

HER2 circolante: valore prognostico e predittivo nel tumore della mammella

Maria Teresa Sandri

Unità di Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia - Milano

ABSTRACT

Serum HER2: prognostic and predictive role in breast cancer

The proto-oncogene HER2-neu encodes a transmembrane receptor with tyrosine kinase activity. Amplification of HER2 occurs in 25-30% of breast cancers, and it has been established as a negative prognostic and predictive factor. The receptor extracellular domain (HER2 ECD) can be shed into the blood, due to proteolytic cleavage. Levels of HER2 ECD are increased in advanced breast cancer. Some studies indicate that elevated levels of the protein are associated with worse prognosis and reduced response to treatment.

RIASSUNTO

Il proto-oncogene HER2-neu codifica per un recettore trans-membrana avente attività tirosinchinasica. La sua amplificazione, rilevata nel 25-30% dei tumori della mammella, è un fattore prognostico negativo, e predittivo di ridotta risposta sia all'ormone che alla chemioterapia. La parte esterna del recettore (HER2 ECD) può venir liberata in circolo a seguito dell'azione di enzimi proteolitici; i suoi livelli sono incrementati soprattutto nelle fasi avanzate della malattia. Alcuni studi suggeriscono che livelli aumentati di proteina circolante sono correlati a prognosi peggiorate e ad una minor risposta alla terapia.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della mammella è la forma di neoplasia più frequente nella donna. Sebbene un numero sempre maggiore di casi venga diagnosticato (si stima che 1 donna su 8 nei paesi occidentali sviluppi questo tumore nell'arco della vita), la mortalità sta lentamente ma costantemente diminuendo, grazie alla possibilità di effettuare la diagnosi in stadi più precoci di malattia (programmi di screening mammografici, maggiore consapevolezza) e/o all'aumento della efficacia delle terapie adiuvanti.

Il decorso della malattia è influenzato da fattori prognostici e predittivi (1,2). I fattori prognostici rispecchiano il potenziale di crescita e di metastatizzazione del tumore primitivo; danno quindi informazioni relative all'outcome clinico delle pazienti al momento della diagnosi, indipendentemente dalle terapie, in termini di sopravvivenza media (OS), di tempo alla progressione (TTP), di tempo di sopravvivenza senza malattia (DFS) e di tempo di fallimento terapeutico (TTF). I fattori predittivi sono associati alla sensibilità o resistenza ad una determinata terapia. Alcuni fattori possono far parte sia dell'una che dell'altra categoria.

Fattori prognostici oramai ampiamente utilizzati nella valutazione del tumore della mammella sono rappresentati da alcune caratteristiche morfologiche - come l'istotipo, la dimensione del tumore, il grado di differenziazione -, dalla presenza di metastasi linfonodali, dalla presenza di invasione vascolare etc. A queste si affiancano alcune caratteristiche "biologiche" come l'indice di proliferazione -Ki67-, l'espressione di recettori ormonali per estrogeni e progesterone (che sono anche predittivi di risposta alla terapia ormonale), l'espressione di oncogeni, etc. (2).

Negli ultimi anni si sta configurando un nuovo scenario,

nato e sviluppatosi a seguito della sempre miglior comprensione dei meccanismi molecolari e delle alterazioni genetiche che sono alla base dello sviluppo e dell'evoluzione della patologia neoplastica della mammella. Infatti, sono stati identificati target molecolari specifici, che rappresentano, e rappresenteranno sempre più nel futuro, la base per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche specificamente dirette contro il tumore. Attualmente l'approccio tradizionale al trattamento del tumore della mammella include la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e la terapia ormonale. Sebbene queste modalità terapeutiche, singolarmente o in varia combinazione fra loro, siano efficaci nella cura di molte pazienti, esse non sono dirette specificamente contro il tumore. Negli anni futuri è possibile che si arrivi ad una sempre miglior caratterizzazione "biomolecolare" del tumore; l'integrazione dei test diagnostici e delle modalità terapeutiche sarà un elemento chiave e fondamentale di questo nuovo scenario.

Un innovativo approccio terapeutico di recente introdotto è rappresentato dall'impiego di anticorpi monoclonali (MoAb) diretti verso molecole-bersaglio espresse sulla superficie cellulare. In particolare il trastuzumab (Herceptin; Genentech, Inc, South San Francisco, CA) è un MoAb umanizzato diretto verso la parte extracellulare di HER2: studi clinici hanno dimostrato che la sua somministrazione a pazienti con carcinoma della mammella, con sovraespressione di HER2, in stadio avanzato determina un miglioramento sia del TTP che dell'OS (3).

