia que el valor pronóstico que confieren indicadores clásicos como el tamaño tumoral o el número de ganglios axilares afectados.

Respecto al valor predictivo de *HER2*, todos los estudios clínicos realizados, salvo uno, han mostrado que existe una asociación entre la expresión de *HER2* y la eficacia de los tratamientos hormonales. La diferencia entre la respuesta clínica al tamoxifeno u otros tratamientos endocrinos es, en general, muy marcada, y en varios de los estudios clínicos la eficacia de la hormonoterapia en las pacientes con sobreexpresión de *HER2* es de la mitad o menos de la mitad que en las pacientes sin sobreexpresión de *HER2*. Las investigaciones realizadas en cáncer de mama primario o metastásico sugieren que *HER2* puede tener valor predictivo de resistencia a la quimioterapia. La asociación de *HER2* con la resistencia a la quimioterapia es especialmente notable en tres estudios que se han realizado en pacientes con cáncer avanzado de mama, en las que se ha evaluado la expresión del dominio extracelular de *HER2* en el suero, y que han mostrado que la eficacia de la quimioterapia puede verse reducida a menos de la mitad en los casos *HER2* positivos. Aunque en este momento no se pueden efectuar recomendaciones terapéuticas definitivas basadas en los datos de los que se disponen, sí debe recomendarse la participación de las pacientes con sobreexpresión de *HER2* en ensayos clínicos que investiguen el uso de los tratamientos estándar con o sin la adición de tratamientos dirigidos contra *HER2*, como el anticuerpo monoclonal Herceptin.

El valor terapéutico de *HER2* está relacionado con el anticuerpo monoclonal Herceptin, que de momento es el único tratamiento dirigido específicamente contra *HER2*. Herceptin ha obtenido respuestas como fármaco único en el 18 % de las pacientes con cáncer de mama avanzado con sobreexpresión de *HER2* y múltiples tratamientos previos y, en combinación con quimioterapia, ha obtenido respuestas clínicas en el 50 % de los casos en primera línea. La baja toxicidad de Herceptin y la facilidad para su combinación con otros fármacos está generando un número muy elevado de estudios clínicos.

REFERENCIAS

- Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998; 3(4): 237-52.
- Lupu R, Colomer R, Zugmaier G, Sarup J, Shepard M, Slamon D, Lippman ME. A ligand for the erbB-2 oncogene interacts directly with the EGF receptor and p185^{erbB-2}. *Science* 1990; 249: 1552-55.
- Colomer R, Lupu R, Bacus S, Gelmann EP. erbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cell lines with erbB-2 oncogene amplification. *Br J Cancer* 1994; 70: 819-25.
- Slamon DL, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of her-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 2771-7.
- Colomer R, Saceda M, Martin BM, Lippman ME, Lupu R. Cross-regulation of erbB-2 oncoprotein and estrogen receptor by estrogen and erbB-2 ligands (gp30/p75). *Proceedings 83rd meeting of the American Association of Cancer Research*. San Diego, California, Mayo 1992. (poster).
- Saceda M, Grunt TW, Colomer R, Lippman ME, Lupu R, Martin MB. Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* 1996; 137(10): 4322-30.
- Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G, Harant H, Huber H, Dittrich C. Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 1995; 63: 560-7.
- Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 85-95.
- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10: 2435-46.
- Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R. The antiestrogenic effects of an erbB-2 ligand on breast cancer cell growth and on erbB-2 expression. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: A3303 (Meeting abstract).
- Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-8.
- Giai M, Roagna R, Ponzzone R, De Bortoli M, Dati C, Sismondi P. Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res* 1994; 14: 1441-50.
- Muss H, Berry D, Thor A, Liu E, Edgerton S, Budman D, Wood W, Henderson C, Cirrincione C, Hayes D, Barcos M, Norton L. Lack of Interaction of Tamoxifen (T) Use and ErbB-2/HER-2/Neu (H) Expression in CALGB 8541: A Randomized Adjuvant Trial of Three Different Doses of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Fluorouracil (CAF) in Node-Positive Primary Breast Cancer (BC). *Proceedings ASCO* 1999; 256.
- Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J, Harris AL, Horne CH. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 65: 118-21.
- Newby JC, Johnston SR, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1643-51.
- Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1220-6.
- Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, Eaton CL, Gullick WJ, Dixon AR, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1018-23.
- Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, O'Sullivan J, Martino S, Osborne CK. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 7-12.
- Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harvey H, Demers L, Lipton A. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1129-35.
- Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosch S, Hayes DF. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2518-25.
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsh A et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1049-56.

