

Спорные аспекты HER2-диагностики

Е.Н.Имянитов

НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова, Санкт-Петербург

Введение

Онкоген HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2; син.: ERBB2, neu) был одновременно идентифицирован несколькими исследовательскими коллективами в середине 1980-х годов (Schechter и соавт., 1984; Coussens и соавт., 1985; Semba и соавт., 1985). Данный ген кодирует рецепторную тирозинкиназу, способную к самостоятельной передаче сигналов от мембраны к ядру, а также к гетеродимеризации с другими белками семейства HER (EGFR/HER1, HER2, HER4) (Hudis, 1987). В 1987 г. D.Slamon и соавт. продемонстрировали высокую встречаемость активации HER2 в раках молочной железы – РМЖ (Slamon и соавт., 1987). Воспроизводимость этих данных стала предметом для оживленной дискуссии на страницах престижного журнала «Science» (Ali и соавт., 1988; Slamon и соавт., 1988); в течение последующих нескольких лет было установлено, что амплификация и гиперэкспрессия онкогена HER2 отмечаются примерно в 20–25% случаев РМЖ (Slamon и соавт., 1988; Imyanitov и соавт., 1993). Более того, ряд модельных экспериментов представил доказательства непосредственного участия онкогена HER2 в процессах злокачественной трансформации; соответственно, инактивация данного гена в опухолевых клетках сопровождалась частичной реверсией злокачественного фенотипа (Wada и соавт., 1990).

На основании убедительных биологических данных рецептор HER2 был признан перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Первым препаратом, созданным для подавления функции HER2 и вошедшим в онкологическую практику, стало гуманизированное антитело трастузумаб (Герцептин). Герцептин успешно прошел клинические испытания I, II и III фаз и в 1998 г. был рекомендован для лечения HER2-позитивного метастатического РМЖ (Slamon и соавт., 2001). Последующие исследования были сосредоточены на операбельных пациентках с РМЖ, получавших лечение Герцептином после хирургического удаления опухоли; применение данного препарата сопровождалось достоверным улучшением показателей безрецидивной выживаемости, поэтому Герцептин был зарегистрирован в качестве средства адьювантной терапии HER2-ассоциированных карцином молочной железы (Romond и соавт., 2005; Joensuu и соавт., 2006). Современные тенденции в лечении HER2-позитивных раков включают как разработку новых HER2-антагонистов, так и расширение спектра показаний для применения HER2-ингибиторов. В частности, в арсенале клинических онкологов недавно появились низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы HER2 – лапатиниб (Тайверб); в настоящее время он разрешен для лечения пациенток с HER2-позитивным метастатическим РМЖ в качестве второй линии терапии, а также для комбинированного применения с ингибиторами ароматазы (Ryan и соавт., 2008; Schwartzberg и соавт., 2010). В свою очередь Герцептин успешно прошел клинические испытания у больных с HER2-позитивным метастатическим раком желудка, что стало основанием для модификации стандартов лечения данного заболевания (Schneider-Merck, Treppel, 2010).

Герцептин справедливо позиционируется как первый таргетный препарат, созданный для лечения рака. Неудивительно, что история создания, клинических испытаний и внедрения Герцептина в практическую онкологию часто используется для иллюстрации преимуществ и ограничений противоопухолевых лекарственных средств нового поколения. Одна из главных особенностей Герцептина – юридически сформулированные критерии к допуску пациентов на лечение, требующие безусловного отказа от назначения препарата при отсутствии признаков активации онкогена HER2 или неизвестном статусе последнего. Подобная стратегия основывается на самом

принципе таргетной терапии, подразумевающей присутствие мишени в опухолевой клетке в качестве абсолютного условия эффективности молекулярного ингибитора. В самом начале клинических испытаний Герцептина к лечению привлекались только те больные, опухоль которых демонстрировала иммуногистохимическое окрашивание по онкобелку HER2. Анализ результатов подобных исследований продемонстрировал заметно лучшие результаты для случаев с выраженной экспрессией HER2 (3+) по сравнению с теми РМЖ, которые характеризовались умеренной степенью HER2-позитивности (2+) (Hudis и соавт., 2007). Систематических испытаний Герцептина в отношении HER2-негативных опухолей не проводилось в связи с низкой ожидаемой эффективностью препарата у данной разновидности пациенток. Герцептин обладает прекрасной переносимостью: для него характерна лишь одна относительно частая разновидность побочных эффектов, а именно кардиотоксичность. Риск осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы является дополнительной мотивацией для ограничения количества пациентов, принимающих Герцептин (Tan-Chiu и соавт., 2005). И наконец, одним из самых важных аргументов для отбора пациентов на лечение представляется высокая цена препарата; предполагается, что оптимизация старых и разработка новых предиктивных тестов поможет заметно снизить частоту неэффективных назначений данного анти-тела.

