

HER-2 diagnosztika

Bánkfalvi Ágnes

Gerhard-Domagk Institut für Pathologie, Wilhelms-Universität, Münster, Németország

A HER-2 (c-erbB2, neu) receptor elsősorban a ductális emlőrákok jellegzetes molekuláris markere, bár más adenokarcinómában is előfordul (pl. endometrium-, vastagbél- vagy tüdőrák). A fokozott receptorexpresszió hátterében leggyakrabban (90–97%) génamplifikáció áll. A HER-2-expresszió kimutatásának emlőrákban fontos szerepe van a prognózis, a kemorezisztencia és a Herceptin terápiára való alkalmasság meghatározásában. A HER-2-expresszió meghatározására az immunhisztokémiai, illetve az in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatok az elfogadottak. Az immunhisztokémiai vizsgálatok standardizálása a HercepTest (Dako) esetében a legjobban kidolgozott, de az intermedier erősségű (2+) fenotípus értelmezéséhez nélkülözhetetlen a kiegészítő FISH vizsgálat elvégzése, miután a 0–1 illetve 3+ intenzitások esetében a génamplifikáció hiánya illetve megléte gyakorlatilag párhuzamban áll az immunhisztokémiai reakcióval. Újabban több alternatív anti-HER-2 antitest is forgalomba került, melyek használata szintén elfogadottá vált a világ több országában. Saját tapasztalataink alapján az emlőrákok esetében a HER-2 státus meghatározására az immunhisztokémiai és a FISH megfelelő kontrollokkal standardizált kombinálása ajánlható. *Magyar Onkológia* 46:11–15, 2002

HER-2 (c-erbB2, neu) receptor is the molecular marker of ductal breast cancer although it is overexpressed in other adenocarcinoma as well (e.g. endometrial, colorectal and lung cancers). The increased receptor expression is most frequently (90–97%) due to gene amplification. Detection of the overexpression of HER-2 helps to determine prognosis, to predict chemoresistance and to select for Herceptin therapy. HER-2 overexpression can be estimated either by immunohistochemistry or by fluorescent in situ hybridisation (FISH). Standardization of the immunohistochemical HER-2 tests is the best in HercepTest (DAKO), however, the frequent 2+ level requires complementary FISH test to verify gene amplification. This combination is not necessary at low (0–1+) or high (3+) level of immunohistochemical reactions, because the correlation with gene amplification status is acceptably high. Recently several new anti-HER-2 antibodies have been introduced into HER-2 diagnostics in various countries. According to our experiences we recommend to combine rationally the immunohistochemistry and FISH techniques to determine the HER-2 status in breast cancer. *Bánkfalvi Á. HER-2 diagnostics. Hungarian Oncology* 46:11–15, 2002



HER-2: terminológia, szerkezet és funkció

A HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2, további szinonimái: c-erbB-2, neu) jelenleg a legizgalmasabb prognosztikai és prediktív marker emlőrákban. Jelentőségét különösen fokozza, hogy a Herceptin® (trastuzumab) kifejlesztése óta az emlőrák kezelésének egyik célmolekulájává vált. A Herceptin® (Hoffman-La Roche) egy humanizált monoklonális antitest, amely nagy

affinitással specifikusan kötődik a HER-2-höz, mint antigénhez, és így gátolja a HER-2-t túlermelő tumorsejtek növekedését.

A HER-2 a 17. kromoszóma hosszú karján (q21-23) elhelyezkedő protoonkogén és tirozinkináz aktivitással rendelkező transzmembrán növekedési receptor fehérjét (p185) kódol. A HER-2 receptor szerkezete rendkívül hasonlít az epidermális növekedési faktor receptorhoz (EGFR; epidermal growth factor receptor; ez az eredeti HER-1), melyek a c-erbB-3 (heregulin) és c-erbB-4 molekulákkal együtt alkotják az erbB-tirozinkinázok családját (az erbB elnevezés a szárnyas erythroblastosis-B retrovirussal való rokonságra utal) (3, 18, 22). Ezek a receptorfehérjék, amelyek kis mennyiségben a normális hámsejtek felszínén is megtalálhatók, sejtosztódást, illetve

Közlésre érkezett: 2002. február 7.
Elfogadva: 2002. március 18.

