

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107076747 B

(45) 授权公告日 2021.02.02

(21) 申请号 201580039837.X

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(22) 申请日 2015.06.02

有限公司 11262

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 郑霞

申请公布号 CN 107076747 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2017.08.18

G01N 33/574 (2006.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

62/007,830 2014.06.04 US

WO 2007140352 A2,2007.12.06

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 2003042660 A2,2003.05.22

2017.01.22

K.P.M.Suijkerbuijk, et al..Oxytocin:

(86) PCT国际申请的申请数据

bringing magic into nipple aspiration..

PCT/US2015/033827 2015.06.02

《Annals of Oncology》.2007,第18卷(第10期),

(87) PCT国际申请的公布数据

Susanna Shin, et al..Serum Biomarkers

W02015/187727 EN 2015.12.10

to Differentiate Benign and Malignant

(73) 专利权人 阿托萨治疗学公司

Mammographic Lesions..《JOURNAL OF THE

地址 美国华盛顿州

AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS》.2007,第204

(72) 发明人 书志·陈 史蒂文·C·夸伊

卷(第5期),

审查员 王在竹

权利要求书2页 说明书31页

(54) 发明名称

分子乳房摄影术

(57) 摘要

本发明涉及筛查及诊断经历乳房摄影术的患者中的癌症的方法。

1. 治疗剂在制备用于治疗个体的乳房病症的药物中的应用,所述个体具有BI-RADSIII或BI-RADSIV病变特征,并且所述治疗包括:

(i) 选择个体,所述个体特征为在乳房摄影成像期间通过乳房摄影装置施加的压力所获得的所述个体的导管内流体存在至少一种与所述乳房病症有关的生物标志物水平的升高或降低,和

(ii) 将所述治疗剂施用至所述个体,其中:

(a) 所述治疗剂为SERM、SERD、AI、其药用盐或其组合;或

(b) 所述治疗剂为蒽环类、铂剂、紫杉烷或其组合。

2. 如权利要求1所述的应用,其中所述个体的导管内流体的挤出是通过在所述乳房摄影成像之前进行下述来刺激:(i) 施用催产素,或(ii) 将阿托品施用到所述个体的乳头上。

3. 如权利要求1的应用,其中所述个体导管内流体的挤出通过在乳房摄影成像前施用碳催产素刺激。

4. 如权利要求1的应用,其中所述治疗进一步包括基于所述导管内流体的分析确定或修改针对所述个体的治疗方案。

5. 如权利要求4的应用,其中所述治疗方案进一步包括放射疗法和/或手术切除乳房组织。

6. 如权利要求1所述的应用,其中所述治疗剂为ado-曲妥珠单抗emtansine、白蛋白结合型紫杉醇、阿那曲唑、丁酸、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、多烯紫杉醇、盐酸多柔比星、盐酸表柔比星、艾立布林、依维莫司、依西美坦、氟尿嘧啶、氟维司群、盐酸吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、伊沙匹隆、二甲苯磺酸拉帕替尼、来曲唑、脂质体多柔比星、醋酸甲地孕酮、氨甲喋呤、米托蒽醌、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培妥珠单抗、雷洛昔芬、他莫昔芬、他莫昔芬衍生物、N-去甲基他莫昔芬、内昔芬、顺式他莫昔芬、托瑞米芬、曲妥珠单抗、长春瑞滨或其组合。

7. 如权利要求1所述的应用,其中所述SERM选自他莫昔芬、他莫昔芬衍生物、顺式他莫昔芬、内昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、苯卓昔芬、阿佐昔芬、米泼昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652和ERA-92。

8. 如权利要求1所述的应用,其中所述治疗剂进一步包括至少一种 ω -3脂肪酸和至少一种维生素D化合物。

9. 如权利要求1所述的应用,其中所述个体还具有CCH、ADH、DCIS或IDC的特征。

10. 如权利要求7所述的应用,其中所述治疗剂为他莫昔芬或他莫昔芬衍生物。

11. 如权利要求10所述的应用,其中所述治疗剂是内昔芬。

12. 如权利要求1所述的应用,其中所述治疗剂包括抗肿瘤抑制物miRNA的沉默剂。

13. 如权利要求1所述的应用,其中所述治疗剂包括oncomir的激活剂。

14. 如权利要求1所述的应用,其中所述治疗剂包括DNA甲基化激活剂或DNA甲基化剂。

15. 如权利要求1所述的应用,其中所述乳房病症是致密型乳腺、乳腺炎、柱状细胞增生、非典型柱状细胞增生、导管增生、小叶增生、非典型导管增生、非典型小叶增生或乳腺癌。

16. 如权利要求15所述的应用,其中所述乳腺癌是原位导管癌、原位小叶癌、侵袭性导管癌、浸润性导管癌、侵袭性小叶癌、浸润性小叶癌、炎性乳腺癌、三阴性乳腺癌、ER+乳腺癌、HER2+乳腺癌、腺样囊性癌、腺囊性癌、低分级腺鳞癌、髓样癌、粘液癌、胶质癌、乳头状