23. Allred DC, Clark GM, Tandon AK et al. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 599-605.
24. Stal O, Sullivan S, Wingren S, Skoog L, Rutqvist LE, Carstensen JM, Nordenskjöld B. c-erbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2185-90.
25. Miles DW, Harris WH, Gilett CE, Smith P, Barnes D. Effect of c-erbB2 and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1999; 84: 354-9.
26. Muss HB, Thor AD, Berry DA et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-6.
27. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirincione C, Edgerton S, Allred C, Norton L, Liu ET. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1346-60.
28. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1361-70.
29. Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Waseinius VM. Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 917-22.
30. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A, Nieruchalski M, Fourquet A, Clough K, Dieras V, Pouillart P, Sastre-Garau X. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 27-33.
31. Makris A, Powles TJ, Dowsett M et al. Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 593-600.
32. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Martin de Civetta MT, Ciocca DR. c-erbB-2 (HER-2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1999; 84: 129-134.
33. Seidman AD, Baselga, Yao TJ, Gilewski T, Rosen PP, Norton L. HER-2/neu over-expression and clinical taxane sensitivity: a multivariate analysis in patients with metastatic breast cancer (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1996; 15: A80 UI: 96712202.
34. Sjoström J, Krajewski S, Franssila K, Niskanen E, Waseinius VM, Nordling S, Reed JC, Blomqvist C. A multivariate analysis of tumour biological factors predicting response to cytotoxic treatment in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998 Sep; 78 (6): 812-5.
35. Wright C, Cairns J, Cantwell BJ, Cattan AR, Hall, AG, Harris AL, Horne CHW. Response to mitoxantrone in advanced breast cancer: correlation with expression of c-erbB-2 protein and glutathion S-transferases. *Br J Cancer* 1992; 65: 271-4.
36. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH. The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998; 55: 33-8.
37. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas B, Casado A, Massutí B, Cortés-Funes H, Lloveras B. Circulating HER2 extracellular domain and chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Research* 2000; 6: 2356-62.
38. Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996; 13: 1359-65.
39. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997; 15: 537-47.
40. Archer CD, Ellis PA, Dowsett M, Smith IE. c-erbB-2 positivity correlates with poor apoptotic response to chemotherapy in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 50: 237 (abstract 108).
41. Clark GM. Should selection of adjuvant chemotherapy for patients with breast cancer be based on erbB-2 status? *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1320-1
42. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumors to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1165-72.
43. Lewis GD, Figari I, Fendly B et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 37: 255-63.
44. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR et al. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829-38.
45. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC et al. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* 1991; 11: 117-27.
46. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM et al. Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 1-5.
47. Ohnishi Y, Nakamura H, Yoshimura M et al. Prolonged survival of mice with human gastric cancer treated with an anti-c-ErbB-2 monoclonal antibody. *Br J Cancer* 1995; 71: 969-73.
48. Sarup JC, Johnson RM, King KL et al. Characterization of an anti p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul* 1991; 1: 72-82.
49. Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA et al. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1991; 266 (22): 14300-5.
50. Flicker SH, Schneider SM, Offterdinger M et al. Tyrosine kinase signaling pathways control the expression of retinoic acid receptor-alpha in SK-BR-3 breast cancer cells. *Cancer Lett* 1997; 115: 63-72.
51. Kumar R, Shepard HM, Mendelsohn J. Regulation of phosphorylation of the c-erbB-2/HER2 gene product by a monoclonal antibody and serum growth factor(s) in

- human mammary carcinoma cells. *J Mol Cell Biol* 1991; 11: 979-86.
52. D'souza B, Taylor-Papadimitriou J: Overexpression of *ERBB-2* in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7202-6.
 53. Vilorio Petit AM, Rak J, Hung MC et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and *ErbB-2*/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cell in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1991; 151: 1523-30.
 54. Carter P, Gorman CD, Presta L et al. Humanization of an anti-p185^{HER-2} antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4285-9.
 55. Kelley RF, O'Connell MP, Carter P et al. Antigen binding thermodynamics and antiproliferative effects of chimeric and humanized anti-p185HER2 antibody Fab fragments. *Biochemistry* 1992; 31: 5434-41.
 56. Eigenbrot C, Randal M, Presta L et al. X-ray structures of the antigen-binding domains from three variants of humanized anti-p185HER2 antibody 4D5 and comparison with molecular modeling. *J Mol Biol* 1993; 229: 969-95.
 57. Kopreski MS, Lipton A, Harvey HA et al. Growth inhibition of breast cancer cell lines by combinations of anti-P185HER2 monoclonal antibody and cytokines. *Anticancer Res* 1996; 16: 433-6.
 58. Xing R, Wu F, Mason RW. Control of breast tumor cell growth using a targeted cysteine protease inhibitor. *Cancer Res* 1998; 58: 904-909.
 59. Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS et al. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene* 1998; 17: 2235-49.
 60. Baselga J, Norton L, Albanell J et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the anti-tumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58: 2825-31.
 61. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER-2 monoclonal antibody in patients with HER-2/*neu* overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 737-44.
 62. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2659-71.
 63. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy NJ et al. Efficacy and safety of Herceptin (humanized anti-HER-2 antibody) as a single agent in 222 women with HER-2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 16: 376 (Abstract 376).
 64. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D et al. Efficacy and safety of Herceptin (Trastuzumab, humanized anti-HER-2 antibody) as a single agent in first-line treatment of HER-2 overexpressing metastatic breast cancer (HER-2 + /MBC). 21st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, 1998 (Abstract 23).
 65. Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC et al. p185c-*erbB-2* signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res* 1994; 54: 3758-65.
 66. Slamon D, Leyland Jones B, Shak S et al. Addition of Herceptin (humanized anti-HER-2 antibody) to first line chemotherapy for HER-2 overexpressing metastatic breast cancer (HER-2 + /MBC) markedly increases anti-cancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17: 377 (Abstract 377).
 67. Norton L, Slamon D, Leyland-Jones B, Wolter J, Flaming T, Eirmann W, Baselga J, Mendelsohn J, Bajamonde A, Ash M, Shak S. Overall survival advantage to simultaneous chemotherapy plus the humanized anti-HER2 monoclonal antibody Herceptin in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: 127 (Abstract 483).
 68. Hudis C, Seidman A, Paton V et al. Characterization of cardiac dysfunction in the Herceptin (Trastuzumab) clinical trials. 21st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, 1998 (Abstract 24).
 69. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 1999; 18: 731-8.