



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0041901
(43) 공개일자 2016년04월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/74 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/57415 (2013.01)
G01N 33/532 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7001553
- (22) 출원일자(국제) 2014년06월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년01월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/043128
- (87) 국제공개번호 WO 2014/205184
국제공개일자 2014년12월24일
- (30) 우선권주장
61/836,863 2013년06월19일 미국(US)

- (71) 출원인
유니버시티 오브 마이애미
미국, 플로리다 33136, 마이애미, 엔더블유 7티에
이치 애비뉴 1951, 3층, 엘에스티피, 아이피씨
- (72) 발명자
탠 에이. 인스
미국 플로리다 33132 마이애미 베이쇼어 드라이브
1800 엔
- (74) 대리인
특허법인 정안

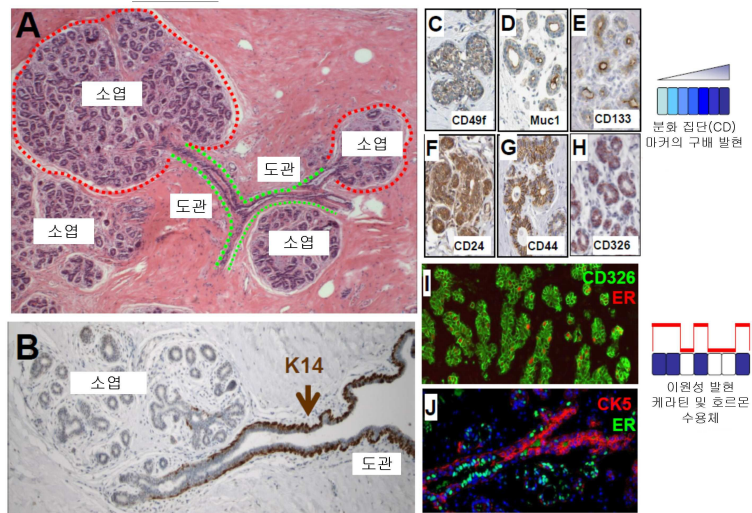
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **유방 암을 분류하고, 예측하며 치료하기 위한 분류 시스템, 방법 및 키트**

(57) 요약

정상 유방 세포 표현형 및 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 및 비타민 D 수용체(VDR)의 다양한 발현 수준을 기준으로 한 유방암에 대한 신규 분류 시스템이 개재되어 있다. 본 발명은 암성 조직에서 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계, 및 유방 암을 발현 수준에 따라 상기-나타낸 범주로 분류하는 단계를 포함하여, 유방 암을 분류하는 방법을 포함한다. 본 발명은 환자에서 유방 암의 예후를 예측하는 방법 및 유방 암이 분류되는 범주에 따라 유방 암에 대한 치료 요법을 결정하는 방법을 포함한다. 본 발명은 암성 조직에서 검출된 ER, AR, 및 VDR의 발현 프로파일에 따라 유방 암을 치료하는 방법을 포함한다. 이를 검출하는 키트가 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6854 (2013.01)

G01N 33/743 (2013.01)

G01N 2333/723 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

G01N 2800/7028 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유방 암 종양에서 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 및 비타민 D 수용체(VDR) 발현의 실질적인 결여에 의해 정의된 제1의 범주;

유방 암 종양에서 ER, AR, 및 VDR 중의 하나만의 발현으로 정의된 제2 범주;

유방 암 종양에서 ER, AR, 및 VDR 중의 2개의 어떠한 조합의 발현으로 정의된 제3의 범주; 및

유방 암 종양에서 ER, AR, 및 VDR 각각의 발현으로 정의된 제4의 범주를 포함하는, 유방 암에 대한 분류 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주가, 종양 세포의 약 1% 미만이 상기 종양내에서 ER, AR, 및 VDR의 발현을 갖는 것으로 정의되는 시스템.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주가, 종양 세포의 약 5% 미만이 상기 종양내에서 ER, AR, 및 VDR의 발현을 갖는 것으로 정의되는 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주가, 종양 세포의 약 10% 미만이 상기 종양내에서 ER, AR, 및 VDR의 발현을 갖는 것으로 정의되는 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주가, 종양 세포의 약 30% 미만이 상기 종양내에서 ER, AR, 및 VDR의 발현을 갖는 것으로 정의되는 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주가, 종양 세포의 약 50% 미만이 상기 종양내에서 ER, AR, 및 VDR의 발현을 갖는 것으로 정의되는 시스템.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주, 상기 제2의 범주, 상기 제3의 범주, 및 상기 제4의 범주의 종양내 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준이 정상인 유방 조직에서 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준에 상응하는 시스템.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제1의 범주, 상기 제2의 범주, 상기 제3의 범주, 및 상기 제4의 범주의 종양이 환자에서 유의적인 생존 차이에 상응하는 시스템.

청구항 9

환자의 암성 유방 조직에서 발현된 에스트로겐 수용체(ER)의 수준을 측정하는 단계,

상기 환자의 암성 유방 조직에서 발현된 안드로겐 수용체(AR)의 수준을 측정하는 단계,

상기 환자의 암성 유방 조직에서 발현된 비타민 D 수용체(VDR)의 수준을 측정하는 단계,

종양에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준을 기반으로 하여 유방 암을 분류하는 단계를 포함하여, 상기 유방

암을 분류하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 환자의 암성 유방 조직내에 발현된 HER2의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 종양에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 상기 발현 수준을 기반으로 하여 다수의 범주 중의 하나로 유방 암을 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 중의 어느 하나의 실질적인 발현을 결여한 경우, 유방 암을 제1의 범주로 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서, 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 중의 하나 만을 발현하는 경우, 유방 암을 제2의 범주로 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 중 어느 두개를 발현하는 경우, 유방 암을 제3의 범주로 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

청구항 11에 있어서, 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 모두를 발현하는 경우, 유방 암을 제4의 범주로 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

청구항 9에 있어서, 상기 종양에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준을 정상의 유방 세포에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

청구항 9에 있어서, 상기 유방 암을 분류하는 단계가 상기 유방 암을 호르몬 수용체 음성(HR0) 상태, 단일의 호르몬 수용체 양성(HR1) 상태, 이중 호르몬 수용체 양성(HR2) 상태, 또는 삼중 호르몬 수용체 양성(HR3) 상태 중의 어느 하나로서 분류하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 단일의 호르몬 수용체 양성(HR1) 상태를 ER, AR, 및 VDR 중의 어느 하나를 발현하는 것으로 정의하는 방법.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 이중 호르몬 수용체 양성(HR2) 상태를 ER, AR, 및 VDR 중의 2개의 어느 조합을 발현하는 것으로 정의하는 방법.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 상기 삼중 호르몬 수용체 양성(HR3) 상태를 ER, AR, 및 VDR 중 모두를 발현하는 것으로 정의하는 방법.

청구항 21

환자의 유방 조직의 종양에서 발현된 에스트로겐 수용체(ER)의 수준을 측정하는 단계;

상기 환자의 종양에서 발현된 안드로겐 수용체(AR)의 수준을 측정하는 단계;
 상기 환자의 종양에서 발현된 비타민 D 수용체(VDR)의 수준을 측정하는 단계;
 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 모두를 발현하는 경우 보다 높은 생존률을 결정하는 단계;
 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 중의 2개만을 발현하는 경우 중간 생존률을 결정하는 단계; 및
 상기 종양이 ER, AR, 및 VDR 중의 하나만을 발현하는 경우 보다 낮은 생존률을 결정하는 단계를 포함하는, 유방 암의 진단을 예측하는 방법.

청구항 22

환자의 암성 유방 조직에서 발현된 에스트로겐 수용체(ER)의 수준을 측정하는 단계;
 상기 환자의 암성 유방 조직에서 발현된 안드로겐 수용체(AR)의 수준을 측정하는 단계;
 상기 환자의 암성 유방 조직에서 발현된 비타민 D 수용체(VDR)의 수준을 측정하는 단계;
 상기 조직이 ER를 발현하는 경우 치료 요법에 적어도 하나의 ER 길항제를 포함시키는 단계;
 상기 조직이 AR을 발현하는 경우 상기 치료 요법에 적어도 하나의 AR 효능제를 포함시키는 단계; 및
 상기 조직이 VDR을 발현하는 경우 상기 치료 요법에 적어도 하나의 VDR 효능제를 포함시키는 단계를 포함하여, 유방 암 환자에 대한 치료 요법을 결정하는 방법.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 수용체 중 하나 이상의 유형이 상기 암성 유방 조직에서 발현되는 경우 치료 요법에 적어도 하나의 ER 길항제, 적어도 하나의 AR 효능제, 및 적어도 하나의 VDR 효능제의 조합을 포함시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 환자의 암성 유방 조직에서 발현된 HER2의 수준을 측정하는 단계 및 상기 조직이 HER2를 발현하는 경우 적어도 하나의 HER2 억제제를 상기 치료 요법에 포함시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 22에 있어서, 상기 치료 요법에 화학치료요법을 포함시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

청구항 22에 있어서, 상기 치료 요법에 상기 종양의 조사(radiation)를 포함시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

환자의 유방 암 종양에 존재하는 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 및 비타민 D 수용체(VDR)의 수준을 측정하는 단계, 및
 ER이 상기 유방 암 종양에서 검출되는 경우 상기 환자에게 치료학적 유효량의 적어도 하나의 ER 길항제를 제공하는 단계,
 AR이 상기 유방 암 종양에서 검출되는 경우 상기 환자에게 치료학적 유효량의 적어도 하나의 AR 리간드를 제공하는 단계, 및
 VDR이 상기 유방 암 종양에서 검출되는 경우 치료학적 유효량의 적어도 하나의 VDR 효능제를 상기 환자에게 제공하는 단계를 포함하는, 상기 유방 암의 치료 방법.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 환자의 상기 유방 암 종양에서 HER2의 수준을 측정하는 단계, 및 HER2가 상기 유방 암 종

양에서 검출되는 경우 치료학적 유효량의 적어도 하나의 HER2 억제제를 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, AR 및 HER2 둘 다가 상기 유방 암 종양에서 검출되는 경우 치료학적 유효량의 적어도 하나의 AR 길항제를 상기 환자에게 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

청구항 28에 있어서, AR이 상기 유방 암 종양에서 검출되고 HER2가 상기 유방 암 종양에서 실질적으로 검출되지 않는 경우 치료학적 유효량의 적어도 하나의 AR 효능제를 상기 환자에게 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

청구항 27에 있어서, 적어도 하나의 ER 길항제, 적어도 하나의 AR 리간드, 및 적어도 하나의 VDR 효능제가 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것으로서 정의되는 방법.

청구항 32

청구항 27에 있어서, 치료학적 유효량의 적어도 하나의 ER 길항제, 적어도 하나의 AR 리간드, 및 적어도 하나의 VDR 효능제를 동시에 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

청구항 27에 있어서, 치료학적 유효량의 적어도 하나의 ER 길항제, 적어도 하나의 AR 리간드, 및 적어도 하나의 VDR 효능제를 연속적으로 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

청구항 27에 있어서, 특수한 환자의 유방 암 종양에서 검출된 ER, AR 및 VDR의 발현 수준을 기반으로 하여 상기 환자의 유방 암을 분류하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

청구항 27에 있어서, 적어도 하나의 투여량의 화학치료제를 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

청구항 27에 있어서, 적어도 하나의 투여량의 방사선을 상기 종양에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

에스트로겐 수용체(ER)의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 소정량의 일차 항체, 안드로겐 수용체(AR)의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 소정량의 일차 항체, 및 비타민 D 수용체(VDR)의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 소정량의 일차 항체를 포함하는 항체 염색 키트(antibody staining kit).

청구항 38

청구항 37에 있어서, HER2의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 소정량의 일차 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 39

청구항 37에 있어서, ER, AR, 및 VDR에 대한 상기 일차 항체 중 적어도 하나에 결합할 수 있는 소정량의 이차 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 40

청구항 37에 있어서, 이차 항체의 존재를 검출할 수 있는 가시화 장치를 추가로 포함하는 키트.

청구항 41

에스트로겐 수용체(ER) 단백질에 결합할 수 있는 소정량의 제1의 프로브,
안드로겐 수용체(AR) 단백질에 결합할 수 있는 소정량의 제2의 프로브, 및
비타민 D 수용체(VDR) 단백질에 결합할 수 있는 소정량의 제3의 프로브를 포함하는 키트.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 소정량의 적어도 하나의 검출 프로브를 추가로 포함함으로써 상기 제1의 프로브, 상기 제2의 프로브, 및 상기 제3의 프로브 중 어느 것의 검출을 허용하는 단계를 추가로 포함하는 키트.

청구항 43

청구항 41에 있어서, HER2 단백질에 결합할 수 있는 소정량의 제4의 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 소정량의 적어도 하나의 검출 프로브를 추가로 포함함으로써 상기 제1의 프로브, 상기 제2의 프로브, 상기 제3의 프로브, 및 상기 제4의 프로브 중 어느 것의 검출을 허용하는 키트.

청구항 45

에스트로겐 수용체(ER) mRNA에 결합할 수 있는 소정량의 제1의 프로브,
안드로겐 수용체(AR) mRNA에 결합할 수 있는 소정량의 제2의 프로브, 및
비타민 D 수용체(VDR) mRNA에 결합할 수 있는 소정량의 제3의 프로브를 포함하는 키트.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 소정량의 적어도 하나의 검출 프로브를 추가로 포함함으로써 상기 제1의 프로브, 상기 제2의 프로브, 및 상기 제3의 프로브 중 어느 것의 검출을 허용하는 키트.

청구항 47

청구항 45에 있어서, HER2 mRNA에 결합할 수 있는 소정량의 제4의 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 소정량의 적어도 하나의 검출 프로브를 추가로 포함함으로써 상기 제1의 프로브, 상기 제2의 프로브, 상기 제3의 프로브, 및 상기 제4의 프로브 중 어느 것의 검출을 허용하는 키트.

청구항 49

에스트로겐 수용체(ER) 활성을 검출할 수 있는 소정량의 제1의 프로브,
안드로겐 수용체(AR) 활성을 검출할 수 있는 소정량의 제2의 프로브, 및
비타민 D 수용체(ER) 활성을 검출할 수 있는 소정량의 제3의 프로브를 포함하는 생검정 키트.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 제1의 프로브가 ER의 적어도 하나의 파트너 단백질의 존재를 검출하는 키트.

청구항 51

청구항 49에 있어서, 상기 제2의 프로브가 AR의 적어도 하나의 파트너 단백질의 존재를 검출하는 키트.

청구항 52

청구항 49에 있어서, 상기 제3의 프로브가 VDR의 적어도 하나의 파트너 단백질의 존재를 검출하는 키트.

청구항 53

청구항 49에 있어서, HER2 활성을 검출할 수 있는 소정량의 제4의 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 54

청구항 53에 있어서, 상기 제4의 프로브가 HER2의 적어도 하나의 파트너 단백질의 존재를 검출하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 연방-지원된 연구 및 개발에 관한 기술

[0002] 본 발명은 국립 암 연구소 및 유방암 연구 기관(National Cancer Institute and the Breast Cancer Research Foundation)에 의해 수여된 등록 번호 제R01-CA146445-01호 하에 미국 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가질 수 있다.

[0003] 발명의 배경

[0004] 발명의 분야

[0005] 본 발명은 질병 분류, 및 보다 구체적으로 암 및 유방 암 분류에 관한 것이다. 이는 또한 유방 암과 같은 질병의 분류 방법 및 이러한 분류를 기준으로 한 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 관련 분야의 설명

[0007] 유방 암은 현재 미국에서 여성에 대한 사망의 제2의 주된 원인이며, 여성에게서 가장 일반적으로 진단된 암이다. 전체적으로, 미국에서 8명의 여성 중 1명이 이들의 생애에서 유방암으로 진행될 것이다. 매년, 40,000 명 이상의 여성이 미국에서만 유방 암으로 사망할 것이다. 전문가들은, 조기 검출이 유방 암으로부터 보다 우수한 결과에 대한 하나의 중요한 요소임에 동의하고 있다. 그러나, 유방 암과 같은 질병을 적절하게 검출하기 위해서는, 의학계는 우선 당해 질병을 이해하고 이의 다양한 형태에서 이를 인식할 수 있어야만 한다. 따라서, 정밀한 진단 및 치료 개발을 허용하기 위해서는, 특수 질병에 대해 정밀하고 균일하게 허용되는 분류 시스템을 갖는 것이 중요하다.

[0008] 질병들을 분류하기 위한 많은 방법들이 있지만, 지난 2세기에 걸쳐서 정상 조직의 형태학 및 기능이 동일한 조직의 다양한 질병을 정의하기 위한 참고점으로서 성공적으로 이용되어 왔다. 가장 주목하게는, 이러한 시도를 사용하여 림프종 및 백혈병과 같은 조혈성 종양을 효과적으로 분류하여 왔다(1). 특히 정상 조혈 세포 유형에 대한 백혈병 및 림프종의 다양한 아유형의 형태학적 및 분자적 유사성의 발견은 당해 공정에서 중요하였다.

[0009] 암에 대한 가장 인식가능하고 가장 빠른 진보 중 일부는 조혈성 악성 종양의 치료시 이루어져 왔다(2). 많은 인자들이 이러한 상대적인 성공에 기여하여 왔지만, 조혈성악성 종양의 정밀한 분류는 중요한 역할을 하였다. 조혈성 세포에 대한 비교적 용이한 접근 및 이들 세포의 표면에서 분화(CD) 마커의 세포-형 특이적인 집단의 확인은 효율적인 면역표현형, 또는 항체 염색을 통해 확인된 것으로서 특수한 단백질 발현 양식을 기준으로 하여 세포를 분류하는 공정을 허용하였다(3). 이들 CD 마커를 후에 사용하여 특수한 정상 세포형과 거의 동일하였던 표현형을 지닌 림프종 및 백혈병을 분류함으로써, 이들 질병의 현재의 분류 시스템의 개발을 허용하였다(4,5).

[0010] 조혈성 악성 종양을 합리적으로 분류하여 치료하는 데 있어서의 주요 성공에도 불구하고, 고행 종양의 다른 유형을 분류하기 위한 정상 세포형의 사용은 광범위하게 모방되지 않아 왔다. 이의 주요 이유는 대부분의 고행 조직에서 세포형의 다양성의 이해의 결여에 있어왔다. 고행 조직에서 정상 세포 아유형의 특성화는 도전중이었다.

[0011] 구체적으로 유방 암과 관련하여, 최근까지, 단지 2개의 세포 유형-내부 내강 세포(inner luminal cell) 및 외부 근상피 세포가 사람 유방에서 형태학적으로 설명되어 왔다(6). 유방 도관을 포함하는 세포형의 이러한 제한된 이해는 정상 세포형-계 분류 시스템의 개발을 불가능하게 하여왔다. 정상 유방 세포 아형에서 최근에 보다 관심

이 집중되고 있지만, 이러한 연구는 기존의 사람 유방 종양 표현형과 관련시키기 어려웠다(7).

[0012] 현재, 사람 유방암은 에스트로겐 수용체(ER+), 및 사람 상피 성장 인자 수용체 2(HER2+)의 존재를 기반으로 하여, 또는 삼중-음성 유방암(ER/PR/HER2-, TNBC)에 있어서 이들의 부재에 의해 3개의 범주로서 임상적으로 그룹화된다. 그러나, 이러한 현재의 분류는 다양한 유방암 아형의 큰 이질성을 고려하지 않았으므로, 불충분한 분류 시스템이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 그러나, 암, 및 특히 유방 암의 보다 정밀한 분류가 요구되고 있다. 의학 및 치료 과학은, 유방 암 종양이 수년 동안, 많게는 15 또는 20년까지 휴면기 또는 무증상일 수 있으며, 이러한 장기간의 기간 후에 드러날 수 있다. 스트레스 및 폐경기와 같은 호르몬 변화는 암 악성 종양 및 공격성으로의 이동을 가져오는 것으로 알려져 있다. 따라서, 유방 암 뿐 아니라, 유방 암의 어떠한 유형도 보다 적절하게 진단하는 방법을 가짐으로써 무증상 상태 또는 휴면기에도 불구하고 보다 우수한 환자 결과, 및 어떠한 치료가 가장 효과적일 수 있는지의 보다 우수한 정보를 갖는 것이 유리할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 발명의 요약

[0015] 유방 암을 보다 잘 이해하고 치료하기 위해서, 본 발명은 세포 집단의 분화 상태에 따라서, 정상 유방 세포 표현형을 기준으로 하는 사람 유방 암에 대한 분류 시스템에 관한 것이다. 적절하고 정밀한 분류 시스템은 유방 암을 이해하는 것 뿐 아니라, 결과적으로 이를 확인하고 치료하는데 있어서 중요하다. 따라서, 이는 유방 암의 약에 대한 강력한 기반을 제공한다.

[0016] 본 발명의 분류 시스템은 분류를 위한 정상 유방 세포 표현형에 대한 유방 암 세포의 비교를 기준으로 하며, 이는 지금까지 알 수 없었던 것이다. 따라서, 정상 유방 세포 아유형의 이해는 현재의 발명의 경우 중요하지만, 고형 조직에서 정상 유방 세포 표현형을 특성화하는 것은 지금까지 시도되어 왔다. 정상 유방은 젖을 생산하는 소엽과 젖을 유두로 수송하는 소엽간 도관으로 구성된다. 도관과 소엽 사이의 해부학적 차이는 유방 암의 병리생리학을 이해하는데 있어 중요하다. 사람 유방 종양의 방대한 대부분은 현재 이들의 기원 세포(cell-of-origin)과 관련되지 않은 이유로 인하여 병리학자들에 의해 "도관 암종" 또는 "소엽 암종"으로서 형태학적 배경으로 분류되고 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 난해 용어는, 도관 및 소엽 유방 암이 정상적인 도관 및 소엽 각각에서 개시한다는 일반적인 오개념을 초래하였다. 그러나, 이들의 명칭에도 불구하고, 종양형 둘 다에 대한 조기 진행 단계 중의 거의 모두는 유방 소엽을 거의 독점적으로 포함한다. 따라서, 조직 구조(architecture)를 보존하고 도관, 소엽 및 상피의 상이한 층의 구별을 허용하는 면역조직화학적(IHC) 염색과 같은 방법을 사용하여 소엽내 정상 세포를 구체적으로 실험하는 것은 본 발명의 분류 시스템을 측정하는데 있어서 첫번째 단계이었다.

[0017] 최근까지 단지 2개의 세포형이 사람 유방에서 형태학적으로 설명되어 왔다; 내강 세포(inner luminal cell) 및 외부 근상피 세포(6). 유방 도관을 포함하는 세포형의 이러한 제한된 이해는 정상 세포형-계 분류 시스템의 개발을 방해해 왔다. 이러한 요구를 충족시키기 위하여, 본 발명은 이전에 수행하지 않았던 방식으로, 정상 유방 세포 아형, 및 유방암 아형을 특성화하고, 유방암을 보다 정밀하게 설명하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 보다 특히, 본 발명은 적어도 조직내 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 및 비타민 D 수용체(VDR)의 발현 프로파일을 기반으로 적어도 4개의 범주(본원에서 HR0-HR3로서 나타냄)를 포함하는, 정상 유방 세포 표현형을 기반으로 하는 유방 암에 대한 분류 시스템에 관한 것이다. 제1 범주(HR0)는 ER, AR, 또는 VDR 중의 어느 것도 발현하지 않는 조직을 포함한다. 제2 범주(HR1)는 ER, AR, 또는 VDR 중 어느 하나만을 발현하는 조직을 포함한다. 제3 범주(HR2)는 ER, AR, 및 VDR 중 2개의 어떠한 조합을 갖는 조직을 포함한다. 그리고 제4 범주(HR3)는 ER, AR, 및 VDR 중 3개 모두를 발현하는 조직을 포함한다. 이들 4개의 범주 각각은 팬-내강(pan-luminal) 마커 K7, K8, K18, 증식하는 세포 마커 Ki67, 및 K5와 같은 특성의 다른 마커들의 존재를 기반으로 소부류로 추가로 나누어질 수 있다. 유방 암의 다양한 유형을 보다 잘 분류할 수 있다는 것은 보다 우수하고 보다 정밀한 진단을 의미한다. 따라서, 본 발명은 또한 종양 시료 속에서 ER, AR, 및 VDR 발현의 수준을 측정하는 단계 및 본원에 기술된 분류 시스템에 따라 유방 암의 유형을 분류하는 단계를 포함하여, 유방암을 분류하는 방법을 포

함한다.

[0019] ER/AR/VDR 발현을 기반으로 한 유방 암의 4가지 주요 범주 각각은 현재 이용가능한 것보다 더 정밀한 진단의 예측을 허용하는, 상이한 생존률과 관련되어 있다. 따라서, 본 발명은 또한 종양 또는 암 조직에서 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계, 및 본원에 기술된 분류 시스템을 기반으로 생존률을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암의 진단을 예측하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 3개의 모든 ER, AR, 및 VDR을 발현하는 종양을 지닌 환자는 호르몬 수용체들 중 2개만을 발현하는 것보다 더 우수한 생존 결과를 가지며, 이는 호르몬 수용체 중 하나만을 발현하는 것들보다 여전히 보다 더 우수하다. 호르몬 수용체가 발현되지 않는 경우, 생존률은 진단 후 처음 5년 동안 거의 양호하지 않으나, 이후 보다 더 우수하게 된다.

[0020] 본 발명은 또한 치료 요법(treatment regimen)을 결정하는 방법, 및 유방 암에 존재하는 ER, AR, 및 VDR의 발현 프로파일에 의존하여, 유방암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 호르몬 치료는 암 조직에 존재하거나 발현되는 상응하는 수용체에 대해 제공된다. 하나 이상의 호르몬 수용체가 존재하는 경우에, 다중 호르몬 치료 요법 및 투여가 고려된다. 이는 암의 중증도 및 진행에 의존하여, 독립적으로 또는 또한 화학치료요법 및/또는 방사선 치료와 함께 수행될 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 조직 샘플 속에서 ER, AR, 및 VDR의 존재를 검출하기 위해 염색 조직에서 사용하기 위한 염색 키트에 관한 것이다. 당해 키트는 ER, AR, 및 VDR에 대해 특이적인 항체를 포함하며, 또한 검출 및 가시화를 위한 제2 항체를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 이들 및 다른 목적, 특징 및 장점은, 도면 뿐만 아니라 상세한 설명도 고려하는 경우 보다 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도면의 간단한 설명

본 발명의 특성을 완전히 이해하기 위하여, 참고는 첨부된 도면과 관련하여 취해진 다음의 상세한 설명에 대해 이루어져야 하며, 여기서:

도 1은 정상 사람 유방의 해부학 및 정상 사람 유방 상피에서 케라틴, 분화 클러스터(cluster differentiation: CD) 마커 및 호르몬 수용체의 발현 패턴을 나타낸다. (A) 소엽 및 소엽내 도관을 나타내는, 정상 사람 유방 상피의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색된 단면. (B) 정상 사람 유방 상피에서 케라틴 K14에 대한 면역조직화학. 소엽내 도관은 근상피 세포에서만 K14(갈색)로 염색되지만, 소엽내 근상피 세포의 대부분은 당해 단면에서 K14에 대해 음성이다. (C-H) 클러스터 분화에 대한 면역조직화학은 마커 CD49f, Muc1, CD133, CD24, CD44 및 CD326(Ep-CAM)을 표지한다. 이들 마커는 소엽 및 도관에서 대부분의 관상 상피 세포에서 양성이었다. 소엽과 도관 사이에 차별적인 표현은 없었다. 일부 세포는 보다 낮은 수준으로 발현하였고 다른 것은 보다 높은 수준으로 발현하였지만, 명백하게 양성 및 음성인 집단은 아니었다. (I) 에스트로겐 수용체(ER) (적색으로 나타냄) 및 CD326(녹색으로 나타냄)(Ep-CAM)에 대해 염색하는 면역형광성은, ER[+] 및 ER[-] 세포가 CD326[+]임을 나타낸다. 따라서, 이들 2개의 마커의 발현 사이에 상관관계는 없다. (J) ER(녹색) 및 K5(적색)에 대한 면역형광성 염색은, ER[+] 및 K5[+] 염색이 이원성(이상성: biphasic)임을 나타낸다. CD 마커와는 달리, 각각의 마커에 대해 명확하게 양성인 세포 집단 및 명확하게 음성인 세포 집단이 존재하며, ER[+] 및 K5[+]는 상호 배타적인데, 즉 세포가 K5[+]인 경우, 이는 거의 항상 ER[-]이며, 역으로도 그러하다.

도 2는 정상 사람 유방에서 중간 필라멘트(intermediate filament) 및 에스트로겐 수용체(ER)의 면역형광성 영상을 나타낸다. (A) K7/18(갈색), (B) K18(적색) 및 K19(갈색), (C) K5/14(갈색), (D) CD10(적색) 및 K14(갈색), (E) K5/14(갈색) 및 평활근 액틴(SMA-적색), (F) K18(녹색), K14(적색), K18 및 K14(황색)를 둘 다 발현하는 세포, (G) K5/14(적색) 및 에스트로겐 수용체(ER-갈색)를 사용한 정상 사람 포르말린-고정된, 파라핀-봉매된(FFPE) 단면의 단일 및 이중 면역염색. 이러한 세포 집단[K5+, K14+ 또는 K17+]은, 조직 단면이 이들 마커로 동시에 염색되지 않기 때문에 지정된다. (H) ER 및 K5/7/14/17/18/19의 발현을 기반으로 한 정상 사람 상피 세포의 분화 단계를 나타내는 벤 다이어그램(Venn diagram), (I) Ki-67(갈색) 및 K5/14(청색), (J) 에스트로겐 수용체(ER-녹색) 및 증식 마커 Ki-67(적색), (K) K18(적색) 및 Ki-67(갈색), (L) ER, 케라틴 및 Ki-67을 기반으로 한 정상 사람 상피 세포의 분화 단계를 나타내는 벤 다이어그램. 임무노퍼옥시다제(A-E, G, I 및 K), 및 면역형광성(F, J) 염색의 합해진 영상이 나타나 있다. 다수의 환자 샘플로부터 선택된 대표적인 영상이 나타나 있다(n=36).