MA CHE COSA È L'HER2?

Il gene HER2/neu è l'analogo umano del gene neu

identificato nel neuroblastoma murino nei primi anni '80 (4). Questo gene è amplificato o sovraespresso nel 25-30% dei tumori mammari (indicati quindi come HER2 positivi), più frequentemente nei carcinomi duttali (5). È sito sul cromosoma 17q21, e codifica per una glicoproteina transmembrana di 185 kD nella quale si riconoscono 3 domini: una parte extracellulare, nella quale si trovano i siti di legame ed indicata come "extracellular domain" (ECD), una parte transmembrana, ed una parte intracellulare con attività tirosin-chinasica. Si comporta come un recettore per fattori di crescita, e fa parte della famiglia degli Epidermal Growth Factors Receptors, che comprende l'EGFR (o HER1), HER2, HER3 ed HER4.

I ligandi per questa famiglia di recettori sono rappresentati da fattori di crescita bivalenti, aventi cioè due siti di legame per il recettore. Mentre sono stati identificati ben 6 ligandi per HER1 indicati come EGF-like (EGF, TGF alfa, amphiregulina, eparin-binding EGF, betacellulina ed epiregulina), ed un numero di ligandi chiamati collettivamente neureguline o hereguline per HER3 ed HER4, il o i ligandi specifici per HER2 non sono ancora stati identificati.

Il legame del ligando con i recettori dà luogo alla formazione di omodimeri ed eterodimeri: la dimerizzazione è seguita dalla fosforilazione della tirosin-chinasi intracellulare e quindi dall'innescarsi di una serie di processi intracellulari quali attivazione di Ras (6), c-Src (7), PI 3-chinasi (8) e fospolipasi C (9).

Sebbene HER2 formi eterodimeri con gli altri membri della famiglia, dei quali sembra essere il partner di legame preferito (10), è possibile che nei casi in cui vi sia un elevato livello di sovraespressione sulla superficie cellulare, HER2 possa formare spontaneamente degli omodimeri, che danno luogo alla formazione di un recettore costituzionalmente attivo (11).

Studi in vitro e negli animali hanno dimostrato che l'amplificazione genica e/o la sovraespressione del gene HER2 gioca un ruolo di primo piano nella trasformazione

neoplastica e nella tumorigenesi: cellule transfettate con HER2 acquisiscono un fenotipo più maligno (12), con stimolo della proliferazione cellulare (13), del potenziale invasivo (14) e della capacità di metastatizzare (15).

HER2 E TUMORE ALLA MAMMELLA

La positività per HER2 è stata riportata in molti tumori umani, come mammella, ovaio, polmone, stomaco ed altri.

Nel 1987 Slamon e collaboratori per primi hanno riportato una associazione tra HER2 e prognosi in pazienti con tumore alla mammella: essi dimostrarono che l'amplificazione del gene HER2 era associata ad una significativa riduzione della sopravvivenza in un gruppo di pazienti con metastasi linfonodali (16). Da allora numerosi sono stati gli studi che hanno valutato il significato prognostico della HER2 positività nel tumore mammario. La maggioranza degli studi ha concluso che l'amplificazione/supraespressione di HER2 rappresenta un fattore prognostico negativo nelle pazienti con tumori già metastatici ai linfonodi, mentre le conclusioni relative alle pazienti con linfonodi negativi sono discordanti (17).

TEST PER HER2

Lo stato di espressione di HER2 viene attualmente determinato sul tessuto mediante due tecniche: l'immunostochimica (IHC), e la FISH (fluorescence-in-situ-hybridization). Queste sono le due tecnologie accettate per la valutazione della espressione di HER2, al fine di candidare una paziente alla terapia con Herceptin.

Accanto alla valutazione tissutale, è possibile ricercare la presenza in circolo della parte esterna del recettore HER2, indicata come HER2 ECD, rilasciata a seguito dell'azione di enzimi litici, probabilmente della classe delle metalloproteasi (18)(Figura 1).

