

PREDIKTIVNÍ VÝZNAM SÉROVÉHO HER-2/NEU U NEMOCNÝCH S KARCINOMEM PRSU LÉČENÝCH HERCEPTINEM

SERUM HER-2/NEU AS PREDICTIVE FACTOR IN BREAST CANCER PATIENTS TREATED WITH HERCEPTIN

ŠIMÍČKOVÁ M., PETRÁKOVÁ K., PECEN L.*, NEKULOVÁ M., FRGALA T., NENUTIL R.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

* ÚSTAV INFORMATIKY AV ČR PRAHA

Souhrn. Východiska: HER-2/neu onkogen kóduje transmembránový receptor růstového faktoru, onkoprotein HER-2/neu. Jeho zvýšená exprese byla prokázána v primární nádorové tkáni až u 30 % nemocných s karcinodem prsu. Extracelulární doména tohoto onkoproteinu (sérový HER2) je prokazatelná v cirkulaci. **Soubor, metody:** V našem souboru 28 nemocných jsme hodnotili dynamiku sérových hladin HER-2/neu (ELISA test, Oncogene Science) v průběhu terapie Herceptinem. **Výsledky:** Nemocné bez odpovědi na terapii vykazují v době prvního restagingu signifikantně vyšší hodnoty koncentrace sérového HER2, které obvykle od počátku terapie neklesají pod diskriminační hranici. U nemocných, u nichž bylo dosaženo nejlepší klinické odpovědi typu kompletní či partiální remise, je po 3 měsících léčby obvykle hladina sérového HER2 v normě, i když byla před terapií zvýšena. Sérový CA15-3 a CEA nevykazují při hodnocení těchto dvou skupin responderů signifikantní změny. Rovněž při dlouhodobém monitorování je prediktorem selhání terapie především zvýšená hladina sérového HER2, a to její hodnota po třech měsících. **Závěr:** Monitorování sérových hladin HER2 během aplikace Herceptinu se zdá být vhodným parametrem pro zhodnocení účinnosti této terapie jak bezprostředně po jejím zahájení, tak i při její dlouhodobé aplikaci.

Klíčová slova: sérový HER-2, karcinom mléčné žlázy, Herceptin, monitorování

Summary. Background: HER-2/neu oncogene codes the transmembrane growth factor receptor, HER-2/neu oncoprotein. Its overexpression of up to 30 % was proved in breast cancer patient primary tumor tissue. Extracellular domain of this oncoprotein can be found in circulation. **Material, methods:** We evaluated dynamics of serum HER-2/neu changes (ELISA Oncogene Science, USA) in our group of 28 patients during Herceptin therapy. **Results:** Non-responding patients evaluated at the time of first restaging (usually 3 months) are characterized by significantly higher concentrations of serum HER-2/neu which are always above cut-off level. Serum HER-2/neu concentrations in patients with best clinical response characterized as complete or partial remission usually normalize within three months of therapy, even though the pretreatment levels were high. Serum CEA and CA15-3 levels do not show significant differences between these two patients groups. Serum HER-2/neu during the initial three months of Herceptin treatment is also the best predictor of therapy failure in long-term follow up. **Conclusion:** Serum HER-2/neu determination during Herceptin therapy appears to be a suitable therapy efficacy validation parameter both at the start and during long-term therapy application.

Key words: serum HER-2/neu, breast cancer, Herceptin, follow-up

Úvod

Maligní nádory epiteliálního původu jsou charakterizovány mnohonásobnou amplifikací HER-2/neu onkogeny (Human Epidermal Growth Factor Receptor, synonymum: c-erbB-2) a zvýšenou expresí HER-2/neu onkoproteinu v primárním nádoru. Zvýšená amplifikace genu i zvýšená exprese onkoproteinu byly prokázány v různých epiteliálních nádorech, např. v karcinomech prsu, tlustého střeva, slinivky, vaječníků a močového měchýře (review viz 1).

HER-2/neu onkoprotein patří do skupiny receptorů růstových faktorů. Vykazuje částečnou homologii s dalšími členy této rodiny, a to s receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR), dále HER3 a HER4. Tyto receptory jsou tvořeny extracelulární vazebnou doménou, transmembránovým lipofilním segmentem a intracelulární částí vykazující tyrozinkinázovou aktivitu s regulačním karboxyterminálním segmentem. Prognostický i prediktivní význam HER-2/neu ve tkáni primárního karcinomu prsu byl potvrzen četnými studiemi (1). Pozitivita tohoto onkoproteinu je předpokladem k nasazení terapie specifickou protilátkou - Herceptinem.