도 3은 정상의 사람 유선 도관 대 소엽에서 케라틴 5, 14 및 17 발현을 나타낸다. **(A-B)** 마우스 유선의 케라틴 5 면역염색은, K5가, 관강 K5 발현이 풍부한 사람 유방과는 달리, 근상피세포 층에서만 발현됨을 나타낸다(K5=갈색). **(C-E)** 케라틴 5, 14 및 17은 정상의 사람 유방 조직에서 근상피(기저) 층에서 발현된다(청색의 대조 염색과 함께, 갈색으로 나타난 K5, 14, 17). **(F-H)** 케라틴 5, 14 및 17은 정상의 사람 유방 조직의 소엽에서 관강 층에서 발현된다(청색의 대조 염색과 함께, 갈색으로 나타난 K5, 14, 17). **(I-K)** 공통의 근상피 마커 CD10 및 SMA를 사용한 이중 면역염색은, K5/14/17 세포가 관강 다음의 CD10/SMA[+] 근상피 세포 위에 위치함을 나타낸다. 갈색으로 나타난 K5(I), 갈색으로 나타난 K14(J), 적색으로 나타난 K17(K), 적색으로 나타난 CD10(I), 적색으로 나타난 SMA(J), 갈색으로 나타난 CD10(K). **(L-P)** K5+ 세포의 빈도는 동일한 사람으로부터의 동일한 단면에서조차 소엽 대 소엽에서 현저하게 상이할 수 있다. **(L)** 많은 소엽에서 K5+ 세포는 거의 존재하지 않는다. **(M)** 드물게 소엽 K5는 일부 근상피 세포에서 발현되지만 관강 세포에서는 발현되지 않는다. **(N)** 많은 소엽에서 관강 세포의 거의 1/2은 K5+이다. **(O-P)** 단일의 K5 염색(갈색으로 나타남, 패널 M), 또는 이들 세포의 관강 특성을 확인하는 이중 면역염색(적색으로 나타난 K5, 녹색으로 나타난 SMA, 패널 N)에도, 일부 소엽에서 거의 모든 관강 세포는 K5+이다. **(Q-S)** 동일한 소엽의 일련의 단면의 이중 면역염색은, 일부 소엽에서 거의 모든 세포는 K5 및 K18 이중 양성임을 나타낸다. 적색으로 나타난 K5, 갈색으로 나타난 K14(Q), 적색으로 나타난 K18, 갈색으로 나타난 K14(R), 갈색으로 나타난 K5, 청색으로 나타난 K18(S). **(T)** 이중 면역염색은, 일부 소엽에서 거의 모든 관강 세포가 이중 K18 및 K14 양성임을 나타낸다. 녹색으로 나타난 K18, 적색으로 나타난 K14, 황색으로 나타난 K14/18 이중 양성 세포. **(U)** 대부분의 K5 관강 세포는 분화 마커인, Muc1을 발현한다. 녹색으로 나타난 K5, 적색으로 나타난 Muc1.

도 4는 정상의 사람 유방에서 중간 필라멘트, 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR) 및 비타민 D 수용체(VDR)의 발현의 면역형광성 영상을 나타낸다. 정상의 사람 유방 FFPE 단면의 이중 면역염색(A, J) 및 합해진 면역형광성 영상(B, C, E-I, K-M)이 나타나 있다. 벤 다이어그램은, 관강(D, N) 및 근상피(O) 세포형의 분화 상태를 나타낸다. **(A)** K5/14(적색) 및 안드로겐 수용체(AR, 갈색). **(B)** 안드로겐 수용체(AR, 녹색) 및 증식 마커 Ki-67(적색). **(C)** ER(녹색), AR(적색) 및 이중 양성 세포(황색). **(D)** ER, 케라틴, Ki-67 및 AR을 기반으로 한 정상의 관강 상피 세포의 분화 상태를 나타내는 벤 다이어그램. **(E)** CD10(녹색) 및 비타민 D 수용체(VDR, 적색). **(F)** VDR(적색) 및 Ki-67(녹색). **(G)** K5(녹색) 및 VDR(적색). **(H)** AR(녹색), VDR(적색) 및 이중 양성(황색). **(I)** ER(녹색), VDR(적색) 및 이중 양성(황색). **(J)** CD10(적색) 및 Ki-67(갈색). **(K)** ER(녹색) AR(적색) VDR(청색), ER+AR(황색), ER+VDR(보라색), VDR+ER(연청색), **(L)** 삼중 호르몬 수용체 양성 세포 ER+AR+VDR(HR3+, 백색). **(M)** HR3+(ER+AR+VDR) 세포(녹색), 증식 마커 Ki-67(적색), 및 핵 마커 DAPI(청색). **(N-O)** 완전한 마커 패널을 기반으로 한 정상의 관강(N) 및 근상피(O) 유방 세포의 분화 단계를 나타내는 벤 다이어그램. 다수의 환자 샘플로부터 선택된 대표적인 영상이 나타나 있다(n=36).

도 5는 K14 및 K5를 사용한 호르몬 수용체 ER, AR 및 VDR의 동시-발현 빈도를 나타내는 표이다. 각각의 열은 나타낸 이중 면역염색으로 염색된 상이한 정상의 유방 단면이다. 각각의 마커(컬럼 1-2), 마커 둘 다(컬럼 3)에 대해 양성인 세포의 총 수, 각각의 마커 및 마커 둘 다(컬럼 6)에 대해 양성인 세포의 분획으로서 이중-양성 세포의 퍼센트(컬럼 4-5)가 묘사되어 있다.

도 6은 증식 마커 Ki-67을 사용한 호르몬 수용체 ER, AR, 및 VDR의 동시-발현 빈도를 나타내는 표이다. 각각의 열은 나타낸 이중 면역염색으로 염색된 상이한 정상의 유방 단면이다. 각각의 마커에 대해(컬럼 1-2), 마커 둘 다에 대해(컬럼 3) 양성인 세포의 총 수, 각각의 마커(컬럼 4-5) 및 마커 둘 다(컬럼 6)에 대해 양성인 세포의 분획으로서 이중-양성 세포의 퍼센트가 묘사되어 있다.

도 7은 정상의 사람 유방의 관강 층 세포내 호르몬 수용체 ER, AR 및 VDR의 동시-발현 빈도를 나타내는 표이다. 각각의 열은 나타낸 이중 면역염색으로 염색된 상이한 정상의 유방 단면이다. 각각의 마커(컬럼 1-2), 마커 둘 다(컬럼 3), 각각의 마커(컬럼 4-5) 및 마커 둘 다(컬럼 6)에 대해 양성인 세포의 분획으로서 이중-양성 세포의 퍼센트가 묘사되어 있다.

도 8은 증식 마커 Ki-67을 사용한 호르몬 수용체 K14, K5, 및 CD10의 동시-발현 빈도를 나타내는 표이다. 각각의 열은 나타낸 이중 면역염색으로 염색된 상이한 정상의 유방 단면이다. 각각의 마커(컬럼 1-2), 마커 둘 다(컬럼 3)에 대해 양성인 세포의 총 수, 각각의 마커(컬럼 4-5) 및 마커 둘 다(컬럼 6)에 대해 양성인 세포의 분획으로서 이중-양성 세포의 퍼센트가 묘사되어 있다.

도 9는 K18을 사용한 K14 및 K5의 동시-발현 빈도를 나타내는 표이다. 각각의 열은 나타낸 이중 면역염색을 사용하여 염색된 상이한 정상 유방 단면이다. 각각의 마커(컬럼 1-2), 마커 둘 다(컬럼 3)에 대해 양성인 세포의

총 수, 각각의 마커(컬럼 4-5) 및 이중 마커(컬럼 6)에 대해 양성인 세포의 분획으로서 이중-양성 세포의 퍼센트가 묘사되어 있다.

도 10은 14개의 상이한 마커로 확인된 다수의 정상 유방 세포 아형을 사용한 다수의 공여자(n=36)로부터의 정상 사람 유방 단면의 면역염색 결과를 나타내고, 이를 기반으로 분류하기 위한 그룹화를 생성하는 표이다. 사람 유방 소엽(L1-11)의 관강 층내 11개의 분화 상태는 호르몬 수용체 음성(HR0; L1-3), 단일 호르몬 수용체 양성(HR1+: ER, AR 또는 VDR; L4-L6), 이중 호르몬 수용체 양성(HR2+: ER/AR, ER/VDR, 또는 AR/VDR; L7-L10) 및 삼중 호르몬 수용체 양성(HR3+: ER/AR/VDR; L11) 상태로 그룹화된다. 모든 관강 세포는 K7/18 및 C1d-4를 발현하였다. 근상피 층에서, 모든 세포는 K5/14/17[-] 또는 K5/14/17[+](My1 및 My2)인 2개의 아형과 함께, SMA, CD10 및 p63을 발현하였다.

도 11은 도 12의 면역형광성 데이터를 생성하는데 사용된 다양한 항체를 나열하는 표이다.

도 12는 정상 사람 유방에서 반응계내에서 12개의 상이한 마커의 다중 면역형광성 실험을 나타낸다. 정상 유방 상피의 1개의 FFPE 단면은 나타낸 마커에 대한 각각의 항체로 일련 염색되었다: (A) 팬-케라틴, (B) K18, (C) K5, (D) DAPI, (E) ER, (F) AR, (G) VDR, (H) Ki-67, (I) SMA. 개개의 면역형광성 염색 영상(A-I)을 합하여(J-O) 각각의 세포에서 모든 마커의 동시-발현 양식을 나타내었다: (J) K5(적색) 및 SMA(녹색), (K) K5(적색) 및 K18(녹색), (L) ER(적색), AR(녹색), K5(청색), (M) VDR(적색) 및 ER(녹색), (N) VDR(적색) 및 AR(녹색), (O) AR(적색) ER(녹색) VDR(청색). (P) 완전한 마커 패널을 기반으로 한 정상 관강 유방 세포의 분화 상태를 나타내는 벤 다이어그램. 다중화된 면역형광성 기술(제조원: GE Healthcare)을 사용하여 획득된 대표적인 영상이 나타나 있다.

도 13은 정상 사람 유방 소엽의 다중 면역형광성 염색을 나타낸다. 정상 유방 상피의 동일한 단면을 마커 Pan-K, K18, K5, ER, SMA, Ki-67, AR, 및 VDR에 대해 일련 평가하였다. 선택된 영상에 대해 합해진 영상이 나타나 있다. 이 경우에 상이한 마커의 역학적 관계를 나타내는 벤 다이어그램이 나타나 있다. 당해 소엽은 주로 AR+ VDR+ 및 AR/VDR+ 세포로 구성되어 있다. ER+, K5+ 및 Ki-67+ 세포는 드물다. GE Healthcare 다중화된 면역형광성 마커 플랫폼으로부터의 대표적인 영상이 나타나 있다.

도 14는 정상 사람 유방 소엽의 다중 면역형광성 염색을 나타낸다. 정상 유방 상피의 동일한 단면을 마커 ER, AR, VDR, C1n-4(클라우딘-4), SMA, K5, K18에 대해 일련 평가하였다. 선택된 영상에 대해 합해진 영상이 나타나 있다. 당해 경우에 다양한 마커의 역학적 관계를 묘사하는 벤 다이어그램이 나타나 있다. 당해 소엽은 주로 K5+, VDR+ 및 K5/VDR+ 세포로 구성되어 있다. ER+, AR+ 및 Ki-67+ 세포는 드물다. GE Healthcare 다중화된 면역형광성 마커 플랫폼으로부터의 대표적인 영상이 나타나 있다.

도 15는 정상 사람 유방 소엽의 동일한 단면의 다중화된 면역형광성 염색의 합해진 영상을 나타낸다. (i) 중간 수준의 호르몬 수용체(HR) 발현 및 상호 배타적인 Ki-67 양성의 증식 세포(적색)를 지닌 대표적인 유방 소엽. (ii-iii) 거의 전적으로 HR+ 세포(녹색)와 혼하지 않은 K5+(ii) 및 Ki-67+(iii) 세포(적색)로 구성된 유방 소엽. (iv-v) 거의 전적으로 K5+ 세포(적색)와, 혼하지 않은 Ki-67+(iv) 및 HR+(v) 세포(녹색)로 구성된 유방 소엽. (vi) 다수의 Ki-67+ 세포(적색)를 갖고, HR+ 세포(녹색)가 없는 고 증식성 유방 소엽. (vii) 유방 세포 아형의 추정된 가능한 분화 계통 트리(differentiation lineage tree)는 계통발생적 분석 소프트웨어(Mesquite)를 사용하여 구축하였다. 당해 모델에 따라서, 모든 HR+ 세포는 K5+ 관강 세포 및 근상피 세포(M1-2)의 일반적인 후대세포와는 상이한 일반적인 후대세포를 갖는다. 모든 3개의 그룹(HR+, K5+, 및 M1-2)의 공통의 후대세포는 증식하는 일시적-증폭 후대세포형과 일치하는 [Ki-67/K18]-양성 및 [HR/K5/SMA]-음성 세포인 것으로 여겨진다.

도 16은 (A) ER+(n=51), (B) HER2+(n=46) 및 (C) 3개의 음성 유방암 (n=119)으로 분리된 216개의 사람 유방 종양(51 ER+, 46 HER2+ 및 119 TNBC 포함)에서 C1d-4, K7, K18, VDR, AR, K5, K14, CD10, SMA, p63, PR, ER 및 HER2의 단백질 수준의 열 지도(heat map)로서, 사람 유방 종양에서 정상 세포 표현형의 확인을 나타낸다. 관강 마커(c1d-4, K7, K18, VDR 및 AR) 및 기본 마커(CD10, SMA 및 p63)가 나타나 있다. 면역염색된 조직 미세배열(TMA) 단면은 광학 현미경 및 0 내지 25 규모를 사용하여 점수매겼다. 종양 세포 염색 퍼센트는 (0)=0%, (1+)=1-20%, (2+)=21-40%, (3+)=41-60%, (4+)=61-80%, 및 (5+)=81-100%로 정량화하였다. 염색 강도는 0 내지 5로 정량화하였다. 총 점수는 점수 퍼센트를 강도 점수와 곱하여 계산하였다. 황색은 고 발현(점수 25)을 나타내고 청색은 저 발현(점수 0)을 나타내며; 백색은 중간 발현이다. 상응하는 정상 세포 대조부분의 벤 다이어그램은 열 지도 다음에 나타낸다. 3개의 음성 종양은 LM1(K5/14-), LM2(K5/14+) 및 M(관강 및 근상피 마커 둘 다 발현함)으로 분리된다. 계층적 집단화를 수행하였다(쌍식 완전 계통) (D) 관찰된 유방 종양 표현형에 상응하는

정상 세포 대응부분을 입증하는 표.

도 17은 사람 유방 종양에서 세포 특이적인 마커의 발현을 나타낸다. 정상 조직과 유사하게, ER, AR, VDR, K5, K7, K14, K18, Cld-4, SMA, CD10은 일반적으로 이항 양식으로 발현되었다. 각각의 마커에 대한 대표적인 예는 조직 미세배열(TMA) 단면에서 인접한 중심에 나타낸다; 좌측에서 음성 중심(<1% 염색, 및 0 강도=0의 점수) 및 우측에서 양성 점수(>80% 염색, 및 5 강도=5의 점수). 이들 점수는 TMA에서 서로에 대해 근접하였다. *반응계내* 염색의 장점들 중 하나는 세포 특이적인 발현을 구별하는 능력이다. 예를 들면, SMA/CD10은 일부 경우에 종양 세포(점수가 25인 우측 중심), 및 다른 경우에 기질 세포(점수가 0인 좌측 중심)에서 강력하게 발현하였다. 이러한 유형의 세포형 특이적인 발현 정보는 종양 추출물의 분자 분석에서 상실된다.

도 18은 사람 유방 종양에서 세포 특이적인 마커의 발현을 나타낸다. **(B-E)** 정상 조직과 유사하게 종양에서 증식하는 Ki-67[+] 종양 세포는 ER[+] 종양 세포와 상호 배타적이다. **(F-I)** 정상 조직과 유사하게, 종양에서 증식하는 Ki-67[+] 종양 세포는 AR[+] 종양 세포와 상호 배타적이다. **(J-M)** 정상 조직과 유사하게, 종양에서 증식하는 Ki-67[+] 종양 세포는 VDR[+] 종양 세포와 상호 배타적이다. **(N-Q)** 일부 경우에 VDR[+] 세포는 또한 Ki-67[+]이었으며, VDR 발현과 증식 사이의 관계가 ER 및 AR과는 상이함을 나타낸다.

도 19는 본 발명의 분류를 기반으로 한 정상 세포 아형으로부터 초래된 결과를 나타낸다. **(A)** 본 연구에서 분석된 간호사의 보건 연구(Nurse's Health Study: NHS) 경우들의 완전한 패널로부터의 ER+, HER2+ 및 TNBC 경우의 분포를 입증하는 파이 그래프(pie graph). **(B)** 당해 연구에서 분석된 NHS 경우의 완전한 패널로부터 HR0-3 범주를 기반으로 한 ER+, HER2+ 및 TNBC 사람 유방 종양의 재분류. 유방 종양은 정상 조직 분화를 기반으로 4개의 범주로 나누었다: ER, AR 및 VDR을 동시 발현하는 3중-양성 종양(HR3), ER-AR[+], AR-VDR[+], 또는 ER-VDR[+]인 이중 양성 종양(HR2), 호르몬 수용체(ER[+], VDR[+] 또는 AR[+]), 및 ER, AR 및 VDR에 대해 음성인 호르몬-수용체 음성 종양(HR0) 중 하나만을 발현하는 단일-양성 종양(HR1). **(C)** 호르몬 수용체 상태(HR3+ 모든 양성)의 경우, HR2+ 이중 양성)의 경우 및 HR1+ 단일 양성)의 경우)에 따른 당해 연구에서 면역조직 화학에 의해 점수매겨진 간호사의 보건 연구로부터의 침입성 유방암을 지닌 모든 개인의 전체 생존에 대한 카플란-마이어 분석(Kaplan-Meier analysis). **(D)** 855명의 환자의 유방 종양 데이터셋으로부터의 모든 침입성 유방 암에 대한 재발이 없는 생존의 카플란-마이어 분석(37). 종양은 ER에 대한 유전자 발현 값에 따라 순위가 정해지고 50% 컷 오프 점(cut off point)을 기반으로 'ER_고' 또는 'ER_저'로 점수매겨졌다. 동일한 시도를 사용하여 'AR_고' 및 'AR_저' 그룹, 및 'VDR_고' 또는 'VDR_저'를 확인하였다. 이후에, 이들 그룹을 HR 상태 HR0를 기반으로 조립하였다, n=141; HR1, n=287; HR2, n=284; HR3, n=143.

도 20은 사람 유방 종양에서 케라틴 5 및 14의 발현을 나타낸다. **(A)** 정상의 사람 유방 세포에서 mRNA의 분석. 정상의 관강 대 기저 특이적인 프로파일은 고도로 정제된 관강 대 근상피 세포를 프로파일링하는 3개의 상이한 연구를 조합하여 유도시켰다(6, 25). mRNA의 작은 소세트만이 모든 3개의 연구에서 일관되게 관강 및 근상피 세포 사이에서 차등적으로 발현되었다. 이들은 강력한 관강(녹색 바아) 및 강력한 근상피(흑청색) 대 신호에 대한 기준으로 제공하였다. 3개의 연구 중 2개에서 차등적 발현은 열 지도의 좌측에서의 착색된 바아로 나타낸, 관강(흑색) 및 근상피(적색) 신호에 대한 기준을 형성하였다(29-31, 54). 합한 사람 유방 mRNA 발현 데이터셋들 이들 관강 기저 유전자의 발현에 대해 분석한 경우, 열 지도 위에 착색된 바아로 표지된, 기저 종양 대 관강(비-기저) 종양 사이에 유의적인 차이가 없었다; 기저 종양(담청색) 대 관강(비-기저) 종양(핑크색). 열(row)은, 유전자를 나타내고, 컬럼은 각각의 환자로부터의 종양 시료를 나타내며; 과 발현은 주황색으로 나타내고, 저 발현은 청색으로 나타낸다. **(B)** K5/6 염색조직화학으로 점수매긴 간호사 보건 연구로부터의 3개의 음성 침입성 유방암을 사용한 모든 개인의 카플란-마이어 분석(n=172). K5/6[+](n=59) 대 K5/6[-](n=113) 종양 사이에 통계적으로 유의적인 생존적 차이는 없었다(p=0.56).

도 21은 HR0-3 범주 및 유방암 세포주의 약물 반응을 기반으로 한 사람 유방 종양의 재분류를 나타낸다. **(A)** ER+, HER2+ 및 TNBC의 임상 범주에서 HR 0, 1, 2 및 3 종양의 빈도를 나타내는 표. **(B)** HR 분류를 기반으로 유방 종양의 조성을 나타내는 벤 다이어그램. **(C-D)** 호르몬 수용체 범주(HR3+ = 흑색 곡선, HR2+ = 적색 곡선, HR1+ = 황색 곡선, HR0 = 청색 곡선)에 따라 당해 연구에서 면역조직화학에 의해 점수매겨진 간호사 보건 연구로부터의 침입성 유방암을 사용한 모든 개인의 카플란-마이어 분석. 생존은 0 내지 5년(C) 및 5 내지 25년(D) 동안 연속된 변수로서 시험하였다.

도 22는 사람 유방 종양계 HR0-3 범주 및 유방 암 세포주의 약물 반응의 재분류를 나타낸다. **(E)** 간호사 보건 연구로부터의 침입성 유방 암을 지닌 모든 개인의 카플란-마이어 분석. 당해 분석에서 HER2+ 종양을 지닌 환자는 명백한 그룹으로 분석되었다. (HR3+ = 흑색 곡선, HR2+ = 적색 곡선, HR1+ = 황색 곡선, HR0 = 청색 곡선,

HER2+ = 핑크색 곡선). (F) 855명의 환자 유방 종양 데이터셋으로부터 모든 침입성 유방 암에 대한 폐 전이되지 않은 생존의 카플란-마이어 분석(37). 종양은 ER에 대한 유전자 발현 값에 따라 순위를 정하여 50% 컷포인트를 기반으로 'ER_고' 또는 'ER_저'로 점수매겨졌다. 동일한 시도를 사용하여 'AR_고 및 AR_저' 그룹, 및 'VDR_고' 또는 'VDR_저'를 확인하였다. 이들 그룹을 이후에 HR 상태를 기반으로 조립하였다.

도 23은 사람 유방 종양계 HR0-3 범주 및 유방암 세포주의 약물 반응의 재분류를 나타낸다. (G) mRNA 발현을 기반으로 한 사람 유방 암 세포주의 HR0-3 분류. 유방 암 세포주는 차등 상태 전사체(C1d-4, K7, K18, VDR, AR, K5, K14, CD10, SMA, HER2, ESR1(ER)의 mRNA 발현에 의해 집단화하였다. 세포주는, 이들이 나타내는 정상의 분화 상태에 따라 그룹화하였다(L1-L11). 집단화는 하기 물질 및 방법에서 설명한 바와 같이 수행하였다. 적색은 발현에 있어서의 상대적인 증가를 나타내고, 녹색은 발현에 있어서의 상대적인 감소를 나타내며 백색은 변화가 없음을 나타낸다. (H, I) 유방 암 세포주에서 마커의 웨스턴 블롯 분석 및 이들 결과의 요약된 표.

도 24는 사람 유방 종양계 HR0-3 범주 및 유방 암 세포주의 약물 반응의 재분류를 나타낸다. (J-P) 합해진 호르몬 치료요법에 대한 HR1-3 유방암 세포주의 반응. 하기 기술된 모든 실험(J-P)에서 저 투여량의 개인의 약물(< 50% 억제)을 사용하여 합해진 2개 약물의 추가 효과를 입증하였다. 각각의 실험은 유사한 결과와 함께 수회 반복되었으며; 1개의 실험으로부터의 대표적인 결과가 나타나 있다. (J) HR1 세포주의 VDR 및 탁솔 조합 치료: ER/HER2 음성 유방 암 세포주 BT20, MDA-MB-468 및 SUM159는 전통적으로 TNBC 모델인 것으로 고려되므로, 호르몬 치료에 대한 후보가 아니다. 그러나, 본 발명자들의 HR 분류에 따르면 이들 HR1(VDR+) 종양은 VDR 효능제를 사용한 치료에 대한 후보물일 수 있다. 이와 일치하여, 증식에 있어서의 감소가, 이들 HR1 유방 암 세포를 VDR 효능제 칼시트롤(Cal, 25nM)을 단독으로 또는 탁솔(0.5nM 또는 1nM)과 같은 화학치료제와 함께 처리하는 경우 관찰되었다. 이들 약물의 조합된 효과는 약물 단독보다 더 컸으며, 부가 효과를 나타낸다. 임상 셋팅에서, 이는 보다 높은 투여량의 탁솔만을 사용하는 것과 동일한 효능으로 각각의 약물의 보다 적은 독성 투여량의 사용을 허용할 수 있다. 이들 결과는, 화학치료요법과 VDR 효능제의 조합이 화학치료요법과 함께 TNBC의 HR1 아형에 대해 추가로 탐색될 수 있음을 나타낸다. (K) HR2 세포주의 ER 및 VDR 조합 치료: 유방 암 세포주 ZR75B는 ER/VDR 조합 호르몬 치료요법으로 잠재적으로 표적화될 수 있는 ER/VDR+ HR2 종양의 모델이다. ER-길항제 ICI 182,780(Faslodex, ICI 5nM)를 VDR 효능제 칼시트롤(Cal, 50nM)과 합하여, 약물 단독을 사용하는 것보다 더 큰 이들 약물의 조합된 효과를 생성하였다. 이러한 결과는, ER 길항제와 VDR 효능제의 조합이 HR2 유방암의 아형에서 추가로 탐색될 수 있었음을 나타낸다. (L) HR3 세포주의 AR 및 VDR 조합 치료: 유방 암 세포주 ER+ T47D는 AR 및 VDR(HR3)을 발현한다. 당해 세포주에서 AR-효능제 R1881(메틸트리에놀론, 50nM)과 VDR 효능제 칼시트롤(Cal, 50nM)의 조합은 약물 단독보다 더 효과적으로 증식을 억제하였다. 이들 실험은 앞서 기술된 바와 같이 (55, 56), 페놀 적색이 함유되지 않은 DMEM + 5% 목탄 스트리핑된 FBS 및 17-베타 에스트라디올(E2, 10nM)에서 수행되었다. 다수의 실험으로부터의 대표적인 결과가 나타나 있다. 이들 결과는, AR 및 VDR 효능제의 조합이 당해 HR3 유방 암의 아형에서 추가로 탐색될 수 있음을 나타낸다. (M) HR2/HER2 세포주의 AR 및 HER2 조합 치료: AR-길항제 플루타미드(Flu 45(N) 및 HER2 억제제 라파르티브(Lap, 0.5 μM)의 조합은 HR2+/HER2+ 유방 암 세포주 MDA-MB-453의 증식을 추가로 억제하였다. (N) HR2/HER2 세포주의 ER 및 HER2 조합 치료: ER-길항제 ICI 182,780(파슬로텍스, ICI 10nM) 및 HER2 길항제 라파르티브(Lap, 10nM)의 조합은 앞서 기술한 바와 같이(57), HR3+/HER2+ 유방 암 세포주 BT474의 증식을 추가로 억제하였다. 다수의 실험으로부터의 대표적인 결과가 나타나 있다. 상기 결과(M, N)는, ER 및 AR 길항제와 HER2 표적화된 치료요법의 조합이 HER2+/HR+ 유방 암에 대해 추가로 탐색될 수 있음을 나타낸다. (O) ER-음성 대조군 세포주(MDA-MB-453)에서 심지어 더 높은 농도(파슬로텍스, ICI 100nM)에서조차 이를 ER 길항제 ICI 182,780로 치료하는 경우, 세포 증식의 억제는 관찰되지 않았다. (P) VDR-음성 대조군 세포주(BT549)에서 이를 VDR 효능제 칼시트롤(Cal)로 10nM, 25nM 및 100nM의 상이한 농도에서 치료하는 경우, 세포 증식의 억제는 관찰되지 않았다. 대조군 및 100nM 그룹이 또한 나타난다.

도 25는 간호사 보건 연구(1976-1996)에서 교차-분류된 ER/AR/VDR 상태(N=1731)에 의한 참여자 특성의 평균 및 빈도를 나타내는 표이다.

도 26은 간호사 보건 연구에서 HR 상태(HR0, HR1, HR2 및 HR3), 하자드 비(hazard ratio) 및 유방암 특이적인 사망률에 대한 95% CI에 의한 유방 암-특이적인 사망률의 다변량 분석을 나타내는 표이다.

유사한 도면 부호는 도면의 수개의 측면 전체에서 유사 부분을 나타낸다.

상세한 설명

본 발명은 유방 암에 대한 신규 분류 시스템, 및 이러한 분류 시스템을 기반으로 하는 치료 방법에 관한 것이다. 당해 시스템은 정상의 비-암성 유방 조직에서 이들 동일한 호르몬 수용체의 표현형적 세포 발현을 반영

하는, 유방 조직에서 특정의 호르몬 수용체의 발현 수준을 기반으로 한다. 본 발명은 현재 본원에서 HR0-3으로 나타낸, 4개의 특수한 호르몬 분화 그룹에 상응하는 유방암의 11개의 세포 아형에 관한 것이다. 더욱이, 각각의 분화 그룹은 다양한 정도의 생존 성공율과 관련되어 있다. 따라서, 당해 종양학적 분류 시스템은 또한 사람 유방암의 모든 아형에 대한 작용가능한 호르몬 치료 전략을 제공하며, 이는, 환자 및 이들이 나타내는 특수한 호르몬 발현 패턴에 대해 개별화될 수 있다.

본 발명의 분류 시스템 및 이러한 분류 시스템을 기반으로 하는 진단, 예후 진단, 및 치료 방법은, 호르몬이 중요한 역할을 하는 어떠한 암에도 동일하게 적용된다. 예를 들면, 본 발명이 본원에 유방암의 측면에서 기술되고 설명되어 있다고 해도, 이는, 나열 목적으로 몇가지만 말하자면, 난소, 전립샘, 및 갑상선암 및 명칭에수소에게 적용된다.