Levelezési cím: Dr. Bánkfalvi Ágnes,
Gerhard-Domagk Institut für Pathologie, Wilhelms-
Universität, Münster, Németország,
e-mail: bankfal@uni-muenster.de

migrációt serkentő jeleket továbbítanak a sejtek belsejébe. Ezt a tulajdonságukat tumorsejtekben is megtartják, sőt, számos humán tumor esetében pl. a Wilms-tumorok 51%-ában, a húgyhólyagrakok 44%-ában, a pankreaszrakok 26%-ában, a petefészek-, endometrium-, vastagbél-, és hörgőrákok kb. 14%-ában a HER-2 receptor túltermelése mutatható ki (24). Emlőrákok közül az invazív duktális karcinómák kb. 25-30%-ában, az in situ karcinómák (DCIS) kb. 60%-ában található fokozott HER-2-produkció, invazív lobuláris karcinómákban gyakorlatilag nem fordul elő (1, 2, 4, 21). A tumorsejtek fokozott proliferációjával és megnövekedett inváziós képességével járó HER-2-túltermelés általában negatív ösztrogén- és progesteronreceptor-expresszióval és alacsonyfokú tumorsejt-differenciációval jár együtt. Független szignifikáns prognosztikai faktornak tekintik metasztatikus emlőrák esetében, ahol gyors progressziót jelez (8, 20). A receptor túltermelésének

hátterében az esetek több, mint 90%-ában a HER-2 gén amplifikációja áll (27).

A HER-2-túltermelés kimutatása

A molekuláris háttér ismeretében érthető, hogy a HER-2 túltermelésének kimutatása DNS-, mRNS- és fehérjeszinten egyaránt lehetséges és a különböző módszerekkel elért eredmények között szoros összefüggés van (14, 23, 27). A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetek vizsgálatára azonban, amelyekkel a diagnosztikus patológia dolgozik, gyakorlatilag két módszer áll rendelkezésre: 1) a fehérjetúltermelés meghatározására az immunhisztokémia, 2) a génamplifikáció kimutatására pedig az in situ hibridizáció.

Mindkét módszernek vannak előnyei és hátrányai, amelyeket a különböző munkacsoportok eltérő hangsúllyal tárgyalnak. A módszerek specificitásának és szenzitivitásának kérdése azonban nehéz probléma elé állítja a kutatókat, tekintettel arra, hogy a vizsgálatok különböző szinteken zajlanak. Több munkacsoport megfigyelése szerint az esetek kb. 3-10%-ában HER-2-overexpresszió génamplifikáció nélkül fordul elő (4, 15, 16, 26-28), mások hasonlóan kisszámú tumornál (6-9%) génamplifikációt fehérjetúltermelés nélkül mutattak ki (4, 11, 28). Nyílt kérdés, hogy a prognózis és a kemorezisztencia szempontjából melyik molekuláris változásnak van jelentősebb szerepe. Mivel a Herceptin® terápia célmolekulája a HER-2 receptor, kézenfekvőnek látszik, hogy a HER-2-túltermelés kimutatására az immunhisztokémia az első lépésben választandó módszer.