Extracelulární doména HER-2/neu uvolněná do séra (dále jen sérový HER2) je protein o molekulové hmotnosti 95-105 kDa. Sérový HER2 vykazuje intra-individuální stabilitu (2); nebyl prokázán rozdíl v hladinách pre- a postmenopauzálních žen. Klinická senzitivita je závislá na stadiu onemocnění, u vyšších stadií je jeho koncentrace vyšší. Zvýšená hladina sérového

HER2 byla prokázána u nemocných s karcinodem prsu, prostaty, plic, kolorekta, ovarií, jater, žaludku a močového měchýře a je spojována obvykle s agresivnější formou choroby a s horší prognózou (review 1,2). Dosud provedenou meta-analýzou vyšetřujících tento onkoprotein v séru nemocných s karcinodem prsu bylo nalezeno zvýšení u 18,5 % nemocných s primárním nádorem (1923 pacientek), u metastatické formy tohoto onemocnění až u 43 % (4622 pacientek) (2). Sérový HER2 je vhodným markerem pro monitorování těch nemocných s metastatickým karcinodem prsu, u nichž byla jeho předterapeutická hodnota zvýšena (1). Bylo prokázáno, že vyšší sérové HER2 koncentrace se nacházejí i u těch nemocných, kdy v primárním nádoru nebyla imunohistochemickou ani FISH technikou zvýšená exprese HER-2/neu nalezena (3-6). Možným vysvětlením je, že nádor s negativním obsahem HER-2/neu (imunohistochemicky < 10 % HER-2-pozitivních buněk) může při metastatickém rozsevu vytvořit sekundární ložisko produkující cirkulující extracelulární doménu HER2/neu ve zvýšené koncentraci. Otázkou zůstává, zda by nebyla tato skupina nemocných vhodná pro specifickou anti-HER-2/neu terapii (1). V séru nemocných s pozitivním nádorem však nemusí být hladina HER2 vždy zvýšena (7) a nemusí vždy korelovat se sérovým markerem CA15-3, ev. CEA (3). Podobně jako tkáňový HER-2/neu má i sérový HER2 *prognostický význam*. Přes různé terapeutické postupy bylo prokázáno, že vyšší hladina sérového HER-2 charakterizuje

nemocné s horší prognózou, hodnocenou jako kratší bezpříznakový interval i kratší celkové přežití (1,2,3).

Závěry analýzy predikce odpovědi na hormonální terapii ve vztahu k sérovému HER2 jsou v souladu s výsledky studií hodnotících tkáňovou produkci HER-2/neu. Bylo zjištěno, že nezávisle na typu hormonální terapie je odpověď horší u těch nemocných, kde byly předterapeutické hodnoty sérového HER2 zvýšeny (8), obzvláště při pozitivitě estrogenních receptorů v primárním nádoru. Vysvětlením mohou být závěry experimentálních studií o vzájemném ovlivnění signálních drah (cross-talk) HER-2/neu a estrogenních receptorů (9).

Sérový HER2 byl hodnocen rovněž jako možný prediktor odpovědi na chemoterapii. Dosavadní výsledky analyzující sérové koncentrace HER2 korelují s již dříve vyslovenými závěry studií o významu tkáňového HER-2/neu. U nemocných se zvýšenými předterapeutickými hladinami cirkulujícího HER-2 lze očekávat sníženou odpověď na CMF režim, naopak zvýšenou senzitivitu na antracykliny (2).

Sérový HER-2 se jeví být významným prediktorem odpovědi na terapii Herceptinem (2,3,10-13). Studie dosud obsahují limitovaný počet nemocných; obecně je možno shrnout, že neklesající koncentrace HER2 v počátku terapie mohou indikovat skupinu, kde je tato léčba neúspěšná.

Cílem naší studie bylo zhodnotit význam stanovení sérového HER-2/neu u nemocných léčených Herceptinem na podkladě jeho předterapeutických hodnot, ev. v době prvního restagingu, pro časné zjištění terapeutické účinnosti. Byla hodnocena rovněž závislost předterapeutických koncentrací HER2 na celkové době do ev. následného selhání terapie.