癌、小管癌、化生性癌或微乳头状癌。

17. 如权利要求1所述的应用,其中所述个体具有致密型乳腺特征。
18. 如权利要求1所述的应用,其中所述生物标志物是miRNA生物标志物。
19. 如权利要求18所述的应用,其中所述miRNA选自下组:Let-7a、Let-7b、Let-7c、miR-27a、miR-92a、miR-383、miR-202、miR-107、miR-141、miR-183、miR-454、miR-650、miR-335、miR-566、miR-497、miR-204、miR-20a、miR-132、miR-539、miR-221、miR-21、miR-200c、miR-200b、miR-638、miR-572、miR-671-5p、miR-30d、miR-1275、miR-15b、miR-644、miR-195、miR-557、miR-1207-5p、miR-874、miR-556-3p、miR-933、miR-96、miR-575、Let-7f、miR-15a、miR-1202、miR-143、miR-19b、miR-1915、miR-1274b、miR-1268、miR-106b、miR-634、miR-129、miR-572、miR-17、miR-29b、miR-877、miR-425、miR-181a、miR-193a、miR-193b、miR-145、miR-17-5p、miR-30b、miR-34a、miR-125b、miR-146a、miR-128、miR-340、miR-20、miR-26a、miR-322、miR-93、miR-519c、miR-23b、miR-548a-3p、miR-183、miR-124、miR-29a、miR-506、miR-3143、miR-4324、miR-569、miR-548e、miR-491-3p、miR-3672、miR-544b、miR-135b、miR-2117、miR-590-3p、miR-378、miR-135a及其任意组合。

分子乳房摄影术

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2014年6月4日提交的美国临时专利申请号62/007,830的权益，其通过引用全文并入本文。

背景技术

[0003] 乳腺癌是迄今为止女性中最常见的癌症形式，并且是人类癌症死亡的第二大主要原因。尽管在乳腺癌诊断和治疗中已取得进展，但是该疾病的发病率从1940年起以每年约1%的速率稳步上升。如今，生活在北美洲的女性在其一生中罹患乳腺癌的可能性为八分之一。

[0004] 目前乳房摄影术(mammography)的广泛使用已经导致乳腺癌检测的改善。尽管如此，由乳腺癌引起的死亡率仍未改变，每100000名女性中大约有27例死亡。医生使用乳腺影像报告和数据系统(BI-RADS)——乳房摄影术的一种普遍认可的预测值风险评估和质量保证工具——将乳腺病变分成从0到VI范围的若干种BI-RADS类别，并基于BI-RADS分类作出诊断和疾病管理的建议。可能由于错误归类至不正确的BI-RADS类别的比例较高及其对临床因素的影响，乳腺癌常常是在极晚期的阶段才被发现，此时的治疗选择和存活率已非常有限。事实上，女性基于其BI-RADS分类获得的信息可表示是否召回进行进一步评估和未能早期检测的可能性之间的差异。虽然放射科医生之间对于该范围的较低端(即BI-RADS I或II)和该范围的较高端(BI-RADS IV或V)具有高度的一致性或共识，但放射科医生之间对于他们将乳腺病变分类为II类和III类似乎观察到较高程度的不一致性。Inter-and intra-radiologist variability in the BI-RADS assessment and breast density groups categories for screening mammograms. Redondo等人.Br J Radiol. 85(1019); 2012年11月, 第1465-1470页; Use of the American College of Radiology BI-RADS guidelines by community radiologists: concordance of assessments and recommendations assigned to screening mammograms. Lehman等人.Am.J.Roentgenology. 2002; 179 (1), 第15-20页。因此，对于更好的疾病分类、乳腺病变的早期检测和乳房病症的诊断的需求尚未得到满足。

发明内容

[0005] 在某些实施方案中，本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法，该方法包括对在乳房摄影术期间从该个体的乳头获得的导管内流体进行针对与乳房病症相关的至少一种生物标志物的筛查。在某些实施方案中，有需要的个体的乳房病症诊断或预后方法对于具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的诊断或预后特别有用。在一些实施方案中，该方法进一步包括使乳头与收集装置相接触。在一些实施方案中，该收集装置包含固相样品收集介质。在一些实施方案中，该收集装置进一步包含使该装置附接至乳房的乳房接合部件。在一些实施方案中，该固相样品收集介质选自吸收性纸、显微镜载玻片、毛细管、收集管、柱、微型柱、孔(well)、板、膜、滤器、树脂、无机基质、珠、颗粒状层析介

质、塑料微粒、胶乳颗粒、涂覆的管、涂覆的模板、涂覆的珠、涂覆的基质或其组合。在一些实施方案中，该方法进一步包括在乳房摄影术之前从所述个体的乳房的乳头导管处去除角蛋白。在一些实施方案中，该方法进一步包括在乳房摄影术之前将阿托品施用到个体的乳头上。在一些实施方案中，该方法进一步包括在进行乳房摄影术之前将催产素施用于所述个体。在一些实施方案中，所述筛查包括使来自导管内流体的细胞与能结合选自CK5、CK14、CK7、CK18和p63的抗原的抗体相接触。在一些实施方案中，所述至少一种生物标志物包括细胞学、蛋白质、糖蛋白、DNA、RNA、基因突变、单核苷酸多态性、DNA拷贝数、DNA的甲基化、组蛋白和/或蛋白质、微RNA、微生物组(microbiome)或其组合。在一些实施方案中，所述筛查包括使来自导管内流体的细胞与能结合选自CK5、CK14、CK7、CK18和p63的抗原的抗体相接触。在一些实施方案中，所述筛查包括在所述导管内流体样品中确定一种或多种miRNA的存在和/或水平、对miRNA特征(signature)进行概况分析(profiling)，或其组合。在一些实施方案中，该miRNA选自表3、表4、表5或其组合。在一些实施方案中，所述导管内流体样品中的miRNA是外来体的(exosomal)。在一些实施方案中，所述筛查包括扩增、测序、限制性长度多态性分析、微阵列分析、多重分析或其组合。在一些实施方案中，所述筛查包括使来自导管内流体的细胞与能结合uPA、PAI-1及Gal-GalNAc的抗体相接触、检测导管内流体样品中公开于表5中的改变的miRNA特征，或检测导管内流体样品中uPA、PAI-1及GalNAc转移酶基因的改变的DNA甲基化模式。