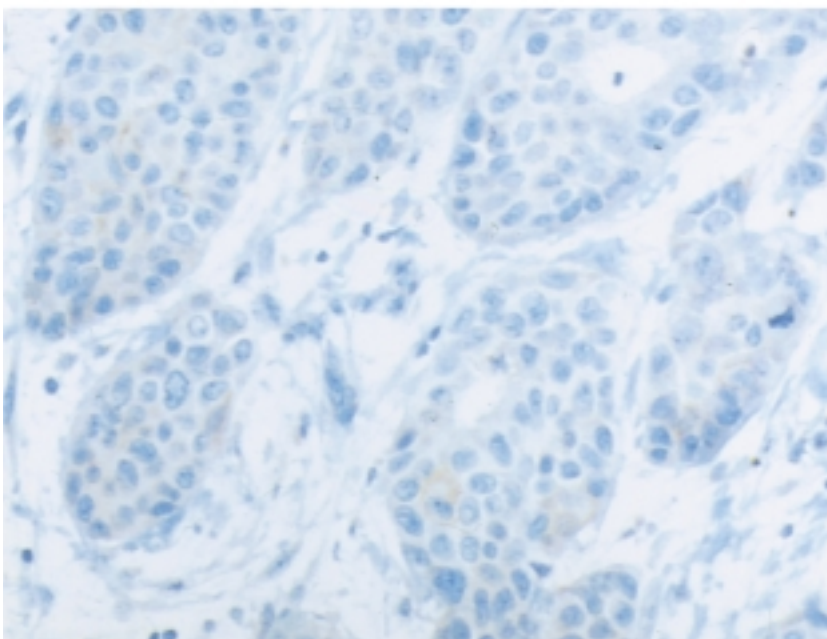
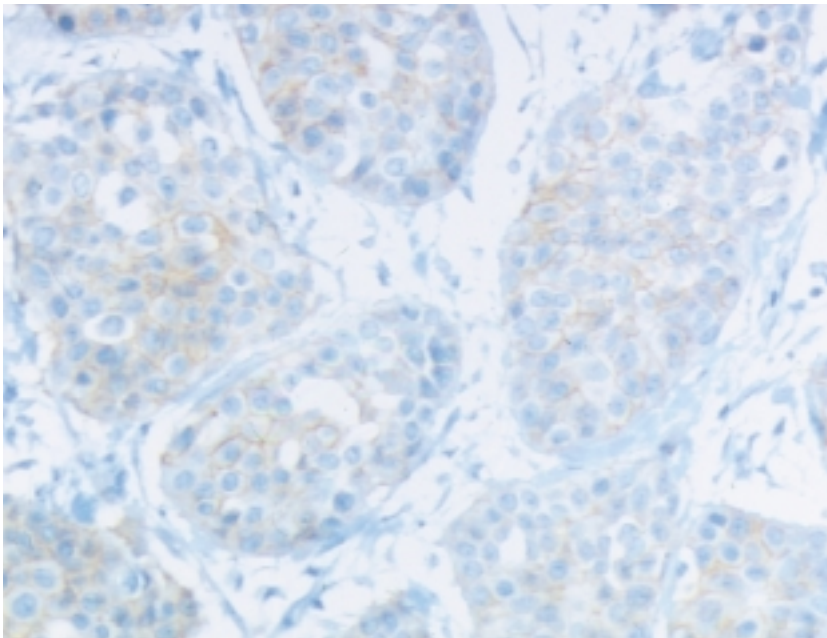
Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia fő előnye, hogy gyors, viszonylag olcsó, technikailag kevésbé munka- és eszközigényes, ezenkívül a legtöbb patológiai laboratóriumban hozzáférhető. A korábban sokszor idézett probléma, nevezetesen, hogy a formalinfixálás és paraffinba ágyazás során egyes epitópok elvesztik antigenitásukat, megfelelő szövetkezeléssel és érzékeny kimutatási módszerekkel kiküszöbölhető. Valódi probléma azonban, hogy a különböző laboratóriumokban használt közel tízféle anti-HER-2 antitest specificitása rendkívül eltérő (6-80%). Ezt a nehézséget látszott megoldani a DAKO által kifejlesztett HercepTest™, amely jelenleg az egyetlen standardizált és az amerikai FDA (Food and Drug Administration, USA) által engedélyezett diagnosztikus immunhisztokémiai kit a HER-2 protein overexpressziójának kimutatására tumorszövetben.

Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

Az immunhisztokémiával párhuzamosan genetikai vizsgálatok is folytak a HER-2 gén prognosztikai jelentőségének, illetve a különböző kemoterápiás szerek várható hatékonyságát előrejelző, ún. prediktív szerepének a felderítésére. A rutin patológiai felhasználás szempontjából a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) bizonyult a legal-

1. ábra.
DAKO HercepTest
versus CB11 IH 2 +
tumorban
(CB11 negatív!)



kalmasabb módszernek, amely formalinfixált és paraffinba ágyazott szövettani metszeteken is nagy hatékonysággal alkalmazható. A FISH-vizsgálat során a sejtmagokban lévő HER-2 génekópiákat fluorezcens festékekkel megjelölt komplemen-ter DNS-próbával hibridizálják, majd az egyes tumorsejtmagokban a fluorezcáló jelzéseket megszámlálják. Klinikailag a HER-2 amplifikációja gyors tumornövekedést és kórlefolyást jelez nyirokcsomó-metasztázis nélküli (node negative) betegek esetében is, ezenkívül előrejelzi az anthracyclin-tartalmú kemoterápiás protokollok (cyclophosphamide/doxorubicin/fluorouracil) várható hatékonyságát (prediktív marker) (8, 17, 19).