Активация онкогена HER2 в опухолях молочной железы

Главная особенность HER2-позитивных карцином молочной железы заключается в значительном увеличении количества данного рецептора: в то время как число молекул HER2 в пересчете на «нормальную» («HER2-негативную») клетку измеряется десятками тысяч, HER2-ассоциированные клетки РМЖ содержат от 500 000 до 2 000 000 HER2-рецепторов (Kopescu и соавт., 2003). Увеличение представленности трансмембранных тирозинкиназ приводит к самопроизвольной активации этих молекул: в то время как в норме для центрального события в запуске сигнального каскада – димеризации рецепторов – требуется взаимодействие с лигандом, повышенная плотность HER2 сопровождается автономным образованием HER2-содержащих гомо- и гетеродимеров.

В подавляющем большинстве HER2-позитивных РМЖ причиной активации данного онкогена является его амплификация. В норме каждая клетка имеет диплоидный набор генов: одна копия гена наследуется от отца, другая – от матери. В опухолевых клетках копияность генов может увеличиваться: например, для онкогена HER2 обычно наблюдается 2–20-кратное увеличение «количества» HER2-специфической ДНК. Таким образом, если в норме продукция РНК и белка осуществляется на матрице одной или двух копий гена, в опухолевой клетке может наблюдаться заметное увеличение числа рамок считывания генетического материала и как следствие нарастание концентрации соответствующего белка (Slamon и соавт., 1987).

Конечное количество продукта зависит не только от копияности гена, но и от интенсивности процессов транскрипции и трансляции, а также от скорости утилизации белка. Уровень интенсивности «работы» гена обычно обозначают термином «экспрессия». На практике под экспрессией обычно подразумевают не столько кинетические параметры генной активности, сколько концентрацию ген-специфического продукта.

В частности, статус гена можно оценивать по уровню специфической РНК в клетке или ткани. Сведения о механизмах регуляции генной транскрипции – образования

РНК на матрице ДНК – к настоящему моменту носят весьма отрывочный характер. Считается, что на уровень транскрипции генов может влиять уровень метилирования цитозина, входящих в состав промоторных последовательностей ДНК (Esteller, 2008). Другой механизм регуляции количества РНК – специфическое связывание последних с комплементарными молекулами микроРНК, приводящее к распаду транскрипта (Fabian и соавт., 2010). Анализ HER2-специфической РНК в опухолях человека проводился лишь в отдельных исследованиях; в целом гиперэкспрессия РНК обычно коррелирует с амплификацией онкогена HER2, однако подобное соответствие наблюдается далеко не во всех карциномах. Существенно, что первоначальные публикации по данной проблеме отмечали относительно частые случаи гиперэкспрессии HER2 в отсутствие его амплификации (Slamon и соавт., 1989). Для оценки генойности в работах 1980-х годов применялся метод Southern-блот, который может давать ложнонегативные результаты в случае примеси значительного количества нормальных тканей в опухолевом образце. Повторный детальный анализ тех же образцов РМЖ установил, что частота гиперэкспрессии HER2 в РМЖ с истинно нормальным ДНК-статусом этого гена не превышает 3% (Pauletti и соавт., 1996).