Soubor nemocných, metody

Do studie bylo dosud zařazeno celkem 28 pacientek s metastatickým karcinomem prsu léčených obvykle v druhé či další linii kombinovanou chemo-imunoterapií s Herceptinem, u nichž bylo možno hodnotit sérový HER-2 před touto terapií i v průběhu dalšího monitorování. Průměrný věk na počátku studie byl 51,9±9,8. HER-2/neu status primárního nádoru byl analyzován pomocí IHC nebo FISH, nemocné byly většinou HER-2 pozitivní 3+, ev. FISH metoda vykazovala silnou amplifikaci HER2/neu. Nemocným byly po celou dobu podávány Herceptinu vyšetřovány kromě sérového HER2 i CA15-3 a CEA.

Hodnocení *diference sérového HER2 před terapií i v době restagingu* bylo možno provést u 28 nemocných, u nichž byla prokázána jako nejlepší odpověď CR, PR (ev. SD), ev. k odpovědi nedošlo (PD). Zhodnocení *doby trvání odpovědi*, tj. doby od nasazení do ukončení terapie obvykle pro progresi (TTF = Time to Treatment Failure) bylo provedeno pro všechny nemocné, tj. i pro ty, které dosáhly pouze stabilizace onemocnění v důsledku terapie. 20 nemocných pokračuje dále v terapii (sledováno 5-17 měsíců, průměrně 9,55 ± 3,65 měsíců).

Sérová koncentrace extracelulární domény HER-2/neu byla vyšetřována vždy před zahájením terapie Herceptinem a dále obvykle ve třítydenních intervalech. Zhodnocení korelace mezi odpovědí na terapii a hladinami vyšetřovaných analytů bylo provedeno po třech měsících v době restagingu, monitorování pokračovalo celé období terapie až do ukončení.

Sérový HER2 byl měřen enzymoimuno-stanovením (mikrodestičková ELISA firmy Oncogene Science). Cut-off pro tuto metodu je 15 µg/l, detekční limit 2,5 µg/l a měřící rozsah do 35 µg/l. Herceptin při tomto stanovení neinterferuje (1).

Vyšetření CEA (elektrochemoluminis-

cenční immunoassay, ELECSYS 2010, Roche) a CA15-3 (enzymoimunoassay s mikropartikulami, AxSYM, Abbott) bylo prováděno jako rutinní vyšetření.

Statistické hodnocení bylo prováděno pomocí neparametrického Wilcoxonova Rank Sum testu pro koncentrace sérového HER2, CEA a CA15-3 před terapií, v době restagingu (obvykle po 3 měsících terapie) i pro jejich poměr (= hladina ve 3 měsících / hladina před terapií), a to pro skupiny s různou léčebnou odpovědí (CR, PR versus PD). Pro zhodnocení významu studovaných analytů (předterapeutická hodnota, doba po 3 měsících a vzájemný poměr těchto hodnot) ve vztahu k TTF byla užitá Kaplan-Meierova metoda odhadu času do TF s využitím mediánů HER2, CEA a CA15-3 jako diskriminační funkce. Porovnání křivek času do TF bylo prováděno Wilcoxonovým testem a Log-Rank testem. Pro určení optimálních sledovaných parametrů ve vztahu k TTF byla aplikována kroková (stepwise) procedura Coxova regresního modelu proporcionálních rizik.

Výsledky

Odpověď na terapii Herceptinem se známou hladinou sérového HER2 před i po prvních 3 měsících terapie bylo možno hodnotit celkem u 28 nemocných našeho souboru. U 14 nemocných (50 %) došlo k výrazné odpovědi (CR nebo PR), u 4 nemocných přetrvává odpověď PR či CR více než 11 měsíců (rozsah 11-39 měsíců). U 9 nemocných bylo optimálně dosaženo SD, u 4 je SD dosud delší než 6 měsíců (rozsah 7-14 měsíců). K progresi došlo u 5 nemocných (17,8 %).