Jelenleg két FDA által engedélyezett FISH-kit van forgalomban az emlőrákok HER-2 génstátusának prognosztikai célból történő mérésére. Az egyik a Vysis által gyártott PathVysion kit, amelyben egyidejűleg két, különböző fluorezcens festékekkel megjelölt próbát alkalmaznak: az egyik próba a 17. kromoszóma centromer régiójával (zöld fluorezcencia), a másik a HER-2 génnel (piros fluorezcencia) reagál. A szignálok megszámlálását követően kiszámítják az egyes tumorsejteken belüli génekópiák arányát a 17. kromoszóma számához viszonyítva, amely 2-nél nagyobb szám esetén a HER-2 gén amplifikációját jelenti. Számos laboratóriumban használják előszeretettel a Vysis kitet (12), más laboratóriumok a Ventana Medical Systems által forgalmazott Oncor INFORM szisztémát részesítik előnyben. Nincs meggyőző adat arra vonatkozóan, hogy egyik módszer jobb lenne, mint a másik.

Az INFORM-kitben egyetlen DNS-próbát használnak a HER-2 gén kimutatására, a hibridizáció eredménye pedig FITC-cel jelölt antitestek segítségével válik láthatóvá az avidin-biotin reakció alapján. A jelek megszámlálása ugyancsak fluorezcens mikroszkóp segítségével történik, majd a tumorsejtmagonkénti HER-2 génekópiaszám középértékének kiszámításával a génstátus meghatározása következik: ≤ 4 génekópia/sejtmag normális génstátust, >4 génekópia/sejtmag a HER-2 gén amplifikációját jelenti. Az INFORM kit ma már csak a Ventana által forgalmazott Benchmark festőautomatával együtt kapható, azonban maga a HER-2 próba önmagában is megrendelhető és az előhívás manuálisan is megoldható, ami a vizsgálatok árát jelentősen csökkenti. A münsteri patológián nagyon jó eredményeket érünk el az általunk kifejlesztett manuális FISH technikával, amelyben az INFORM HER-2 próbát digoxigeninnel jelölt formában alkalmazzuk, az előhíváshoz pedig a digoxigenin-anti-digoxigenin nagy specificitású immunreakciót használjuk a szem számára sokkal könnyebben kiértékelhető Cy3 (piros fluorezcencia) jelöléssel (12).

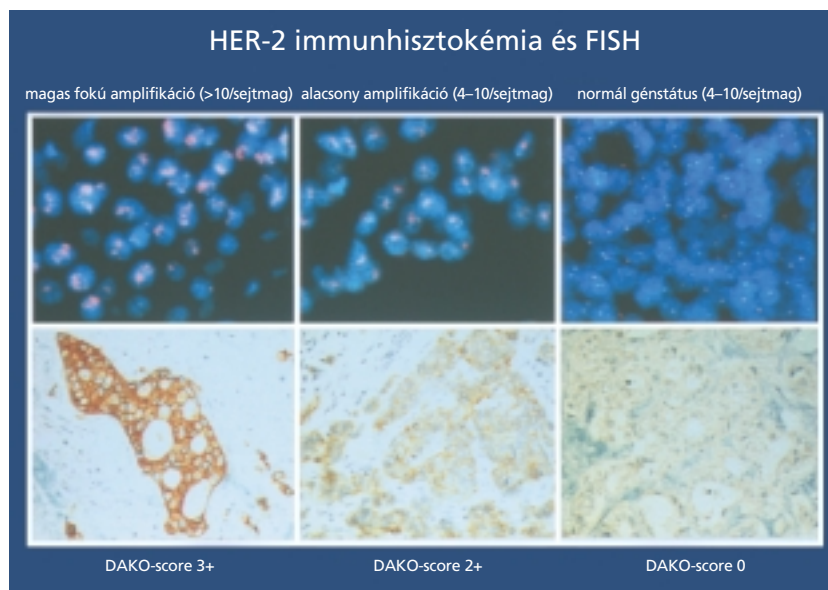
A FISH módszer gyakorlati hátránya az immunhisztokémiával szemben, hogy drágább, munkaigényesebb, speciális kiképzést és műszereket igényel; alkalmazása ezért specializált laboratóriumokban könnyebben megvalósítható. Elméleti hátrány, hogy kisszámú tumor esetén (3-10%) fehérjetúltermelés génamplifikáció nélkül is előfordulhat, pl. transzkripció szintű szabályozás révén.