[0006] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括根据所述筛查的结果来确定或修改针对个体的治疗方案。在一些实施方案中，该治疗方案包括治疗剂、放射疗法和/或手术切除乳房组织。在一些实施方案中，该治疗剂为蒽环类(例如，多柔比星或表柔比星)、铂剂、紫杉烷(例如，紫杉醇或多烯紫杉醇(docetaxel))或其组合。在一些实施方案中，该治疗剂为ado-曲妥珠单抗emtansine、白蛋白结合型紫杉醇、阿那曲唑、丁酸、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、多烯紫杉醇、盐酸多柔比星、盐酸表柔比星、艾立布林、依维莫司、依西美坦、氟尿嘧啶、氟维司群、盐酸吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、伊沙匹隆、二甲苯磺酸拉帕替尼、来曲唑、脂质体多柔比星、醋酸甲地孕酮、氨甲喋呤、米托蒽醌、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培妥珠单抗、雷洛昔芬、他莫昔芬或他莫昔芬衍生物(诸如4-羟基他莫昔芬、N-去甲基他莫昔芬和顺式他莫昔芬)、托瑞米芬、曲妥珠单抗、长春瑞滨(ado-trastuzumab emtansine, albumin-bound paclitaxel, anastrozole, butyric acid, capecitabine, carboplatin, cisplatin, cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin HCl, epirubicin HCl, eribulin, everolimus, exemestane, fluorouracil, fulvestrant, gemcitabine HCl, goserelin acetate, ixabepilon, lapatinib ditosylate, letrozole, liposomal doxorubicin, megestrol acetate, methotrexate, mitoxantrone, paclitaxel, pamidronate disodium, pertuzumab, raloxifene, tamoxifen, or a tamoxifen derivative (such as 4-hydroxytamoxifen, N-desmethyltamoxifen and cis-tamoxifen), toremifene, trastuzumab, vinorelbine)或其组合。在一些实施方案中，该治疗剂为ado-曲妥珠单抗emtansine、白蛋白结合型紫杉醇、阿那曲唑、丁酸、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、多烯紫杉醇、盐酸多柔比星、盐酸表柔比星、艾立布林、依维莫司、依西美坦、氟尿嘧啶、氟维司群、盐酸吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、伊沙匹隆、二甲苯磺酸拉帕替尼、来曲唑、脂质体多柔比星、醋酸甲地孕酮、氨甲喋呤、米托蒽醌、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培妥珠单抗、雷洛昔芬、他莫昔

芬、他莫昔芬衍生物、4-羟基他莫昔芬、N-去甲基他莫昔芬、内昔芬(endoxyfen)、顺式他莫昔芬、托瑞米芬、曲妥珠单抗、长春瑞滨或其组合。在一些实施方案中，该治疗剂为SERM、SERD、AI、其药用盐或其组合。在一些实施方案中，该治疗剂进一步包括至少一种 ω -3脂肪酸和至少一种维生素D化合物。

具体实施方式

[0007] 在某些实施方案中，本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法，该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些实施方案中，该导管内流体样品包括乳腺流体，全细胞，细胞碎片，细胞膜，导管内流体中选定的液体部分、细胞部分或其它固体部分，以及该导管内流体的蛋白质、糖蛋白、肽、脂质、糖、寡糖、糖脂类、核苷酸(包括DNA和RNA多核苷酸)和其它类似生物化学组分和分子组分。在一些实施方案中，该方法包括使收集装置与乳房相接触。在一些实施方案中，由乳房摄影装置施加的压力导致导管内流体从乳房中挤出(expression)。在一些实施方案中，该导管内流体样品通过收集装置收集。在一些实施方案中，对该导管内流体样品进行针对乳房病症的生物标志物的筛查。

[0008] 定义

[0009] 术语“个体”、“受试者”或“患者”可以互换使用。如本文所用，它们表示任何哺乳动物(即，在分类学分类为动物界：脊索动物门：脊椎动物亚门：哺乳纲内的任意目、科和属的种)。在一些实施方案中，该哺乳动物为人类。这些术语均不需要或不限于以医护工作者(例如，医生、注册护士、从业护士、医生助手、护理员或临终护理人员)的监督(例如持续的或间歇性的)为特征的情形。

[0010] 如本文所用，“乳房病症”意为乳房的任何病症。乳房病症包括乳房的良性病变及乳腺癌。良性乳房病变包括但不限于致密型乳腺、乳腺炎、柱状细胞增生、非典型柱状细胞增生、导管增生、小叶增生、非典型导管增生和非典型小叶增生。

[0011] 如本文所用，“乳腺癌”意为乳腺细胞的任何恶性肿瘤。存在若干种乳腺癌。示例性的乳腺癌包括但不限于原位导管癌、原位小叶癌、侵袭性(或浸润性)导管癌、侵袭性(或浸润性)小叶癌、炎性乳腺癌、三阴性乳腺癌、ER+乳腺癌、HER2+乳腺癌、腺样囊性(或腺囊性)癌、低分级(low-grade)腺鳞癌、髓样癌、粘液(或胶质)癌、乳头状癌、小管癌、化生性癌和微乳头状癌。单个乳腺肿瘤可以是这些类型的组合或侵袭性和原位癌的混合。