본 발명을 상세히 설정하기 전에, 몇가지 용어들을 정의하여 이를 이해하는 것이 도움이 될 수 있으며, 이들은 하기의 다음 단락에 상응하게 설정된다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 분야의 모든 용어, 표기법 및 다른 과학적 용어 또는 학술용어는, 본 발명이 속한 분야의 기술자가 일반적으로 이해할 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해된 의미를 지닌 용어가 명확성 및/또는 용이한 참고를 위해 본원에 정의되어 있으며, 본원의 이러한 정의의 포함은 당해 분야에서 일반적으로 이해되는 것보다 실질적인 차이를 나타내는 것으로 필수적으로 제한되어서는 안된다. 또한, 일반적으로 사용된 사전에 정의된 것들과 같은 용어는 관련 분야의 내용에서 이들의 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 고려되고/되거나 달리 본원에 정의되어야 한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "환자"는 특수한 치료의 수령인인, 사람과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 어떠한 동물을 말한다. 환자일 수 있는 동물의 다른 비-제한적인 예는 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 비-사람 영장류, 설치류 등을 포함한다. 전형적으로, 용어 "환자" 및 "피검자"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "발현하는" 또는 "발현"은 특수한 뉴클레오타이드 서열, 유전자 또는 유전자 단편의 단백질, mRNA, DNA, 유전자 또는 유전자 단편, 생물학적 및/또는 생화학적 활성의 수준을 말한다. 용어 "발현하는" 및 "발현"은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

또한, 유의적인 또는 관련된 발현 수준은, 발현 수준이 질병 상태 및/또는 이의 진행 및/또는 완화와 관련되거나 단백질, mRNA, DNA, 유전자 또는 유전자 단편, 또는 생물학적 및/또는 생화학적 활성을 억제하거나 활성화시키는 리간드(예를 들면, 효능제 및 길항제)에 대한 반응과 관련된 정도까지의 상기 단백질, mRNA, DNA, 유전자 또는 유전자 단편, 또는 생물학적 및/또는 생화학적 활성 또는 경로의 발현을 의미한다. 리간드에 대한 반응은 시험관내 또는 생체내에서 관찰될 수 있고/있거나 측정될 수 있는 리간드-수용체 결합에 대한 어떠한 적절한 생물학적, 화학적, 생화학적, 의학적, 병리학적, 표현형적, 및/또는 어떠한 다른 반응일 수 있다. 예시적인 예는 세포 증식 및/또는 세포 성장, 세포자멸사, 분화, 성장 정지, 이주, 침입에 있어서의 증가 또는 감소, 전이, 종양 크기, 질병-유리된 생존, 재발이 없는 생존, 전체적인 생존 등에 있어서의 증가 또는 감소를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

생물학적 및/또는 생화학적 관련성의 단점에 속하는 발현의 수준은 발현되지 않거나 실질적으로 발현을 결여한 것으로 고려된다. 발현은 적량적이거나 정성적이며, 불연속적으로 또는 연속적으로 정량화될 수 있으며, 특정의 역치(threshold)가 다양한 수준의 발현을 의미하기 위한 연속체와 함께 어느 곳에서도 설정될 수 있다. 예를 들어, 발현은 단백질, mRNA, DNA, 유전자 또는 유전자 단편의 어떠한 검출가능한 양 및/또는 특수한 뉴클레오타이드 서열, 유전자 또는 유전자 단편의 생물학적 및/또는 생화학적 활성을 나타내는 집단에서 세포의 수에 의해 측정될 수 있다. 다른 구현예에서, 발현은 단백질, mRNA, DNA, 유전자 또는 유전자 단편의 검출가능한 양 및/또는 특수한 뉴클레오타이드 서열, 유전자 또는 유전자 단편의 생물학적 및/또는 생화학적 활성의 수준, 정도, 또는 강도에 의해 측정될 수 있다. 발현은 또한 정량적 및 정성적 특성의 조합으로 측정될 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, "질병"은 질환, 질병 또는 상태, 또는 정상 기능을 손상시키는 건강하거나 정상의 생물학적 활성으로부터의 다른 일탈을 말한다. 용어 "질병", "질환", 및 "상태"는 본 명세서 전체에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 상태는 산발적인 또는 유전가능한 유전적 비정상에 의해 유발될 수 있다. 상기 상태는 또한 비-유전적 비정상에 의해 유발될 수 있다. 상기 질병은 임상 또는 전-임상 증상을 지닌 피검자에서 존재할 수 있지만; 상기 피검자는 또한 진단 시기에 무증상일 수 있다. 질병은 양성 성장 또는 양성 종양(즉, 비-암성 성장), 및 암(즉, 암세포 또는 암성 종양)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원에 사용된 것으로서 적어도 하나의 구현예에서 "질병"은 유방 암, 및 보다 구체적으로 사람 유방 암을 말한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "암" 또는 "암성"은 세포의 과성장, 또는 덩어리 또는 성장(즉, 종양)을 생성하는, 세포의 조절되지 않은 성장 및 분화를 말한다. 이는 양성 및 전이성 형태의 암 둘 다를 포함한다. "종양"을 언급하는 경우, 암성 종양은 흔히 "악성 종양"으로 언급되지만; "종양" 만에 대한 참고는 또한 일부 내용에서 악성 종양을 말할 수 있다. "암"은 총칭적으로 개개의 암성 세포 및 암성 세포의 하나 이상, 또는 덩어리와 같은 종양을 말한다. 추가로, "암"에 대한 참고는 종양 기원 부위에서 성장하여 암성 성장을 형성하기 위해 진행되는 일차 종양, 및 일차 종양의 악성 세포(들)로부터 기원하지만 일차 종양으로부터 먼 부위에서 성장하는 전이성 병변 또는 하나 이상의 종양을 포함한다. 그러나, 용어 "암"의 사용은, 일차 종양이 여전히 전이됨을 필수적으로 의미하지는 않는다. 일부 암은 초기에 무통성이거나 공격성일 수 있다. 대조적으로, 일부 암은 무통성 병변으로서 시작하여 시간이 경과하면서 변화하여 공격성으로 될 수 있다. 자체로서, 일차 종양은 수시간 동안 무통성으로 잔류할 수 있으며 비 전이성 발생없이 매우 느리게 성장하여 궁극적으로 공격성이 되고 신속하게 성장하여 전이될 수 있다. 용어 "암" 및 "종양"의 사용은 본 발명에서 사용된 것으로서 상기 기술된 이러한 모든 가능성을 포함할 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, "치료" 및 "치료하는"은 질환의 발달 또는 진행을 정지하거나 억제하고/하거나 질환, 질병 및/또는 이의 증상의 감소, 억제, 회귀, 또는 완화를 유발하기 위해 시도하는 것을 말한다. 당해 분야의 숙련가에게 이해될 수 있는 바와 같이, 다양한 임상 및 과학적 방법론 및 검정을 사용하여 질환의 발달 또는 진행을 평가할 수 있으며, 유사하게, 다양한 임상 및 과학적 방법론 및 검정을 사용하여 질병 또는 이의 증상의 감소, 회귀, 또는 완화를 평가할 수 있다. "치료"는 치료학적 치료 및 예방학적 또는 방지적 조치 둘 다를 말한다. 치료가 요구되는 것은, 질병이 이미 있는 것 및 질병을 가지기 쉬운 것 또는 질병이 예방되어야 하는 것을 포함한다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "투여하는"은 피검자에게 치료 생성물의 치료학적 유효량을 제공함을 말한다. 치료 생성물은 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 비타민 D 수용체(VDR), 및 HER2를 포함하는, 본원의 분류 시스템에 포함된 호르몬 중 적어도 하나에 대해 시그널링 경로에 영향을 미칠 수 있는 화학적, 생화학적 또는 약제학적 분자 또는 화합물로서 고려된다. 예를 들면, 치료 생성물은 ICI 182,780(파슬로텍스)와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, ER 길항제일 수 있다. 치료 생성물은 비-제한적인 예로서 R1881(메틸트리에놀론)과 같은 AR 효능제 또는 칼시트롤과 같은 VDR 효능제일 수 있다. 치료 생성물은 호르몬 수용체에 직접 영향을 미칠 수 있거나, 시그널링 및 다운스트림 효과(downstream effect)를 위한 호르몬 및/또는 호르몬 수용체와 상호작용하거나 이에 대해 효과를 갖는 "파트너 단백질"에 영향을 미침으로써 작용할 수 있다. 더욱이, 치료 생성물은 경구, 유리체내, 안구내, 안구, 망막하, 척수내, 정맥내, 피하, 경피, 피하내, 두개내, 및 국소와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 어떠한 적절한 투여 방법을 사용하여 환자에게 투여되거나 제공될 수 있다. 치료 생성물은 단독으로 또는 다른 화합물, 부형제, 충전제, 결합제, 담체 또는 선택된 투여 경로 및 표준 약제학적 실시를 기준으로 선택된 다른 비히클과 함께 투여될 수 있다. 투여는 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 또는 염수 용액과 같은 주사가 가능한 용액제; 크림제; 로션제; 캡셀제; 정제; 과립제; 펠렛제; 산제; 현탁제; 유제, 또는 미세유제; 패취제(patch); 미셀제(micelle); 리포솜; 비히클; 미세이식물을 포함하는 이식물; 눈 점적제; 다른 단백질 및 펩타이드; 합성 중합체; 미세구; 나노입자; 등과 같은 담체 또는 비히클을 통해 수행할 수 있다.

치료 생성물은 또한 글루코즈, 락토즈, 검 아카시아, 젤라틴, 만니톨, 크산탄 검, 로쿠스트 빈 검(locust bean gum), 갈락토즈, 올리고사카라이드 및/또는 다당류, 전분 페이스트, 마그네슘 트리실리케이트, 활석, 옥수수 전분, 전분 단편, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 감자 전분, 우레아, 텍스트란, 텍스트린 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 결합제 및 충전제와 같은 다른 무-독성 화합물을 포함하거나, 이와 함께 포장될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 실시에서 사용하기 위해 고려되는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 결합제, 및 충전제는, 본 발명의 화합물이 경구 전달, 유리체내 전달, 안구내 전달, 안구 전달, 망막하 전달, 척수내 전달, 정맥내 전달, 피하 전달, 경피 전달, 피하내 전달, 구개내 전달, 국소 전달 등에 조정 가능하도록 하는 것들이다. 더욱이, 포장 물질은 플라스틱 중합체, 실리콘 등과 같은, 생물학적으로 불활성이거나 생활성을 결여할 수 있으며 이와 함께 포장되고/되거나 전달된 치료 생성물의 효능에 영향을 미치지 않고 환자에 의해 내부적으로 가동될 수 있다.

본원에 기술된 치료 생성물에 적용된 것으로서, 상호교환적으로 사용될 수 있는, 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 바람직한 치료학적 결과가 되도록 하는데 필수적인 양을 의미한다. 예를 들면, 유효량은, 이에 대해 치료학적 화합물, 생물학적 또는 조성물이 투여되는 질병, 예를 들면, 암 및 보다 구체적으로 유방 암의 증상을 치료하거나, 치유하거나, 완화시키는데 효과적인 수준이다. 고려한 특수 치료학적 목표에 효과적인 양은 치료되는 질병 및 이의 중증도 및/또는 발달/진행의 단계; 사용된 특수 화합물, 생물학적 또는 약제학적 조성물의 생

이용성, 및 활성; 피검자에서 투여 경로 또는 방법 및 도입 부위; 특수한 화합물의 청소율 또는 생물학적 및 다른 약력학적 특성; 치료 기간; 접종 요법; 특수한 화합물, 생물학적 또는 조성물과 조합하여 또는 함께 사용된 약물; 치료하는 피검자의 연령, 체중, 성별, 식이, 생리학적 및 일반적인 건강; 및 관련 과학 분야에서 기술자에게 잘 공지된 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존할 것이다. 용량에 있어서 일부 변화는 치료되는 피검자의 상태에 따라 필수적으로 발생할 것이며, 치료를 투여하는 주치의 또는 다른 개인은 어떠한 경우에도, 개인 환자에 대해 적절한 투여량을 결정할 것이다.

본원에 사용된 것으로서 용어 "길항제"는 수용체에 결합함으로써 동일한 수용체에 결합하는 다른 분자의 능력을 차단하는 분자, 약제학적, 약물, 또는 화합물을 의미한다. 길항제는 이의 표적 수용체에 대한 결합시 생물학적 반응을 생산하지 않으며, 여전히 이들의 결합은 생물학적 효과를 유발할 수 있는 다른 분자의 결합을 방지한다. 따라서, 길항제는 살아있는 유기체에서 생화학적 경로의 하부스트림 현상을 억제하거나 차단하는 억제성 분자로 고려된다. 길항제의 효과는, 다른 분자가 동일한 수용체에 결합하는 동일한 부위인, 수용체에서의 활성 부위에 대한 결합의 결과일 수 있다. 길항제 효과는 또한 알로스테릭 결합(allosteric binding)의 결과일 수 있으며, 여기서 길항제는, 다른 분자가 결합할 수 있는 수용체 상의 다른 부위에 결합하지만, 그럼에도 불구하고 이러한 다른 분자의 결합을 방지한다. 길항제는 수용체 결합 부위에 대해 다양한 수준의 친화성을 가질 수 있으므로, 수용체와의 결합에 대한 다른 내인성 리간드 또는 기질과 경쟁하고/하거나 더 잘 경쟁한다. 또한, 길항제-수용체 결합은 길항제, 수용체, 결합 부위 특성, 및 이의 친화성에 따라 가역적이거나 비가역적일 수 있다.

본원에 사용된 것으로서, 용어 "효능제"는 수용체에 결합하여 반응을 개시하는 분자, 약제, 약물, 또는 화합물을 의미한다. 예를 들면, 수용체는 세포 상에서 또는 세포내에서 발현될 수 있으며, 효능제의 결합은 세포 상에서 또는 세포내에서 효과 또는 변화를 유발할 것이다. 당해 효과는 친연적으로 생물학적이거나 생화학적일 수 있다. 예를 들면, 수용체에 대한 효능제 결합은 특수한 단백질의 발현을 유도할 수 있거나, 생화학적 경로 또는 생화학적 경로에서 반응의 "캐스케이드(cascade)"의 활성화를 유발할 수 있다. 효능제는 특수한 수용체 또는 수용체 상의 결합 부위에 대해 선택적일 수 있거나, 수용체의 부류 또는 결합 부위에 대해 일반적일 수 있다. 또한, 효능제는 특수한 효능제 및 표적 수용체에 따라, 이의 표적 결합 부위에 대해 다양한 친화성 및 선택성으로 결합할 수 있다. 효능제는 유사한 수용체 및/또는 결합 부위에 결합하는 다른 리간드와 경쟁적일 수 있거나, 수용체 및/또는 결합 부위에 대해 유일할 수 있다. 또한, 효능제-수용체 결합은 효능제, 수용체, 결합 부위 특성, 및 이의 친화성에 따라 가역적이거나 비가역적일 수 있다.

이들 정의를 유념하여, 본 발명자들은 이제 본 발명으로 돌아간다. 구체적으로, 본 발명은 특정 단백질, 즉, 에스트로겐 수용체(ER), 안드로겐 수용체(AR), 및 비타민 D 수용체(VDR), 및 일부 경우에 HER2, 및 유방 조직의 관강 층 및 근상피 층에서 차등적으로 발현되는 케라틴과 같은 특정의 마커의 발현의 정상 유방 세포 표현형을 기반으로 하는 유방 암에 대한 분류 시스템에 관한 것이다.

분류 시스템은 몇가지 이유로 이들 특수 수용체 및 마커의 존재를 기반으로 한다. 첫째로, 문헌의 초기 고찰 및 예비 면역염색은 조직 성장 및 분화에 대해 원칙적으로 관여하므로, 호르몬 수용체에 대해 수행하였다. 초기 고찰은, 3개의 수용체 ER, AR, 및 VDR이 일부 세포에서는 강력하게 발현되지만 다른 것에서는 전혀 발현되지 않는, 유방 소엽의 관강 층내 명백한 이원성 발현 양식으로 드러났음을 나타내었다. 많은 다른 호르몬 수용체는 이원성 발현을 나타내지 않았으므로, 유방 조직에서 세포 아형(즉, 관강 대 근상피)를 확인하기 위한 마커로서 유용하지 않았다. 또한, K7, K8, K18, K5, Ki67(증식하는 세포에 대한 마커)과 같은 특정의 단백질 및 케라틴, 및 클라우딘-4(Cld-4)은 유방 조직의 관강 층 세포내에서 차등적으로 발현된다. 분화 마커 CD10, 평활근 액틴(SMA) 및 p63의 집단을 포함하는, 다른 케라틴 및 단백질은 유방 조직의 근상피 층 세포로 국제화된다. 관강 층은 증식하거나 성장하는 세포를 함유하며, 암은 필수적으로 세포의 조절되지 않은 성장이므로, 유방 조직의 관강 층내에서 세포의 표현형의 이해는 유방 암을 이해하고 분류하는데 있어서 중요한 단계인 것으로 고려되었다. 더욱이, 사람 종양의 95%는 표현형에 있어서 관강 층 세포와 유사하며, 정상의 유방에서 거의 모든 증식은 관강 층에서 발생한다.

본 발명은 어떠한 형태의 ER, AR, 및 VDR, 및 이들이 결합할 리간드 중 어느 것을 기준으로 한 분류 및 방법을 포함하는 것에 주목하여야 한다. 예를 들면, 본 발명을 사용하여 에스트론, 에스트라디올, 에스트리올, 스테롤, 및 크세노에스트로젠과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 스테로이드성 및 비-스테로이드성 에스트로젠을 기반으로 하는 활성을 확인할 수 있다. 유사하게, 이를 사용하여 부신 안드로젠과 같은 AR을 지닌 어떠한 안드로젠을 기반으로 한 활성을 확인할 수 있으며, 테스토스테론, 디하이드로테스토스테론(DHT), 테하이드로에피안드로스테론(DHEA), 안드로스텐디온, 안드로스텐디올, 및 안드로스테론을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 비타민 D2 및 D3과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 어떠한 비타민 D도 본 발명에 포함된 VDR 발현에서 고려될

수 있다.

보다 특히, 본 발명의 분류 시스템은 유방 암 종양 또는 암성 조직에서 ER, AR, 및 VDR 중의 어느 것의 발현의 실질적인 결여에 의해 정의된 제1 범주를 포함한다. 따라서, 당해 범주는 또한 이들 3개의 수용체의 발현의 결여에 상응하는 다른 명칭이 사용될 수 있다고 해도, 본원에서 호르몬 수용체 음성 상태, 또는 HR0로 언급될 수 있다. 이들 명명 전략은 하기 설명된 다른 범주에 대해 유사하게 적용된다.

HR0 범주에 속하기 위해서는, 유방 조직은 다른 단백질을 발현할 수 있다고 해도, 유의적이거나 관련된 수준의 ER, AR, 또는 VDR을 발현하지 않아야 한다. 본원에 사용된 것으로서, 발현의 "실질적인 결여"는 예를 들면 다운 스트림 효과를 생성하지 않는 것과 같이, 작용적으로 관련되지 않는 발현 수준을 의미한다. 따라서, 이는 일부 적은 수준의 ER, AR, 및/또는 VDR이 당해 범주내에 존재하고/하거나 검출가능할 수 있으며, 여전히 무시되는 소량으로 존재할 수 있음이 실현가능하다. 예로서, 및 제한된 의미로 고려되지 않지만, 적어도 하나의 예에서, ER, AR, 및/또는 VDR의 발현의 실질적인 결여는, ER, AR, 및/또는 VDR을 발현하는 것으로 밝혀진 조직 시료내에서 1% 미만의 세포가 존재하는 경우 측정될 수 있다. 다른 구현예에서, ER, AR, 및/또는 VDR 발현의 실질적인 결여에 대한 역치는 5% 미만, 10% 미만, 30% 미만, 50% 미만, 및 세포 발현의 0% 내지 50% 사이의 연속된 범위 내의 어느 것이다. 여전히 다른 구현예에서, 발현은 ER, AR, 및/또는 VDR을 발현하는 다수의 세포에 의해서뿐만 아니라, 오히려 발현의 강도 또는 정도에 의해서도 측정될 수 있다. 예를 들면, 1 미만 또는 50% 미만의 강도는 작용적으로 또는 유의적으로 관련이 있지 않은 것으로 고려될 수 있다. 너무 센 강도는 발현 결정을 위한 연속적인 또는 별개의 규모에서 고려될 수 있다.

더욱이, 당해 제1의 전략(HR0)은 도 10에서 L1-L3로 정의된, 다수의 아형, 또는 아부류를 포함한다. 이들 아형 모두는 ER, AR, 및 VDR에 대해 음성인 것으로 분류되며, 일부 유방 조직은 세포 증식 마커 Ki67(L1)을 발현하지만, 다른 것은 케라틴 K8(L2)을 발현하고 여전히 다른 것은 케라틴 K5(L3)를 발현한다.

분류 시스템은 또한 ER, AR, 또는 VDR 중의 어느 하나의 발현에 의해 정의된 제2 범주를 포함한다. 따라서, 당해 범주는 또한 본원에서 단일 호르몬 수용체 양성 상태, 또는 HR1 또는 HR1+로서 언급될 수 있다. 수용체 ER, AR, 또는 VDR 중의 어느 것도 당해 범주에 속하기 위하여 존재할 수 있지만, 하나 만이 발현될 수 있다. 앞서 정의된 바와 같이, ER, AR, 및/또는 VDR은 작용적으로 유의적이고/이거나 관련되는 수준으로 존재하는 경우에 발현되는 것으로 고려된다. 적어도 하나의 구현예에서, 발현은 단백질, mRNA, DNA, 또는 생활성과 같은 어떠한 형태의 ER, AR, 및/또는 VDR을 나타내는 세포의 적어도 1%에 의해 측정될 수 있다. 다른 구현예에서, 발현에 대한 역치는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 30%, 및 적어도 50%로 정의된다. 앞서와 같이, 발현은 정량적으로 또는 정성적으로 정의될 수 있으며 별개일 수 있거나 연속적일 수 있다.

당해 발현은 유방 조직의 관강 층내에서 일어난다. 따라서, 및 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, HR1(L4-L7)의 다수의 아형 또는 아부류가 존재한다. 예를 들면, 하나의 아형은 ER(L4) 만을 발현하는 조직에 상응한다. 다른 아형은 AR(L5) 만을 발현하는 조직에 상응한다. 다른 아형은 VDR(L6) 만을 발현하는 조직에 상응한다. 최종 아형은 VDR 만을 발현하는 조직에 상응하지만, 이는 또한 케라틴 K5(L7)을 발현한다.

분류 시스템은 ER, AR, 및 VDR 중 어떠한 2개의 조합의 발현으로 정의된다. 따라서, 당해 범주는 또한 본원에서 이중 호르몬 수용체 양성 상태, 또는 HR2 또는 HR2+로 언급될 수 있다. 앞서와 같이, 당해 발현은 관강 층내에서 일어난다. 따라서, 각각의 특수 조합에 상응하는, 도 10에서 L8-L10으로 나타낸, 3개의 아형이 존재한다. 예를 들면, L8은 ER 및 AR 둘 다를 발현하는 세포에 상응한다. L9는 ER 및 VDR 둘 다를 발현하는 세포에 상응한다. L10은 AR 및 VDR 둘 다를 발현하는 세포에 상응한다.

분류 시스템은 또한 모든 3개의 ER, AR, 및 VDR의 발현으로 정의된 제4의 범주를 포함한다. 따라서, 당해 범주는 또한 본원에서 3중 호르몬 수용체 양성 상태, 또는 HR3 또는 HR3+로 언급될 수 있다. 이는 또한 도 10에서 관찰된 바와 같이, 이의 자체의 아부류 L11인 것으로 고려된다.

특정의 구현예에서, 분류 시스템은 또한 사람 상피 성장 인자 수용체 2(HER2)의 발현을 포함하며, 이는 일부 유형의 유방 암과 관련된 것으로 알려져 있다. 이의 발현은 전형적으로 보다 공격적인 유방 암의 표식으로 고려되어 왔으며 호르몬 치료에 대해 보다 내성인 것으로 고려된다.

본 발명의 당해 분류 시스템을 사용하여, 유방 암 종양 또는 암성 조직을 분류하고, 이들이 양성 또는 악성인지를 분류한다. 이는 정상 유방 조직에서 ER, AR, 및 VDR의 유사한 표현형적 발현 양식을 기반으로 하며, 이는 다수의 방법에서 유일하다. 첫째로, 본 시스템은 표현형적 특성에 대해 정상 세포와의 이의 비교에 있어서 공지된 유방 암 분류 시스템으로부터 일탈되어 있다. 이는 암의 아형의 보다 정밀한 확인을 허용한다. 둘째로, 이는

확인을 위한 ER, HER2 및 삼중-음성 종양 만을 관찰하는 공지된 분류 시스템과 비교하여, 종양 분류를 측정하는데 있어서 AR 또는 VDR 수준을 평가하는 유일한 분류 시스템이다(보다 상세한 것은 하기 도 19 및 실시예 9를 참조함). 실제로, 본 발명은 ER, AR, 및 VDR, 및 일부 경우에 HER2 발현 수준을 함께 고려하는 통합 시스템이다. 본 발명의 이들 국면은, 본 발명의 분류 시스템이 기존 그룹의 재명명일 뿐 아니라, 현재 존재하는 종양 분류의 보다 우수한 조직화를 제공하며, 이는 보다 정밀한 진단 및 보다 효과적인 치료 요법의 설계를 허용한다.

본 발명은 또한 본 분류 시스템을 이용하여 유방 암을 분류하는 방법에 관한 것이다. 필수적으로, 본 방법은 환자의 유방 암 종양 또는 암 조직에 존재하는 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계, 및 이들 단백질의 발현 수준을 기반으로 하여 암을 분류하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이는 또한 HER2의 수준을 측정하는 단계 및 존재하는 ER, AR, VDR, 및 HER2의 수준을 기반으로 암을 분류하는 단계를 포함한다. 본 명세서 전체에 사용된 것으로서 "측정하는" 수준은 당해 분야의 숙련자에게 이해될 수 있는 바와 같이, 어떠한 적절한 화학적, 생물학적, 및/또는 생화학적 방법으로 수행될 수 있다. 예는 면역염색, 면역형광성, 면역검정, 및 면역침전과 같은 항체계 검정; 단백질, DNA 또는 RNA의 질량 분광법; 웨스턴 블롯 분석과 같은 단백질 연구; 노던 블롯 분석, 프로브 하이브리드화, mRNA 연구, DNA 또는 RNA의 폴리머라제 체 반응(PCR), 반응계내 하이브리드화와 같은 핵산 연구; 및 생물학적 및/또는 생화학적 활성을 검출하기 위한 생검정을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 측정된 ER, AR, 및/또는 VDR의 수준은 앞서 기술된 바와 같이 0을 포함하거나 실질적으로 또는 작용적으로 0을 포함하는 어떠한 값을 포함할 수 있으며, 별개이거나 연속될 수 있다. 이러한 정보는 암을 범주로 분류하는데 사용된다. 앞서, 및 물질 및 방법 단락에서 보다 상세히 설명된 바와 같이, ER, AR, 및 VDR 양성 상태는, 샘플 중의 세포의 1% 이상이 상기의 어떠한 발현 또는 활성을 나타내는 경우에 배정될 수 있다. 다른 구현예에서, 양성 상태는 세포의 5% 이상, 세포의 10% 이상, 및/또는 세포의 50% 이상으로 정의된다. 이들 사이의 다양한 증가 또한 본 발명의 취지내에 포함된다.

보다 특히, 적어도 하나의 구현예에서 상기 방법은 암을 종양 또는 조직 샘플에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준을 기반으로 하여 다수의 범주 중의 하나로 분류하는 단계를 포함한다. 이들 범주는 본 발명의 분류 시스템의 설명에서 앞서 설명된 바와 같으며, 제1 범주(즉, HR0), 제2 범주(HR1), 제3 범주(HR2) 및 제4 범주(HR3)를 포함한다. 본 방법은 따라서, 종양 또는 암성 조직에서 측정된 ER, AR, 및 VDR의 수준을 유사한 발현 양식 및/또는 유방 조직과 같은 정상의 상응하는 조직에서 ER, AR, 및 VDR의 수준에 대해 비교하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서 "조직"은 동일한 기원의 세포와 같은 유사한 유형 세포의 공동체로 구성되므로, 적어도 하나의 세포를 포함한다.

또한, 본 분류 시스템의 다양한 범주(하기 제공된 도 및 실시예에서 HR0-HR3+로서 나타냄)는 유방 암으로 진단된 환자에서 유의적인 생존 차이에 상응한다. 본원에 사용된 것으로서, "유의적인"은, 상기 현상이 대부분 변화에 의해 유발되는 것이 아니라, 특수 원인 - 이 경우에, ER, AR, 및/또는 VDR 및 이의 조합의 존재의 직접적인 결과에 의해 유발되는 것을 의미한다. 예를 들면, 하기 도 19에 나타내고 실시예 10에서 보다 상세히 설명된 바와 같이, ER, AR, 및 VDR 모두를 발현하는 제4 범주(즉, HR3)로 분류된 종양을 지닌 환자는 다른 범주로 분류된 종양을 지닌 환자와 비교하여 가장 우수한 생존률(따라서 보다 우수한 예후)을 갖는다. ER, AR, 및 VDR 중 어느 2개를 발현하는 제3 범주(즉, HR2) 종양은, 생존율이 거의 양호하지 않지만, ER, AR, 또는 VDR 중 하나만을 발현하는 제2 범주(즉, HR1)는, 다른 범주와 비교하여 생존률이 최악이므로 예후도 최악이다. 이는 도 19에 가지적으로 나타나 있으며, 여기서 카플란-마이어 곡선(Kaplan-Meier curve)은, HR3+로 분류된 종양을 지닌 환자들이 HR2+ 종양을 지닌 환자와 비교하여 진단 후 어떠한 제공된 시점(즉, 년수)에서 생존함을 나타내며, 이는 HR1+ 종양을 지닌 환자보다 더 우수하다. 본원에 사용된 것으로서, "+"와 함께 및 이의 부재하에 사용된 범주 지정은 동일하며 상호교환적으로 사용될 수 있다(예를 들면, HR3 및 HR3+). HR0 종양을 사용하여, 생존의 변화는 진단 후 5년을 초과하는 수준이며 다른 종양보다 시간에 걸쳐 더 우수하지만 초기에는 다른 종양보다 열악하다. 본 발명의 분류 시스템으로부터 초래된, 이러한 정보를 기반으로 하여, 보다 정밀한 예후가 환자에게 제공될 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한 유방암의 예후를 진단하는 방법에 관한 것이며, 이는 환자의 종양 또는 암성 조직에 존재하는 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 이러한 수준을 기반으로 하여, 상기 방법은, 3개의 ER, AR, 및 VDR 모두가 발견되는 경우 보다 높은 생존률을 결정하는 단계; ER, AR, 및 VDR 중 2개만이 발견되는 경우 중간 생존률을 결정하는 단계; 및 ER, AR, 및 VDR 중 한개 만이 발견되는 경우 보다 낮은 생존률을 결정하는 단계를 포함한다. ER, AR, 및 VDR 중 어느 것도 발견되지 않는 경우, 당해 방법은 진단 후 처음 5년내에 양호하지 않은 생존률과 함께, 혼합된 생존률을 측정하는 단계, 및 이후에 진단 후 20년까지 매우 양호한 것으로

안정화하는 단계를 포함한다. 이들 생존물은 절대적이지 않지만, 예후를 예측하는 방법은 하기 실시예 10에서 설명된 본 연구에 의해 측정된 것으로서, 도 19의 C 및 D에서 나타난 카플란-마이어 생존 곡선을 크게 기반으로 한다.