Megbeszélés

Mind az immunhisztokémiának mind a FISH-nek vannak szenvedélyes támogató és ellenzői, tény azonban, hogy jelenleg még nincsenek klinikai adatok sem a HerceptinTM, sem a szabadalmazott FISH tesztek esetében arra vonatkozólag, hogy a különböző diagnosztikus módszerek milyen hatékonysággal tudják előrejelezni a Herceptin[®] terápia várható hatékonyságát. Azokban a klinikai kísérletekben ugyanis, amelyekben a Herceptin[®] hatékonyságát eredetileg vizsgálták, a HER-2 proteint túltermelő emlőtumoros betegek kiválasztása egy központi laboratóriumban elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat alapján történt (CTA; clinical trial assay) amelyben két monoklonális antitest (4D5 és CB11) került alkalmazásra. Pozitívnak értékelték azokat a tumorokat, amelyekben legalább az egyik antitesttel a tumorsejtek több, mint 10%-ában gyenge/közepes (2+), illetve erős intenzitású (3+) teljes membránfestődést találtak. Ezekből a klinikai vizsgálatokból tudjuk, hogy a Herceptin[®] sokkal hatékonyabb erős (3+), mint gyenge/közepes (2+) HER-2 protein-túltermelés esetén, tehát a HER-2-overexpresszió legalábbis szemikvantitativ meghatározásának terápiai jelentősége van (9, 29). Időközben retrospektív FISH vizsgálattal meghatározták a tumorok többségében a HER-2 gén státusát, amelyből kiderült, hogy a Herceptin[®] praktikusán csak a FISH-pozitív, vagyis amplifikált tumorok esetében volt hatékony (6, 10).

Mivel a HerceptinTM valójában a CTA alternatívjaként a Herceptin[®] szabadalmaztatásával egyidőben került bevezetésre, ezért jelenleg még előrejelzés a Herceptin[®] terápia várható hatékonyságára vonatkozóan a Herceptin[®] alapján kiválasztott betegek esetében nem adható. Anynyit tudunk, hogy az FDA általi engedélyezését megelőzően a Herceptin[®] hatékonyságát és pontosságát a HER-2-túltermelés kimutatásában 548 emlőrák esetében egy független kísérlet keretében összehasonlították a CTA alapján kapott eredményekkel és ez 79%-ban azonosnak bizo-

2. ábra.
FISH és IH
összehasonlítása



nyult. Különösen magas volt az egybeesés (89%), ha a negatív tumorokat (0, 1+) a pozitívokkal (2+ és 3+) hasonlították össze. Az eltérés főként abból adódott, hogy a HercepTest™ alkalmazásával jelentősen megnőtt a pozitív tumorok, ezen belül is a 2+, azaz a klinikailag problematikus tumorok száma (5). Erre időközben más kutatócsoportok is felhívták a figyelmet (7, 25). Saját vizsgálataink szerint is a 2+ tumorok száma szignifikánsan nagyobb HercepTest™ alkalmazásakor, mint pl. a CB11 monoklonális antitest használata esetén. E tumorok >90%-ában normális génstátus található FISH segítségével, ami a HercepTest™ által detektált 2+ tumorok túlnyomó többségében álzpozitív eredményre utal (13). Mivel azonban a HercepTest™ mind összetételében, mind az alkalmazási protokoll vonatkozásában standardizált, ezért az eredmények nagymértékben reprodukálhatók (egy laboratóriumon belül 100%, különböző laboratóriumok között 82%). Itt az eltérés főleg a kiértékelés szubjektívitasából ered a DAKO cég által kidolgozott egységes Score-rendszer ellenére (5).