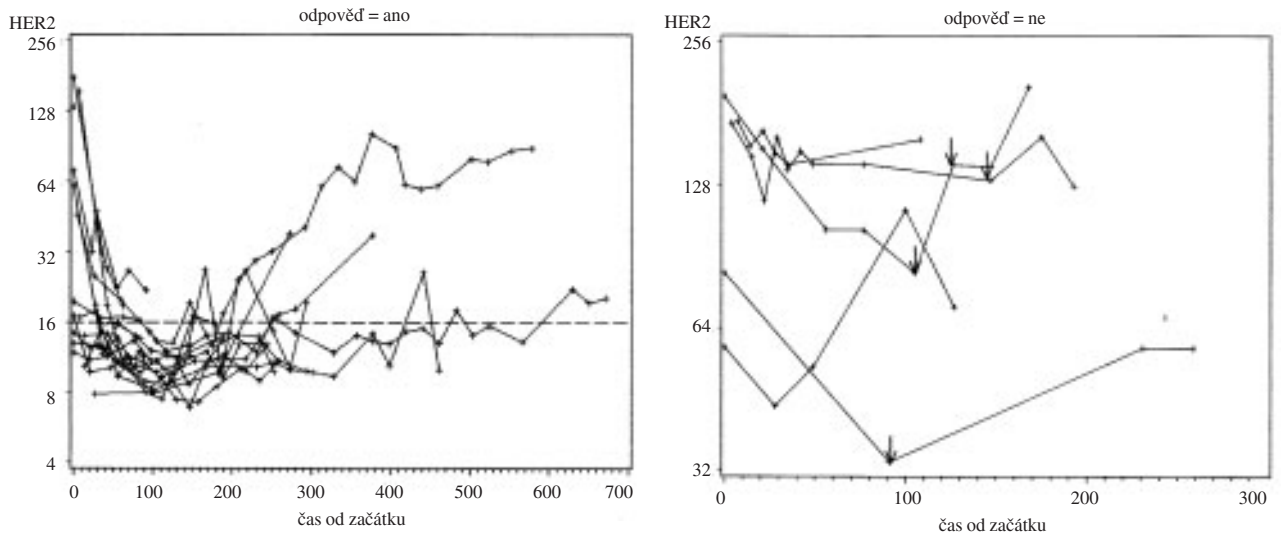
Koncentrace sérového HER2 před terapií byla zvýšena celkem u 57,1 % (16/28) nemocných. Při restagingu (po obvykle 3 měsících terapie) byla u nemocných, u nichž bylo dosaženo CR či PR jako nejlepší dosažené odpovědi, koncentrace sérového HER2 v normě (pod 15 µg/l) u 13 ze 14 nemocných (Tab.1). U skupiny nemocných s progresí však koncentrace S_HER2 ve všech 5 případech stále pohybovala nad cut-off hladinou. Tento rozdíl byl statisticky významný (p-value 0,005) (tab.1, obr.1). Statistické významnosti se přibližovaly rovněž rozdíly v předterapeutické hodnotě sérového HER2 u těchto dvou skupin nemocných, i když i u nemocných s dosaženou remisí byly nalezeny výrazně zvýšené koncentrace před začátkem terapie Herceptinem (obr.1); hodnoty nemocných v progresi byly výrazně vyšší než cut-off vždy. Poměr poklesu hladin S_HER2 nebyl v našem souboru signifikantní. Výpovědní hodnota CEA po 3 měsících sice vykazuje signifikantní diferenci středních hodnot (mediánů), při progresi je však medián vyšší. Pro CA15-3 nebyly nalezeny ve dvou skupinách hodnocených podle odpovědi na terapii signifikantní rozdíly (tab.1).

Tab.1. Srovnání mediánu sérových markerů a srovnání počtu nemocných se zvýšenými markery v době před a po prvním cyklu terapie ve skupinách podle odpovědi na terapii; skupiny hodnoceny podle nejlepšího dosaženého efektu léčby.