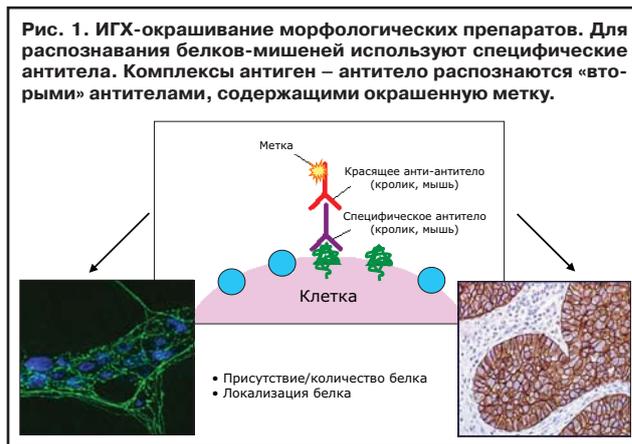
Наконец, завершающий этап синтеза ген-специфического продукта – процесс трансляции, заключающийся в синтезе белка на матрице РНК. Принципы регуляции этого процесса также остаются недостаточно изученными. Известно, что связывание РНК-транскриптов с уже упомянутыми микроРНК может замедлять трансляцию (Fabian и соавт., 2010). На конечную концентрацию белка влияет не только скорость его синтеза, но и кинетика его специфической деградации. Существенно, что количество белка не в полной мере отражает его функциональные свойства: активность большинства белков регулируется различными механизмами посттрансляционной модификации, например фосфорилированием и гликозилированием (Hudelst и соавт., 2006).

Лабораторное тестирование статуса онкогена HER2

В рутинной клинической практике используется 2 основных метода диагностики статуса онкогена HER2: иммуногистохимия (ИГХ) и различные виды гибридизации in situ (FISH, CISH, SISH, DualCISH) (Wolff и соавт., 2007; Sauter и соавт., 2009).

ИГХ-метод выявления активации HER2 получил наибольшее распространение (рис. 1). Принцип его действия основан на взаимодействии антигена с антителом. В качестве антигена выступает определенный эпитоп (участок) белка HER2. К этому эпитопу фирмы-производители диагностических наборов подбирают антитела. Процедура получения антител всегда подразумевает иммунизацию какого-либо животного. Наиболее простой технологией является выработка так называемых поликлональных антител: для этого относительно крупному животному (кролику или козлу) инъецируется белок-антиген, а спустя несколько недель производится забор сыворотки; при необходимости антитела, содержащиеся в сыворотке, могут подвергаться дополнительной очистке.

Поликлональные антитела обладают высокой чувствительностью, однако их специфичность далеко не абсолютна: многие из антител, присутствующих в сыворотке, могут распознавать не только белок-мишень (HER2), но и взаимодействовать со сходными эпитопами других белков. Большую популярность получила технология получения так называемых моноклональных антител. В этом случае в качестве иммунизируемого животного, как правило, выступает мышь. В-лимфоциты, полученные от иммунизируемой мыши, иммортализируются посредством слияния с бессмертными клетками – клетками миеломы – и рассеиваются на лабораторных планшетах по индивидуальным лункам. Для широкомасштабного производства отбирается наилучший клон, производящий наиболее специфичные антитела. Главное преимущество моноклональных антител – хорошая специфичность продукта. При этом моноклональные антитела несколько проигрывают поли-



клональным в чувствительности, так как в отличие от поликлональных антител они способны распознавать лишь один эпитоп в белке-мишени. Применение ИГХ-метода подразумевает инкубацию диагностических антител с иммобилизованным на предметном стекле гистологическим срезом опухоли. При этом антитела взаимодействуют со специфическим белком-антигеном и остаются «прикрепленными» к срезу даже после промывки препарата. Как сделать провзаимодействовавшие антитела видимыми для детекции? Для этого используется технология так называемого сэндвича, подразумевающая применение вторых, «меченых» антител. Например, если для взаимодействия с антигеном-мишенью используются моноклональные мышинные антитела, то для детекции образовавшихся комплексов антиген – антитело добавляются «антимышинные» антитела, имеющие встроенную метку для визуализации.

ИГХ имеет колоссальные преимущества по сравнению с другими методами. Эта разновидность анализа чрезвычайно проста и может использоваться в любой морфологической лаборатории.

ИГХ позволяет визуализировать компоненты среза, которые демонстрируют окрашивание, в частности дифференцировать опухолевую и внеопухолевую экспрессию того или иного белка. Помимо того, ИГХ помогает локализовать нахождение белка внутри клетки, в частности дискриминировать между мембранным, цитоплазматическим и ядерным окрашиванием.