Ismét visszajutottunk tehát az eredeti kérdéshez: melyik módszer a jobb a HER-2 státus meghatározására a Herceptin® terápiából várhatóan előnyt élvező emlőrákos betegek kiválasztásában? Az ismeretek mai szintjén ez a kérdés nem megválaszolható, a különböző országokban elvileg hasonló ajánlások vannak érvényben nem kötelező jelleggel.

Ajánlás a Herceptin® terápia molekuláris patológiai indikációjának felállításához

A legtöbb laboratóriumban, köztük a münsteri patológián is, valamennyi újonnan diagnosztizált emlőrák esetében, illetve metasztatikus tumoroknál visszamenőlegesen, standardszerűen meghatározzák a HER-2 receptorstátust immunhisztokémia segítségével. A 3+ tumorok mint HER-2-pozitív, a 0 és 1+ tumorok mint HER-2-negatív kerülnek besorolásra. A 2+ tumorok esetében kiegészítő FISH vizsgálat szükséges, amelyben ≤ 4 génekópia/sejtmag normális HER-2 génstátust (negatív FISH), > 4 génekópia/sejtmag (pozitív FISH) HER-2 génamplifikációt jelez. A Herceptin® terápia molekuláris patológiai indikációja ezért: 3+ immunhisztokémiával kimutatott receptortúlermelés, vagy 2+ immunhisztokémia és pozitív FISH. Ezek az értékek irányadóak a jelenleg is folyó számos, a Herceptin® hatékonyságát különböző feltételek mellett vizsgáló klinikai kísérletben.

Ajánlás a Herceptin® terápiára való kiválasztáshoz szükséges módszerekre

A módszerek vonatkozásában, éppen a HercepTest™ által detektált túl sok álzpozitív eset miatt, nincs egységes követelmény. Egyes helyeken a poliklonális A0485 DAKO antitestet használják manuális vagy automatizált előhívással, másról az időközben ugyancsak az FDA által szabadalmazott CB11 monoklonális antitestet (Novo-

castra vagy Biogenex) ismét másutt a szintén FDA által regisztrált TAB 250 antitestet (Zyto-med) részesítik előnyben. Az utóbbi cég egyébként fénymikroszkóppal kiértékelhető kromogén in situ hibridizációs tesztet is forgalmaz. Egyben azonban valamennyi vizsgáló egyetért, ez pedig a kontrolllok fontossága. A HercepTest™ a standardizált reagenseken kívül pozitív kontrollmetszeteket is tartalmaz (5db!) ismert HER-2 receptor-sűrűségű sejtvonalakkal: a 0 (~20 000 receptor/sejt) és az 1+ (~100 000 receptor/sejt) minták negatívak, a 2+ (~500 000 receptor/sejt) gyengén pozitív, míg a 3+ (~2 000 000 receptor/sejt) erősen pozitív. Ha a különböző laboratóriumok ezzel megegyező érzékenységgű saját kontrollal rendelkeznek – a kontroll célból kiválasztandó tumorok HER-2 státusának meghatározásához a referencialaboratóriumok segítségét lehet kérni (Németországban jelenleg 5 ilyen patológiai intézet van: Münster, München, Hamburg, Berlin, Göttingen) – akkor az antitest, illetve a detektálás módja másodlagos jelentőségű.

A FISH módszerek közül egyes laboratóriumok a Pathvysion-tesztet, mások az INFORM kítet favorizálják, utóbbit manuális vagy automatizált (pl. Ventana/Benchmark) technika segítségével.

Zárszó

Jelenleg még nincs nemzetközi tudományos megegyezés arra vonatkozólag, hogy melyik módszer a legmegbízhatóbb a HER-2 státus meghatározásához az emlőrákok várható körlefordulásának, illetve egy szisztémás kezelésre adandó reakciójának előrejelzésére. Tumorbiológiai szempontból megalapozottnak látszik, hogy a HER-2 diagnosztikában a fehérjétúlermelés meghatározása elsődleges fontosságú. Itt azonban felmerül az a probléma, hogy maga a HER-2-overexpresszió definíciója a különböző antitestek eltérő specificitása miatt még nem egyértelmű.