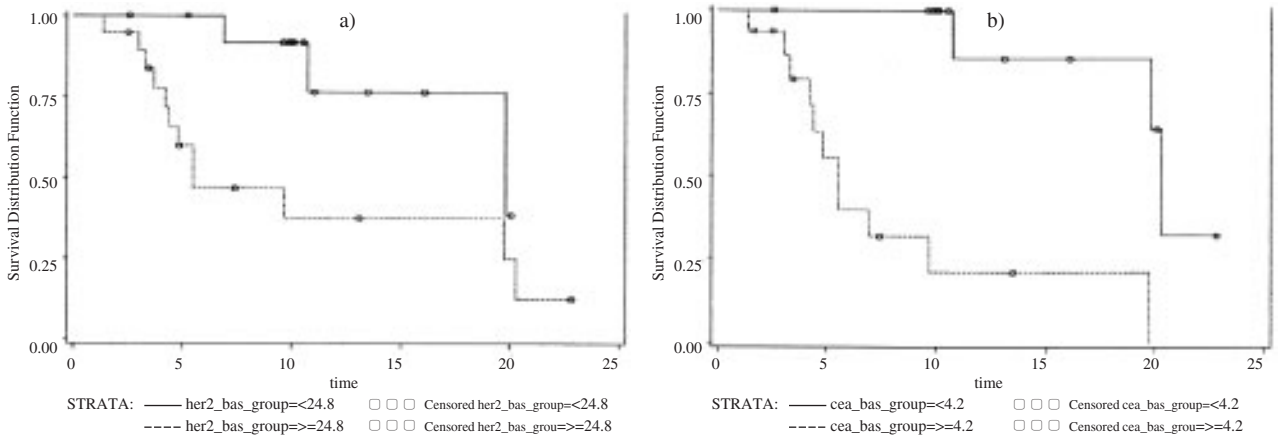
Marker	Sérová hodnota	Nejlepší odpověď CR+PR		Nejlepší odpověď PD		Nejlepší odpověď SD	
		medián	zvýšení N (%)	medián	zvýšení N (%)	medián	zvýšení N (%)
HER2 (µg/l)	před terapií	23,5 ^a	7/14 (50)	153,4 ^a	5/5 (100)	15,0	4/9(44)
	po 3 měsících	9,7 ^b	1/14 (7)	113,4 ^b	5/5 (100)	11,3	3/9 (33)
	poměr ^c	0,37		0,79		0,78	
CA15-3 (kU/l)	před terapií	38,5	9/14 (64)	544	3/5 (60)	36,0	4/8 (50)
	po 3 měsících	29,0	6/13 (46)	523	3/5 (60)	34,5	3/6 (50)
	poměr ^c	0,58		1,14		1,20	
CEA (µg/l)	před terapií	4,0	6/14 (43)	10,3	3/5 (60)	4,1	3/8 (38)
	po 3 měsících	3,75	4/12 (33)	21,5	3/5 (60)	2,6	3/6 (50)
	poměr ^c	0,53		1,3		0,76	

^{a, b} signifikance difference mezi CR+PR versus PD (Wilcoxonův Rank Sum test), ^a p=0,0277, ^b p=0,005, ^c uváděny jsou mediány individuálních poměrů počítaných pro každou nemocnou

Obr. 1. Koncentrace S_{HER2} (µg/l) v souboru vyšetřovaných nemocných, které dosáhly jako optimální odpovědi CR, ev. PR (odpověď = ano), ev. k odpovědi nedošlo (PD, odpověď = ne). Čas od začátku terapie ve dnech, konec terapie při PD: →



Obr. 2. Kaplan-Meierova analýza doby do ukončení terapie (TTF) podle mediánu předterapeutické koncentrace a) S_{HER2}, medián 24,8 µg/l; b) CEA, medián 4,2 µg/l; čas uveden v měsících. — hladina nižší než medián; hladina vyšší než medián.



Vzhledem k nárůstu S_{HER2} u pacientek, u nichž došlo po delší době monitorování k progresi onemocnění, jsme se pokusili o analýzu celkové doby do ukončení terapie. Hodnocení bylo jednak provedeno Kaplan-Meierovou metodou odhadu času do TF s využitím mediánů S_{HER2}, CEA a CA15-3 jako diskriminační funkce a porovnání křivek času do TF Wilcoxonovým a Log-Rank testem. Dále byla použita kroková (stepwise) procedura Coxova regresního modelu proporcionálních rizik. Nemocné, které měly předterapeutickou koncentraci S_{HER2} vyšší než 24,8 µg/l, mají signifikantně kratší dobu do ukončení terapie (p-value 0,0273 dle Log-Rank testu; p-value 0,0084 dle Wilcoxonova testu). Rovněž předterapeutická CEA vyšší než 4,2 µg/l je statisticky významná (p value <0,0002 a 0,0006 dle uvedených testů), (obr. 2a,b). Zaznamenali jsme rovněž nejvýraznější korelaci mezi CEA a S_{HER2} před terapií ($r_s=0,5958$, p-value 0,0005 pro N=30). Analýza krokovou (stepwise) procedurou Coxova regresního

modelu proporcionálních rizik (počet hodnotitelných případů je pouze 21) vykazuje nejlepší prediktivní hodnotu hladinu S_{HER2} v době po 3 měsících od začátku terapie (tab.3). Prognostické významnosti dosahuje rovněž předterapeutická hodnota CEA a CA15-3.