[0012] 如本文所使用的术语“诊断”是指分子或病理学状态、疾病或病况的鉴别，诸如乳房病症或乳房病症的分子亚型的鉴别。

[0013] 如本文所使用的术语“预后”是指对可归因于乳腺癌的死亡的可能性或包括复发、转移扩散和抗药性在内的乳房病症进展的可能性的预测。术语“预测”可指基于观察、经验或科学推理的预言或预估的行为。在一个实例中，在手术切除原发性肿瘤并且/或者进行一段特定时间的化学疗法而癌症未见复发后，医生可预测患者能存活的可能性。

[0014] 当前的诊断方法

[0015] 乳房摄影(mammogram)是乳房的X射线照片。其利用电离辐射来产生乳房组织的图像，该图像使得肿块和/或微钙化能够可视化。乳房摄影用来对没有疾病指征(sign)或症状的女性进行乳房病症的检查以及在发现肿块或疾病的其它指征或症状后进行乳房病症的

检查。

[0016] 乳房摄影术减少了年龄为40到74岁的女性因癌症而死亡的人数。然而，乳房摄影术有若干缺点，包括：假阳性结果和过度诊断、假阴性结果和无法全面诊断以及辐射暴露。当放射科医生在不存在乳腺癌时错误地将乳房摄影解释成表示存在乳腺癌时将产生假阳性结果。假阳性结果导致过度诊断及过度治疗。研究表明，在10次每年进行的乳房摄影后具有假阳性结果的可能性为约50%到60%。在乳房摄影显示原位导管癌(DCIS——可变成癌性细胞的异常细胞在乳腺管的内衬中积累的一种非侵袭性肿瘤)的情况下，假阳性尤为常见。这导致过度诊断及过度治疗。假阴性结果导致无法全面诊断及癌症的进展。假阴性结果在具有致密型乳腺或患有小叶癌、粘液癌或快速发展的癌的个体中很常见。大多数绝经前女性具有致密型乳腺，并且许多绝经后女性也具有致密型乳腺。乳房摄影术在具有致密型乳腺的女性中发现癌症的灵敏度可为15%到30%。

[0017] 乳房摄影术的一种普遍认可的预测值风险评估和质量保证工具为乳腺影像报告和数据系统(BI-RADS)。乳腺病变被分为从0到VI范围的若干种BI-RADS类别。医生采用BI-RADS作为乳房病症管理工具来提出建议。

[0018] 表1

BI-RADS 评估类别和管理建议			
BI-RADS 类别	病变状态	管理	癌症/恶性肿瘤的可能性
0	不完全	召回进行附加的成像/与先前的检验比较	N/A
I	阴性	常规乳房摄影术筛查	基本上为 0%
II	良性	常规乳房摄影术筛查	基本上为 0%
III	可能良性	短间隔筛查(6m) 随访或继续进行监视乳房摄影术	0% - ≤ 2%
IV • IVa • IVb	疑似异常 • 低度疑似恶性肿瘤	组织诊断	> 2% - ≤ 95%
			> 2% - ≤ 10%
[0019] [0020]	• IVc • 中度疑似恶性肿瘤 • 高度疑似恶性肿瘤		> 10% - ≤ 50% > 50% - ≤ 95%
	V	高度提示恶性肿瘤	组织诊断 ≥ 95%
	VI	证实为恶性肿瘤	临幊上适用时手术切除 N/A

[0021] 虽然观察者间对于该范围的较低端(即BI-RADS I或II)和该范围的较高端(BI-RADS IV或V)具有高度的一致性,但据报道,观察者间在BI-RADS II类和III类之间较高程度地缺乏一致性(即,不一致性)(Inter-and intra-radiologist variability in the BI-RADS assessment and breast density groups categories for screening mammograms.Redondo等人.Br J Radiol.85(1019);2012年11月,第1465-1470页;Use of the American College of Radiology BI-RADS guidelines by community

radiologists:concordance of assessments and recommendations assigned to screening mammograms.Lehman等人.Am.J.Roentgenology.2002;179(1).第15-20页)。具有最高的53.5%的不一致性的评估为“可能良性发现”(III类)。例如,放射科医生之间关于分类成BI-RADS II和III类还是分类成IVa和IVb类的分歧意味着,其中一位放射科医生已检测到良性病变且未发现召回个体进行进一步评估的理由,而另一位已发现可能良性的病变并建议进一步评估,这似乎是一种主观评价(Redondo等人;BI-RADS Lexicon for US and Mammography:Interobserver variability and Positive Predictive Value.Lazarus等人.Radiology.2006,239(2),第385-391页)。事实上,女性得到的信息(这将改变下一步)是召回进行进一步评估。但由于错误归类的比例较高及其对临床因素的影响,在放射科医生群体中关于BI-RADS III和IV类的最终评估的归类存在一些争议。因此,对于更好的疾病分类、乳腺病变的早期检测和乳房病症的诊断的需求尚未得到满足。

[0022] 乳房病症

[0023] 正常的乳腺由导管和具有双层结构的小叶组成。腔分泌细胞围绕中空内腔,进而被与基底膜直接接触的一层肌上皮细胞所围绕。

[0024] 乳腺增生

[0025] 增生(又称上皮增生或增生性乳腺疾病)是指内衬于导管或小叶的细胞的过度生长。当增生在导管中时,称为导管增生或导管上皮增生。当增生累及小叶时,称为小叶增生。