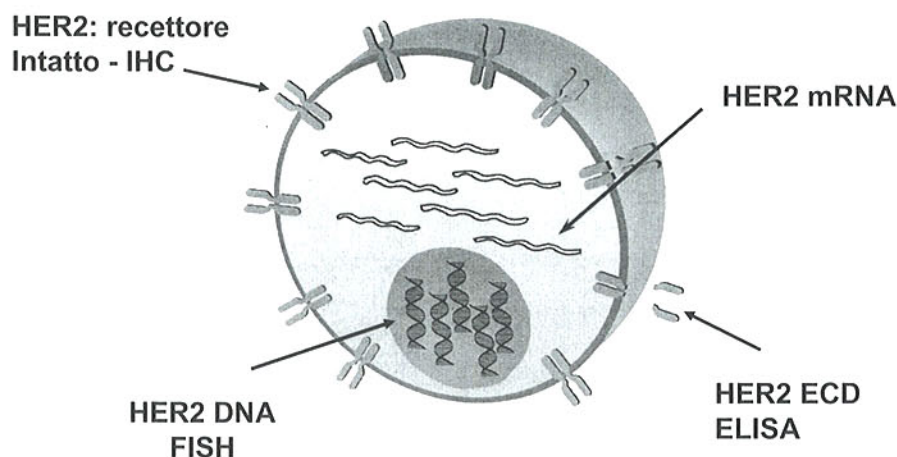


Figura 1

Metodi per la determinazione di HER2. L'espressione del recettore sulla superficie cellulare viene rilevata mediante tecniche immunostochimiche (IHC: Immuno Histo Chemistry); la presenza di amplificazione genica viene valutata mediante FISH (Fluorescence In Situ Hybridization); i livelli di HER2 ECD (ECD Extra Cellular Domain), liberati in circolo a seguito dell'azione delle metalloproteasi, vengono misurati mediante tecnica ELISA

IHC

La tecnica immunoistochimica, che valuta la quantità di recettore presente sulla superficie cellulare mediante l'impiego di specifici anticorpi, è un metodo relativamente semplice che utilizza strumentazione normalmente presente nei reparti di Anatomia Patologica, ed è relativamente poco costosa. Tuttavia alcuni problemi sono associati all'impiego di questa tecnica: variabilità nella fissazione e processazione dei tessuti, impiego di anticorpi aventi specificità diverse verso HER2, necessità di operatori addestrati, lettura ed interpretazione soggettiva. Il risultato viene fornito in maniera semiquantitativa, assegnando un punteggio da zero a 3+, che riflette l'intensità e la tipologia del segnale rilevato nelle cellule tumorali.

Data la ampia disponibilità e la facilità di esecuzione, la IHC rappresenta il principale metodo utilizzato per la determinazione dello stato HER2.

Attualmente due test sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) americana per questo utilizzo (HerceptTest - DAKO Corp, Carpinteria CA, e l'anticorpo monoclonale CB11, commercializzato dalla Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ).

FISH

La FISH, che valuta la presenza o meno di amplificazione genica, è una tecnica altamente sensibile e riproducibile. Usa una sonda specifica per HER2 opportunamente marcata, che, a seguito della ibridazione con il gene HER2 presente nel campione di tessuto, viene rilevata in microscopia a fluorescenza. Fornisce una determinazione quantitativa ed obiettiva della eventuale amplificazione del gene HER2. Tuttavia è una tecnologia laboriosa e decisamente più costosa della IHC. Due sono i test attualmente in commercio approvati dalla FDA: il Ventana INFORM ed il kit Vysis PathVysion (Vysis, Inc, Downers Grove, IL).

CONCORDANZA FRA FISH E IHC

Sia la FISH che l'IHC sono due tecniche estremamente valide per la valutazione dello stato di HER2 nei campioni di tessuto del tumore primitivo e delle metastasi. Molti studi hanno evidenziato un livello di concordanza >90% utilizzando vari tests FISH e IHC (19-22). Tuttavia, mentre la concordanza è molto alta tra FISH positiva ed IHC 3+, questa scende ad una percentuale che si aggira intorno al 25% tra FISH positiva e IHC 2+: per questo motivo è stato studiato un apposito algoritmo da seguire al fine di valutare con esattezza lo stato HER2 della paziente, e poterla quindi eventualmente trattare con Herceptin.

ELISA

Questa metodologia viene utilizzata per misurare l'HER2 ECD, ossia la parte esterna del recettore, rilasciata nel plasma a seguito dell'azione proteolitica delle metalloproteasi. La FDA ha recentemente approvato due test ELISA aventi la stessa formulazione e tra loro ben correlati (23), uno in micropiastre e l'altro su piattaforma automatizzata, da utilizzarsi nel monitoraggio delle pazienti con tumore metastatico della mammella in trattamento con Herceptin (Oncogene Science/Bayer Corporation, Cam-

bridge, MA, USA - Bayer Immuno1, Bayer Diagnostics, Tarrytown, USA).

Numerosi studi hanno evidenziato che i livelli di questo marcatore sono elevati mediamente nel 20% delle pazienti: la sua sensibilità passa da 0% in pazienti con stadio I al 40% nelle pazienti con stadio IV (24).