E kérdés tudományos tisztázásáig a következő diagnosztikus szempontok figyelembevétele ajánlható a Herceptin® terápia molekuláris patológiai indikációjának felállításához metasztatikus emlőrák esetében:

1. A HER-2 receptorprotein túlermelésének kimutatása immunhisztokémiával. A módszert tekintve, kisebb laboratóriumok számára a standardizált HercepTest™ (DAKO) alkalmazása látszik célszerűnek. Nagyobb intézetek számára, ahol az immunhisztokémiai diagnosztika standardizált körülmények között folyik, *megfelelő kontrolllok alkalmazása mellett* az antitest, illetve az előhívó módszer megválasztása tetszőleges.

2. Negatív eredmény (0; 1+) vagy erős immunhisztokémiai pozitívítás (3+) esetén további genetikai vizsgálatra nincs szükség. A 3+ erősségű HER-2-túlermelés önmagában a Herceptin® terápia molekuláris patológiai indikációjának tekinthető.

3. Gyenge/közepes (2+) immunhisztokémiai eredmény esetén a génstátus felderítésére kiegészítő FISH elvégzése ajánlatos, amelynek kivitele-

zése optimális körülmények között néhány specializált laboratóriumban történhet. 2+ immunhisztokémia és pozitív FISH esetén a Herceptin® kezelés megkezdhető.

A Herceptin® terápia hatékonyságának tesztelésére számos párhuzamos klinikai kísérlet folyik jelenleg is. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményétől várható a diagnosztikus módszerek tekintetében fennálló nyitott kérdések megválaszolása is.

Irodalom:

- Bánkfalvi Á, Simon R, Brandt B, et al. Comparative methodical analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology* 37:411-419, 2000
- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319:226-230, 1986
- Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, et al. Correlation of HER2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84:1279-1282, 1992
- Cobleigh MA, Vogel CL, 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* 17:2639-2648, 1999
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao Y-C. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230:11322-1139, 1985
- DAKO HercepTest™ FACTS 2000, 1
- Downward J, Yarden Y, Mayes E. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-527, 1984
- Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, et al. Recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol* 53:890-892, 2000
- Evans AJ, Pinder SE, Ellis IO, et al. Correlations between the mammographic features of ductal carcinoma in situ (DCIS) and C-erbB-2 oncogene expression. *Nottingham Breast Team. Clin Radiol* 49:559-562, 1994
- Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, et al. HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridisation allows risk-group assessment in node-negative breast cancer. *Int. J Oncol* 14:663-671, 1999
- Herceptest™ package insert
- Herceptin(R)® complete prescribing information, Genentech, USA
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the evaluation of HER2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1974-1982, 1999
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Specificity of HercepTest in determining HER2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983-1987, 1999
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analysed by fluorescence in situ hybridisation. *Proc Natl Acad Sci* 89:5321-5325, 1992
- Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, et al. HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation. *J Clin Oncol* 19:354-363, 2001
- Mass RD, Sanders C, Charlene K, et al. The concordance between the clinical trial assay (CTA) and fluorescence in situ hybridisation (FISH) in the Herceptin(R) pivotal trials. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 19:291a, 2000
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13:63-72, 1996
- Persons DL, Borelli KA, Hsu PH. Quantitation of HER2/neu and c-myc gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridisation. *Mod Pathol* 10:720-727, 1997
- Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 15:2894-2904, 1997
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 54:2771-2777, 1994
- Ratcliffe N, Wells W, Wheeler K, Memoli V. The combination of in situ hybridization and immunohistochemical analysis: an evaluation of Her2/neu expression in paraffin-embedded breast carcinomas and adjacent normal-appearing breast epithelium. *Mod Pathol* 10:1247-1252, 1997
- Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34:791-808, 1998
- Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J Clin Oncol* 17:434 (letter), 1999
- Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16:413-428, 1998
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182, 1987
- van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 319:1239-1245, 1988
- Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D et al. First-line non-hormonal treatment of women with HER2 overexpressing metastatic breast cancer with Herceptin(R) (trastuzumab, humanized anti-Her2 antibody). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 19:275a, 2000