[0026] 增生通常采用芯针活检或手术活检来诊断。基于细胞在显微镜下所见,将增生表述为轻度增生、普通增生或非典型增生。轻度增生并不会增加乳腺癌的风险。普通类型的增生(没有异型性),也称为普通型增生,使患癌风险增加至无乳腺异常的女性的乳腺癌风险的约 $1\frac{1}{2}$ 至2倍。非典型增生(非典型导管增生[ADH]或非典型小叶增生[ALH])使乳腺癌风险增加至无乳腺异常的女性的乳腺癌风险的约4至5倍。

[0027] 此外,随着筛查乳房摄影术的广泛采用,乳腺的柱状细胞病变(CCL),包括柱状细胞增生(CCH),已成为乳房活检中的常见发现。接近于已知的癌前变化和癌性变化的CCL的存在表明CCL可能是癌变前的,并且已知CCL和低分级DCIS的高频率发生存在于同一乳房中,且CCL和DCIS通常发生在同一个或相邻的末端导管小叶单位(TDLU)中。由于更晚期的CCL和非典型增生及DCIS在细胞学变化及结构变化上的相似性,提出CCL是非典型乳腺增生和乳腺癌的先兆。

[0028] 乳腺癌

[0029] 乳腺癌通常开始于小叶或导管的细胞中。乳腺癌可能为“混合瘤”,这意味着其包含癌性导管细胞和小叶细胞的混合物。在这类情况下,癌被视为导管癌。如果乳腺中存在多个肿瘤,则将乳腺癌描述为多灶性或多中心的。在多灶性乳腺癌中,所有肿瘤均源自原始肿瘤,并且它们通常位于乳腺的相同区段。如果癌为多中心的,则意味着所有肿瘤均分别形成,并且它们通常位于乳腺的不同区域。

[0030] 侵袭性与非侵袭性:克服乳房摄影术的现有缺点

[0031] 非侵袭性癌停留在乳腺的导管或小叶内。它们没有长入或侵入乳腺之内或之外的正常组织。非侵袭性癌有时被称为原位癌(“在同一个地方”)且很多人认为其为癌前病变(pre-cancer)。

[0032] 侵袭性癌扩张或迁移到正常、健康的组织内。大多数乳腺癌是侵袭性的。癌是非侵

袭性的还是侵袭性的将会影响对其的治疗选择和响应。

[0033] 乳腺癌可以既为侵袭性的又为非侵袭性的。这意味着,癌的一部分已经长入正常组织内,且癌的一部分仍停留在乳导管或乳小叶内。在这样的情况下,这些癌将被视为侵袭性的。

[0034] 在大多数情况下,乳腺癌被分类为以下中的一种:DCIS(原位导管癌);MIC(微侵袭性乳腺癌);MICB和DCIM。DCIS为停留在乳导管内的非侵袭性癌。MIC为DCIS的亚型。它具有小于1.0mm的大小,并且约10%或更少的MIC细胞已经离开导管组织(原始肿瘤部位)。

[0035] LCIS(原位小叶癌):LCIS为停留在小叶内的细胞的过度生长。其表明发展为侵袭性癌的风险增加。IDC(侵袭性导管癌)是乳腺癌最常见的类型。侵袭性导管癌(IDC)虽然从乳导管内开始,但已经长入乳腺内的周围正常组织中。ILC(侵袭性小叶癌)虽然在小叶内开始,但长入乳腺内的周围正常组织中。

[0036] 表2

侵袭性乳腺癌的不同类型和特定形式的患病率和肿瘤特征			
侵袭性乳腺癌的类型	在所有侵袭性乳腺癌中的比例	肿瘤特征	预后
[0037] 侵袭性导管癌(IDC)	50-75%	<ul style="list-style-type: none"> • 硬肿瘤质地 • 肿瘤为不规则的星形 • 细胞特征多变 • DCIS 通常存在 	<ul style="list-style-type: none"> • 预后随肿瘤的分期和分级而不同

侵袭性乳腺癌的不同类型和特定形式的患病率和肿瘤特征			
侵袭性乳腺癌的类型	在所有侵袭性乳腺癌中的比例	肿瘤特征	预后
侵袭性小叶癌 (ILC)	10-15%	<ul style="list-style-type: none"> 正常，略微坚固或坚硬的肿瘤质地 细胞以单行的顺序出现 肿瘤最常见的ER-阳性和HER2/neu-阴性 	<ul style="list-style-type: none"> 预后随肿瘤的分期和分级而不同 对于任何给定的分期或分级，预后类似于IDC的预后 转移的模式与IDC略有不同(更有可能转移到胃肠道)
髓样癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> 软肿瘤 细胞具有片状外观 肿瘤通常为ER-阴性 	<ul style="list-style-type: none"> 在年轻女性和具有BRCA1基因突变的女性中更为常见 目前，预后是比IDC和ILC的预后更好还是与其相似是未知的
[0038]			
粘液(胶体)癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> 软肿瘤 通常没有可触及的肿瘤 细胞由过量的粘液(粘蛋白)包围 肿瘤最常见的ER-阳性和HER2/neu-阴性 	<ul style="list-style-type: none"> 在老年女性中更为常见 倾向于具有良好的预后 癌扩散到淋巴结较不常见
乳头状癌	1-5%	<ul style="list-style-type: none"> 软肿瘤 细胞呈现为指状分支 	<ul style="list-style-type: none"> 在绝经后的女性中更为常见 倾向于具有良好的预后
小管癌	1-5%*	<ul style="list-style-type: none"> 肿瘤通常较小 通常没有可触及的肿瘤 细胞形成管状结构 肿瘤最常见的ER-阳性和HER2/neu-阴性 	<ul style="list-style-type: none"> 预后通常比IDC更好(5年存活率为88%) 癌很少扩散到淋巴结或身体的其他部分