유방 암에 대한 분류 시스템 및 생존물은 유방 암 종양 또는 암성 조직내에 존재하는 ER, AR, 및 VDR의 수준을 기반으로 하므로, 이들 단백질에 영향을 미치는 것에 목표를 둔 치료 요법이 유방 암을 치료하고/하거나 관리하는데 도움을 줄 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이, "치료하는"은 질병의 발달 또는 진행을 정지 또는 억제하는 것, 또는 정지 또는 억제하기 위해 시도하는 것, 또는 질병 및/또는 이의 증상의 감소, 억제, 회귀, 또는 완화를 유발하기 위해 시도하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계, 및 종양 또는 암성 조직에 존재하는 ER, AR, 또는 VDR 각각에 대해 적어도 하나의 영향을 미치는 분자를 포함시키는 단계를 포함하여, 유방 암 환자에 대한 치료 요법을 결정하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 치료 요법 및 치료 방법은, 이들의 특수한 종양 또는 암성 조직이 본 분류 시스템을 기반으로 분류되는 범주 및 소분류에 의존하여, 각각의 환자에 대해 개별화되는 것으로 고려된다.

예를 들면, 상기 방법은, ER이 종양 또는 조직에 존재하는 경우 적어도 하나의 ER 길항제를 치료 요법에 포함시키는 단계를 포함한다. 에스트로겐은 정상 유방 세포에서 성장 억제제이다. 대조적으로, 이는 유방 암에서 성장을 촉진한다. 따라서, 에스트로겐의 역할은 정상 세포 대 암성 세포에서 역전되므로, 암에서 에스트로겐의 작용을 차단하는 것이 중요하다. 앞서 정의한 바와 같이, "길항제"는 수용체에서 결합 작용의 효과를 차단하거나 억제한다. 에스트로겐 수용체(ER) 및 에스트로겐 시그널링은 유방 암에서 중요한 역할을 하여, 세포의 증식을 초래한다. 길항제를 사용하는 것과 같이, ER의 작용을 억제함으로써, 다운스트림 증식 또는 유방 세포의 성장이 또한 억제됨으로서, 유방 암의 발달 및/또는 진행이 지연된다. ER을 발현하는 종양 또는 암성 세포의 경우, ICI 182,780(파스플렉스)와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 ER 길항제를 사용한 치료는 유방 암 성장의 증식을 억제한다. 추가의 세부사항에 대해서는 실시예 12 및 도 24를 참조한다.

치료 요법을 결정하는 방법은 또한, 종양 또는 암성 세포가 AR을 발현하는 경우 적어도 하나의 AR 리간드를 치료 요법에 포함시키는 단계를 포함한다. 상기에 논의된 바와 같이 암에서 이의 역할이 역전되는 에스트로겐과는 대조적으로, 안드로겐은, 이들이 또한 HER2를 발현하는지에 따라서 환자에서 정상 및 암성 세포 둘 다에 있어서 세포 성장에 상이하게 영향을 미친다. 따라서, 안드로겐의 작용을 촉진하는 것은 일부 경우에 암 성장을 억제하는데 유리하며, 안드로겐을 억제하는 것은 다른 경우에 유리하다. 구체적으로, HER2+ 및 HER2- 환자에서 AR은 반대 역할을 한다. HER2+ 환자에서, AR은 억제될 필요가 있으므로, AR 길항제가 사용된다. HER- 환자의 경우, AR은 촉진되어야 하므로 AR 효능제가 사용된다. 위에서 정의된 바와 같이, "효능제"는 수용체에 결합하여 생물학적 반응을 개시할 수 있다. 안드로겐 수용체(AR) 및 호르몬 안드로겐은 또한 궁극적으로 세포 성장을 억제하는 시그널링 경로를 통해 유방 암에서 중요한 역할을 한다. 따라서, AR을 함유하는 유방 암 세포에 적용된 R1881(메틸트리엔놀론)과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 AR 효능제는 유방 암 세포 증식 및 성장을 추가로 억제한다. 추가의 세부사항에 대해서는 실시예 12 및 도 24를 참조한다. 그러나, HER2+ 환자에서 AR은 반대 역할을 하며 억제될 필요가 있다. 따라서, HER2+ 환자에서 AR 길항제는 세포 성장을 억제하는데 사용된다. 따라서, 본원에 사용된 것으로서, "리간드"는 AR과 같은 표적 수용체 단백질과 결합할 어떠한 분자도 의미하며, 유방 암 아형에 따라, 효능제 및 길항제 둘 다를 포함한다.

치료 요법을 결정하는 방법은 또한, 종양 또는 암 세포가 VDR을 발현하는 경우 적어도 하나의 VDR을 치료 요법에 포함시키는 단계를 포함한다. 안드로겐을 사용하므로, 비타민 D는 또한 정상 및 암 세포에서 세포 증식을 억제한다. 칼시트롤과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 VDR 효능제는 따라서 유방 암에서 세포 증식을 억제한다. 추가의 세부사항에 대해서는 실시예 12 및 도 24를 참조한다.

더욱이, ER, AR, 및 VDR 중 하나 이상이 종양 또는 암성 조직에서 검출되는 경우, 치료 요법을 측정하는 방법은 치료 요법에 대한 다중-호르몬 시도를 포함시키는 단계를 포함한다. 나열된 예로서, 종양이 ER+/VDR+인 경우, ER 길항제 및 VDR 효능제 둘 다가 치료 요법에 포함될 수 있다. 이러한 다중-호르몬 치료는 적어도 부가 효과, 및 일부 경우에, 상승 효과를 가지는 것으로 밝혀졌으며, 호르몬 치료 생성물이 단독으로 달성될 수 있는 것보다 함께 투여되는 경우 유방 암 세포 성장의 심지어 보다 풍부한 억제를 생산한다. 추가의 세부사항에 대해서는 실시예 12 및 도 24를 참조한다. ER, AR, 및 VDR의 상응하는 발현 프로파일에 대한 다중-호르몬 치료의 어떠한 적절한 조합도 본 발명의 다양한 구현예내에서 고려된다. 적어도 하나의 다른 구현예에서, 치료 생성물은 ER, AR, 또는 VDR에서 특이적으로 작용하지 않고, 오히려 "파트너 단백질"에서 작용하여 ER, AR, 및/또는 VDR이 직접 작용하는 경우와 동일한 방식으로 시그널링에 영향을 미친다.

본 발명은 유방 암에 대한 다중-호르몬 치료요법 치료의 이의 사용에 있어서 신규하며, 공지된 암 치료보다 많은 장점을 제공한다. 예를 들면, 본 치료 방법은 화학치료요법이 아니므로, 보다 더 안전하며 보다 적은 부작용을 초래한다. 더욱이, 관련된 호르몬 치료 생성물 각각의 보다 적은 투여량을 사용하여 효과적인 결과를 달성할 수 있으므로, 더욱 견딜 수 있으며 여전히 보다 적은 부작용을 유발한다. 다중 치료 생성물이 유방 암의 분류에 따라 불리는 경우, 치료 생성물은 보다 신속하고/하거나 부가적이거나 상승적인 효과를 위해 동시에 환자에게 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 다중 치료 생성물은 환자에게 연속적으로, 잠재적으로는 한번에 하나를 회전시키면서 순서대로 투여할 수 있다.

더욱이, 본 치료 방법은 다른 치료 프로코콜에 비하여 더 이점을 제공한다. 예를 들면, 안드로젠은 일부 여성에서 조기 폐경을 유도하는 것으로 공지되어 왔으며, 이는 생리적으로 및 정서적으로 매우 불편할 수 있다. 비타민 D는 칼슘 시그널링에 있어서 중요하므로, 비타민 D 수용체에 영향을 미치는 것은 체내에서 칼슘 활용에 부정적인 효과를 가질 수 있으며, 감소된 골 다공성 및 골다공증을 유발할 수 있다. 그러나, 특히, 함께 투여하는 경우에, ER 시그널링을 차단하고 AR 및 VDR 시그널링을 촉진하는 치료 생성물을 제공함으로써, 본 발명은 단독으로 사용되는 경우보다 더 우수한 결과를 제공하며, 종양원성 효과로부터의 부작용을 분리시킬 수 있다.

앞서 설명한 바와 같이, 현재의 유방 암은 ER+, HER2+, 또는 ER, PR 및 HER2에 대한 삼중 음성의 존재 또는 부재를 기반으로 분류된다. 더욱이, HER2+ 유방 암 종양의 거의 95%는 적어도 하나의 호르몬 수용체를 발현한다. 따라서, 적어도 하나의 구현예에서 치료 요법을 측정하는 본 방법은 또한 치료 요법에 적어도 하나의 HER2 억제제를 포함시키는 단계를 포함한다. 하나의 예는, 비록 어떠한 HER2 억제제도 사용될 수 있지만, 라파트니브(Lap)이다. 이는, 각각의 수용체가 종양 또는 암성 세포에서 존재하거나 검출되는 경우 치료 요법에서 ER 길항제, AR 효능제, 및/또는 VDR 효능제중 적어도 하나의 포함에 더해진다. 이러한 구현예에서, HER2 억제제는 ER 길항제, AR 효능제, 및/또는 VDR 효능제와 부가적으로 작용하여 암 또는 조직에서 유방 암 세포 증식을 억제한다.

암 및/또는 이의 단계, 진행, 및 공격성의 정도의 중증도에 따라서, 상기 나타낸 호르몬 치료(들)과 함께 치료요법에서 다른 추가의 전통적인 암 치료를 포함시키는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 치료요법을 결정하는 방법은 치료 요법에 화학치료요법을 포함시키는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 사용되고 당해 분야에서 일반적으로 이해되는 바와 같이, "화학치료요법"은 암을 치료하는데 사용된 어떠한 약물, 약제, 분자, 화합물, 또는 제제도 의미하며, 유방 암과 같은 암의 유형에 대해 특이적일 수 있다. 본원에 이용된 화학치료요법의 투여량, 투여 회수, 및 투여 빈도는, 화학치료요법 약물이 고유하게 독성이므로, 주치의 또는 다른 보건 전문가에 의해 결정된다. 많은 인자들이 본 발명과 함께 화학치료요법 약물을 포함시키고/시키거나 투여하기 위한 양, 및 빈도를 측정하는데 있어서 고려되어야만 하며, 이는 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 치료되는 특수한 질병 및/또는 암 및 이의 중증도 및/또는 발달/진행의 단계; 사용된 특수 화학치료요법 약물의 생이용능, 활성, 및 독성 수준(예를 들면, LD₅₀); 투여 경로 또는 방법 및 피검자에서 도입 부위; 특수한 화학치료요법 약물의 청소율 및 다른 약력학적 특성; 치료 기간; 점중 요법 및 빈도; ER 길항제, AR 효능제, VDR 효능제와 같은 특수한 화학치료요법 제제와 함께 또는 이와 동시에 사용된 약물, 및 이들 사이의 가능한 사용금지 사유 및 이로부터의 부작용; 화학치료요법 제제를 청소하는데 있어서 사용된 간 및 신장과 같은, 필수 신체 기관을 포함하는, 치료되는 피검자의 연령, 체중, 성별, 식이, 생리학적 및 일반적인 건강; 및 관련 과학 분야에서 기술자에게 잘 공지된 유사 인자.

일부 구현예에서, 치료 요법을 결정하는 방법은 또한 치료 요법에서 종양 또는 암 세포의 조사를 포함시키는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "방사선"은 종양 또는 암 세포에 적용되어 암 세포를 사멸시키는 에너지를 말한다. 이는 X-선 또는 다른 형태의 방사선을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이는 외부 공급원으로부터 환자에게 적용되거나 지시된다. 다른 구현예에서, 방사선은 단거리요법을 포함하며, 여기서 방사활성 물질의 일부가 환자에게 삽입되고/되거나 이식됨으로서 환자에 체내로부터 암 세포 상에 방사선을 방출한다. 본 발명에 사용된 방사선의 과장, 강도, 기간, 및 빈도는 암의 치료를 위해 사용된 바와 같은 어느 것일 수 있으며, 치료되는 피검자의 연령, 체중, 성별, 식이, 생리학 및 일반적인 건강; 방사선 치료요법과 관련하여 제공된 다른 치료; 이의 가능한 부작용 및 강도; 및 관련 과학 분야의 기술자에게 잘 공지된 유사 인자를 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 인자에 의존한다.

명백해지는 바와 같이, 본 발명은 또한 유방 암을 치료하는 방법에 관한 것이며, 이는 본 분류 시스템을 기반으로 한다. 구체적으로, 유방 암을 치료하는 방법은 유방 암 종양 또는 환자의 세포에서 ER, AR, 및 VDR의 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 앞서와 같이, 이들 수준은 0 발현, 또는 특수한 호르몬 수용체의 다양한 발현 수준

을 반영할 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, 당해 방법은 또한 유방 암 종양 또는 암 세포에서 검출된 ER, AR, 및 VDR의 발현 수준을 기반으로 환자의 유방 암을 분류하는 단계를 포함한다. 이러한 분류 단계는 본 발명의 분류 시스템에 따르며, 이는 정상 유방 세포의 표현형을 기반으로 한다.

상기 방법은 또한, ER이 종양 또는 암성 세포에서 검출되는 경우 환자에게 적어도 하나의 ER 길항제의 치료학적 유효량을 제공하는 단계를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "제공하는"은 "투여하는"과 동일하며, 이와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서 "치료학적 유효량"의 의미는 위에서 정의한 바와 같다. 상기 방법은 또한 AR이 종양 또는 암성 세포에서 검출되는 경우, 치료학적 유효량의 적어도 하나의 AR 효능제를 환자에게 제공하는 단계, 및 VDR이 종양 또는 암성 세포에서 검출되는 경우 치료학적 유효량의 적어도 하나의 VDR 효능제를 환자에게 제공하는 단계를 포함한다. 종양 또는 암성 세포가 ER, AR, 및 VDR 중의 하나 이상을 발현하는 경우, 당해 방법은 앞서 논의한 바와 같이, 유방 암 세포 증식의 억제의 추가적 효과를 위해, 치료학적 유효량의 적어도 하나의 ER 길항제, AR 효능제, 및 VDR 효능제를 동시에 또는 함께 제공하거나 투여하는 단계를 포함한다.

유방 암을 치료하는 본 방법에서, ER 길항제, AR 효능제, VDR 효능제, 및 HER2 억제제 중 어느 것도 상기 정의의 단락에서 정의된 바와 같이, 어떠한 적절한 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 이들은 예시적인 실시예로서, 경구적으로 또는 정맥내 투여될 수 있다. 또한, 이들은 앞서 정의된 바와 같이, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 이는 액체, 고체, 또는 증기 형태일 수 있다.

특정의 구현예에서, 유방 암을 치료하는 방법은 또한 화학치료요법의 적어도 하나의 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 이는 상기에 보다 상세히 논의되어 있다. 일부 구현예에서, 유방암을 치료하는 방법은 방사선의 적어도 하나의 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 또한 상기에 보다 상세히 논의되어 있다.

본 발명은 또한 샘플에서 ER, AR, 및 VDR을 검출하는데 유용한 키트에 관한 것이며, 임의로 또한 HER2에 대해 시험할 수 있다. 이러한 키트는 고형 조직 샘플, 생검, 포르말린-고정된 파라핀-포매된(FFPE) 조직, 조직 미세배열, 배양물 또는 매트릭스내 세포, 및 다른 생물학적 샘플과 같은 조직의 얇은 단면 또는 쉬이트(sheet)에서, 비록 이들이 키트의 일부인 것으로 의도되지 않는다고 해도, 사용될 수 있다. 키트는 살아있는 환자 또는 시체로부터의 생물학적 샘플에서 사용될 수 있다.

본 발명의 키트의 하나의 구현예는 면역염색 및 검출을 위한 항체-기반이다. 이러한 키트는 이의 검출을 위해 ER, AR, 및 VDR의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 소정의 양의 일차 항체를 포함한다. 따라서, 키트는 이들 호르몬 수용체 각각을 검출하기 위한 일차 항체를 함유한다. 바람직하게는, 상기 키트는 각각의 호르몬 수용체에 대해 한개씩인, 3개의 별개의 일차 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 또한 이의 검출을 위해, HER2의 적어도 하나의 결합 부위에 결합할 수 있는 일차 항체의 소정의 양을 함유한다. 키트에 포함된 일차 항체의 특수량은, 키트가 의도되는 고려된 수의 시험 및/또는 사용될 샘플의 크기에 의존할 것이다.

본원에 사용된 것으로서, "일차 항체"는 표적 분자를 인식하기 위하여 특수한 표적 분자에 대해 생성된 항체를 의미하며, 이는 이와 직면하는 경우 표적 분자에 결합할 것이다. 이들은 이들의 특수한 표적에 고 친화성 및 특이성으로 결합하며, 특수한 결합 부위, 또는 일차 항체가 결합하는 분자의 일부에 대해 특이적일 수 있다. 결합 부위는 특정의 아미노산 서열(단백질의 경우), 단백질의 특정의 3-차원 구조(예를 들면, α -나선형, β -병풍 구조, 루프, β -벌지(bulge)), 또는 화학 분자의 특수한 작용 그룹일 수 있다. 일차 항체는 마우스, 토끼, 염소, 당나귀, 및 양을 포함하나, 이에 한정되지 않는 어떠한 적절한 동물에서 상승될 수 있다. 일차 항체는 동일한 항체를 생산하는 면역 세포로부터 제조된, 모노클로날일 수 있거나, 또는 면역 세포의 혼합된 집단으로부터 제조된, 폴리클로날일 수 있다.

적어도 하나의 구현예에서, 본 염색 키트는 또한 ER, AR, 및/또는 VDR에 대한 적어도 하나의 일차 항체를 결합시킬 수 있는 소정의 양의 이차 항체를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "이차 항체"는 일차 항체 또는 이의 단편에 결합하는 항체를 말하며, 이의 위치, 및 이에 의해 일차 항체 및 목적인 표적 분자의 위치를 가시화하고/하거나 확인하기 위한 리포터(reporter) 또는 다른 마커를 지닌다. 마커 또는 리포터의 예는 특정 과정에서 형광성을 지니는 형광단을 포함하며, 이는 다수의 항체의 동시 검출을 위한 다른 형광단과 구별될 수 있다. 일차 항체는 이차 항체 결합을 위한 항원 또는 표적 분자로서 작용한다. 이차 항체는 전체 Ig 분자, 또는 중쇄 또는 경쇄, Fc 또는 Fab 영역의 일부와 같은 일차 항체의 단편일 수 있는, 이의 표적에 고 친화성 및 특이성으로 결합한다. 이차 항체는 마우스, 토끼, 염소, 당나귀, 및 양을 포함하나, 이에 한정되지 않는 어떠한 적절한 동물에서 생성될 수 있으나, 표적 일차 항체를 생산하는 것과는 상이한 동물에서 생산된다. 이차 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 이차 항체는 어떠한 적절한 방법에 의해서 및 형광측정법 또는 가시적으로와 같

은, 그러나 이에 한정되지 않는, 이차 항체를 검출할 어떠한 적합한 장치를 사용하고 어떠한 적절한 방법에 의해 가시화시킬 수 있다.

본 발명의 키트의 다른 구현에는 ER, AR, VDR, 및/또는 HER2 단백질을 검출하기 위한 프로브를 사용한다. 따라서, 키트는 ER 단백질의 어떠한 부위에도 결합할 수 있는 제1 프로브, AR 단백질의 어떠한 부위에도 결합할 수 있는 제2 프로브, 및 VDR 단백질의 어떠한 부위에도 결합할 수 있는 제3 프로브의 적어도 소정의 양을 포함한다. 상기 프로브는 이들의 표적 단백질에 세포외적으로 또는 세포내적으로 결합할 수 있으며, 어떠한 특이성 및 친화성 수준으로 결합할 수 있으나, 보다 높은 수준이 특이성 및 친화성이 일부 구현예에서 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 또한 검출용 HER2 단백질 상의 어떠한 부위에도 결합할 수 있는 제4의 프로브를 포함할 수 있다.

키트는 또한 단백질에 대한 제1, 제2, 제3, 및 가능하게는 제4의 프로브의 검출을 허용하는 검출 프로브(들)을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 및 제4의 프로브를 가공하여 각각의 표적 단백질과의 결합에 있어서 구조적 변화가 결합시 프로브의 형광성을 통해서와 같이, 검출을 허용할 수 있다.

유사하게, 다른 구현예에서 키트는 위에서 기술한 바와 같지만, 단백질보다는 ER, AR, VDR, 또는 HER2 mRNA에 결합하는 프로브를 사용한다. 여전히 다른 구현예에서, 키트는 ER, AR, VDR, 및 일부 경우에 HER2의 생물학적 활성에 대해 시험하는데 사용된 생검정 키트이다. 생검정 키트는, 각각의 수용체가 포함되는 시그널링 경로의 다운스트림 효과와 같은, 특이적인 ER, AR, VDR 및/또는 HER2 생물학적 활성을 검출하기 위한 프로브를 함유하며, 이는 그러나 적은 예로서, 예를 들면, 대사물질, 화학물질, 또는 세포 작용의 존재를 검출하는 것을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, 키트는 수용체 자체보다는 ER, AR, VDR, 및/또는 HER2의 특수한 "파트너 단백질"을 결합시킬 수 있는 프로브를 포함한다.

따라서, 본 발명의 키트는 면역염색을 위해 사용될 수 있다. 특정의 구현예에서, 키트는 또한 이차 항체의 존재를 검출하기 위한 가시화 장치(visualizing device)를 포함할 수 있다. 예는 휴대용 또는 이동가능한 형광측정법을 포함한다. 적어도 하나의 구현예에서, 키트는 또한 이의 내용물을 사용하기 위한 지시사항을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 실시예

[0025] 본원에 기술된 방법 및 조성물 및 관련 키트는 나열의 방식으로 제공되며 제한하는 것으로 의도되지 않는 다음 실시예에서 추가로 나열된다. 나타난 성분의 요소에 있어서 비율 및 대체물질에 있어서의 변화는 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이며 본 발명의 구현예의 영역내에 있음을 인식할 것이다. 이론적 국면은, 출원인이 나타난 이론에 의해 구속되는 것을 추구하지 않는다는 이해와 함께 나타내어진다. 모든 부 또는 양은, 달리 규정하지 않는 한, 중량 기준이다.

[0026] 물질 및 방법

[0027] 조직 샘플

[0028] 정상 유방 조직 및 유방 종양의 외과적 절개 표본으로부터의 파라핀 블록(paraffin block)을 브리그햄 및 여병원(Brigham and Women's Hospital: BWH)의 보관소로부터 BWH 기관 감사 위원회에 의해 규정된 과도한 조직 사용을 위한 규정에 따라 수득하였다. 본 연구는 헬싱키의 선언에 요약된 원칙에 따라 수행되었다. 삼중 음성 종양(HTMA114)의 조직 미세배열(TMA)은 앞서 기술되었다(54). TMA BRC1501 및 BRC1502는 업자(Pantomics(캘리포니아주 리치몬드 소재))로부터 구입하였다. HER2 양성 종양은 IHC(하기 기술된 점수매김 규모에서 >6의 발현)에 의해 정의되었다. 정상의 유방 세포의 TMA 및 간호사의 건강 연구(Nurses' Health Study)로부터의 샘플의 TMA는 앞서 기술되었다(36).

[0029] 조직의 면역조직화학 및 면역형광성

[0030] 파라핀 단면을 도 11에 나타난 항체 및 조건으로 염색하였다. 탈파라핀화된 단면을 3% H₂O₂로 차단시키고, 항원 회수는 120°C +/- 2°C, 15 +/- 5 PSI에서 다코(Dako) 시트레이트 완충액(pH 6.0)이 들어있는 압력 쿠키(pressure cooker)를 사용하여 수행하고, 슬라이드를 3% 혈청으로 차단시키고, 일차 항원(도 11에서 나타난 희석)과 함께 실온에서 40분 동안 항온처리하였다. 일차 항원 적용에 이어 이차 항원으로서 다코 표지된 중합체-HRP와 함께 30분 항온처리하고, 색원체(Dako Envision+ System)로서 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)을 사용하여 가시화하였다. 마이어-헤마톡실린을 대비염색으로 사용하였다. 면역염색된 단면은 광학 현미경으로 관찰하였으며

각각의 개개 중심에 지정된 값으로 가시적으로 점수매겼다. 면역형광성은 유사한 조건을 사용하여 수행하였으나 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 텍사스 적색, Cy3, Cy5, 또는 알렉사플루오르(AlexaFluor) 염색과 접합된 형광성 표지된 이차 항체로 수행하고 표준 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0031] 도 16에서, 면역염색된 단면은 광학 현미경을 사용하여 2명의 병리학자에 의해 별도로 및 0 내지 25 규모로 점수매겼다. 중앙 세포 염색의 퍼센트는 (0) = 0%, (1+) = 1-20%, (2+) = 21-40%, (3+) = 41-60%, (4+) = 61-80%, 및 (5+) = 81-100%로 정량화하였다. 염색의 강도는 0 내지 5로 정량화하였다. 총 점수는 퍼센트 점수를 강도 점수와 곱하여 계산하였다. 따라서, 발현과 강도 사이에 차이가 존재한다. 발현은, 적어도 1%의 세포가 발현의 신호를 나타내는지의 여부를 기반으로 하는, 온 또는 오프의 계수적(quantal) 또는 이원성 측정이다. 강도는 존재하는 경우 신호가 나타내는 발의 정도를 말한다. 총 점수는 측정 둘 다를 기반으로 한다.

[0032] 평가는 기본적으로 정량적이거나 정성적일 수 있다. 예를 들면, 상기 실험에서, 발현은, 조직내 적어도 1%의 세포가 목적인 단백질을 나타내는 경우에 고려된다. 다른 구현예에서, 발현은 양성 염색 또는 다른 유사하게 적절한 검출 기술을 나타내는 적어도 5%의 세포에 의해 측정될 수 있다. 다른 구현예에서, 발현 역치는 적어도 10%의 세포이다. 여전히 다른 구현예에서, 발현은 양성 검출을 나타내는 적어도 50%의 세포로서 측정된다. 이들 상기 검출 범위는 ER, AR, VDR, 및 HER2 검출에 동일하게 적용된다.

[0033] 간호사의 건강 연구(NHS)를 위해, 도 19에서 1,731명의 환자 각각에 대해 4개의 점수가 존재하였다(총(6,924개 점수)). 당해 점수를 함유하는 조직 미세배열(TMA)을 ER, PR, HER2, VDR, AR, [K8/18/C1d-4], K5/6, 및 [SMA/p63/CD10] 항체로 염색하고 반-정량적으로 점수매겼다. 점수매겨지는 거대한 수의 점수(1,731 x 4 x 7 = 55,392) 및 파일럿 연구에서 관찰된 이원성 발현 양식을 제공하여(도 16) 본 발명자는 본 연구에서 1% 컷 오프를 사용하여 이원성 점수매김 시스템을 진행하였다. 점수매김은 염색이 되지 않는 경우 0(<1%), 양성 염색의 경우 1이었다. 병리학자들은 다른 병리학자에 의해 제공된 점수 및 생존 결과에 대해 알리지 않았다. 점수매김 평균은 2개의 병리학 판독으로부터의 모든 해석가능한 점수로 지정된 값을 사용하여 케이스당 결정하였다. 진단 조직이 부재하거나 염색이 모든 3개의 점수에 대해 해석되지 않은 경우, 당해 경우 상태를 손실(missing)로 기록하였다. 각각의 경우의 ER, PR 및 HER2 상태는 앞서 기술된 바와 같았다(58).

[0034] NHS는 1976년에 개시된 장래의 집단 연구법(cohort study)이며; 30 내지 55세 연령의 121,700명의 여성 US-승인된 간호사들이 노출 정보를 업데이트하고 비치명적인 사건의 질병을 추정하는데 사용된 격년의 잇달은 질의서(biennial follow-up questionnaire)를 사용하여 여성의 건강과 관련된 요인들을 포함하는 질의서를 완료하였다. 집단, 결과 분석을 위한 선택 기준, 평가된 공변량, 및 통계적 분석 방법에 대한 정보는 (36)에서 앞서 기술한 바와 같다.