Il significato funzionale della liberazione dell'HER2 ECD non è stato ancora completamente chiarito. Tuttavia dati in vitro sembrano suggerire che il distacco della parte extracellulare della molecola dia luogo alla formazione di un recettore troncato, indicato come p95, caratterizzato da una aumentata capacità trasformante e di innesco del segnale (25). La proteina p95 risulta presente e fosforilata in cellule di tumore mammario primitivo (26), ed è stata associata con la presenza di metastasi linfonodali nelle pazienti con tumori che sovraesprimono HER2 (27,28). La liberazione in circolo di HER2 ECD potrebbe quindi dar luogo alla formazione di un recettore costituzionalmente attivo, che contribuisce a determinare un fenotipo più aggressivo.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno indagato se la determinazione di HER2 ECD potesse fornire informazioni sia prognostiche che predittive di risposta alle diverse terapie. E' stato inoltre valutato il suo ruolo nel follow-up delle pazienti, sia per evidenziare la ripresa della malattia che per documentare la risposta alla medesima.

Inoltre sono stati effettuati studi per valutare la correlazione fra stato di HER2 tissutale e livelli di HER2 circolante: i risultati non sono unanimi, e sembra che la concordanza riportata da alcuni autori sia dovuta soprattutto al numero elevato di pazienti che risultano negative sia alla determinazione sul tessuto che a quella su siero. D'altra parte anche la non buona correlazione tra sovraespressione - amplificazione di HER2 ed il riscontro di elevati livelli di HER2 ECD può essere spiegata sia dal fatto che i livelli circolanti dipendono dalla massa tumorale, e che quindi piccoli tumori positivi alla determinazione sul tessuto non si accompagnano necessariamente ad elevati livelli di HER2 ECD, sia dalla necessità di intervento delle metalloproteasi per la liberazione in circolo della parte extracellulare del recettore.

L'analisi dei diversi lavori fin ad ora pubblicati è limitata dalla possibilità di paragonare i diversi studi: infatti nei primi anni '90 sono stati utilizzati metodi molto diversi fra loro, con cut-off differenti e talora nemmeno riportati. Un altro limite è rappresentato dal numero di pazienti arruolate negli studi: infatti mentre alcuni, soprattutto i più recenti, hanno delle casistiche di numerosità adeguata, altri sono relativi ad osservazioni effettuate su poche pazienti. Infine non sono ancora disponibili studi prospettici, ma la gran parte è stata effettuata in maniera retrospettiva.

HER2 ECD COME FATTORE PROGNOSTICO

Molti studi hanno cercato di valutare se l'HER2 ECD potesse essere considerato un marcatore prognostico, andando a valutare il suo impatto sul DFS e OS.

Nella tabella 1 è mostrata una sintesi dei principali lavori apparsi in letteratura tra il 1995 ed il 2002, relativi a

Tabella 1
Livelli di HER2 ECD e prognosi

Studio	Riferimento	N. pazienti	Stadio	Metodo	Correlazione di HER2 ECD con decorso	P	Tipo di analisi
Harris et al (44)	J Clin Oncol 2001	425	IV	Triton/Chiron	Diminuzione OS	0.045	Multivariata
Hayes et al (30)	Clin Cancer Res 2001	242	IV	Oncogene/Bayer	Diminuzione OS	0.007	Univariata
Willsher et al (33)	Breast Cancer Res Treat 1996	119	I-IV	Bender/MedSystems	Diminuzione OS	0.002	Univariata
Fehm et al (34)	Oncology 1998	80	IV	Triton/Chiron	Diminuzione OS	<0.01	Multivariata
Lipton et al (31)	J Clin Oncol 2002	711	IV	Bayer Immuno I	Diminuzione OS	<0.001	Univariata
Saghtchian et al (29)	ASCO 2001	700	I-III	Bayer Immuno I	Diminuzione OS	0.003	Univariata
Mehta et al (47)	J Clin Oncol 1998	79	II-III	Oncogene*	Riduzione TTP se linfonodi metastatici	0.01	Univariata
Leitzel et al (32)	J Clin Oncol 1995	300	IV	Triton/Chiron	Diminuzione OS	<0.001	Univariata

OS: sopravvivenza media; TTP: tempo alla progressione
*kit di prima generazione

questo argomento.

Nella maggioranza degli studi è stata rilevata un'associazione fra livelli elevati di HER2 ECD e stadio più avanzato di malattia, metastasi linfonodali, bassa espressione dei recettori per estrogeni o progesterone nel tumore primitivo, e prognosi peggiore.

Uno studio retrospettivo su 700 pazienti con malattia localizzata o localmente avanzata ha correlato elevati livelli di HER2 ECD prima della chirurgia ad una ridotta DFS ($p=0.003$) e ridotta OS ($p=0.002$) (29).