Помимо преимуществ, ИГХ имеет целый ряд ограничений. Традиционный протокол ИГХ-окрашивания по своему принципу напоминает проявление черно-белых фотографий в домашних условиях. В случае обработки фотографий критическим фактором является состояние проявителя, а также время и условия инкубации (фотографы-любители знают, что «свежий» проявитель работает лучше старого, и обычно контролируют время инкубации на глаз, прекращая процесс проявления по мере достижения желаемой интенсивности снимков). В случае ИГХ в качестве «проявителя» выступает раствор специфических антител. Разумеется, применение столь критического реагента подразумевает его одинаковую рабочую активность от партии к партии. В реальности антитела могут частично разрушаться при хранении, особенно при несоблюдении требуемых условий или сроков.

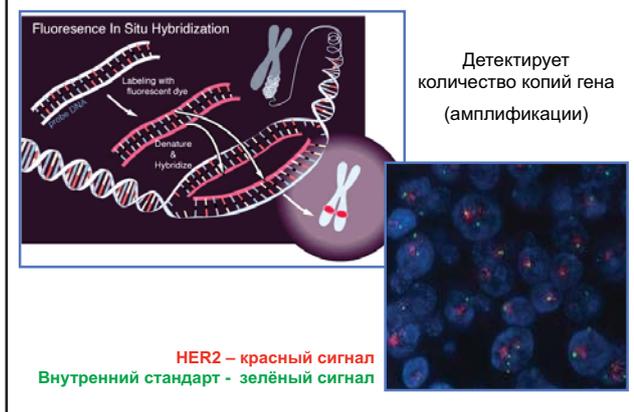
Скорость взаимодействия антител и антигена чрезвычайно зависит от температуры инкубации: столь важный фактор должен контролироваться с точностью до градуса, что возможно при применении современных автоматических иммуногистостейнеров.

Помимо изложенных объективных особенностей метода, следует признать, что в большинстве лабораторий в целях экономии практикуется разведение антител ниже рекомендованных производителем концентраций.

В отличие от молекулярно-генетических методов многие протоколы ИГХ-прокраски не имеют «встроенного» контроля.

При использовании антител к онкогену HER2 гистологический препарат может не прокрашиваться вовсе. Так

Рис. 2. Флюоресцентная гибридизация in situ (FISH, fluorescent in situ hybridization). Принцип данного метода заключается в гибридизации флюоресцентно-меченых ген-специфических зондов с гистологическими срезами изучаемых тканей.



как в ткани молочной железы отсутствуют типы клеток, которые всегда экспрессируют HER2, дать однозначную интерпретацию «негативной» реакции с HER2-антителами не представляется возможным; отрицательные результаты окрашивания могут быть связаны как с действительным отсутствием экспрессии белка-мишени, так и с артефактами самой лабораторной процедуры.

Еще сложнее обстоит дело с (полу)количественной оценкой степени экспрессии белка посредством ИГХ-анализа. Как упоминалось выше, интенсивность специфического сигнала не только зависит от ряда сопутствующих факторов, но и является предметом для достаточно субъективной оценки. Существует целый ряд перспективных разработок, которые направлены на улучшение возможностей количественной ИГХ-оценки, а также на увеличение объективности данного метода, однако внедрение подобных технологий в повседневную клиническую практику вызывает определенные затруднения.

В некоторых ситуациях в качестве объекта для окрашивания антителами можно использовать не срезы изучаемой ткани, а полученную в ходе пунктирования опухоли взвесь трансформированных клеток; соответственно, для подобной разновидности детекции специфических молекул используют термин «иммуноцитохимия» (ИЦХ; immunocytochemistry – ICC). Разумеется, ИЦХ не позволяет оценивать результаты молекулярного анализа в контексте строения изучаемой ткани, поэтому данный метод на практике не используется для HER2-диагностики.

Флюоресцентная гибридизация in situ ориентирована на оценку копийности гена-мишени (рис. 2). В качестве специфического зонда используется одноцепочечный нуклеотидный фрагмент гена, помеченный флюоресцентной меткой. Этот фрагмент гибридизуется с гистологическим препаратом, содержащим денатурированную ДНК. ДНК-зонд распознает ген-мишень по принципу комплементарности и образует двуцепочечные молекулы ДНК. Каждая копия гена визуализируется в виде отдельной «точки». В норме клетки (ядра) содержат 2 точки, при делеции генетического материала количество точек на клетку уменьшается до 1 или 0, а при амплификации возрастает в зависимости от степени увеличения копийности гена.