[0035] **다중 면역형광성의 분석**

[0036] 접합체의 교차 채널 형광성, 일차 항체 하이브리드화 조건의 비상용성 및 이차 항체의 중 제한으로 인한 제한을 포함하는 수개의 원인으로 인하여 3개 이상의 항체를 동시에 사용하여 FFPE 조직 단면을 면역염색하는 것은 매우 어려웠다(59-61). 첫째로, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), Cy3, Cy5, 및 알렉사플루오르(AlexaFluor) 염료와 같은 형광성 접합체에 대한 여기 및 방사 과장은 이론적으로 비-오우버랩핑인 반면, 채널들 사이를 통한 블리드(bleed)는 일반적이다. 따라서, 동시 다중처리(multiplexing)는 매우 상이한 여기 및 방사 과장을 지닌 형광성 접합체를 사용하는 것을 필요로 하며, 이는 모든 실제 목적을 위해 3 또는 4개로 동시 사용될 수 있는 형광성 프로브의 수를 제한한다. 둘째로, 단일의 일차 항체 대 3 내지 4개의 상이한 상체를 사용한 조직의 일차 하이브리드화는 항상 동일한 결과를 생산하지 않는다. 이는, 일부 경우에 항체 정보검색 조건이 각각의 항체에 대해 상이하거나 최적의 하이브리드화 조건이 상이한 온도 또는 시간을 필요로 할 수 있기 때문이다. 따라서, 모든 항체에 대해 동시에 작업할 수 있는 조건을 사용하여야만 하는데, 이는 전체는 아니지만, 일부 항체에 대해 수회 아임계적이다(62). 셋째로, 대부분의 이차 항체 선택성은, 대부분의 잘 특성화된 일차 항체가 마우스, 토끼, 랫트 또는 닭에서 생산되므로, 종 기반으로 하며, 이는 또한 동시에 다중처리될 수 있는 이차 항체의 수를 제한한다. 따라서, 모든 의도 및 목적을 위해, 이는 동시 다중처리에 대해 상한치를 투입한다.

[0037] 이들 문제를 해결하기 위하여, GE Global Research Center(뉴욕주 니스카유나 소재)에서 개발된 연속적인 다중처리 면역형광성 방법을 본원에서 사용하였으며, 여기서 2개의 항체가 조직 단면에 대해 동시에 하이브리드되어 영상이 2개의 채널로 조직에 여기되는 2개의 레이저로 수집된다. 따라서, 당해 시도는 각각의 항체에 대한 최적의 항원 정보검색 및 하이브리드화를 사용하는 것을 허용하며 표면상 형광성의 교차 채널 블리드-쓰로우(bleed-through)는 존재하지 않는다(63). 요약하면, IF-계 연속적인 다중처리 방법은 Cy3 또는 Cy5 염료를 사

용한 일차 항원의 직접적인 접합을 필요로 한다. 조직 단면은 각각의 라운드의 염색에 대해 Cy3 및 Cy5로 염색한 2개의 일차 항체로 일련 염색하였으며, 이후에 영상을 획득한 후 형광성 표지를 불활성화시켰다. 다른 라운드의 염색을 이후에 다른 2개의 Cy3 및 Cy5 표지된 항체를 사용하여 수행하였다. 당해 공정은, 목적한 모든 항체가 염색되고 영상이 획득될 때까지 반복하였다. 당해 연구를 위해, 총 12개의 항체를 동일한 조직 단면에서 다중처리하였다.

[0038] 영상 분석은 MetaMorph 7.7(Molecular Devices, 펜실베이니아주 다운타운)로 수행하였다. 관강 상피 세포의 분석의 결과가 기록된다. DAPI 영상을 사용하여 핵 차폐 영상을 생성하였다. DAPI 강도 역치를 설정하여 모든 세포 핵을 확인하고, 컷(cut)/조인 툴(join tool)을 사용하여 각각의 핵을 요약하였다. 다음, 케라틴 음성 부위를 파쇄제거하여 기질 세포로부터의 시그널을 제거하고 SMA 영상을 사용하여 근상피 세포를 차폐하였다. 적분된 형태 계측/측정 대상(Integrated Morphometry Analysis/Measure Object: IMA/MO)을 70 화소(pixel)의 최소의 대상 영역과 함께 사용하여 완전한 세포 핵이 되기에 너무 작은 대상은 제거하였다. 수득되는 측정된 대상 영상을 이원화하여 핵 차폐를 생성하였다. 핵 차폐 영상을 이원화한 후 희석하여(이웃 2, 반복 수 5, 밀폐 없이 확장시킴) 이원 세포 차폐 영상을 생성하였다. 이원 세포 차폐 영상을 이후에 모든 11개의 영상 평면에 연산: 점수 채널 영상 스택 및 이원 셀 차폐를 사용하여 적용하였다. 수득되는 영상은 매 화소에 대해 개시하는 강도 값을 가졌으며 차폐 영상은 '온(on)'이었고, 매 화소에 대한 영(zero)의 값에서 차폐 영상은 '오프(off)'이었다. 모든 대상이 매 채널에서 나타났다는 것을 보증하기 위해, 메타모프(MetaMorph) 이원 세포 차폐 영상을 1 (이원이 '온'인 경우) 및 0(이원이 '오프'인 경우)인 통상의 16-비트 영상으로 전환시켰다. 이후, 당해 영상을 영상 채널의 각각에 가하였으며, 이는 각각의 평면에서 각각의 채널-대상에 대한 동일한 최소의 가능한 강도를 생성하였고, 모든 영상 평면은 동일한 대상을 가졌다. 다음에, 데이터를 대상 부위 및 강도(1 내지 65,535)에 대한 결과에 대한 역치화 함께 마이크로소프트 엑셀로 보냈다. 이중(HR2) 및 삼중(HR3) 호르몬 수용체 양성 세포의 분석을 촉진시키기 위해, 메타모프를 사용하여 HR2 및 HR3 세포를 특징화하는 영상을 생성하였다. 독립된 세포 대상의 11개의 평면 영상 스택(stack)으로 출발하여, 스택을 중복시키고, 유지 평면 명령(Keep Planes command)을 사용하여 목적물 - ER, AR, VDR(핵)의 영상 평면 채널을 유지시키고 스택 연산 평균을 사용하여, ER, AR 또는 VDR(핵) 시그널 중의 어느 것이 높은 경우 밝은 핵 시그널로 영상, "HR2" 또는 "HR3"를 생성하였다. 표시 목적을 위해, 색상 조합을 또한 일부 영상 삼중항, 예를 들면, 적색=ER, 녹색=AR, 청색=DAPI에서 수행하였다.

[0039] **간호원의 건강 연구: 설계 및 집단**

[0040] NHS는 1976년에 개시된 장래의 집단 연구이며: 30 내지 55세 연령 사이의 121,700명의 여성 US-등록된 간호원이 노출 정보를 업데이트하고 비치명적인 사건의 질병을 추정하는데 사용된 격년의 잇달은 질의서를 사용하여 여성의 건강과 관련된 요인들을 포함하는 질의서를 완료하였다. 집단, 결과 분석을 위한 선택 기준, 평가된 공변량, 및 통계적 분석 방법에 대한 정보는 (36)에서 앞서 기술한 바와 같다.

[0041] **mRNA 발현 프로파일의 분석**

[0042] 855명의 환자 유방 종양 데이터세트(37)(<https://genome.unc.edu/>)로부터의 모든 침입성 유방 암에 대한 재발이 없는 생존의 카플란-마이어 분석을 ER, AR, 및 VDR에 대한 유전자 발현 값에 따라 모든 855명의 종양을 우선 독립적으로 순위 순서매겨 수행하였다. 다음, 종양은 50번째의 퍼센트 컷 오프를 사용하여 서로에 대해 독립적으로, 각각의 유전자에 대해 '양성/고' 또는 '음성/저'로서 분류하였다. 이후에, 그룹을 각각의 유전자에 대한 양성 또는 음성 콜(call)을 기반으로 조립하였다; 모든 음성=HR0, 하나의 양성=HR1+, 2개의 양성=HR2+, 모든 3개의 양성=HR3+.

[0043] **유방 암 세포주의 특성화**

[0044] 모든 세포주를 ATCC 안내서에 따라 배양하였다. BT20, HCC1187, MDAMB468 및 SUM159 세포를 0.05% 트립신/EDTA로 트립신 처리하고 적절한 밀도(BT20: 6,000, HCC1187: 10,000, MDAMB468: 4,000 및 SUM159: 1,000개 세포/웰)에서 96웰 플레이트 속에서 DMEM+10%FBS에 플레이팅하였다. 다음날, 칼시트리올 및 탁술을 각각 25nM 및 1.5nM의 농도에서 가하였다(0일). ZR75B의 경우, 4000개의 세포/웰을 96 웰 플레이트 속에서 DMEM+10%FBS에 플레이팅하였다. 50nM의 칼시트리올 및 5nM의 ICI180,782를 다음날 신선한 배지와 함께 가하였다(0일). 배지를 매 격일마다 새로이 교체하고 세포 증식 검정을 상기 세포주에 대해 6일째에 수행하였다. T47D 세포를 페놀 레드가 없는 삼중 발현물(Invitrogen)로 트립신처리하고 PBS로 세척하고 10,000개의 세포/웰을 페놀 레드가 없는 DMEM+ 5% 목탄 스트리핑된 FBS(CSFBS) 속에서 96 웰 플레이트 속에서 플레이팅하고 3일 동안 배양하였다. 4일째 날에, 10nM의 17 베타 에스트라디올(E2)을 신선한 페놀 레드가 없는 DMEM+5% CSFBS을 지닌 상이한 그룹에서

10nM ICI180,782, 10nM R1881 및 50nM 칼시트리올 외에, 비-약물 처리 그룹을 제외하고 모든 웰내로 가하였다 (0일). 세포를 동일 배지 속에서 계수 전 6일 동안 배양하였다. 모든 증식 검정을 세포 역가 블루 시약 (Promega)을 사용하여 수행하고 형광성을 바이오-텍 분광광도법(Bio-Tek spectrophotometer)를 사용하여 530/25nm(여기) 및 590/35nm(방출)에서 측정하였다. 비히클만의 그룹은, E2를 대조군으로 사용하는 T47D를 제외한 모든 실험에서 대조군으로 사용하였다.

[0045] **통계적 분석**

[0046] 사건 결과를 카플란-마이어 분석을 사용하여 비교하였으며 P 값은 로그랭크 시험(logrank test)으로 측정하였다. 근상피 및 관강 유전자 세포(25-27)의 종양 발현은 fRMA 표준화된(참조: McCall & Irizarry 2010, Biostatistics) 유전자 발현 데이터(GSE3744, , GSE4922, GSE6532, GSE7390)에서 계층화 군집 분석(피어슨 상관 계수(Pearson correlation coefficient), 평균 계통)을 사용하여 바이오컨덕터 패키지 메이드(Bioconductor package made4)를 사용하여 탐색하였다(참조: Culhane et al. 2005). 세계적인 시험(Global test)(참조: Goeman et al. 2004)을 사용하여 유전자 발현과 관강 또는 근상피 분류 사이의 상관관계를 평가하였다. 종양은, 기저-유사 아형 분류가 발명자에 의해 제공된 경우(참조: Richardson et al. 2006)를 제외하고는, 앞서 기술한 바와 같이(참조: Culhane & Quackenbush 2009) 기저 또는 비-기저 유사로 분류하였다. 바이오컨덕터 패키지 세계적인 시험(Bioconductor package globaltest)(참조: Goeman, J. J., van.(2004))으로부터 이용가능한 세계적인 시험을 사용하여 개개 유전자와 기저/비-기저 개인 사이의 상관관계를 측정하였다.

[0047] **유전자 발현 분석**

[0048] 본 분류 시스템 및 이를 사용한 방법을 개발하기 위하여, 실험을 정상의 유방 세포에서 수행하여 양성 종양 또는 조직을 분류하기 위한 참고로서 사용하였다. 구체적으로, 거대한 세트의 유방 상피 마커의 전신계적 분석을 수행하였다. 이러한 정보를 사용하여 정상의 세포 유형을 기준으로 한 사람 유방 종양을 4개의 주요 아형으로 분류하였다. 당해 신규 종양학적 분류 계획은 유의적인 환자 생존 차이와 관련되어 있으며 실시예 및 도면에서 보다 상세히 설명된 바와 같이, 유방 종양을 치료하기 위한 행동가능한 통찰력을 제공한다.

[0049] 실시예 1: 정상의 사람 유방에서 분화의 집단(CD) 마커의 분석

[0050] 앞서 나타난 바와 같이, 정상의 사람 유방은 젖을 생산하는 소엽과 젖을 유두로 수송하는 소엽내 도관으로 구성된다(도 1, A). 사람 유방 종양의 막대한 대부분은 '도관 암종' 또는 '소엽 암종'으로서 형태학적 배경으로 분류되며, 도관 및 소엽 유방 암이 정상 도관 및 소엽 각각에서 개시된다는 일반적인 오개념을 초래한다. 그러나, 이들의 명칭에도 불구하고, 종양 유형 둘 다에 대한 조지 진행 단계의 거의 모두는 전적으로 유방 소엽을 포함한다. 따라서, 소엽에서 정상 세포는 조직 구조를 보존하고 도관, 소엽 및 상이한 층의 상피의 구별을 허용하는 면역조직화학(IHC) 염색을 사용하여 시험하였다. 그러나, 대부분의 단백질은 IHC와 같은 반-정량적인 방법을 사용하여 세포 아형을 정의하는 이들의 용도를 제한하는 생체내 구매 양식으로 발현된다. 따라서, 이원성 발현 양식(즉, 하나의 소집단은 명확하게 음성이고 다른 것은 강력하게 양성이다)을 갖는 마커가 정상 유방 조직의 면역조직화학적 염색을 기반으로 하여 확인되었다(도 1).

[0051] 실시예 2: 정상의 사람 유방에서 중간 필라멘트의 분석

[0052] 정상의 사람 유방에서 이원성 발현 양식을 지닌 분자를 확인하기 위한 시도에서, 중간 필라멘트는 명백한 세포 주에서 차등적으로 발현되며 이들의 발현은 조직 및 세포-형 특이적이므로, 중간 필라멘트의 발현을 시험하였다. 또한, 중간 필라멘트의 세포-형 특이적인 발현은 종양에서 보존됨이 잘 인식되어 있다(10). 당해 이유로, 이들은 발생학자에 의해 성공적으로 사용되어 조직 분화를 연구하였고 병리학자들에 의해 성공적으로 이용되어 종양의 조직 기원을 측정하여 왔다(11). 이원성 양식으로 발현하는, 사람 유방 세포의 아집단(subpopulation)을 확인하는데 유용한 아세트(subset)가 발견되었다. 이들은 K5, 7, 8, 14, 17, 18, 및 19를 포함하였다(도 1, J).

[0053] 다음, 12명의 완전한 FFPE 단면 및 24명의 환자로부터의 샘플을 사용한 조직 미세배열을 포함하는, 36개의 유방 축소 유방성형수술로부터의 정상 유방 조직을 시험하였다. 이들 경우는 K5, 7, 8, 14, 17, 18, 19, CD10, p63 및 평활근 액틴(SMA)으로 면역염색되었다.

[0054] 정상의 유방 소엽 및 도관은 2개의 세포형, 즉 내부 젖을 생산하는 관강 세포-형 및 외부 지지성 근상피 세포형으로 이루어진 것으로 사료되는 이-층 상피에 의해 나누어진다. 앞서 나타난 바와 같이, K7, K18 및 클라우딘-4(Cld-4)는 모든 관강 층 세포에서 발현되며 근상피 층 세포에서는 발현되지 않는다(도 2, A)(12). 따라서, 이들 3개의 항체는 모든 관강 세포를 확인하는 팬-관강 마커를 구성한다. 대조적으로, CD10, SMA 및 p63은 모든

근상피 층 세포에서 발현되지만, 관강 층 세포에서는 발현되지 않으므로; 이들은 팬-근상피 마커 패널을 구성한다. 흥미롭게도, 대부분의 관강 세포는 K19으로 염색되는 반면, 드물게 소엽 K19는 음성이었다(도 2, B). 따라서, 이의 발현 양식에 있어서 전적으로 관강이지만, K19는 팬-관강 마커가 아니다.

[0055] 사람 피부 및 마우스 유선 조직에서 K5/14/K17은 유방의 근상피 층의 기저 층에서 전적으로 발현된다(도 3, A, B). 이들 관찰을 기반으로 하여 이들 케라틴은 일반적으로 '기저 케라틴'으로 언급된다(13). 그러나, 정상 사람 유방 조직에서 K5, K14 및 K17은 단일 층에 대해 배타적이지 않았으며, 이들의 발현은 위치에 따라 관강과 기저 층 사이에서 스위칭되었다. 사람 유방에서 보다 큰 직경의 소엽내 도관에서 K5/14/17은 예측된 바와 같이 근상피(기저) 층에서 발현되었다(도 1, B, 도 3, C-E). 그러나, 유방 압 및 전구체 병변에 대한 조기 진행 단계가 발달하는 부위인, 소엽에서, K5, K14 및 K17는 관강 층에서 보다 주로 발현되었다(도 2, C-E, 도 1, J, 도 3, F-H)(7). 이들 [K5+, K14+ 또는 K17+] 양성 세포의 관강 특성은 이중 면역염색으로 확인하였다. 소엽에서 [K5+, K14+ 또는 K17+] 세포는 비멘틴(vimentin)+, SMA+, CD10+ 및 p63+ 근상피 세포층 위에 위치하여 관강 공간에 직접 면한다. 이들 세포는 또한 근상피 특이적인 마커 CD10, SMA 및 p63에 대해 음성이며, 이들의 관강 표현형을 입증한다(도 3, I-K).

[0056] 관강 [K5+, K14+ 또는 K17+] 세포는 시험한 모든 환자에서 확인되었다(n=36). 따라서, 이는 관강 세포의 풍부하고 고도로 재생성인 소집단이었다. 특히, 일부 소엽에서는 단지 작은 퍼센트의 관강 세포만이 [K5+, K14+ 또는 K17+]이었지만, 다른 소엽에서는, 거의 100%의 관강 세포가 심지어 동일한 환자로부터의 조직의 단일의 단면에서조차 [K5+, K14+ 또는 K17+]이었다(도 3, L-O).

[0057] 2개의 상이한 세포 계통을 마커의 상호 배타적인 발현으로 정의하는 경우, 동일한 세포에서 이들 마커의 동시-발현은 '줄기성(stemness)'의 증거로 사용되어 왔다. 이미, K5, K14 또는 K17과 K7 또는 K18의 동시-발현은 혼합된 관강/근상피 표현형을 지닌 이중-잠재성 세포에 대한 증거로서 해석되어 왔다. 그러나, 여기서 당해 증거는, 일부 소엽이 전적으로 이러한 이중-양성 세포로 구성되며 이러한 소엽은 시험한 거의 모든 조직 단면에서 존재함을 입증한다(도 2, F, 도 3, P-T). 중요하게도, 이들 K5+ 및 K14+ 세포는 또한 관강 분화의 마커인 Muc1을 발현하였다(도 3, U). 이는 전적으로 후대세포/줄기 세포로 구성된 상피 조직을 발견하는데 매우 일반적이지 않을 수 있으므로, 이들 결과는 K5/14/17과 K18/19을 동시 발현하는 관강 층 세포가 분화된 관강 세포 다양성과 보다 일치함을 나타낸다.

[0058] 이들 데이터는, 케라틴 5/14/17이 사람 피부 및 마우스 유방에서 이들의 단일형 기저 발현과는 달리, 사람 유방에서 전적으로 '기저 케라틴'이 아님을 나타낸다. 정상 사람 유방의 소엽에서 K5/14/17은 관강 층에서 주로 발현된다. 대조적으로, 소엽내 도관에서, K5/14/17은 근상피(기저) 층에서 주로 발현된다(7, 14). 주목하게도, K5/14/17 발현은 관강 층 내에서 이원성이었는데, 즉, K5, K14 및 K17 음성인 하나의 아세트, 및 K5+, K14+ 또는 K17+인 다른 아세트를 지닌 2개의 명백한 관강 층 세포 집단이 존재하였다. 모든 이들 연구에서, 각각의 마커를 상이한 중, 제조업자 및 클론으로부터 온 수개의 항체로 시험하여 항체 동형 특이적인 변수를 제외시켰다. 모든 경우에, 당해 결과는 상이한 항체 사이에서 유사하였다(이들 연구에 사용된 37개의 일차 항체의 목록에 대해서는 도 11을 참조한다).

[0059] 실시예 3: 정상 사람 유방에서 호르몬 수용체의 분석

[0060] K5/14/17 발현을 기반으로 관강 층 세포의 2개의 아형을 확인하고, 이들 세포에서 호르몬 수용체의 발현을 특성화하였다(15). 호르몬 수용체는 조직 분화의 조절에 밀접하게 포함되며 일부 호르몬 수용체는 이원성 발현 양식을 가지므로 마커의 어필링 세트(appaling set)를 나타낸다.

[0061] 이미 발표된 연구 및 예비 면역염색의 초기 조사에서, 에스트로젠 수용체(ER), 안드로젠 수용체(AR) 및 비타민 D 수용체(VDR)를 포함하는 3개의 수용체가 소엽의 관강 층에서 명백한 이원성 발현 양식(TRH α β / β PTH1R, OXTR, SSTR1-3,5, RAR α β , 및 RXR α β)으로 부각되었다(일부 세포에서는 강력한 발현인 반면 다른 세포에서는 발현하지 않는다). 많은 다른 호르몬 수용체는 이원성 발현 양식(TRH α / β PTH1R, OXTR, SSTR1-3,5, RAR α β , 및 RXR α β)를 가진 것으로 여겨지지 않았다. 따라서, 이들 다른 수용체는 정상 사람 유방에서 세포 아형을 확인하기 위한 잠재적인 이원성 마커로서 촉망적인 것으로 여겨지지 않았다. ER의 발현을 사용한 프로게스테론 수용체 트랙의 발현으로 인하여, PR은 마커의 이미 집중적인 패널의 본 특성화에 포함되지 않았다.

[0062] K5/14/17 및 ER을 사용한 이중 면역염색은 다음에 수행하였다. 당해 분석은, ER 및 K5/14/17이 동일한 세포에서 동시-발현되지 않았음을 입증하였으므로(<0.5% 오우버랩, 도 5-9)(도 2, G, 도 1, J, 도 5), 3개의 상호 배타적인 관강 세포 상태: (a) ER+, (b) K[5/14/17]+ 및 (c) ER-/K[5/14/17]-를 정의한다(도 2, H). 세포 주기내 이

들의 위치와는 상관없이 증식하는 세포를 표지하는 Ki-67 항체를 사용한 동일한 단면의 염색은, 증식하는 관강 세포가 ER 또는 K5/14/17을 매우 드물게 발현하였음을 나타내었다(<0.4% 오우버랩, 도 6)(도 2, I-J). 거의 모든 증식하는 Ki-67+ 세포는 K18+ 관강 세포였다(도 2, K). 이들 결과는, 정상 유방의 소엽에서 4개의 상호 배타적인 관강 세포 상태를 정의하도록 하였다: (a) ER+ 세포, (b) K[5/14/17]+ 세포, (c) ER-/ K[5/14/17]- 세포 및 (d) Ki-67+ 세포(도 2, L). 이들 세포 모두는 팬-관강 마커 K7/18에 대해 양성이었다.

[0063] 이중 면역염색은, AR+ 세포가 또한 K/5/14/17+ 및 Ki-67+ 세포와 상호 배타적이었으나(0.0% 오우버랩, 도 5, 도 4, A 및 B), 이들은 ER+ 세포와 부분적으로 오우버랩되었음(11-36%, 도 7, 도 4, C)을 입증하였다. 이들 결과는, 호르몬 수용체(HR) 양성 세포의 3개의 아세트: ER+, AR+ 및 AR/ER+(도 4, D)를 나타내었다. AR 발현은 관강 층에서만 관찰되었으며 근상피 층에서는 관찰되지 않았다.

[0064] 이중 염색은 또한, VDR+ 세포가 관강 층에서 또한 배타적이었으며 CD10+ 근상피 세포와 오우버랩되지 않았음을 입증하였다(도 4, E). VDR+ 관강 세포는 또한 증식하는 Ki-67+ 세포와 상호배타적이었으나(0.0% 오우버랩, 도 6, 도 4, F), 이들은 K5/14+ 세포(15-23%, 도 5, 도 4, G), AR+ 세포(16-35%, 도 7, 도 4, H), 및 ER+ 세포(22-74%, 도 7, 도 4, I)와 부분적으로 오우버랩하였다. 흥미롭게도, Ki-67+ 증식하는 세포의 대부분은 이들이 CD10+ 근상피 세포와 상호배타적인 것에 의해 입증되는 바와 같이, 관강 층에 존재하였다(도 4, J, 도 5-9). 삼중 염색은 또한, 삼중 HR+(ER/AR/VDR+) 세포의 존재를 입증하였다(도 4, K, L, 백색의 삼중 양성). 증식하는 관강 세포는 호르몬 수용체 발현 ER, AR 또는 VDR 세포와 상호 배타적이었다(도 4, M).

[0065] 이들 결과는 도 4, N에서의 다이어그램에 묘사된 사람 유방 소엽의 관강 층에서 호르몬 수용체(HR) 양성 세포의 7개의 아세트: ER+, AR+, VDR+, AR/ER+, ER/VDR+, AR/VDR+ 및 ER/AR/VDR+를 나타내었다. 흥미롭게도, VDR+ 세포 만이 실질적으로 K5/14/17+ 관강 세포와 오우버랩되었고, 증식하는(Ki-67+) 관강 세포는 이들 마커 모두에 대해 음성이었다(도 4, B, F, M).

[0066] 누적적으로, 11개의 분화 상태는 따라서, 사람 유방 소엽의 관강 층(L1-11; 도 10)에서 정의되었다. 이들은 단일의 호르몬 수용체 양성(HR1+: ER, AR 또는 VDR; L4-L7), 이중 호르몬 수용체 양성(HR2+: ER/AR, ER/VDR, 또는 AR/VDR; L8-L10) 또는 삼중 호르몬 수용체 양성(HR3+: ER/AR/VDR; L11)(도 10)으로 그룹화된, 3개의 호르몬 수용체 음성 상태(도 10에서 HR0; L1-3) 및 8개의 호르몬 수용체 양성(HR+) 상태(도 10에서 L4-11)를 포함한다. 모든 관강 세포는 K7/18 및 Cld-4를 발현하였다.

[0067] 근상피 층에서, 모든 세포는 K5/14/17[-] 또는 K5/14/17+[+](도 10, My1 및 My2)인 2개의 아형과 함께, SMA, CD10 및 p63을 발현하였다. 증식하는 세포는 근상피 층에서 매우 특별하며; CD10 및 Ki-67은 세포의 0.5%에서만 오우버랩되었다(도 4, J, 도 10, 도 11, D).

[0068] 실시예 4: 신규의 다중 면역형광성 방법을 사용한 정상의 사람 유방에서 12개 마커의 동시 실험

[0069] 상기 실험에서, 동일한 FFPE 단면을 3개 이하의 상이한 항체로 동시 염색하였다. 보다 큰 수의 항체는 상기 논의된 다수의 이유로 통상의 방법을 사용하여 다중처리하기 어렵다. 일련의 단면을 염색하는 것은, 각각의 단면이 5 마이크로미터 두께이므로, 작은 세포가 기껏해야 2개 이상의 일련의 단면에서 존재하지 않기 때문에 이러한 문제를 다루지 않는다.

[0070] 모든 12개의 상이한 마커 ER, AR, VDR, K5, K7, K8/18, Cld-4, SMA, CD10, Ki-67, NaKATPase 및 DAPI에 대해 이중 및 삼중 면역염색에 의해 예측된 즉각적인 동시-발현 양식을 확인하기 위하여, 동일한 세포에서 이들의 발현은 다중처리 면역염색으로 실험하였다.

[0071] 구체적으로, 10개 이상의 상이한 항체를 일렬로 사용하여 동일한 조직 단면의 면역염색을 허용하는 신규 기술이 최근에 개발되었다(참조: General Electric, NY, USA)(16). 이들 기술을 사용하여 물질 및 방법 단락에 따라, 24명의 환자로부터의 정상의 사람 유방 소엽을 함유하는 조직 미세배열(TMA)을 염색함으로써 상기 결과를 입증하였다. 이들 실험에서, 팬-케라틴 염색을 사용하여 모든 상피 세포를 확인하였다. DAPI 및 NaKATPase를 사용하여 핵 및 막을 각각 강조하였다. 이들 실험은, 도 10에서 모든 마커의 동시-발현 양식을 독립적으로 확인하였다(도 12-14). 다시 한번, 증식하는 관강 세포는 호르몬 수용체(ER, AR 및 VDR), 또는 케라틴 5/14를 발현하지 않았다. 호르몬 수용체 양성 세포는 관강 층에서 독점적이었으며 이들은 서로 부분적으로 오우버랩되어 본 발명자들이 이미 관찰한 HR1, HR2 및 HR3 표현형을 입증하였다(도 12-14).

[0072] 사람 유방에서 정상의 관강 세포에 대해 기술된 본 발명의 11개의 분화 상태 중에서, 이들 실험은 4개의 우세한 분화 양식을 강조한다: 호르몬 수용체 양성 상태(HR+), 증식 상태(Ki-67+), 및 2개의 호르몬 수용체 음성 상태; 하나의 K5+ 및 다른 K5-(도 13-15). 이들은 거대한 상호 배타적인 상태에 있으므로, 다른 표현형으로 확장된 하

나의 표현형은 소엽에서 수축하여야만 하는지의 여부를 가설화하였다. 이와 일치하여, Ki-67 및 K5+ 세포는 HR+ 세포에서 풍부한 소엽에서 드물었다(도 15, ii-iii). K5+ 세포가 확장된 경우, HR+ 및 Ki-67 세포는 감소하였으며(도 15, iv-v), 고도로 증식성인 부위에서, 매우 적은 HR+ 또는 K5+ 세포가 존재하였다(도 15, vi). 따라서, 단일 단면에서 다중처리 염색 기술은, 이들 분화 상태가 매우 상호 배타적이며, 여기서 제공된 세포는 한번에 하나의 상태로만 존재할 수 있음을 입증하였다(도 15, vii)(17).

[0073] 실시예 5: ER+ 유방 종양에서 HR+ 및 HR- 세포형의 분석

[0074] 정상의 유방 상피에서 단일 세포 수준에서 관찰된 현저한 이질성에 있어서, 유방 종양이 정상의 세포형/분화 특이적인 양식을 유지하는지의 여부를 조사하였다.