Anche gli studi effettuati su pazienti con tumori in stadio avanzato hanno riportato una correlazione fra elevati livelli del marcatore circolante e prognosi peggiore. In particolare Hayes e coll. (30) hanno studiato 242 pazienti con malattia avanzata trattate con ormonoterapia o chemioterapia. Elevati livelli di HER2 ECD, riscontrati nel 37% delle pazienti, sono risultati associati ad una riduzione di OS. Lipton e coll. (31) analizzando l'outcome di 711 pazienti arruolate in 3 studi tra loro molto simili, nei quali le pazienti venivano trattate con 3 tipi di terapia ormonale, hanno evidenziato che i livelli di HER2 ECD erano elevati nel 30% delle pazienti: in questo gruppo il TTP e OS erano significativamente ridotti rispetto al gruppo di pazienti con livelli di HER2 ECD non elevati.

Dai dati sopra-esposti e da quelli presentati nella Tabella 1, si può concludere che esiste una correlazione tra elevati livelli di HER2 ECD e prognosi peggiore, valutata di volta in volta come TTP, OS o DFS.

HER2 ECD COME FATTORE PREDITTIVO

Terapia ormonale

Studi in vitro hanno dimostrato che la forzata espressione

del gene HER2 in cellule mammarie normali porta all'acquisizione di estrogeno-indipendenza. Inoltre l'aumentata espressione di uno di questi due recettori (Estrogeni o HER2) sembra ridurre l'espressione dell'altro, come confermato dai dati clinici che indicano che l'amplificazione di HER2 è associata più frequentemente ad un fenotipo negativo per recettori di estrogeni.

Queste osservazioni trovano riscontro nell'associazione inversa tra espressione dei recettori per estrogeni o progesterone e sovraespressione di HER2, e forniscono anche la spiegazione per la ridotta risposta alla terapia ormonale nelle pazienti HER2 positive (Tabella 2). In uno studio che ha coinvolto 300 pazienti con tumore avanzato (32) trattate con megestrolo acetato o con fadrazolo come seconda linea di terapia, elevati livelli di HER2 ECD erano associati ad una minor probabilità di risposta (20.7% vs. 40.9%, $P=0.004$). Recentemente Lipton e coll. (31) hanno riportato le medesime conclusioni su un gruppo di 711 pazienti trattate con megestrolo acetato o con un inibitore delle aromatasi (fadrozolo o letrozolo): le pazienti che hanno risposto alla terapia sono state il 45% nel gruppo con HER2 ECD non elevato ed il 23% nel gruppo di pazienti con HER2 ECD elevato ($p<0.0001$). Uno studio recente effettuato su 562 pazienti trattate con tamoxifen o con letrozolo ha evidenziato una superiorità (in termini di risposta clinica e di TTP) del letrozolo nei confronti del tamoxifen nel gruppo di pazienti con normali livelli di HER2 circolante. Nel gruppo di pazienti con livelli elevati, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa, ma solo una tendenza ad una miglior risposta al letrozolo, in termini di TTP e TTF (35).

Chemioterapia

In numerosi studi di fase II e fase III pazienti con tumore

mammario (più frequentemente in stadio avanzato) sono state suddivise in 2 gruppi, per valutare se livelli elevati del marcatore prima del trattamento fossero predittivi di risposta (Tabella 2).

Tuttavia, gli studi a disposizione sono pochi, retrospettivi e su gruppi di pazienti non numerosi. Per quanto riguarda i farmaci alchilanti negli studi effettuati su tessuto sembra emergere una relativa resistenza nelle pazienti con sovraespressione di HER2 (36,37), tranne che in un lavoro recente (38), nel quale le pazienti HER2 positive hanno beneficiato della terapia con agenti alchilanti, anche se questa è risultata meno efficace della terapia effettuata con antracicline. La sovraespressione tissutale di HER2 non sembra invece condizionare la risposta alle antracicline (39,40).