Результаты FISH обычно оценивают при помощи подсчета количества «точек» в нескольких десятках клеток опухоли. В отличие от ИГХ в FISH всегда присутствует внутренний стандарт. При оценке геномного статуса HER2 в качестве контроля может использоваться фрагмент генетического материала, расположенный в центре хромосомы 17; увеличение копийности гена HER2, локализованного на длинном плече той же хромосомы, выражается соотношением количества HER2-специфических и контрольных сигналов. В случае отсутствия гена-рефери копийность гена HER2 оценивается по среднему количеству сигналов HER2 в ядрах опухолевых клеток; при этом нормальные клетки гистологического препарата, содержащие 2 копии гена, выступают в качестве контроля.

Значительную популярность получила модификация флюоресцентной гибридизации in situ, получившая название «chromogenic in situ hybridization» (CISH, хромогенная гибридизация in situ). В отличие от исходно метода в CISH используются цветные метки, поддающиеся визуализации в обычном световом микроскопе.

Таким образом, CISH не требует флюоресцентного микроскопа для детекции сигнала, позволяет осуществлять гистологическую оценку изучаемого препарата и архивировать результаты реакции (Tanner и соавт., 2000).

Еще один перспективный метод оценки статуса гена HER2 – так называемая количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Данный метод может применяться как для оценки копийности гена на уровне ДНК, так и для анализа уровня РНК-транскриптов. HER2-специфическая нуклеотидная последовательность амплифицируется при помощи соответствующих праймеров; в той же реакционной смеси параллельно осуществляется амплификация гена-рефери. Синтезируемый продукт распознается при помощи специальных флюоресцентных зондов, а кинетика его накопления мониторируется датчиком флюоресценции, встроенным в ПЦР-аппарат. Количественная оценка статуса гена HER2 осуществляется посредством измерения соотношения сигнала, соответствующего гену-мишени и гену-рефери. Возможность постоянного контроля за кинетикой накопления сигналов позволяет выполнять измерения с высокой степенью точности. ПЦР-анализ является объективным и воспроизводимым методом, требует минимального количества исследуемой ткани. К его недостаткам относятся необходимость максимального обогащения препарата опухолевыми клетками посредством микродиссекции, а также потребность в дорогостоящем оборудовании и специально подготовленном персонале.

Следует отметить, что на сегодняшний день одобренными методами определения HER2-статуса в рутинной клинической практике являются ИГХ-и FISH-метод.

Поэтому на них стоит остановиться подробнее.

ИГХ и/или FISH?

РМЖ является самым частым онкологическим заболеванием у женщин – он поражает каждую десятую жительницу развитых стран. Примерно 1 из 5 случаев РМЖ характеризуется активацией гена HER2; подавляющее число подобных пациенток нуждаются в длительном применении Герцептина либо для профилактики постоперационного рецидива РМЖ, либо для лечения метастатического процесса. Правильный отбор пациенток на лечение – исключительно важная медико-социальная задача, выполнение которой самым непосредственным образом отражается не только на качестве лечения, но и на бюджете здравоохранения.

В настоящее время в мире сосуществуют 2 подхода к определению статуса HER2 (Wolf и соавт., 2007; Sauter и соавт., 2009). Первый предусматривает двухэтапную процедуру. Исследование начинается с иммуногистохимического анализа экспрессии HER2-белка. Случаи с сильным окрашиванием (3+) сразу расцениваются как HER2-позитивные и отбираются на терапию Герцептином без каких-либо дополнительных процедур. РМЖ с отсутствием реактивности (0) или слабым окрашиванием (1+) исключаются из дальнейшего рассмотрения. Образцы со степенью окраски 2+ подвергаются дополнительной процедуре – FISH-анализу – и направляются на лечение Герцептином только в случае обнаружения амплификации гена HER2.