[0075] 20개의 유방 암의 예비 세트에서, 첫번째로 완전한 FFPE 단면에서 12개의 단백질 마커의 염색 패턴을 IHC로 평가하였다(도 11). 이들 결과는, 216개의 종양(51 ER+, 46 HER2+ 및 119 TNBC를 포함)의 제2 세트를 함유한 조직 미세배열(TMA)에서 확인되었다(도 16). TMA에서 종양의 염색은 (0) = 0%, (1+) = 1-20%, (2+) = 21-40%, (3+) = 41-60%, (4+) = 61-80%, 및 (5+) = 81-100%로 정량화되었다. 염색의 강도는 0(염색되지 않음) 내지 5(최대 강도)로 정량화되었다. 총 점수는 점수 퍼센트를 강도 점수와 곱하여 계산함으로써 0-25 발현 규모를 유도해내었다(도 17).

[0076] 조직 세트 둘 다에서, 모든 ER+ 사람 유방 암은 다중의 팬-관강 마커(C1d-4, K7 및 K18)를 강력하게 발현하였으며 어느 것도 팬-근상피 마커(CD10, SMA 및 p63)에 대해 양성인 것이 없었다(도 16, A). 모든 ER+ 유방 암은 K5/14에 대해 음성이었다(도 16, A). 흥미롭게도, 대부분의 ER+ 종양은 VDR+(93%)이었으며, 2/3는 AR+(59%)이었다(도 16, A). 당해 양식은 AR 또는 VDR을 동시-발현할 수 있지만 K5/14/17 또는 근상피 마커 CD10/SMA에 대해서는 매우 드물게 양성인 정상의 유방 ER+ 세포와 동일하였다. 이들 결과는, 모든 ER+ 종양이 관강 층(정상의 분화 상태 L4, L8, L9, 및 L11)에서 HR+ 정상의 유방 세포와 동일한 관강 표현형을 가짐을 나타낸다(도 16, A 및 D). 흥미롭게도, 정상의 조직과 유사하게, 대부분의 증식하는 종양 세포(Ki-67+)는 또한 ER 또는 AR에 대해 음성이었다(도 18, B-I). 대부분의 Ki-67+ 종양 세포가 VDR 음성(도 18, J-M) 반면, 중심적으로 일부 증식하는 종양 세포는 또한 VDR+이었다(도 18, N-Q).

[0077] 실시예 6: HER2+ 유방 종양에서 HR+ 및 HR- 세포형의 분석

[0078] HER2+ 종양에서, 다중 팬-관강 마커(C1d-4, K7 및 K18)의 강력한 발현이 관찰되었으며, 팬-근상피 마커 중 어느 것도(CD10, SMA, p63) 존재하지 않았다(도 16, B). 이들 데이터는, 거의 모든 HER2+ 종양(44/46)이 정상의 유방 세포에서 동일한 HR+ 관강 표현형(L4-L11)을 가짐을 나타내었다(도 16, B, D). 소수(2/46)는 HR 음성 세포와 유사하였다(도 16, B, D). 이렇게 HR0 HER2+ 종양이 거의 없는 이유의 한가지 가능한 설명은, HER2 과발현이 HR0 세포에서 유해할 수 있는 반면, HR+ 세포 종양에서 유리하기 때문이다.

[0079] 실시예 7: 삼중 음성 유방 종양에서 HR+ 및 HR- 세포형의 분석

[0080] 삼중 음성 유방 암종(TNBC)은 ER, PR 및 HER2의 발현을 결여하는 것으로 정의된다. 본 발명에서, 119개의 TNBC를 HR 및 케라틴 마커의 발현에 대해 분석하였다. 당해 작업은, K5/14에 대한 염색을 기반으로(18) 관강 1(LM1), 관강 2(LM2) 및 혼합된(M)(도 16, C)로서 언급된 3개의 주요 아그룹을 나타내었다. TNBC의 거의 66%(n=78/119)는 순수한 관강 표현형을 가졌으며; 이들 종양의 표현형은 팬-관강 마커에 대해 양성, 팬-근상피 마커 및 ER에 대해 음성이지만, AR, VDR 또는 둘 다에 대해 양성인 정상의 관강 세포형의 것과 유사하였다(도 16, C). 이들 중에서, 37개는 K5/14 음성인 관강 세포형(L1-2, L5-7, 또는 L10 세포형(LM1)과 유사하였고 41개는 K5/14 양성(LM2)인 정상의 관강 세포형 L3 또는 L7과 동일하였다(도 16, C,D).

[0081] 나머지 TNBC(33%, n=41) 모두는 또한 관강 마커(C1d-4, K7, AR, VDR, K18)를 강력하게 발현하였지만, 이들 종양 중 38개는 정상의 근상피 세포에서 발견된 항원(CD10, SMA 및 p63)을 발현하였다(도 16, C). 이들 종양은 관강 및 실제 기저 표현형의 거의 동일한 부분인 표현형을 가지므로(즉, 이들은 진실된 기저/근상피 마커를 발현한다), 이들은 "혼합된 표현형"(M)으로 언급된다.

[0082] 이들 데이터는, 사람 유방 종양의 놀랄만하게 높은 분획(~95%)이 단일의 정상 유방 세포 아형과 표현형적으로 동일함을 나타내며, 이들 종양이 이들의 세포 기원의 분화 표현형을 유지하거나 이들이 정상의 세포 분화 계통을 따라 분화함을 나타낸다. 정상의 대응부 세포형은 혼합된 분화를 지닌 사람 종양의 작은 소수(~5%)에 대해서는 확인될 수 없었다. 이들 종양의 정상의 대응부는 혼합된 소엽 또는 근상피를 지닌 후대세포 세포와 같은 세포형일 수 있거나(19), 이들 종양은 이들 마커의 적절한 발현을 초래하는 돌연변이로 인하여 변경된 표현형을

나타낼 수 있음이 가능하다.

[0083] 실시예 8: TNBC에서 정상외의 기저 대 관장 특이적인 mRNA의 발현

[0084] TNBC의 세포 기원은 큰 관심사가 되어 왔다(20). 앞서 언급한 바와 같이, 케라틴 K5/14/17은 사람 피부 및 설치류 유선의 기저 층에서 발현된다(도 3, A, B). 따라서, 이들 케라틴은 문헌에서 일반적으로 '기저 케라틴'으로 언급되어 왔다(14). 결과적으로, K5/14/17을 발현하는 TNBC 중 일부는 '기저-유사 암종'(BLC)으로 불리어 왔다(21). 이를 기반으로, 일부는, 이들 종양이 정상 유방의 근상피(기저) 세포와 유사하다고 제안하여 왔다. 그러나, 본원에 입증된 바와 같이, K5/14/17은 주로 정상외의 사람 유방 소엽의 관장 층에서 발현되며 K5/6+ TNBC 기저-유사 암(BLC)은 이들 관장 세포에 이들과 동일한 마커를 발현한다(도 10, L3 및 L7).

[0085] TNBC/BLC 범주는 미세배열 분석에서 mRNA 발현을 기반으로 하였으므로(22-24), 정상외의 사람 유방 세포에서 mRNA의 분석은 고도로 정제된 관장 대 근상피 세포를 프로파일링한 3개의 상이한 연구로부터의 결과를 합하여 수행하였다(25-27). mRNA의 작은 아세트만이 모든 3개의 연구에서 일관되게 관장과 근상피 세포 사이에서 차등적으로 발현되었다. 이들은 정상외의 관장 대 근상피 세포를 구별한 강력한 컨센서스 신호(cossensus signature)를 제공하였다. 이들 유전자의 발현은 이후에 기저-유사 및 비-기저-유사 사람 유방 종양에서 시험하였다(28-31).

[0086] 흥미롭게도, 이들 집단에서의 '기저-유사 종양'과 정상외의 기저/근상피 세포의 발현 신호 사이에 유의적인 상관관계가 관찰되지 않았다(도 20, A). 실제로, 3개의 앞서 발표된 '관장' 또는 '근상피' 신호 중 유전자의 목록은 기저 또는 비-기저 종양에서 보다 강력하게 발현된 유전자와 유의적으로 오버랩되지 않았다(피셔의 정확도 시험(Fisher's exact test) P 값 = 0.22)(도 20, A). 따라서, 대부분의 "기저-유사" 종양은 mRNA 및 실제 기저 세포인, 정상외의 근상피 세포의 단백질 마커의 발현에 의해 정의된 바와 같은 실제의 기본적인 표현형을 입증하지 않았다(도 20, B). 고유하게, 마우스 모델에서의 최근 연구는 또한, 기저-유사 암종의 세포 기원이 실제로 관장 세포임을 제안하였다(14, 20, 32). 일부 집단에서, 기저-유사 종양을 지닌 환자는 TNBC 종양을 지닌 환자보다 나쁜 결과를 갖는다(21). 본 분석에서는, K5/6+ 대 K5/6- TNBC 환자 사이에 관찰가능한 유의적인 차이가 없었다(도 20, A).

[0087] 이들 데이터는, 기저-유사 종양이 mRNA 프로파일링을 기반으로 한 TNBC의 명백하고 재생가능한 아-그룹이지만, 명칭 "기저-유사"는 아마도 이들의 분화 상태 또는 이들의 세포 기원의 정확한 설명이 아님을 나타낸다.(7, 14, 33). BLC의 분화 상태는 유방의 K5/14/17[+] 정상외의 관장 세포와 가장 유사하다.

[0088] 실시예 9: NHS 집단에서 HR0-3 유방 종양 표현형의 분포

[0089] 상기 결과를 기반으로, 사람 유방 종양은 사람 유방 조직의 정상외의 분화 상태에 따라 분류될 수 있다는 가설을 세웠다. 당해 가설은 25년 이상 연장하여 환자, 및 다수의 환자들(n=1731)로부터의 유방 암 샘플의 이용가능성을 이용한 간호원 건강 연구(NHS)로부터의 유방 암 집단을 사용하여 시험하였다(34-36). 1,731명의 NHS 환자로부터의 샘플을 포함하는 조직 미세배열(TMA)을 ER, PR, HER2, VDR, AR, K8/18/C1d-4, K5/6, 및 SMA/p63/CD10 항체로 면역염색하고 반-정량적으로 점수를 매겼다. 파일럿 연구는, 이들 마커가 대부분의 종양에서 이원성 양식으로 발현됨을 나타내었다(도 16). 따라서, 점수매겨진 코어의 거대한 수(>55,000)에 의해, 이원 점수매김 시스템을, NHS TMA를 점수매기는 경우에 1% 발현 컷 오프 점을 사용하여 시행하였다. 당해 연구에서 유방 종양은 정상외의 조직 분화를 기반으로 4개의 범주로 나누었다: ER, AR 및 VDR을 동시 발현하는 삼중-양성 종양(HR3), ER/AR[+], AR/VDR[+], 또는 ER/VDR[+]인 이중-양성 종양(HR2), 호르몬 수용체, ER[+], VDR[+] 또는 AR[+] 중 하나만을 발현하는 단일-양성 종양(HR1), 및 ER, AR 및 VDR에 대해 음성인 호르몬-수용체 음성 종양(HR0).

[0090] 주목하게도, 4개의 HR 범주는 현재의 ER+, HER+ 및 TNBC 분류와 동일하지 않다. 예를 들면, 표준 분류를 기반으로 약 75%의 NHS 연구 환자가 ER+ 종양을 가졌고(n=1,356), 10%가 HER2+ 종양을 가졌으며(n=177) 15%는 삼중-음성 종양을 가졌다(n=253)(도 19, A, B). 대조적으로, 이들 동일한 종양은 HR3 58.1%(n=1006), HR2 24.8%(n=429), HR1 10.7%(n=185), 및 HR0 6.4%(n=111)로 분류되었다(도 19, A, 도 25).

[0091] 각각의 표준 유방 암 범주의 실험은, 각각의 아형이 다수의 HR 그룹으로 구성됨을 나타내었다. 예를 들면, ER+ 종양의 HR 분류는, 75%가 HR3+(ER+/VDR+/AR+)이었으며, ER+ 종양의 나머지는 HR2+(23.4%) 및 HR1+(1.5%) 종양으로 구성됨을 나타내었다(도 21, A, B). 거의 1/3의 HER2+ 종양(29%)이 모든 3개의 호르몬 수용체(HR3+)를 발현하였으며, 나머지는 HR2+(43.5%), HR1+(22.0%) 및 HR0(5.1%) 종양으로 구성되었다(도 21, A, B). 따라서, HR 계 분류 시도는 단지 기존의 그룹을 재명명하지 않지만, 이는 새로운 방식으로 유방 종양을 체계화한다. 그 결과, HR0-3 환자의 분포는 현재의 범주와는 유의적으로 상이하다. 삼중-음성 유방 암(n= 262) 중에서, 36.8%는 어떠한 호르몬 수용체(H0)도 발현하지 않았으며, 44.6%는 적어도 하나의 호르몬 수용체 AR 또는 VDR(HR1+)를 발

현하였고, 18.6%는 AR 및 VDR(HR2+) 둘 다를 발현하였다(도 21, A, B).

[0092] 실시예 10: 정상 세포 계통 표현형을 기반으로 한 유방암 결과의 분석

[0093] HR0-3 범주에서 양성 수용체의 총 수와 유방암 생존 또는 결과 사이에는 강력한 상관관계가 존재한다. 구체적으로, NHS 집단의 카플란-마이어 분석은, HR3+ 종양을 지닌 여성이 가장 잘 생존하며, HR1+ 종양은 가장 열악하게 생존하고, HR2+ 종양은 중간 생존을 가짐을 나타내었다(도 19, C)($p < 0.0001$).

[0094] 다변량 분석에서 이들 차이는 유의적인 것으로 남았다. HR3 종양과 비교하는 경우, HR2 종양에 대한 상대적인 위험비(relative hazard ratio: RHR)는 2.9(95% 신뢰 구간 [CI] 1.60-5.21)이었고, HR1 종양의 경우 RHR은 5.3(95% CI 2.77-9.97)이었으며 HR0의 경우 RHR는 6.9(95% CI 3.37-14.39)이었다.

[0095] 흥미롭게도, HR0 그룹은 처음 5년 동안 최악의 결과를 지닌 HR1 종양과 유사한 이원상 결과 곡선을 가졌으나, 5년 후 당해 곡선은 탁월한 결과와 일치하게 평편하게 되었다(도 19, C). Cox 회귀 모델의 주요 추측은, 시간에 따른 고정 위험비이다. 따라서, 본 발명자들은 다변량 모델에서 시간-의존성 공-변량을 가하고 5년 컷 오프 전 및 후까지 계층화시킨 상관관계를 재-평가하였다. 처음 5년 동안 HR3(RHR=1.69, 95% CI=1.14-2.50)와 비교하여 HR3 종양은 가장 우수한 결과를 가졌고, HR2 종양은 더 나쁜 결과를 가졌으며 HR1 및 HR0 종양 둘다 최악의 결과를 가졌다(HR1 RHR = 2.44, 95% CI = 1.55-3.84; HR0 RHR = 2.7, 95% CI = 1.56-4.70)($p < 0.0001$)(도 21, C, 도 26). 5년 후, 가장 우수한 결과 위험비 0.34($p=0.02$)를 가진 HR0 그룹을 제외하고는, HR3, 2 및 1 사이에 유의적인 차이는 없었다($p > 0.5$)(도 21, D). HER2 그룹을 별도로 분석하는 것은 이들 결과를 변화시키지 않았다(도 22, E). 다변량 분석에서, 이들 차이는 연령, 단계, 등급, HER2 상태, 치료 및 방사선과 같은 다변량 분석에서 다른 요인을 고려한 후조차 유의적인 것으로 남았다(도 25-26).

[0096] 이들 생존 결과는, 855명의 사람 유방 종양의 데이터셋을 실험함으로써 mRNA 발현 수준에서 확인되었다(37). 재발이 없는 생존에 대한 카플란-마이어 분석은, HR3+ 종양을 지닌 여성이 가장 우수한 결과를 가졌으며, HR1+ 및 HR0 종양을 가진 여성은 가장 공격성이었고, HR2+ 종양을 가진 여성은 이들 그룹 사이에서 중간이었음을 나타내었다. 매우 유의적인 전체 생존 차이를 갖는 IHC 기반 HR 범주와는 달리($p < 0.0001$, 도 19, C), mRNA계 HR 그룹 사이에서 보다 보통인 전체 재발이 없는 생존 차이가 존재하였다($p= 0.13$, 도 19, D). 그러나, mRNA계 HR 그룹 사이의 폐 재발이 없는 생존 차이는 유의적으로 상이하였다($p= 0.0014$, 도 20, F).

[0097] 이를 함께 취하면, 이들 데이터는, 호르몬 수용체의 수가 종양 세포의 분화 상태와 관련되어 있으며, 추가의 차이가 공격성이 낮은 종양 행위와 관련되어 있음을 뒷받침한다. 중요하게도, 이들 결과는, ER, AR 및 VDR의 경우에, 단백질 발현 수준의 측정이 종양 거동을 예측하기 위한 mRNA 수준보다 더 관련될 수 있음을 제안한다.

[0098] 실시예 11: 유방암 세포주에서 HR+ 및 HR- 세포형의 분석

[0099] 유방암 세포주에서 HR0-3 표현형의 보존을 또한 시험하였다. 60개 이상의 유방암 세포주로부터의 공공 이용가능한 mRNA 발현 데이터(38)를 분석하였으며, 이는, 대부분의 종양 세포주가 정상 세포 기원 범주 중 하나에 속함을 나타내었다.

[0100] 구체적으로, HR+ 순수한 관장 유방암 세포주(ER/AR/VDR+, $n=16$)는 예측한 바와 같이 드물게 K5/14/CD10/SMA를 발현하였다(도 23G). 이는 또한 K5/14/CD10/SMA를 드물게 발현하였지만 예측한 바와 같이 때때로 AR/VDR+인, HER2+ 종양 세포주($n=13$)의 경우 그러하였다. 대표적인 TNBC-LM1 표현형을 갖는 5개의 세포주(BT-20, HCC38, HCC-1187, SUM149), TNBC-LM2 표현형을 갖는 3개의 세포주(BPLER, HCC-1143, HCC-1500), 및 혼합된 표현형을 갖는 5개의 세포주(HMLER, HCC-70, HCC1937, HCC-3153, MDA-MB-468)가 존재하였다(도 23, G). 이들 표현형은 또한, 유방암 세포주에서 단백질 수준으로 확인하여(도 23, H), 반응계내 HR 표현형과 밀접하게 일치하는 유방암 세포주의 아셋트를 선택하였다(도 23, I). 당해 세트의 유방암 세포주는 하기 기술된 시험관내 약물 반응 연구를 위해 시험하였다.

[0101] 흥미롭게도, 사람 유방암의 모델로서 매우 흔히 사용된 MDA-MB-231, SUM-159, MDA-MB-435($n=9$)와 같은 다수의 세포주는 정상 유방 세포 또는 사람 유방암에서 존재하지 않는 발현 프로파일을 가졌다. 이들 특수한 세포주는 본 연구에서 조사한 대부분의 상피 마커에 대해 음성이었다. 당해 프로파일은 생체내에서 거의 관찰되지 않으므로, 이들 세포는 자체의 원래의 표현형을 상실하였거나 이들은 매우 드문 종양형으로부터 기원한 것으로 여겨진다. 따라서, 시험한 모든 세포주 중에서, 이들 특수한 세포주는 사람 유방암의 가장 일반적인 형태와는 최적으로 유사한 것으로 여겨지므로, 사람 질병의 대표적인 모델로서 이들의 빈번한 사용에 대해 주의하여야 한다.

[0102] 실시예 12: HR 억제에 대한 유방암 세포주의 반응

- [0103] 유방 암의 HR0-3 분류는 임상적으로 유의적인 결과 그룹과 관련되지 않을 뿐 아니라, 또한 이들 환자의 치료가 개별화될 수 있는 방법에 대한 통찰력을 제공한다. 예를 들면, 본 발명은, HR3 종양이 ER 길항제와 AR 및 VDR 효능제를 결합시킨, 삼중-호르몬 치료요법으로 치료될 수 있음을 고려하고 있다. 따라서, 이들 개념 중 일부를 유방 암 세포주에서 시험하였다.
- [0104] TNBC에 대한 효과적인 치료는 ER 및 HER2에 대해 음성이므로 이들은 현재 매우 적다. 그러나, TNBC 중 63%는 AR 또는 VDR, 또는 수용체 둘 다를 발현하므로, 호르몬 치료는 대부분의 TNBC에서, 화학치료요법과 함께 가능할 수 있다. BT20, HCC1187, MDA-MB-468 및 SUM159는 TNBC-HR1 표현형에 상응하는 VDR 수용체만을 발현한다. VDR 효능제 칼시트롤과 탁솔을 합하는 것은 약물 단독보다 이들 HR1+ 유방 암 세포의 증식을 보다 효과적으로 부가적으로 억제하였다(도 24, J).
- [0105] 유사한 조합 치료 전략을 또한 ER+ 종양 세포에서 사용할 수 있다. 예를 들면, HR2+ ZR75B 세포는 ER 및 VDR 수용체를 동시-발현하며, VDR 효능제 칼시트롤과 저 투여량의 ER-길항제 ICI 182,780(파슬로텍스, ICI 0.5nM)의 조합은 이들 유방 암 세포의 증식을 부가적으로 억제하였다(도 24, K). 다른 예에서, AR-효능제 R1881(메틸트리 에놀론, 50nM)과 VDR 효능제 칼시트롤(Cal, 50nM)의 조합은 HR3+ 유방 암 세포주 T47D의 증식을 부가적으로 억제하였다(도 24, L).
- [0106] HER2+ 유방 암 세포에서, AR-길항제 플루타미드(Flu 45 μM) 및 HER2 억제제 라파트니브(Lap 0.5 μM)의 조합은 HR2+/HER2+ 유방 암 세포주 MDA-MB-453의 증식을 부가적으로 억제하였다(도 24, M). 유사하게, ER-길항제 ICI 182,780(파슬로텍스, ICI 0.5nM)와 HER2 길항제 라파트니브(Lap, 10nM)의 조합은 HR3+/HER2+ 유방 암 세포주 BT474의 증식을 부가적으로 억제하였다(도 24, N). 대조군 실험에서, ER-음성 HR2 MDA-MB-453 세포에서 ER-길항제 ICI 182,780의 사용(도 24, O) 또는 VDR-음성(BT549) 대조군 세포주에서 VDR 효능제 칼시트롤의 사용(도 24, P)으로는 억제가 관찰되지 않았다.
- [0107] 거의 95%의 HER2 종양은 적어도 하나의 호르몬 수용체를 발현하고, 29%는 모든 3개의 호르몬 수용체를 발현하므로, 이들 결과는, 호르몬 치료가 또한 항-HER2 치료요법과 함께 HER2 종양의 대부분에서 가능할 수 있음을 나타낸다.
- [0108] 많은 변형, 변이 및 변화가 상세하게 본 발명의 기술된 바람직한 구현예에 대해 이루어질 수 있지만, 앞서의 설명에서 및 첨부된 도면에 나타난 모든 문제는 설명하는 것이며 제한하는 의미로 해석되어서는 안되는 것으로 해석된다. 따라서, 본 발명의 영역은 첨부된 특허청구범위 및 이들의 법적 등가물에 의해 결정되어야 한다.
- [0109] 참고 문헌
- [0110] 1. The International Agency for Research on Cancer, S.S., E. Campo, N. Lee Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue(IARC WHO Classification of Tumours). World Health Organization.
- [0111] 2. Hamilton, A., Gallipoli, P., Nicholson, E., and Holyoake, T.L. 2010. Targeted therapy in haematological malignancies. *J Pathol* 220:404-418.
- [0112] 3. Wood, G.S., and Warnke, R.A. 1982. The immunologic phenotyping of bone marrow biopsies and aspirates: frozen section techniques. *Blood* 59:913-922.
- [0113] 4. Drexler, H.G. 1987. Classification of acute myeloid leukemias--a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia* 1:697-705.
- [0114] 5. Mason, D.Y., and Gatter, K.C. 1987. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol* 40:1042-1054.
- [0115] 6. Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J.S., Fulford, L., Dexter, T., Davies, S., Bulmer, K., Ford, E., et al. 2004. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64:3037-3045.
- [0116] 7. Gusterson, B.A., Ross, D.T., Heath, V.J., and Stein, T. 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143-148.

- [0117] 8. Reis-Filho, J.S., and Pusztai, L. 2011. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378:1812-1823.
- [0118] 9. Nakshatri, H., Srour, E.F., and Badve, S. 2009. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther* 4:50-60.
- [0119] 10. Karantza, V. 2011. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30:127-138.
- [0120] 11. Chu, P.G., and Weiss, L.M. 2002. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 40:403-439.
- [0121] 12. Ince, T.A., Richardson, A.L., Bell, G.W., Saitoh, M., Godar, S., Karnoub, A.E., Iglehart, J.D., and Weinberg, R.A. 2007. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell* 12:160-170.
- [0122] 13. Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S., and Blanpain, C. 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479:189-193.
- [0123] 14. Molyneux, G., Geyer, F.C., Magnay, F.A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. 2010. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7:403-417.
- [0124] 15. Conzen, S.D. 2008. Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol* 22:2215-2228.
- [0125] 16. Ginty, F., Adak, S., Can, A., Gerdes, M., Larsen, M., Cline, H., Filkins, R., Pang, Z., Li, Q., and Montalto, M.C. 2008. The relative distribution of membranous and cytoplasmic met is a prognostic indicator in stage I and II colon cancer. *Clin Cancer Res* 14:3814-3822.
- [0126] 17. Maddison, W.P., and Maddison, D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- [0127] 18. Collins, L.C., Martyniak, A., Kandel, M.J., Stadler, Z.K., Masciari, S., Miron, A., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., and Garber, J.E. 2009. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am J Surg Pathol* 33:1093-1097.
- [0128] 19. Boecker, W., and Buerger, H. 2003. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor(adult stem) cell concept. *Cell Prolif* 36 Suppl 1:73-84.
- [0129] 20. Molyneux, G., and Smalley, M.J. 2011. The cell of origin of BRCA1 mutation-associated breast cancer: a cautionary tale of gene expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:51-55.
- [0130] 21. Lavasani, M.A., and Moinfar, F. 2012. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review. *J Biophotonics* 5:345-366.
- [0131] 22. Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T., and Perou, C.M. 2006. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 19:264-271.
- [0132] 23. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874.
- [0133] 24. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8418-8423.

- [0134] 25. Grigoriadis, A., Mackay, A., Reis-Filho, J.S., Steele, D., Iseli, C., Stevenson, B.J., Jongeneel, C.V., Valgeirsson, H., Fenwick, K., Iravani, M., et al. 2006. Establishment of the epithelial-specific transcriptome of normal and malignant human breast cells based on MPSS and array expression data. *Breast Cancer Res* 8:R56.
- [0135] 26. Lakhani, S.R., Reis-Filho, J.S., Fulford, L., Penault-Llorca, F., van der Vijver, M., Parry, S., Bishop, T., Benitez, J., Rivas, C., Bignon, Y.J., et al. 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 11:5175-5180.
- [0136] 27. Raouf, A., Zhao, Y., To, K., Stingl, J., Delaney, A., Barbara, M., Iscove, N., Jones, S., McKinney, S., Emerman, J., et al. 2008. Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. *Cell Stem Cell* 3:109-118.
- [0137] 28. Richardson, A.L., Wang, Z.C., De Nicolo, A., Lu, X., Brown, M., Miron, A., Liao, X., Iglehart, J.D., Livingston, D.M., and Ganesan, S. 2006. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9:121-132.
- [0138] 29. Loi, S., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Wirapati, P., Lallemand, F., Tutt, A.M., Gillet, C., Ellis, P., Ryder, K., Reid, J.F., et al. 2008. Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen. *BMC Genomics* 9:239.
- [0139] 30. Ivshina, A.V., George, J., Senko, O., Mow, B., Putti, T.C., Smeds, J., Lindahl, T., Pawitan, Y., Hall, P., Nordgren, H., et al. 2006. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res* 66:10292-10301.
- [0140] 31. Desmedt, C., Piette, F., Loi, S., Wang, Y., Lallemand, F., Haibe-Kains, B., Viale, G., Delorenzi, M., Zhang, Y., d'Assignies, M.S., et al. 2007. Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res* 13:3207-3214.
- [0141] 32. Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N.C., Pal, B., Hart, A.H., Asselin-Labat, M.L., Gyorki, D.E., Ward, T., Partanen, A., et al. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15:907-913.
- [0142] 33. Gusterson, B. 2009. Do 'basal-like' breast cancers really exist? *Nat Rev Cancer* 9:128-134.
- [0143] 34. Collins, L.C., Cole, K.S., Marotti, J.D., Hu, R., Schnitt, S.J., and Tamimi, R.M. 2011. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 24:924-931.
- [0144] 35. Hu, R., Dawood, S., Holmes, M.D., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Cole, K., Marotti, J.D., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., and Tamimi, R.M. 2011. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res* 17:1867-1874.
- [0145] 36. Santagata, S., Hu, R., Lin, N.U., Mendillo, M.L., Collins, L.C., Hankinson, S.E., Schnitt, S.J., Whitesell, L., Tamimi, R.M., Lindquist, S., et al. 2011. High levels of nuclear heat-shock factor 1(HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18378-18383.
- [0146] 37. Harrell, J.C., Prat, A., Parker, J.S., Fan, C., He, X., Carey, L., Anders, C., Ewend, M., and Perou, C.M. 2012. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat* 132:523-535.
- [0147] 38. Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., et al. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10:515-527.
- [0148] 39. Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., Turashvili, G., Rueda, O.M., Dunning, M.J., Speed, D., Lynch, A.G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., et al. 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000

breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486:346-352.