In uno studio effettuato su 191 pazienti con malattia metastatica, trattate o con CMF (ciclofosfamide - metotrexate - 5 fluorouracile) o con uno schema contenente antracicline, è stata riportata una migliore percentuale di risposta nelle pazienti con HER2 ECD elevato che avevano ricevuto la doxorubicina (64.1% vs. 38.4%) (41). Tuttavia non vi erano differenze nell'OS e TTP. Al contrario non sono state rilevate differenze di risposta in uno studio nel quale sono state confrontati 2 gruppi di pazienti, uno trattato con CMF l'altro con uno schema contenente mitoxantrone, e nel quale sono state valutate in totale 211 pazienti con malattia localizzata (42). Recentemente Classen e coll. (43) ha valutato 64 pazienti con malattia metastatica trattate con ormono- o chemioterapia (adriamicina o CMF): le pazienti con elevato HER2 ECD mostravano una ridotta percentuale di risposta (84% nelle pazienti con

livelli bassi rispetto a 11.5 % nelle pazienti con livelli elevati, $P < 0.001$) ed una diminuzione del TTP. Inoltre nelle pazienti che non rispondevano alla terapia, i livelli elevati di HER2 erano associati ad elevati livelli di LDH, ALP, ed alla presenza di metastasi epatiche.

In un gruppo di pazienti sottoposto a chemioterapia ad alte dosi, elevati livelli di HER2 ECD erano correlati ad una ridotta sopravvivenza (44)

Infine elevati livelli di HER2 ECD sono risultati un fattore predittivo indipendente di ridotta sopravvivenza in pazienti in stadio II/III trattate con CMF da solo o in associazione a vincristina e prednisone (47).

Herceptin

L'Herceptin è un anticorpo monoclonale diretto verso il dominio extracellulare del recettore HER2, di recente introdotto in terapia, il cui meccanismo di azione non è ancora stato completamente chiarito.

Il ruolo della determinazione dell'HER2 ECD nelle pazienti trattate con Herceptin è tuttora un campo di attiva ricerca, e pochi sono gli studi già pubblicati.

Diverse domande sono ancora senza una risposta definitiva. In sintesi i principali interrogativi ancora aperti sono:

- La somministrazione di trastuzumab interferisce con la determinazione di HER2 ECD?
- L'HER2 ECD si complessa con il trastuzumab?
- I livelli pre-terapia di HER2 ECD sono predittivi di risposta?
- Variazioni dei livelli di HER2 ECD correlano con l'andamento clinico?

Tabella 2

Livelli di HER2 ECD e risposta alla chemioterapia o al trattamento ormonale

Studio	Riferimento	N. pazienti	Stadio	Metodo	Trattamento	% di risposte ECD+ / ECD-	p
Harris et al (30)	Clin Cancer Res 2001	242	IV	Triton/Chiron	CT o HT	Non ruolo predittivo	/
Lipton et al (31)	J Clin Oncol 2002	711	IV	Bayer Immuno 1	HT	23% / 45%	<0.0001
Leitzel et al (32)	J Clin Oncol 1995	300	IV	Triton/Chiron	HT	20% / 40.9%	0.004
Yamauchi et al (45)	J Clin Oncol 1997	94	IV	Oncogene*	HT	9% / 56%	<0.0001
Willsher et al (33)	Breast Cancer Res Treat 1996	67	III-IV	Bender/MedSystems	HT	Non ruolo predittivo	/
Fehm et al (42)	Breast Cancer Res Treat 1997	211	II-III	Triton/Chiron	CT	Non ruolo predittivo	/
Colomer et al (46)	Clinical Cancer Res 2000	58	IV	Calbiochem	CT	CR: 0% / 26%	0.021
Harris et al (41)	ASCO 1996	218	IV	Ciba-Corning	CT	Predittivo di risposta	0.087
Harris et al (44)	J Clin Oncol 2001	191	IV	Triton/Chiron	CT	Predittivo di risposta	0.067
Classen et al (43)	Tumor Biol 2002	64	IV	Dianova	CT / HT	11.5% / 84.2%	<0.001

CT: Chemioterapia, HT: Ormonoterapia

*kit di prima generazione

Sebbene i primi studi avessero riportato che livelli molto elevati di HER2 ECD (500 ng/ml) potevano diminuire la vita media del trastuzumab (48), studi successivi hanno dimostrato che livelli elevati di HER2 ECD non precludono la possibilità di risposta nelle pazienti trattate con questa terapia (49,50). Inoltre la somministrazione di Herceptin non interferisce con la determinazione di HER2 ECD, probabilmente perché i siti di legame del farmaco all'ECD sono diversi ed indipendenti da quelli dei due MoAb utilizzati nella formulazione del kit (23).

Sebbene vi siano le prime indicazioni secondo le quali elevati livelli di HER2 ECD sembrano essere predittivi di risposta alla terapia con Herceptin (50), i dati a disposizione non sono ancora sufficienti per trarre delle conclusioni definitive.

Per quanto riguarda la possibile associazione fra variazioni dei livelli di HER2 circolante e andamento clinico della malattia, la maggioranza degli studi riporta che le variazioni dei livelli di HER2 ECD correlano con l'andamento clinico della malattia.