[0039] 分子亚型

[0040] 基因表达概况分析将乳腺癌分为四个主要的生物学上不同的本征亚型：管腔A型、管腔B型、人表皮生长因子受体-2(HER2)过表达型及基底样/三阴性型。这些分子亚型具有

预后和预测价值。不同分子亚群的预后和化疗敏感性不同。

[0041] ER+乳腺癌的特征为在癌细胞的表面上存在雌激素受体。ER+癌细胞的生长与雌激素的利用度有关。针对ER+乳腺癌的治疗选择为阻断雌激素的化疗剂(例如他莫昔芬)。

[0042] HER2+乳腺癌的特征为在癌细胞的细胞表面上有过量的HER2。HER2+癌通常用曲妥珠单抗联合其它化疗剂进行治疗。

[0043] 三阴性乳腺癌是一种特征为细胞缺乏雌激素受体和孕酮受体且其表面上没有过量的HER2蛋白质的乳腺癌。三阴性乳腺癌通常比其它乳腺癌更具侵袭性。由于该肿瘤细胞缺乏雌激素和孕酮受体,因此激素疗法(例如他莫昔芬)是无效的。此外,由于细胞缺乏HER2蛋白质,因此靶向HER2的药物(例如曲妥珠单抗)是无效的。

[0044] 管腔癌

[0045] 大多数乳腺癌为管腔肿瘤。管腔肿瘤细胞看起来像在内衬于乳导管的内部(管腔)细胞中开始的乳腺癌的细胞。

[0046] 管腔A型乳腺癌为ER+和/或PR+、HER2-、低Ki67。约42-59%的乳腺癌为管腔A型。管腔A型肿瘤往往具有低或中等的肿瘤分级。在四个亚型中,管腔A型肿瘤往往具有最好的预后,并具有相当高的存活率和相当低的复发率。仅有约15%的管腔A型肿瘤具有p53突变,p53突变是与预后不良相关的因素。

[0047] 管腔B型乳腺癌为ER+和/或PR+、HER2+(或具有高Ki67的HER2-)。约6-17%的乳腺癌为管腔B型。具有管腔B型肿瘤的女性往往比那些具有管腔A型肿瘤的女性在更年轻的年龄时被诊断出。与管腔A型肿瘤相比,管腔B型肿瘤也往往具有导致预后不良的因素,包括:较差的肿瘤分级、较大的肿瘤大小和p53基因突变。通常,具有管腔B型肿瘤的女性具有相当高的存活率,尽管并不像具有管腔A型肿瘤的女性的存活率那么高。

[0048] 基底样

[0049] 约14-20%的乳腺癌为基底样乳腺癌。基底样乳腺癌与管腔癌的不同之处在于对于免疫表型标志物ER-/PR-/HER2-为三阴性的但表达CK5/6。基底样乳腺癌表现出加重的缺氧和高肿瘤分级,并具有以高细胞增殖和较差的临床结果为特征的侵袭性表型。大多数BRCA1乳腺癌和许多BRCA2乳腺癌为三阴性/基底样两者。与雌激素受体阳性亚型(管腔A型和管腔B型肿瘤)相比,三阴性/基底样肿瘤通常为侵袭性的并具有不良的预后。三阴性/基底样肿瘤通常采用手术、放射疗法和化学疗法的某种组合来治疗。这些肿瘤不能用激素疗法或曲妥珠单抗(Herceptin®)来治疗,因为它们为激素受体阴性和HER2/neu-阴性的。

[0050] 乳腺癌的诊断或预后方法

[0051] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。有需要的个体的乳房病症的这些诊断或预后方法对于具有BI-RADS II-V病变、优选BI-RADS II-IV病变、更优选BI-RADS III-IV病变的个体的诊断或预后特别有用。在一些实施方案中,该方法可用于区分管腔型和基底样乳腺癌。在其它实施方案中,该方法可用于区分癌前病变与癌症、增生与癌症以及侵袭性与非侵袭性癌症。在一些实施方案中,该导管内流体样品包括乳腺流体,全细胞,细胞碎片,细胞膜,导管内流体选定的液体部分、细胞部分或其它固体部分,以及导管内流体的蛋白质、糖蛋白、肽、脂质、糖、寡糖、糖脂类、核苷酸(包括与细胞结合的和无细胞的DNA(例如,cfDNA、线粒体DNA)和与细胞结合

的和无细胞的RNA多核苷酸、无细胞的DNA和无细胞的RNA(例如,mRNA、线粒体RNA和微RNA)和其它类似生物化学组分和分子组分。在一些实施方案中,该方法包括使收集装置与乳房相接触。在一些实施方案中,由乳房摄影装置施加的压力导致导管内流体从乳房中挤出。在一些实施方案中,所挤出流体的量为少于1微升。在一些实施方案中,所挤出流体的量为少于1纳升。在一些实施方案中,所挤出流体的量为1纳升到1皮升之间。在一些实施方案中,所挤出流体的量为1皮升、2皮升、3皮升、4皮升、5皮升、6皮升、7皮升、8皮升、9皮升、10皮升、10皮升到15皮升之间或15皮升到20皮升之间。在一些实施方案中,通过收集装置收集导管内流体样品。在一些实施方案中,对导管内流体样品进行针对乳房病症的生物标志物的筛查。在一些实施方案中,该方法进一步包括清洁乳房的乳头。在一些实施方案中,该方法进一步包括在乳房摄影术之前将催产素施用于该个体。

[0052] 收集装置

[0053] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些实施方案中,该方法包括使收集装置与乳房相接触。在一些实施方案中,通过收集装置收集导管内流体样品。在一些实施方案中,该收集装置是可佩戴的。