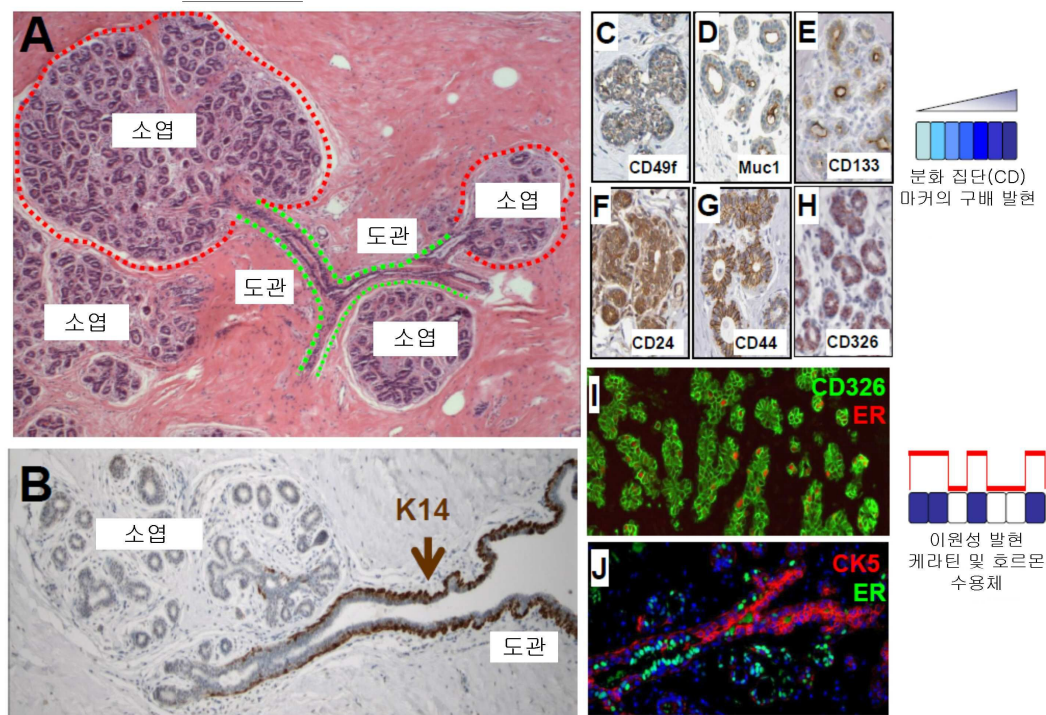
- [0149] 40. Banerji, S., Cibulskis, K., Rangel-Escareno, C., Brown, K.K., Carter, S.L., Frederick, A.M., Lawrence, M.S., Sivachenko, A.Y., Sougnez, C., Zou, L., et al. 2012. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486:405-409.
- [0150] 41. Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., et al. 2009. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462:1005-1010.
- [0151] 42. TCGA. 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490:61-70.
- [0152] 43. Ni, M., Chen, Y., Lim, E., Wimberly, H., Bailey, S.T., Imai, Y., Rimm, D.L., Shirley Liu, X., and Brown, M. 2011. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell* 20:119-131.
- [0153] 44. MacConaill, L.E., Campbell, C.D., Kehoe, S.M., Bass, A.J., Hatton, C., Niu, L., Davis, M., Yao, K., Hanna, M., Mondal, C., et al. 2009. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples. *PLoS One* 4:e7887.
- [0154] 45. Yalcin-Ozuysal, O., and Brisken, C. 2009. From normal cell types to malignant phenotypes. *Breast Cancer Res* 11:306.
- [0155] 46. Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., et al. 2008. Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134:62-73.
- [0156] 47. McAllister, S.S., Gifford, A.M., Greiner, A.L., Kelleher, S.P., Saelzler, M.P., Ince, T.A., Reinhardt, F., Harris, L.N., Hylander, B.L., Repasky, E.A., et al. 2008. Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* 133:994-1005.
- [0157] 48. Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-799.
- [0158] 49. Gupta, G.P., and Massague, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- [0159] 50. Tamimi, R.M., Baer, H.J., Marotti, J., Galan, M., Galaburda, L., Fu, Y., Deitz, A.C., Connolly, J.L., Schnitt, S.J., Colditz, G.A., et al. 2008. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res* 10:R67.
- [0160] 51. Panchision, D.M., Chen, H.L., Pistollato, F., Papini, D., Ni, H.T., and Hawley, T.S. 2007. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells* 25:1560-1570.
- [0161] 52. Kordek, R., Potemski, P., Kusinska, R., Pluciennik, E., and Bednarek, A. 2010. Basal keratin expression in breast cancer by quantification of mRNA and by immunohistochemistry. *J Exp Clin Cancer Res* 29:39.
- [0162] 53. Ince, T.A., Ward, J.M., Valli, V.E., Sgroi, D., Nikitin, A.Y., Loda, M., Griffey, S.M., Crum, C.P., Crawford, J.M., Bronson, R.T., et al. 2008. Do-it-yourself(DIY) pathology. *Nat Biotechnol* 26:978-979; discussion 979.
- [0163] 54. Lu, X., Wang, Z.C., Iglehart, J.D., Zhang, X., and Richardson, A.L. 2008. Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. *Breast Cancer Res Treat* 108:191-201.
- [0164] 55. Birrell, S.N., Bentel, J.M., Hickey, T.E., Ricciardelli, C., Weger, M.A., Horsfall, D.J., and Tilley, W.D. 1995. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:459-467.
- [0165] 56. Naderi, A., and Hughes-Davies, L. 2008. A functionally significant cross-talk between androgen

receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia* 10:542-548.

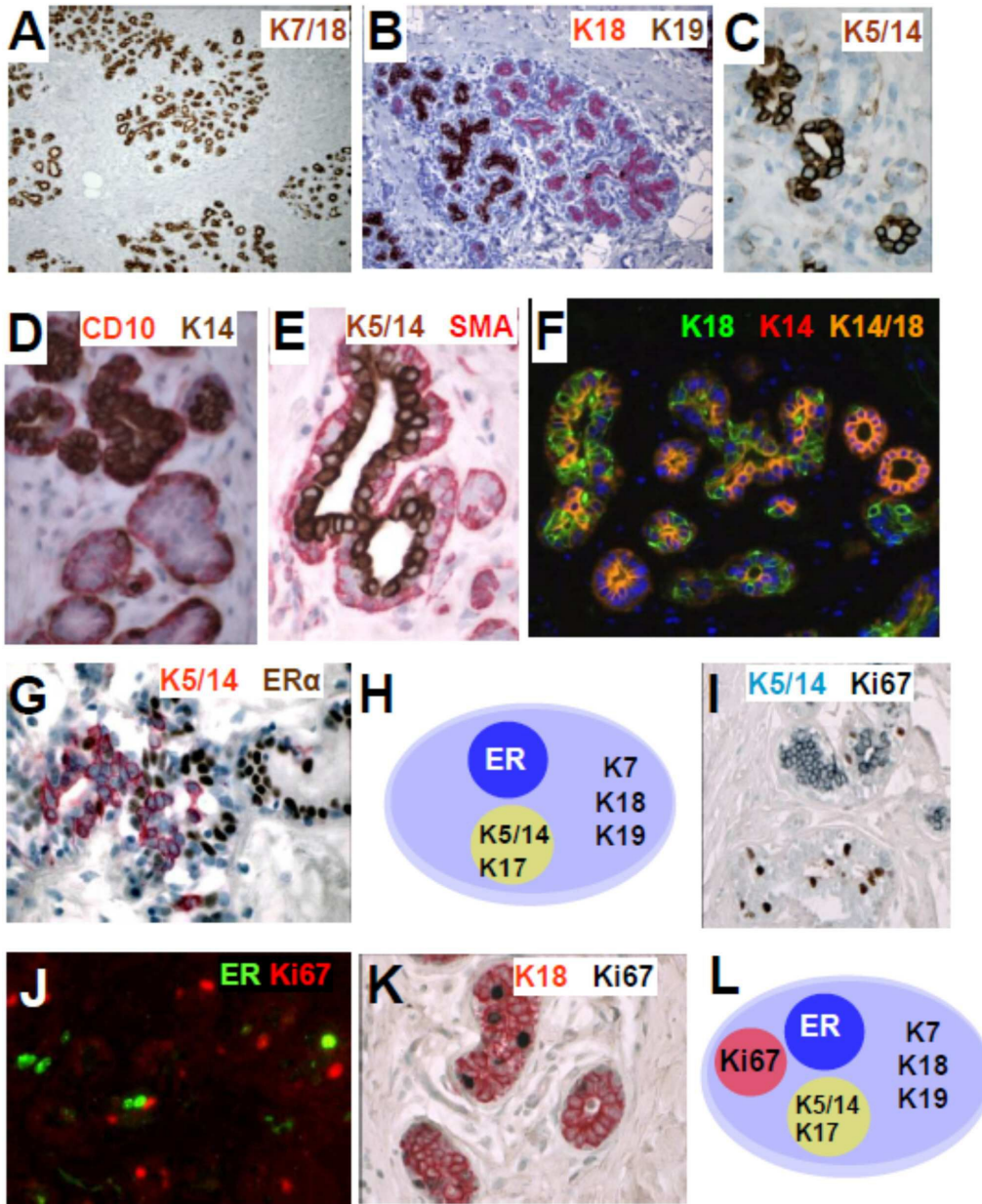
- [0166] 57. Emde, A., Mahlknecht, G., Maslak, K., Ribba, B., Sela, M., Possinger, K., and Yarden, Y. 2011. Simultaneous Inhibition of Estrogen receptor and the HER2 Pathway in breast Cancer: Effects of HER2 Abundance. *Transl Oncol* 4:293-300.
- [0167] 58. Dawood, S., Hu, R., Homes, M.D., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Connolly, J., Colditz, G.A., and Tamimi, R.M. 2011. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 126:185-192.
- [0168] 59. Gerner, M.Y., Kastenmuller, W., Ifrim, I., Kabat, J., and Germain, R.N. 2012. Histo-cytometry: a method for highly multiplex quantitative tissue imaging analysis applied to dendritic cell subset microanatomy in lymph nodes. *Immunity* 37:364-376.
- [0169] 60. Robertson, D., Savage, K., Reis-Filho, J.S., and Isacke, C.M. 2008. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded(FFPE) tissue. *BMC Cell Biol* 9:13.
- [0170] 61. Tsurui, H., Nishimura, H., Hattori, S., Hirose, S., Okumura, K., and Shirai, T. 2000. Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition. *J Histochem Cytochem* 48:653-662.
- [0171] 62. Shi, S.R., Shi, Y., and Taylor, C.R. 2011. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 59:13-32.
- [0172] 63. Glass, G., Papin, J.A., and Mandell, J.W. 2009. SIMPLE: a sequential immunoperoxidase labeling and erasing method. *J Histochem Cytochem* 57:899-905.

도면

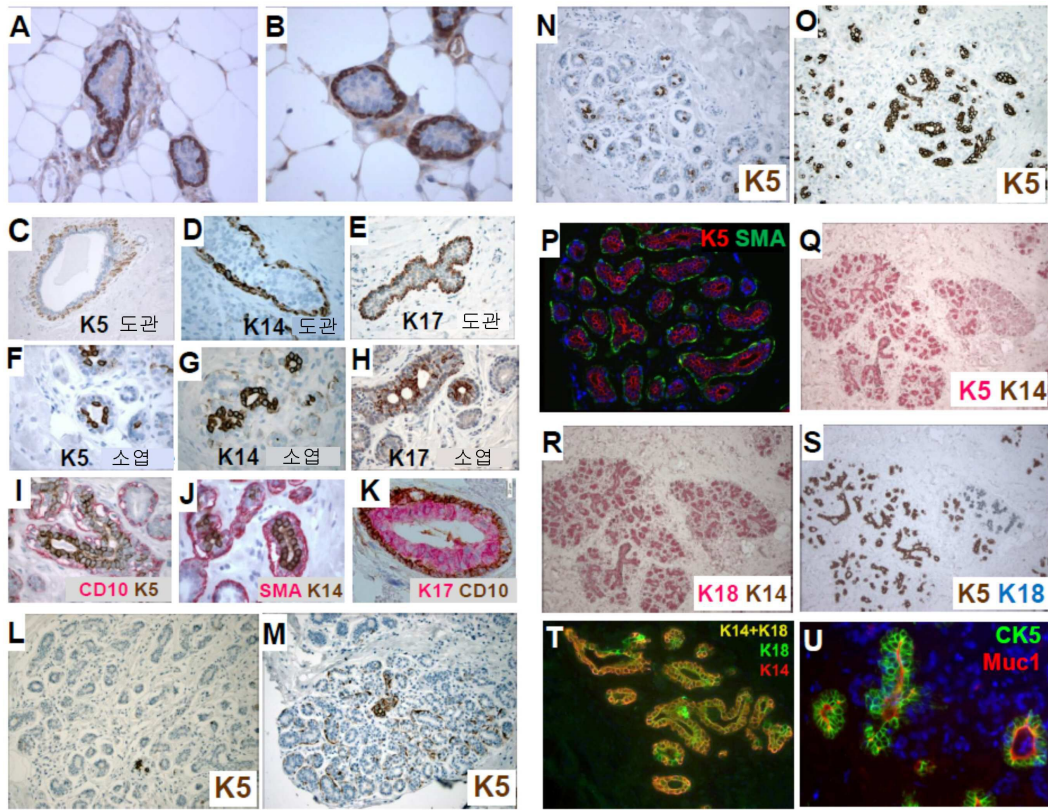
도면1



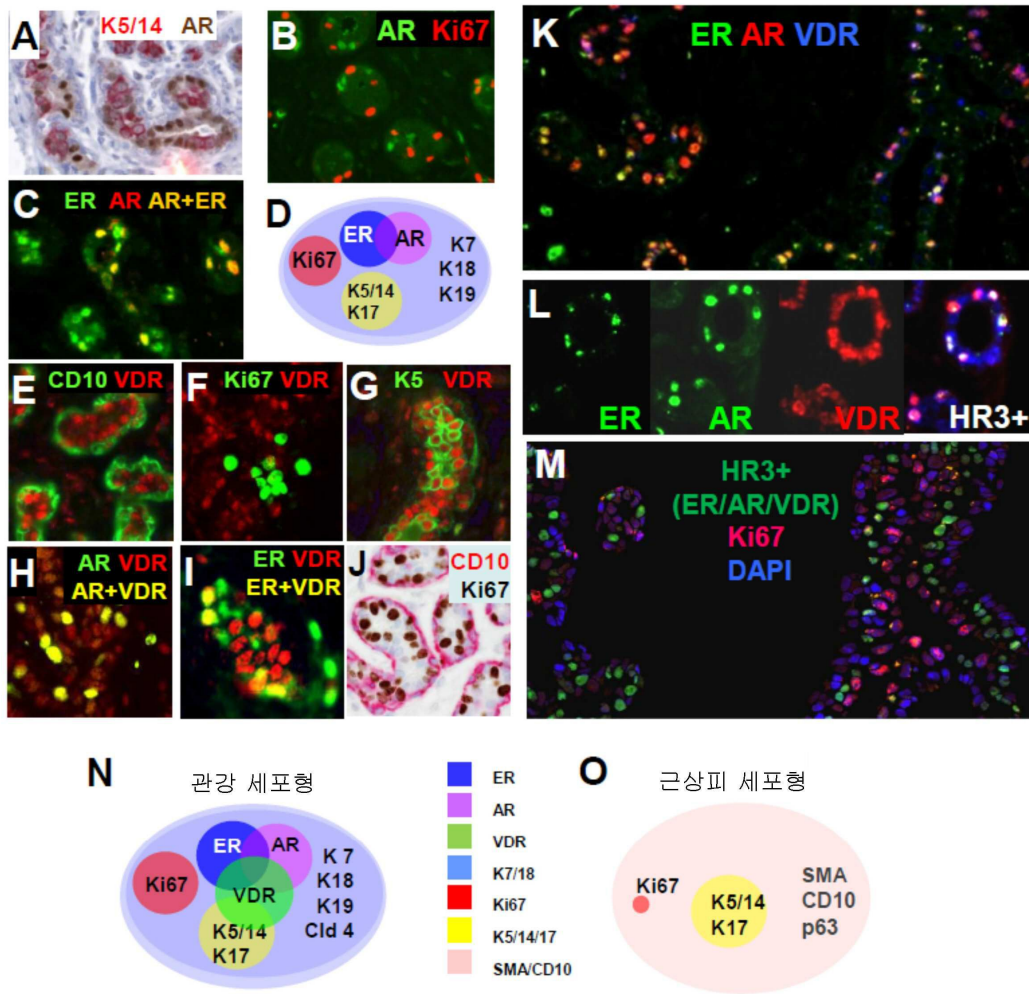
도면2



도면3



도면4



도면5

K5 & ER 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	K5	[K5+ER]	ER의%	K5의 %	총 %
영상 1	183	103	0	0%	0%	0.0%
영상 2	97	32	0	0%	0%	0.0%
영상 3	100	54	0	0%	0%	0.0%
영상 4	18	97	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	398	286	0	0%	0%	0%

K5 & AR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	AR	K5	[K5+AR]	AR의 %	K5의 %	총 %
영상 1	144	46	0	0%	0%	0.0%
영상 2	82	27	0	0%	0%	0.0%
영상 3	13	15	0	0%	0%	0.0%
영상 4	22	27	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	261	115	0	0%	0%	0%

K14 & ER 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	K14	[K14+ER]	ER의%	K14의 %	총 %
영상 1	61	37	0	0%	0%	0.0%
영상 2	45	40	1	4%	5%	2.0%
영상 3	39	33	0	0%	0%	0.0%
영상 4	35	24	0	3%	4%	2.0%
영상 5	21	9	0	0%	0%	0.0%
합계	201	143	1	0.5%	0.7%	0.3%

K14 & AR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	AR	K14	[K14+ AR]	AR의 %	K14의 %	총 %
영상 1	20	14	0	0%	0%	0.0%
영상 2	19	5	0	0%	0%	0.0%
영상 3	192	26	0	0%	0%	0.0%
영상 4	58	79	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	289	124	0	0%	0%	0%

K17 & ER 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	K17	[K17+ER]	ER의%	K17의 %	총 %
영상 1	605	12	0	0%	0%	0.0%
영상 2	629	10	0	0%	0%	0.0%
영상 3	773	12	0	0%	0%	0.0%
영상 4	197	11	0	0%	0%	0.0%
영상 5	29	6	0	0%	0%	0.0%
합계	2233	51	0	0%	0%	0%

K5 & VDR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	VDR	K5	[K5+VDR]	VDR의%	K5의 %	총 %
영상 1	35	20	6	15%	23%	10.9%
영상 2	41	14	7	15%	33%	12.7%
영상 3	28	7	2	7%	22%	5.7%
영상 4	16	28	4	20%	13%	9.1%
영상 5	17	35	6	26%	15%	11.5%
합계	137	104	25	15%	19%	10.4%

도면6

ER & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	Ki67	[ER+ Ki67]	ER의 %	Ki67의 %	총 %
영상 1	46	60	1	2%	2%	0.9%
영상 2	201	56	0	0%	0%	0.0%
영상 3	174	62	0	0%	0%	0.0%
영상 4	374	52	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	795	230	1	0.1%	0.4%	0.1%

VDR & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	VDR	Ki67	[VDR+ Ki67]	VDR의 %	K5의 %	총 %
영상 1	43	9	0	0%	0%	0.0%
영상 2	47	2	0	0%	0%	0.0%
영상 3	10	8	0	0%	0%	0.0%
영상 4	11	21	0	0%	0%	0.0%
영상 5	24	4	0	0%	0%	0.0%
합계	135	44	0	0.0%	0.0%	0.0%

AR & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	AR	Ki67	[AR+ Ki67]	AR의 %	K5의 %	총 %
영상 1	142	47	0	0%	0%	0.0%
영상 2	102	96	1	1%	1%	0.5%
영상 3	48	6	0	0%	0%	0.0%
영상 4	33	17	0	0%	0%	0.0%
영상 5	147	59	0	0%	0%	0.0%
합계	472	225	1	0.2%	0.4%	0.1%

도면7

ER & VDR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	VDR	[ER+VDR]	ER의 %	VDR의 %	총 %
영상 1	7	166	20	74%	11%	11.6%
영상 2	65	152	24	27%	14%	11.1%
영상 3	41	87	17	29%	16%	13.3%
영상 4	70	100	20	22%	17%	11.8%
영상 5						
합계	183	505	61	25%	11%	8.9%

AR & VDR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	AR	VDR	[AR+VDR]	AR의 %	VDR의 %	총 %
영상 1	41	171	22	35%	11%	10.4%
영상 2	58	116	11	16%	9%	6.3%
영상 3	15	91	9	38%	9%	8.5%
영상 4	25	276	13	34%	4%	4.3%
영상 5						
합계	139	654	42	23%	6%	5.3%

ER & AR 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	ER	AR	[ER+AR]	ER의 %	AR의 %	총 %
영상 1	73	12	10	12%	45%	11.8%
영상 2	34	22	14	29%	39%	25.0%
영상 3	62	56	41	40%	42%	34.7%
영상 4	47	30	28	37%	48%	36.4%
영상 5						
합계	216	120	93	30%	44%	27.7%

도면8

K14 & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	K14	Ki67	[K14+Ki67]	K14의 %	Ki67의 %	총 %
영상 1	56	120	0	0%	0%	0.0%
영상 2	28	37	2	7%	5%	3.1%
영상 3	65	23	4	6%	15%	4.5%
영상 4	12	26	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	161	206	7	4.2%	3.3%	1.9%

K17 & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	K17	Ki67	[CD10+ Ki67]	K17의 %	Ki67의 %	총 %
영상 1	9	63	0	0%	0%	0.0%
영상 2	4	40	0	0%	0%	0.0%
영상 3	33	12	0	0%	0%	0.0%
영상 4	22	42	0	0%	0%	0.0%
영상 5	118	29	0	0%	0%	0.0%
합계	186	186	0	0.0%	0.0%	0.0%

K5 & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	K5	Ki67	[K5+ Ki67]	K5의 %	Ki67의 %	총 %
영상 1	46	59	1	2%	2%	1.0%
영상 2	40	61	0	0%	0%	0.0%
영상 3	19	30	0	0%	0%	0.0%
영상 4	56	20	0	0%	0%	0.0%
영상 5						
합계	161	170	1	0.6%	0.6%	0.3%

CD10 & Ki67 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	CD10	Ki67	[CD10+ Ki67]	CD10의 %	Ki67의 %	총 %
영상 3	36	56	4	10%	7%	4.3%
영상 2	93	115	0	0%	0%	0.0%
영상 3	55	111	0	0%	0%	0.0%
영상 4	191	209	2	1%	1%	0.5%
영상 5	90	123	3	3%	2%	1.4%
합계	465	614	5	1.1%	0.8%	0.5%

도면9

K14 & K18 동시-발현				오우버랩 %			K5 & K18 동시-발현				오우버랩 %		
세포 수	K18	K14	[K18+K14]	K18의 %	K14의 %	총 %	세포 수	K18	K5	[K18+ K5]	K18의 %	K5의 %	총 %
영상 1	70	14	14	17%	100%	16.7%	영상 1	217	65	65	23%	100%	23.0%
영상 2	71	47	47	40%	100%	39.8%	영상 2	120	38	38	24%	100%	24.1%
영상 3	104	94	94	47%	100%	47.5%	영상 3	215	60	60	22%	100%	21.8%
영상 4	109	41	41	27%	100%	27.3%	영상 4	114	33	33	22%	100%	22.4%
영상 5							영상 5	213	101	101	32%	100%	32.2%
합계	354	196	196	36%	100%	35.6%	합계	879	297	163	16%	55%	13.9%

도면10

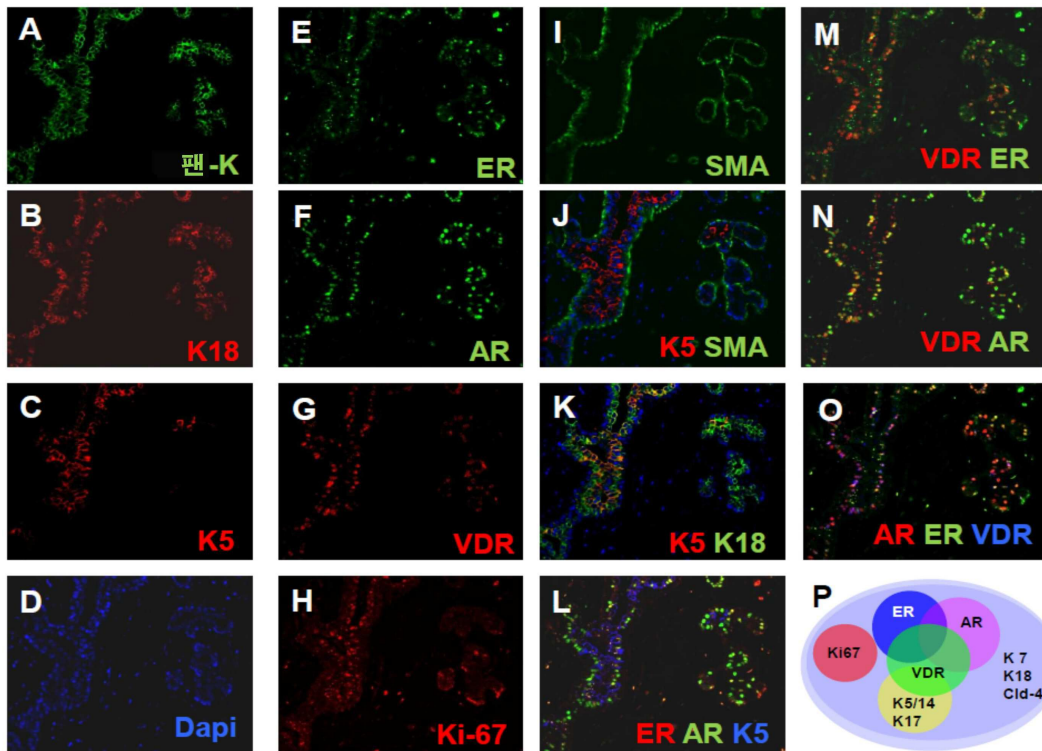
정상의 사람 유방 소엽에서 세포 분화 상태

세포형				K5			K7			CD10		
				K14			K8			SMA		
				ER	AR	VDR	K17	Ki67	Cld-4	K18		p63
L1	HR0	Ki67+	관강	-	-	-	-	+	+	+		-
L2	HR0	K18+	관강	-	-	-	-	-	+	+		-
L3	HR0	K5+	관강	-	-	-	+	-	+	+		-
L4	HR1	ER+	관강	+	-	-	-	-	+	+		-
L5	HR1	AR+	관강	-	+	-	-	-	+	+		-
L6	HR1	VDR+	관강	-	-	+	-	-	+	+		-
L7	HR1	K5/VDR+	관강	-	-	+	+	-	+	+		-
L8	HR2	ER/AR+	관강	+	+	-	-	-	+	+		-
L9	HR2	ER/VDR+	관강	+	-	+	-	-	+	+		-
L10	HR2	AR/VDR+	관강	-	+	+	-	-	+	+		-
L11	HR3	ER/AR/VDR+	관강	+	+	+	-	-	+	+		-
My1		CD10+	근상피	-	-	-	-	-	-	-		+
My2		K5+	근상피	-	-	-	+	-	-	-		+