Cook (24) ha riportato una concordanza dell'86.8% tra le variazioni di HER2 ECD e l'andamento clinico della malattia in un gruppo di 38 pazienti che presentavano elevati livelli all'arruolamento. Il valore predittivo positivo nel caso d'incremento o di diminuzione delle concentrazioni sieriche era del 100%.

In un lavoro dello scorso anno, Esteva e coll. (50) hanno valutato 30 pazienti con malattia avanzata, trattate con Herceptin e docetaxel. I livelli di HER2 ECD sono stati valutati prima dell'inizio della chemioterapia ed al momento della rivalutazione clinica. Ventun pazienti (70%) presentavano elevati valori elevati di HER2 ECD pre-chemioterapia. La percentuale di risposta tra i due gruppi di pazienti (pazienti con livelli elevati vs. pazienti con livelli basali di HER2 ECD) è stata significativamente diversa (76% vs. 33%, $P=0.04$). Inoltre le variazioni dei livelli circolanti dell'HER2 ECD correlavano con l'andamento clinico della malattia. Questa osservazione è stata confermata da uno studio di Schondorf e coll. (51): 23 pazienti con tumore della mammella metastatico sono state monitorate con prelievi effettuati alle varie visite di rivalutazione. Le variazioni dei livelli di HER2 ECD nel tempo correlavano con l'andamento clinico della malattia nel 74% delle pazienti. Questa correlazione risultava addirittura migliore se l'analisi veniva ristretta alla pazienti con metastasi viscerali. Questi risultati sono stati confermati anche in uno studio molto recente su 57 pazienti con tumore metastatico, trattate con Herceptin e Taxolo (52), nel quale i livelli di HER2 ECD diminuivano nel gruppo di pazienti in risposta, mentre incrementavano nel gruppo di pazienti in progressione.

In uno studio effettuato su pazienti trattate con Herceptin + paclitaxel prima dell'intervento chirurgico (53), i livelli sierici di HER2 ECD sono risultati elevati, prima dell'inizio della chemioterapia, nel 24% delle pazienti. La determinazione di HER2 ECD effettuata al termine della terapia neoadiuvante e prima dell'intervento chirurgico ha mostrato che nelle pazienti con risposta clinica i livelli scendevano al di sotto del cut-off, mentre in quelle con malattia

stabile o in progressione i livelli, pur diminuendo, non scendevano al di sotto del cut-off.

Questi risultati, anche se ottenuti su piccoli gruppi di pazienti, sono estremamente importanti per quanto riguarda il monitoraggio delle pazienti. Infatti, forniscono al clinico in modo semplice e rapido delle informazioni attendibili sull'andamento della malattia, permettendo una eventuale precoce modifica del trattamento in corso, nel caso sia inefficace.

CONCLUSIONI

La determinazione di HER2 ECD sembra avere un valore sia prognostico che predittivo, ed il monitoraggio dei livelli circolanti sembra utile nelle pazienti con malattia avanzata. Il suo ruolo, inoltre, potrebbe assumere sempre più importanza con la diffusione delle terapie mirate anti-HER2. Attualmente, tuttavia, non è ancora possibile raccomandare l'uso routinario di questo marcatore, in quanto le conclusioni disponibili a tutt'oggi sono per lo più derivate da studi retrospettivi, oppure da casistiche limitate. È probabile che nel prossimo futuro, quando saranno disponibili risultati di studi prospettici ben disegnati, l'ambito di impiego clinico della determinazione di HER2 ECD assumerà la sua connotazione più precisa e conclusiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Research and Treatment* 1998;2:305-19.
2. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Reviews* 2001;27:137-42.
3. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
4. Hung M-C, Lau Y-K. Basic science of HER2/neu: a review. *Semin Oncol* 1999;26(Suppl. 12):51-9.
5. Ross JS, Fletcher JA. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;112(Suppl. 1):S53-67.
6. Janes PW, Daly RJ, deFazio A, Sutherland RL. Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2. *Oncogene* 1994;9:3601-08.
7. Muthuswamy SK, Siegel PM, Dankort DL, Webster MA, Muller WJ. Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 1994;14:735-43.
8. Tan M, Grijalva R, Yu D. Heregulin beta1-activated phosphatidylinositol 3-kinase enhances aggregation of MCF-7 breast cancer cells independent of extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res* 1999;59:1620-25.
9. Kassir J, Moellinger J, Lo H, Greenberg NM, Kim HG et al. A role for phospholipase C-gamma-mediated signalling in tumor cell invasion. *Clin Cancer Res* 1999;5:2251-60.
10. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *Embo J* 1997;16:1647-55.
11. Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene ampli-