Diskuse

Léčba Herceptinem, tj. protilátkou proti receptorům růstových faktorů, patří k jedné z prvních léčebných modalit, která je namířena proti specifickému proteinu. Indikací k terapii je průkaz tohoto onkoproteinu v primárním nádoru. Proteolyticky štěpená extracelulární doména HER-2/neu uvolňovaná do cirkulace by mohla být nadějným markerem pro monitorování úspěšnosti této terapie, projevujícím se ve zkrácení času neefektivní terapie, snížením jejích nežádoucích účinků a v neposlední řadě i nákladů. Závěry pro zhodnocení jeho prediktivního významu nejsou však dosud podloženy dostatečnými daty. Koestler et al. (10) prokázal v souboru 55 nemocných s metastatickým karcinomem prsu léčených Herceptinem, že u nemocných s odpovědí na terapii dojde k výraznému poklesu sérového HER2 již během prvního měsíce, a poměr HER2 v době klinického restagingu a před zahájením léčby je výrazně nižší než u non-responderů. Předterapeutická hodnota se však signifikantně nelišila. U 30 nemocných hodnocených v souboru léčených Herceptinem s docetaxelem, z nichž bylo 16 responderů, se normalizovala sérová hladina HER2 u 75 %

Tab. 3. Coxův model regresní analýzy, kroková procedura.

Marker	Pořadí vstupu do krokové varianty Coxova modelu	p-value
S _{HER2} ve 3 měsících	1.	0,0003
CA15-3 před terapií	2.	0,0050
CEA před terapií	3.	0,0127

nemocných (11). Hoopman et al. (12) prokázal, že v souboru 20 nemocných byla dobrá odpověď charakterizována u poloviny responderů buď poklesem cirkulujícího HER2 pod cutoff, nebo byla konstantně v normě (12). U 43 nemocných zhodnocených rovněž před terapií a na konci 1. cyklu kombinované terapie s Herceptinem byla jako prediktor progrese prokázán neklesající sérová koncentrace HER2 (13).

Závěry dosavadních studií, které dosud zahrnují pouze malý počet nemocných, lze tedy shrnout takto: 1) Neklesne-li koncentrace HER2 v séru po prvním cyklu terapie k normálním hodnotám, pak se jedná obvykle o neúspěšnou léčbu. 2) Jeho zvýšené předterapeutické hladiny se mohou vyskytovat ve skupinách nemocných s dobrou i špatnou odpovědí na terapii. 3) Poměr sérové HER2 koncentrace v době po prvním cyklu terapie ve vztahu k předterapeutické hodnotě je u responderů výrazně nižší než u non-responderů (10-13).

V našem souboru jsme prokázali, že koncentrace sérového HER2 ve 3 měsících má prediktivní význam a podporuje tak závěry klinických vyšetření získaných při prvním restagingu zobrazovacími technikami. U nemocných, kde totiž hodnota HER2 v cirkulaci neklesne v tomto období z počátečních zvýšených koncentrací pod diskriminační hladinu, nedojde k odpovědi na terapii. Další sledované nádorové markery (CA15-3 a CEA) nemají tuto výpovědní hodnotu.

Nárůst koncentrace HER2 v séru v průběhu déletrvající terapie je podle našich výsledků obvykle indikátorem selhání terapie po delším období. V uvedeném souboru nemocných byla nejsilnějším prediktorem opět zvýšená hladina sérového HER2, a to podle porovnání Kaplan-Meierova křivek času do TF spíše jeho předterapeutická hodnota; Coxův model (dosud početně limitovaný soubor) preferuje jako optimální prediktor zvýšenou hodnotu ve 3 měsících. Je zajímavé, že poměrně silnou predikci vykazují rovněž hodnota CEA před nasazením terapie. Zvýšené hladiny sérového CEA jsme zaznamenali v několika případech tehdy, došlo-li k tvorbě mozkových metastáz. Dosud není možno rozhodnout, zda má tato skutečnost souvislost s poměrně nízkou penetrací Herceptinu do mozku (11).