[0054] 在一些实施方案中,该收集装置包含固相样品收集介质。在一些实施方案中,该收集装置进一步包含使该装置附接至乳房的乳房接合部件。

[0055] 在一些实施方案中,该固相样品收集介质为吸收性纸。在一些实施方案中,该吸收性纸吸收流体。在一些实施方案中,该吸收性纸与蛋白质结合。在一些实施方案中,该吸收性纸与核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA或其组合结合。在一些实施方案中,该吸收性纸不与细胞结合。

[0056] 在一些实施方案中,所述收集装置包含吸收性纸。在一些实施方案中,该吸收性纸吸收流体。在一些实施方案中,该吸收性纸与蛋白质结合。在一些实施方案中,该吸收性纸与核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA或其组合结合。在一些实施方案中,该吸收性纸不与细胞结合。

[0057] 与本文公开的方法一起使用的吸收性纸(其在本文中也可被称为“膜”)是由适于收集上皮细胞和生物标志物例如蛋白质、碳水化合物、脂质、核酸、RNA、DNA等的任意材料制成的。吸收性纸包括例如由硝化纤维素、微纤维素、混合纤维素酯或其它任何适用于导管内流体样品收集的材料制成的那些吸收性纸。

[0058] 在一些实施方案中,吸收性纸不会对乳头和/或乳晕造成纸切口。在一些实施方案中,吸收性纸成形为避免对乳头和/或乳晕造成纸切口。

[0059] 吸收性纸通过采用金属模具由大的纸料冲压该纸而形成。吸收性纸大到足以覆盖或部分地覆盖乳头。在一些实施方案中,吸收性纸大到足以覆盖乳头。因此,在吸收性纸的任意尺寸上,吸收性纸在其平均尺寸A处的直径或长度可为约1.0英寸至约3.0英寸。吸收性纸的直径可为例如约1.0、约1.1、约1.15、约1.2、约1.25、约1.3、约1.35、约1.4、约1.45、约1.5、约1.55、约1.6、约1.65、约1.7、约1.75、约1.8、约1.85、约1.9、约1.95、约2.0、约2.1、约2.15、约2.2、约2.25、约2.3、约2.35、约2.4、约2.45、约2.5、约2.55、约2.6、约2.65、约2.7、约2.75、约2.8、约2.85、约2.9、约2.95或约3.0英寸。在一些实施方案中,吸收性纸覆盖或部分覆盖乳房的乳晕。在一些实施方案中,吸收性纸覆盖乳房的乳晕。在一些实施方案中,吸

收性纸部分地覆盖乳房的乳晕。在一些实施方案中,吸收性纸覆盖乳头但不延伸到乳房的乳晕。

[0060] 吸收性纸的厚度可以变化,以允许最佳的样品收集,并包括厚度为约0.0001英寸至约0.1英寸的材料。例如,吸收性纸的厚度可为约0.0001、约0.02、约0.03、约0.04、约0.05、约0.06、约0.07、约0.08、约0.09或约0.1英寸。

[0061] 在一些实施方案中,所述固相样品收集介质包括显微镜载玻片、毛细管、收集管、柱、微型柱、孔、板、膜、滤器、树脂、无机基质、珠、颗粒状层析介质、塑料微粒、胶乳颗粒、涂覆的管、涂覆的模板、涂覆的珠、涂覆的基质或其组合。

[0062] 催产素

[0063] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些实施方案中,该方法进一步包括在乳房摄影术之前将催产素或其类似物(包括羧催产素(carbetocin))施用于该个体。在一些实施方案中,该方法进一步包括在乳房摄影术之前将羧催产素施用于该个体。

[0064] 在一些实施方案中,催产素或其类似物,包括羧催产素,刺激腺泡-导管组织的肌上皮收缩,这导致从个体的乳头挤出导管内流体。在一些实施方案中,鼻内施用催产素或其类似物,包括羧催产素。在一些实施方案中,通过肌肉内或血管内注射来施用催产素或其类似物,包括羧催产素。在一些实施方案中,以有效刺激导管内流体从乳头挤出的量施用催产素或其类似物,包括羧催产素。

[0065] 一旦经过足够的施用后时间,从而使催产素能到达并刺激目标腺泡-导管组织,即从乳头直接收集导管内流体。在收集到导管内流体后对该导管内流体进行生物测定,以确定乳房病症的生物标志物的存在和/或量。

[0066] 任何适宜的催产素或其类似物(包括羧催产素)的制剂用于本文公开的方法中。

[0067] 乳房的准备

[0068] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物和/或与特定乳房病症中较好的临床结果有关的标志物如T细胞标志物的筛查。在一些实施方案中,该方法进一步包括清洁乳房的乳头。

[0069] 用任何适当的方法清洁乳头。在一些实施方案中,对乳头进行消毒。在一些实施方案中,从乳头处去除碎屑(例如,角蛋白栓),从而增大对乳头导管的可及性。在一些实施方案中,用含有去角质(dekeratinizing)凝胶的温和磨砂膏(scrub)来擦洗乳头。在一些实施方案中,用去角质剂(exfoliant)擦洗乳头。任何合适的去角质剂均可与本文所公开的方法结合使用。合适的去角质剂的实例包括但不限于微纤维布、粘性剥离片、微珠面部磨砂膏、绉纸、碎杏仁或扁桃壳、糖或盐晶体、浮石以及研磨材料,例如海绵、丝瓜络、刷子、水杨酸、羟基乙酸、水果酶、柠檬酸、苹果酸、 α -羟基酸(AHA)和 β -羟基酸(BHA)。在一些实施方案中,清洁乳头导致乳头导管打开。在一些实施方案中,清洁后乳头导管的直径为约0.1mm到约0.3mm。