Альтернативный подход к HER2-тестированию предусматривает полный отказ от ИГХ и использование FISH в качестве единственного лабораторного метода HER2-анализа (Sauter и соавт., 2009). Сторонники теста на амплификацию гена HER2 акцентируют внимание на общеизвестных недостатках ИГХ (недостаточная межлабораторная воспроизводимость и субъективизм оценки результатов), а также на почти полном соответствии геномного и экспрессионного статуса данного онкогена. Примечательно, что те редкие пациентки с РМЖ, которые характеризуются низкой экспрессией HER2 по результатам

ИГХ (0 или 1+), но тем не менее обнаруживают амплификацию гена по результатам FISH, демонстрируют заметную частоту ответов на терапию HER2-ингибиторами (Press и соавт., 2008). Существенно, что один из главных аргументов против расширенного использования FISH – несколько большая стоимость по сравнению с ИГХ – представляется абсолютно несостоятельным, если привлечь во внимание потенциальный источник экономии – отказ от заведомо безрезультатного многомесячного лечения HER2-ингибиторами.

По-видимому, выбор оптимального алгоритма HER2-тестирования может зависеть от конкретных условий, в которых работает клиника, в частности от потока больных РМЖ. Считается, что каждый случай инвазивного РМЖ должен оцениваться на предмет активации онкогена HER2. Многочисленные исследования указывают на значительное увеличение достоверности результатов при централизованном HER2-тестировании; предполагается, что лаборатории с большим потоком анализов используют более стандартизованные процедуры и реже выдают неправильные заключения; в особой мере это утверждение справедливо для ложноположительных оценок статуса HER2 (Paik и соавт., 2002; Perez и соавт., 2006).

Следует отметить, что достоверное выявление активации гена HER2 – не единственная проблема, сопряженная с назначением HER2-ингибиторов. Поиск дополнительных маркеров чувствительности к Герцептину и другим HER2-антагонистам – исключительно важная проблема, над которой работают многочисленные исследовательские коллективы.

Благодарности

Автор выражает сердечную благодарность канд. биол. наук Е.Ш.Кулигиной за неоценимую помощь при подготовке иллюстраций к статье.

Литература

1. Ali IU, Campbell G, Lidereau R, Callaban R. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988; 240 (4860): 1795–6.
2. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230 (4730): 1132–9.
3. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351–79.
4. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358 (11): 1148–59.
5. Hudelist G, Kbstler WJ, Czerwenka K et al. Her-2/neu and EGFR tyrosine kinase activation predict the efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118 (5): 1126–34.
6. Hudis CA. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007; 357 (1): 39–51.
7. Imyanitov EN, Chernitsa OI, Serova OM et al. Amplification of HER-2(erbB-2/neu) oncogene as the most significant prognostic factor in a group of Russian breast cancer patients. *Neoplasma* 1993; 40 (1): 35–9.
8. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P et al. FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354 (8): 809–20.
9. Kononen G, Pauletti G, Pegram M et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95 (2): 142–53.
10. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E et al. Real-world performance of HER2 testing – National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (11): 852–4.
11. 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* 1996; 13 (1): 63–72.
12. Perez EA, Suman VJ, Davidson NE et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006; 24 (19): 3032–8.
13. Press MF, Finn RS, Cameron D et al. HER-2 gene amplification, HER-2 and epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression, and lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (23): 7861–70.
14. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16): 1673–84.
15. Ryan Q, Ibrahim A, Coben MH et al. FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *Oncologist* 2008; 13 (10): 1114–9.
16. Sauter G, Lee J, Bartlett JM et al. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009; 27 (8): 1323–33.
17. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984; 312 (5994): 513–6.
18. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 (19): 6497–501.
19. Schneider-Merck T, Trepel M. Lapatinib. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184: 45–59.
20. Schwartzberg LS, Franco SX, Florance A et al. Lapatinib plus letrozole as first-line therapy for HER-2+ hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *Oncologist* 2010; 15 (2): 122–9.
21. 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* 1987; 235 (4785): 177–82.
22. Slamon DJ, Clark GM. Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors? *Science* 1988; 240 (4860): 1796–8.
23. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244 (4905): 707–12.
24. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344 (11): 783–92.
25. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005; 23 (31): 7811–9.
26. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 2000; 157 (5): 1467–72.
27. Wada T, Myers JN, Kokai Y et al. Anti-receptor antibodies reverse the phenotype of cells transformed by two interacting proto-oncogene encoded receptor proteins. *Oncogene* 1990; 5 (4): 489–95.
28. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (1): 118–45.

*