- fication. *Lancet* 1987;2:69-72.
12. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7159-63.
 13. Aguilar Z, Akita RW, Finn RS, Ramos BL, Pegram MD et al. Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene* 1999;18:6050-62.
 14. Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, et al. ERBB-2 overexpression confers PI3'kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* 2000;82:666-74.
 15. Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL, et al. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 2000;148:385-97.
 16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
 17. Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:139-152.
 18. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J et al. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloprotease-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1196-1201.
 19. Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113:852-9
 20. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1974-82
 21. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation. *Mod Pathol* 2000;13:37-45
 22. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, et al. Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 2000;53:374-81.
 23. Payne RC, Allard JW, Anderson-Mausser L, Humphreys JD, Tenney DJ et al. Automated assay for HER-2/neu in serum. *Clin Chem* 2000;46:175-182.
 24. Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, Cambetas DR, Hussain M, et al. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:1465-70.
 25. Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988;8:5570-74.
 26. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, et al. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4744-49.
 27. Christianson TA, Doherty JH, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 1988;58:5123-29.
 28. Molina MA, Saez R, Ramsey EE, Garchia-Barchino MJ, Rojo F, et al. NH82-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:348-53.
 29. Saghatchian M, Guepratte S, Floiras J, et al. Correlation of serum ERBB-2 concentration with initial clinico-biological presentation and patients' outcome in primary breast cancer. *Proc Am Soc Oncol* 2001;20:62b.
 30. Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirrincione GT, Rodrigue SP et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clin Cancer Res* 2001;7:2703-11.
 31. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli VM et al. Elevated serum HER-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1467-72
 32. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G et al. Elevated serum c-erbB-e antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:1129-35.
 33. Willsher PC, Beaver J, Pinder S, Bell JA, Ellis IO, et al. Prognostic significance of serum c-erbB-2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1996;40:251-55.
 34. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH. The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998;55:33-38.
 35. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Harvey HA et al. Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen. *J Clin Oncol* 2003;21:1967-72.
 36. Miles DW, Harris WH, Gillett CE, Smith P, Barnes DM. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer* 1999;84:354-59.
 37. Berns EM, Foekens JA, van Staveren H, van Putten WL, de Koning HY, et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995;159:11-18.
 38. Menard S, Valagussa P, Pilotti S, Biganzoli E, Boracchi P, et al. Benefit of CMF treatment in lymph node-positive breast cancer overexpressing HER2. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;18.
 39. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, et al 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.
 40. Petit T, Ghnassia J, Rodier J, Borel C, Escande A, et al. Relationship between erbB-2 status and neoadjuvant chemotherapy response is dependent on anthracycline dose intensity. *Proc Am Soc Oncol* 2000;19:(370).
 41. Harris LN, Trock B, Berris M, Esteva-Lorenzo F, Paik S. The role of ERBB2 extracellular domain in predicting response to chemotherapy in breast cancer patients. *Proc Am Soc Oncol* 1996;15.
 42. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A et al. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:87-95.
 43. Classen S, Kopp R, Possinger K, Weidenhagen R, Eiermann W, Wilmanns W. Clinical relevance of soluble c-erbB-2 for patients with metastatic breast cancer predicting the response to second-line hormone or chemotherapy. *Tumor Biol* 2002;23:70-75.
 44. Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P et al. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:1698-1706.
 45. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY,

- et al. 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.
46. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, et al. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2356-62.
47. Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, Marler KC, Patel MK et al. Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16:2409-16.
48. Volas GH, Leitzel K, Teramoto Y et al. Serial serum c-erbB-2 levels in patients with breast carcinoma. *Cancer* 1996;78:267-72.
49. Nunes RA, Burstein H, Gakhar M, Gelman R, Carney W, et al. Serum HER 2 in breast cancer patients treated with preoperative therapy with Herceptin and Taxol. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:(131).
50. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1800-8.
51. Schondorf T, Hoopmann M, Warm M, Neumann R, Thomas A, Göhring UJ et al. Serologic concentrations of HER-2/neu in breast cancer patients with visceral metastases receiving trastuzumab therapy predict the clinical course. *Clin Chem* 2002;48:1360-2.
52. Carney WP. The emerging role of monitoring serum HER-2/neu oncoprotein levels in women with metastatic breast cancer. *Lab Med* 2003;1:58-64.
53. Burstein HJ, Harris LN, Gelman R, Lester SC, Nunes RA, et al. Preoperative therapy with trastuzumab and paclitaxel followed by sequential adjuvant doxorubicin/cyclophosphamide for HER2 overexpressing stage II or III breast cancer: a pilot study. *J Clin Oncol* 2003;21:46-53.