Dosavadní výsledky monitorování koncentrací sérového HER2 našeho souboru jak v počátečním období terapie Herceptinem (do prvního restagingu), tak i při dlouhodobém monitorování je třeba doplnit o další nemocné. Již nyní se však jeví, že sérová hladina tohoto onkoproteinu stále zvýšená (nebo v průběhu monitorování se zvyšující nad diskriminační hranici) je podporou rozhodnutí ukončit neúspěšnou (a ekonomicky náročnou) terapii.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZ České republiky č. 00020980501

Literatura

1. J. S. Ross, J. A. Fletcher, G. P. Linette, J. Stec, E. Clark, M. Ayers, W. F. Symmans, L. Pusztai, K. J. Bloom: The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist* 8, 2003, 307-325.
2. W. P. Carney, R. Neumann, A. Lipton, K. Leitzel, S. Ali, C. H. Price: Potential utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentration in patients with breast cancer. *Clin.Chem.* 49, 2003, 1579-1598.
3. D. Lüftner, C. Luke, K. Possinger: Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients. *Clin.Biochem.* 36, 2003, 233-240.
4. T. I. Andersen, E. Paus, J. M. Nesland, S. J. McKenzie, A. L. Borrensen: Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. *Acta Oncol.* 34, 1995, 499-504.
5. T. Fehm, P. Maimonis, A. Kalatinic, W. Jager: The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 55, 1998, 3-38.
6. M. Krainer, T. Brodowitz, R. Zellinger, C. Wiltshcke, C. Schoelten, M. Seifert et al.: Tissue expression and serum levels of HER-2neu in patients with breast cancer. *Oncology* 54, 1997, 475-481.
7. T. Fehm, G. Gebauer, W. Jager: Clinical utility of serial serum c-erbB-2 determinations in the follow-up of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 75, 2002, 97-106.
8. A. Lipton, S. M. Ali, K. Leitzel, L. Demers, V. Chinchilli, L. Engle, H. A. Harvey, C. Brady, C. M. Nalin, M. Dugan, W. Carney, J. Allard: Elevated serum HER-2/neu levels predict decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 26, 2002, 1467-1472.
9. J. Shou, S. Massarweh, C. K. Osborne, A. E. Wakeling, S. Ali, H. Weiss, R. Schiff: Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 96, 2004, 926-35.
10. W. J. Kostler, B. Schwab, C. Singer, R. Neumann, E. Marton, T. Brodowitz, S. Tomek, G. Steger, M. Krainer, C. Wiltshcke, C. Zelinski: Predictive value of serum HER-2/neu extracellular domain (ECD) during trastuzumab-based therapy in patients with breast cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, Abstract 2437, 43, 2002, 201.
11. J. Esteve, V. Valero, D. Booser, L. T. Guerra, J. L. Murray, L. Pusztai, M. Cristofanilli, B. Arun, B. Esmali, H. A. Ffritsche, N. Sneige, T. L. Smith, G. N. Hortobagyi: Phase II study of weekly Docetaxel and Trastuzumab for patients with HER-2 -overexpressing metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 20, 2002, 1800-1808.
12. M. Hoopmann, R. Neumann, T. Tanasale T. Schöndorf: HER 2/neu determination in blood plasma of patients with HER 2/neu overexpressing metastasized breast cancer: A longitudinal study. *Anticancer Res.* 22, 2002, 1031-1034.
13. H. J. Burstein, L. N. Harris, P. K. Marcom, R. Lambert-Falls, K. Havlin, B. Overmoyer, R. J. Friedlander, J. Gargiulo, R. Strenger, C. L. Vogel, P. D. Ryan, M. J. Ellis, R. A. Nunes, C. A. Bunnell, S. M. Campos, M. Hallor, R. Gelman, E. P. Winner: Trastuzumab and Vinorelbine as first-line therapy for HER-2 overexpressing metastatic breast cancers: Multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J.Clin.Oncol.* 21, 2003, 2889-2895.