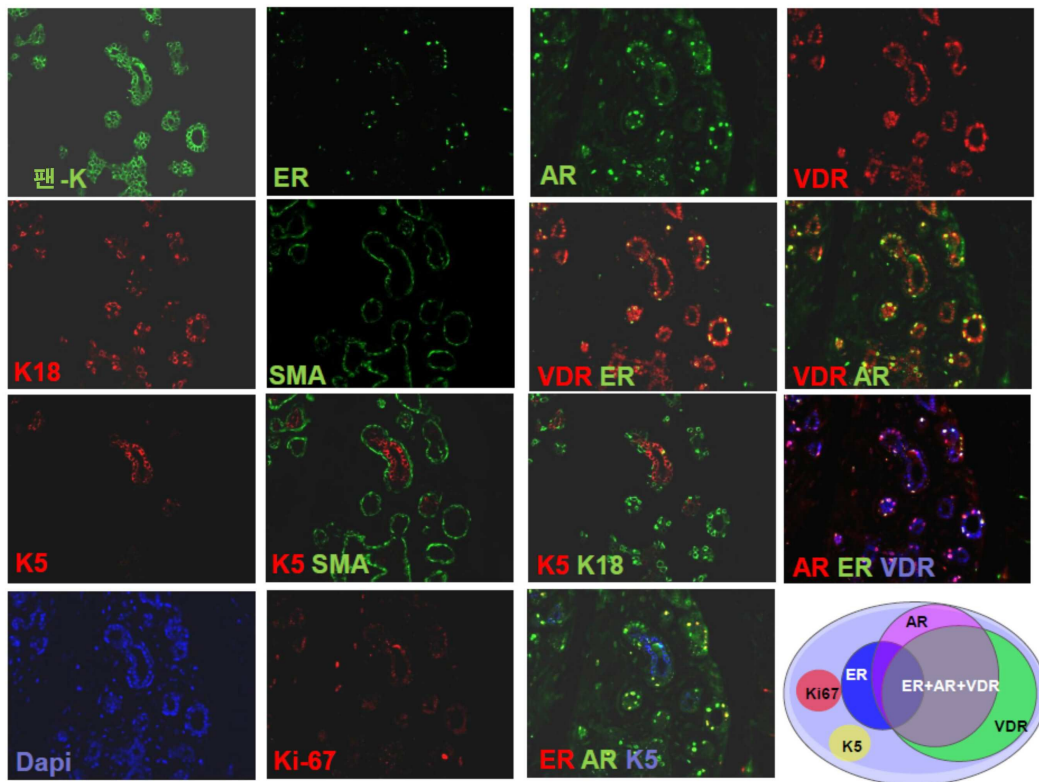
도면11

유방 단면을 염색하는데 사용된 항체								
항체	회사	제품 번호	종	클론	Ag 검색	원차 희석	세포 구획	사용된 도면
1 AR	Dako	M3562	마우스	AR441	시트레이트PC	500	핵	도. 1-5, S2, S4
2 CD10	Vector	VP-C328	마우스	56C6	시트레이트PC	20	세포질	도. 1-5, S2
3 CK 8/18	Becton/Dick	349205	마우스	cam5.2(8+18)	10' 프로테아제	50	세포질	도. 1-5, S2
4 CK14	Serotec	MCA890	마우스	n/a	시트레이트PC	600	세포질	도. 1-5, S2
5 CK17	Millipore	MAB1677	마우스	E3	시트레이트PC	400	세포질	도. S2
6 CK19	Dako	M0888	마우스	RCK108	10' 프로테아제	1000	세포질	도. 1, S2
7 CK5	Lab Vision	MS-1896	마우스	XM26	시트레이트PC/MV	50/30	세포질	도. 1-5, S2
8 CK5/6	Chemicon	MAB1620	마우스	D5/16B4	EDTA PC	400	세포질	도. 5
9 CK7	Dako	M7018	마우스	OV-TL 12/30	10' 프로테아제	1000	세포질	도. 1-5, S2, 3, 4
10 ER	NeoMarker	RM-9101-S	토끼	SP1	시트레이트PC	100	핵	도. 1-5, S2, 3, 4
11 Ki67	Dako	M7240	마우스	mib1	시트레이트PC/MV	200	핵	도. 1-5, S2, 3, 4
12 Muc-1	Novocastra	CL-Muc1-co	마우스	Ma552	시트레이트PC	600	세포질	도. S3
13 NaK ATPase	Epitomics	2047-1	토끼	EP1845Y	시트레이트PC	200	막	도. 3, 4
14 p63	Dako	M7247	마우스	4A4	시트레이트MV	800	핵	도. 4, 5
15 PanK	Sigma	C1801	마우스	PCK-26	시트레이트MV	300	세포질	도. S3
16 PR	Dako	M3569	마우스	PgR636	시트레이트PC	200	핵	도. 4, 5
17 SMA	Sigma	A2547	마우스	1A4	none	20K	세포질	도. 1-5, S2, 3
18 VDR	Novus	NBP1-19	토끼	n/a	시트레이트PC	200	핵	도. 2, 4, S2, S4
19 VDR	Santa Cruz	sc-13133	마우스	sc-13133	시트레이트PC	2000	세포질 / 핵	도. 5, 6
20 Vimentin	Abcam	ab8069	마우스	V9	시트레이트PC	2000	세포질	도. 1
21 AR (2)	Millipore	06-680	토끼	N/A	시트레이트PC		핵	
22 CK5 (2)	Abcam	ab75869	토끼	EPR1600Y	시트레이트PC	100	세포질	
23 CK7 (2)	Abcam	Ab68459	토끼	EPR1619Y	시트레이트PC	100	세포질	
24 CK14 (2)	LabVision	LL025	마우스	MS-620-P	시트레이트PC		세포질	
25 CK18 (2)	NeoMarkers	MS-142	마우스		시트레이트PC	200	세포질	
26 CK18 (3)	Abcam	E431-1	토끼	Ab32118	시트레이트PC	100	세포질	
27 CK19 (2)	LabVision	MS-198-P	마우스				세포질	
28 Ki67	Vector Labs	VP-K451	토끼		시트레이트PC	2500	핵	
29 Vimentin	Dako	M7020	마우스	Vim3B4	20' 프로테아제	400	세포질	
직접 접합된 항체								
30 CD24-PE	BD	555428	마우스	ML5			막	
31 CD44-APC	BD	559942	마우스	G44-26			막	
32 CD133/1-PE	Miltenyi	130-080-801	마우스	AC133			막	
33 CD326-FITC	Serotec	MCA1870FT	마우스	VU-ID9			막	도. S1
34 CD326-PerCPCy5.5	BD	347199	마우스	EBA-1			막	
35 CK 8/18 -FITC	Abcam	ab54728	마우스	cam5.2(8+18)			세포질	도. S2
36 ER α -AF488	Santa Cruz	sc-542K	토끼	MC-20			핵	도. S1
37 Ki-67-AF488	Santa Cruz	sc-7846	염소	M-19			핵	
이자 항체								
항체(항-)	회사	제품 번호	종	특이성	접합체			
1 토끼	Invitrogen		염소	IgG	알렉사플루오로647			
2 토끼	R&D	NL004	당나귀	IgG	노스 라이트557			
3 마우스	Invitrogen		염소	IgG	알렉사플루오로647			
4 토끼	GE	NA934V	당나귀	IgG	HRP			
5 마우스	GE	NXA931	양	Ig	HRP			
6 마우스	Jackson	115-115-164	염소	IgG	R-PE			

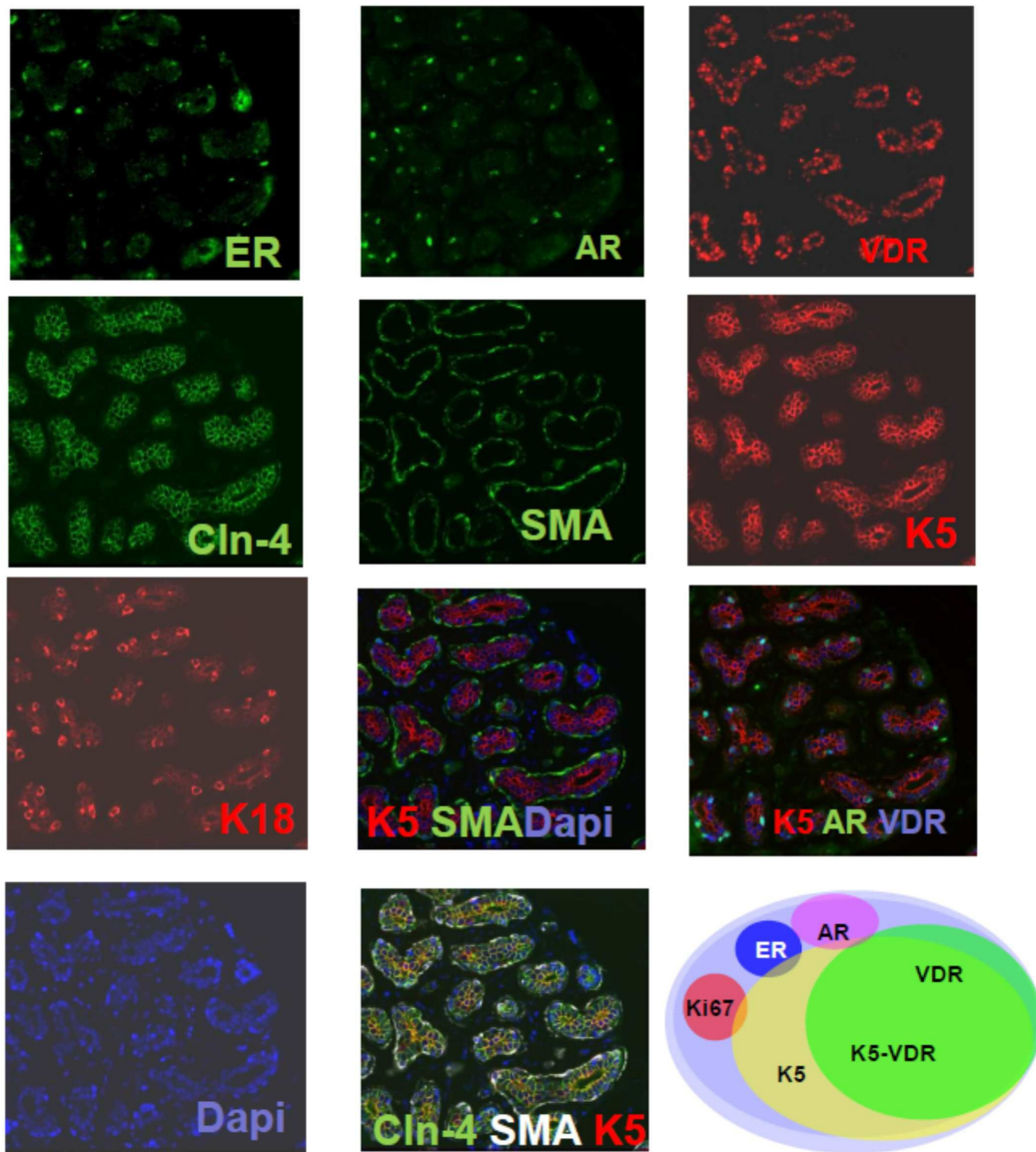
도면12



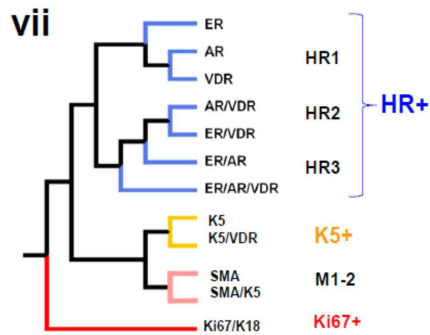
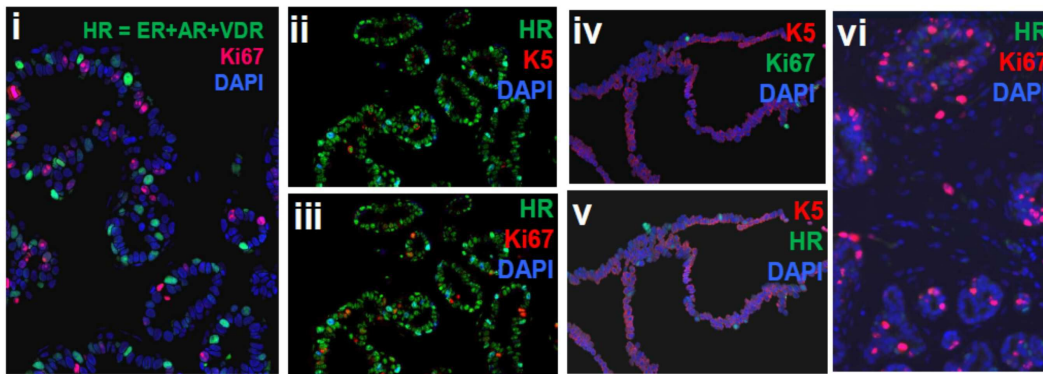
도면13



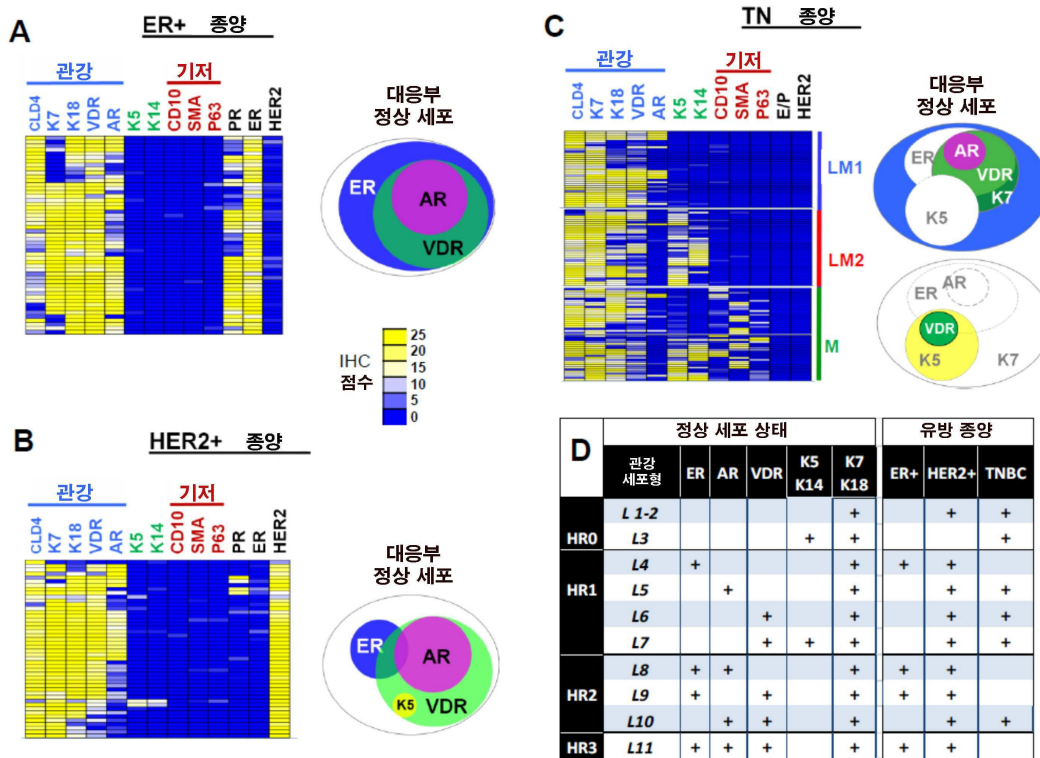
도면14



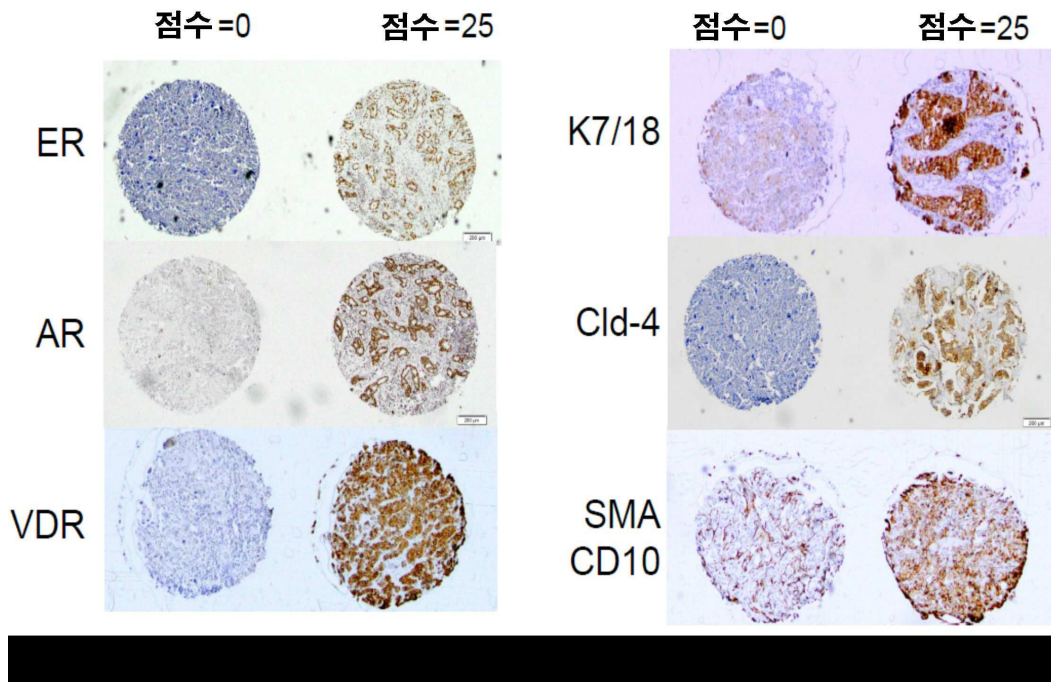
도면15



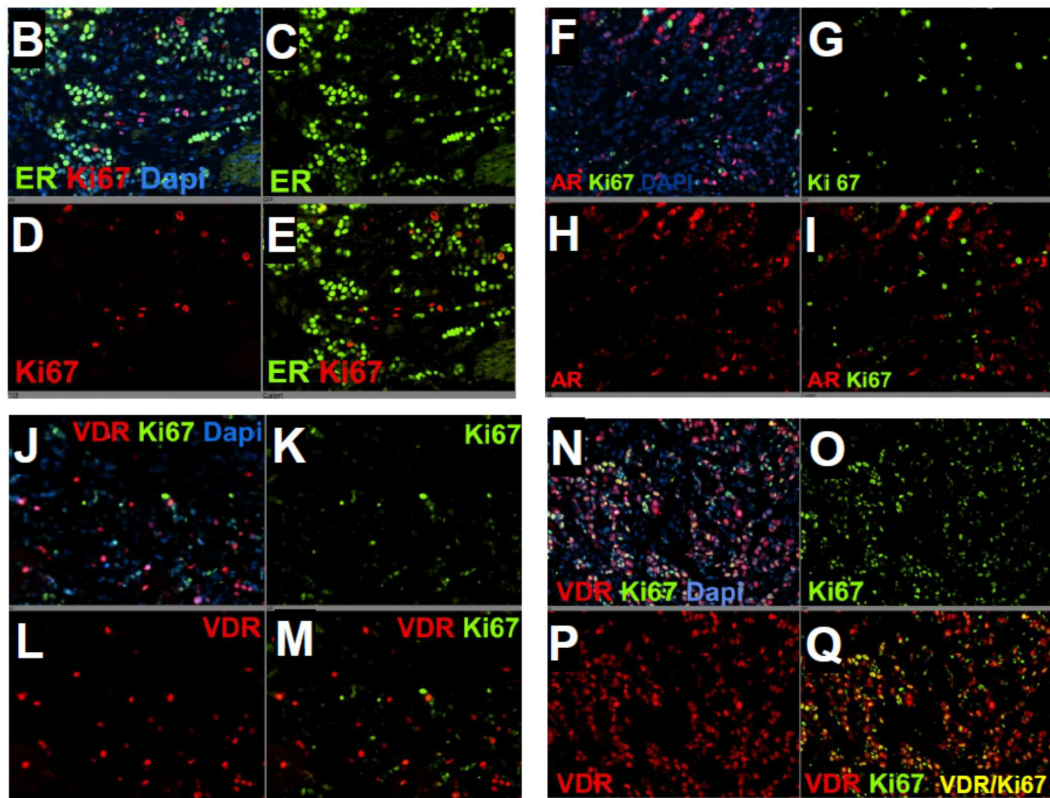
도면16



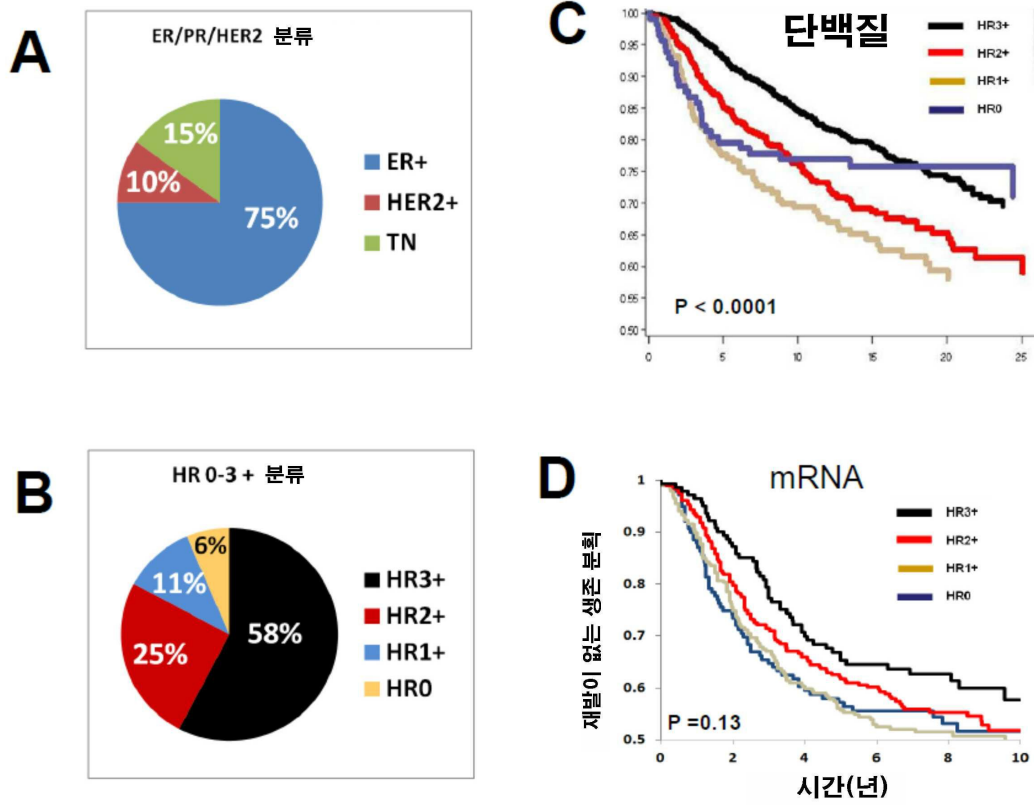
도면17



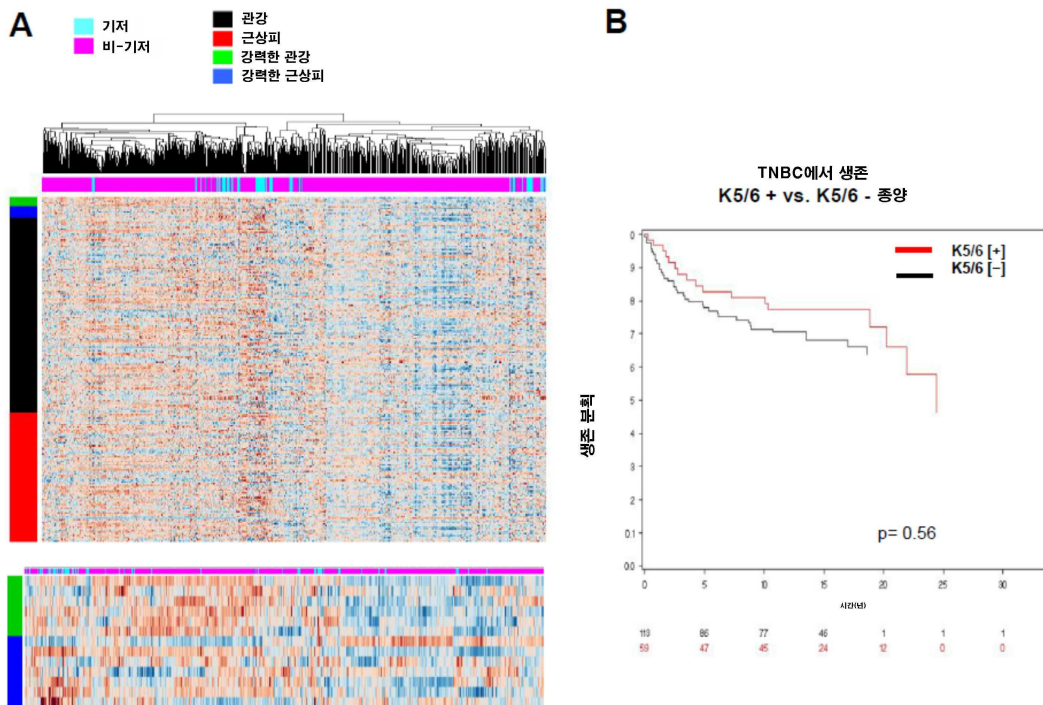
도면18



도면19



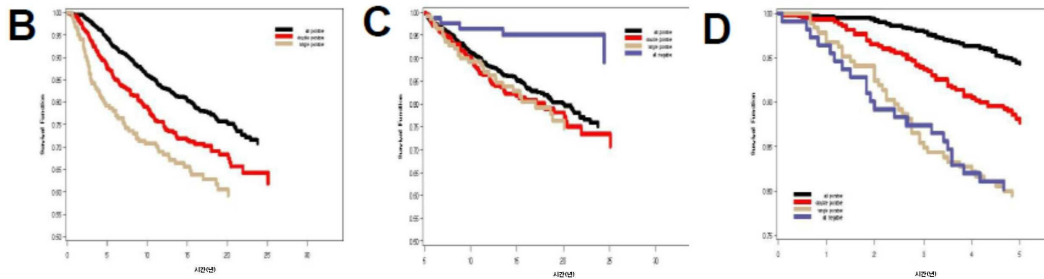
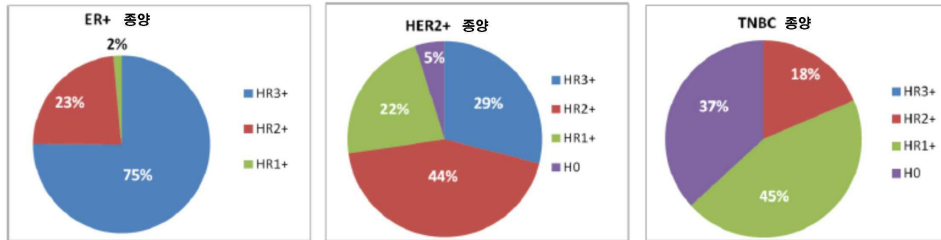
도면20



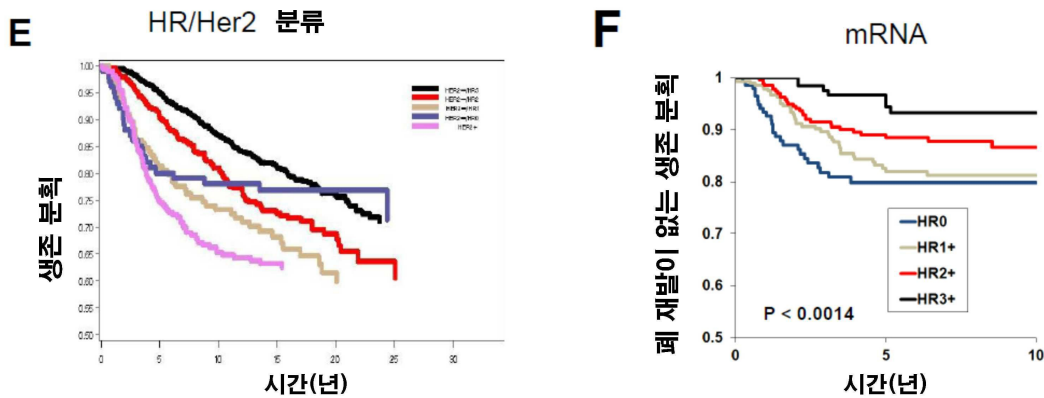
도면21

HRO-3 범주를 기반으로 한 유방 종양의 분류

특징	ER+ 종양	HER2+ 종양	TNBC	합계
HRO	0 % (0)	5.1 % (9)	36.8 % (95)	6.1% (104)
HR1	1.5 % (19)	22.0 % (39)	44.6 % (115)	10.8% (185)
HR2	23.4 % (294)	43.5 % (77)	18.6 % (48)	25.0% (429)
HR3	75.1 % (946)	29.4 % (52)	0% (0)	58.2% (998)
합계	100 % (1259)	100 % (177)	100% (258)	100% (1731)



도면22



위험에서의 수	0	5	10	15	20	25	25+
HR3	954	877	762	509	227	66	13
HR2	362	314	263	156	88	21	4
HR1	146	115	100	63	37	15	4
HR0	102	80	76	63	36	12	3
HER2	219	162	139	97	49	24	4

도면25

특징	HR3	HR2	HR1	HR0
N (%)	1006 (58.1)	429 (24.8)	185 (10.7)	111 (6.4)
진단시 연령, 평균(N), 연 진단시 폐경 상태, N*(%)	57.6 (1006)	57.3 (429)	55.6 (185)	54.7 (111)
폐경 전	224 (22.6)	94 (22.4)	35 (19.7)	28 (25.7)
폐경 후	767 (77.4)	326 (77.6)	143 (80.3)	81 (74.3)
ER 상태, N* (%)				
양성	1006 (100.0)	328 (76.5)	22 (11.9)	0 (0.0)
음성	0 (0.0)	101 (23.5)	163 (88.1)	111 (100.0)
HER2 상태, N* (%)				
양성	52 (5.2)	77 (18.2)	39 (21.2)	9 (8.2)
음성	946 (94.8)	347 (81.8)	145 (78.8)	101 (91.8)
결절 포함, N (%)				
없음	686 (68.2)	279 (65.0)	99 (53.5)	69 (62.2)
1 - 3	194 (19.3)	83 (19.4)	50 (27.0)	25 (22.5)
4 - 9	84 (8.4)	36 (8.4)	21 (11.4)	12 (10.8)
≥10	42 (4.2)	31 (7.2)	15 (8.1)	5 (4.5)
종양 크기 (cm), N (%)				
≤2	692 (68.8)	260 (60.6)	100 (54.1)	58 (52.3)
> 2	314 (31.2)	169 (39.4)	85 (46.0)	53 (47.8)
조직학적 등급, N* (%)				
I (저)	252 (25.3)	62 (14.7)	10 (5.5)	2 (1.8)
II (중간)	632 (63.4)	234 (55.6)	82 (45.3)	15 (13.5)
III (고)	113 (11.3)	125 (29.7)	89 (49.2)	94 (84.7)
단계, N (%)				
I	529 (52.6)	205 (47.8)	66 (35.7)	44 (39.6)
II	326 (32.4)	149 (34.7)	76 (41.1)	47 (42.3)
III	151 (15.0)	75 (17.5)	43 (23.2)	43 (23.2)
화학치료요법, N* (%)				
있음	260 (34.4)	146 (47.0)	81 (64.8)	51 (65.4)
없음	495 (65.6)	165 (53.1)	44 (35.2)	27 (34.6)
호르몬 치료, N* (%)				
있음	556 (73.3)	211 (69.0)	47 (38.5)	28 (36.8)
없음	203 (26.8)	95 (31.1)	75 (61.5)	48 (63.2)
방사선 치료, N* (%)				
있음	337 (44.2)	128 (41.4)	60 (48.4)	34 (44.2)
없음	426 (55.8)	181 (58.6)	64 (51.6)	43 (55.8)

*N은 정보 손실로 인하여 합계에 가지지 않는다

†Stage I= 종양 크기 ≤2cm 및 결절은 포함안됨;

II= 종양 크기 ≤2cm 및 1-3 결절 또는 2-4cm 및 0-3 결절 또는 4+cm 및 0 결절 ;

III= 종양 크기 ≤2cm 및 4+ 결절 또는 2-4cm 및 4+ 결절 또는 >4cm 및 1+ 결절 .

도면26

HR 상태(HR0, HR1, HR2 및 HR3)에 의한 유방 암-특이적인 사망률의 다변량 분석; 진단 이 후의 시간까지 간호사의 건강 연구에서 유방 암 특이적인 치사율에 대한 위험을 및 95% CI				
	<5 년		5+ 년	
	HR (95%CI) ¹	HR (95%CI) ²	HR (95%CI) ¹	HR (95%CI) ²
HR3	1.0 (REF)	1.0 (REF)	1.0 (REF)	1.0 (REF)
HR2	2.26 (1.55-3.28)	1.69 (1.14-2.50)	1.20 (0.99-1.58)	1.24 (0.93-1.66)
HR1	3.74 (2.47-5.66)	2.44 (1.56-3.84)	1.14 (0.77-1.70)	1.25 (0.81-1.93)
HR0	3.57 (2.17-5.85)	2.71 (1.56-4.71)	0.28 (0.12-0.69)	0.34 (0.13-0.86)

1- 연령 조정됨

2- 연령, 진단한 해, HER2 상태, 질병 상태, 등급, 방사선 치료, 화학치료요법 및 호르몬 치료에 대해 조정됨.