[0070] 乳头导管具有环形平滑肌,其倾向于保持导管的管腔闭合。在一些实施方案中,将阿托品或相关的肌肉松弛药如托吡卡胺或苯福林施用至个体。

[0071] 导管内流体的处理

[0072] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些情况下,在收集到乳房摄影术期间获得的导管内流体之后清洗固相样品收集介质。

[0073] 在一些实施方案中,清洗固相样品收集介质去除了附着的干扰物。在一些实施方案中,清洗固相样品收集介质包括使其与缓冲溶液、去污剂或水接触。示例性的去污剂包括但不限于:吐温20(聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯)、吐温80(聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯)、Triton X-100(辛基苯氧基聚环氧乙醇)、TRIzol®(Life Technologies, CA)和十四烷基三甲基溴化铵。在一些实施方案中,如此清洗的流出物利用包括但不限于显微术、免疫细胞化学和流式细胞术的方法来分析。例如,在清洗含有导管内流体样品的吸收性纸或膜以移除任意细胞之后,利用显微术评估该清洗溶液,并确定流出物中的细胞数目。在一些实施方案中,确定存在于流出物中的任何细胞的形态学。在一些实施方案中,针对一种或多种细胞外标志物和/或细胞内标志物对存在于流出物中的细胞进行染色,以确定该细胞是否具有正常的概况(profile)或者是否具有一种或多种指示癌细胞的标志物。例如,可分析细胞中BRCA1、BRCA2、p63、细胞周期蛋白、细胞角蛋白、Her2或任何其它标志物(该标志物可基于其存在、不存在或其水平来指示该细胞为癌细胞或正常细胞)的存在与否。

[0074] 在其它实施方案中,在清洗含有导管内流体样品的吸收性纸或膜后,针对蛋白质、DNA如cfDNA和线粒体DNA以及RNA如无细胞的RNA和微RNA(包括pri-miRNA、pre-miRNA和成熟miRNA)的存在对清洗溶液进行评估。提取DNA或RNA,随后进行进一步的如本文公开的分析。可进行的分析的实例包括但不限于DNA拷贝数变化、染色体畸变、DNA突变(复制、缺失、倒位等)和单核苷酸多态性(SNP)、DNA甲基化、组蛋白甲基化和蛋白质甲基化miRNA表达或特征、凝集素特征变化和微生物组变化的确定。

[0075] 在另一些实施方案中,在清洗含有导管内流体样品的固相收集介质如吸收性纸或膜后,对该固相收集介质进行进一步的如本文公开的分析。

[0076] 在一些实施方案中,在测定之前或与之同时进行初步评估以验证在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的样品来源和/或质量。这类初步评估的重点在于验证从乳房摄影术期间获得的导管内流体收集的样品确实为乳房来源的,并且未被其它潜在的污染物(诸如来自乳头周围皮肤的汗液)所污染。其它用于样品验证的乳腺流体标志物包括但不限于特征性地由正常和癌性乳房上皮细胞表达的细胞角蛋白,以及与人乳脂肪球蛋白(HMFG)的糖蛋白组分相对应的人乳房上皮抗原(HME-Ag)。

[0077] 筛查与分类

[0078] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些实施方案中,尤其是对患有BI-RADS II-IV类的个体,本文公开的方法作为用作乳房摄影术的辅助手段的伴随诊断方法是有用的。相应地,在一些优选的实施方案中,本文公开了对具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间从该个体的乳头获得的导管内流体进行针对与乳房病症相关的至少一种生物标志物的筛查。

[0079] 在其它实施方案中,该方法可用于预测治疗选择、治疗结果如患者复发和疾病复发、存活和对诸如化疗法、激素疗法、放射疗法等疗法的响应。在另一些实施方案中,本文公开的方法可用于监控个体对治疗性处理的响应。

[0080] 可在导管内流体样品中测定的乳房病症标志物包括细胞学、基因突变(包括置换、缺失和倒位)、单核苷酸多态性(SNP)、DNA拷贝数、DNA甲基化模式或特征、组蛋白甲基化模式或特征、microRNA模式、微生物组模式、其它疾病生物标志物或其组合。关于可用于本发明目的的乳房病症标志物的概括性和非全面的综述,参见Hirata等人.Disease Markers,2014,第2014卷,文章ID 513158;Pultz等人.J.Cancer.2014,第5卷,第559-571页;Lari和Keurer,J.Cancer.2011,第2卷,第232-261页,所有这些文献均全文并入本文。

[0081] 在一些实施方案中,所述筛查包括细胞学、免疫组织化学、免疫细胞化学、FISH、ICH、RIA或其任意组合。在一个优选的实施方案中,该筛查包括ELISA。在其它实施方案中,该筛查包括基因、多核苷酸、DNA(包括cfDNA和线粒体DNA)、RNA(包括mRNA、无细胞的或外来体的miRNA和线粒体RNA)、脂肪酸和糖蛋白以及凝集素的扩增、测序、限制性片段长度多态性和微阵列或多重分析。

[0082] 在一些实施方案中,所述扩增通过连接酶链反应(LCR)或聚合酶链反应(PCR)进行,包括但不限于逆转录酶(RT-PCR)、定量PCR(qPCR)、定量RT-PCR(qRT-PCR)、实时PCR、等温PCR、多重PCR、甲基化特异性PCR等。

[0083] 在其它实施方案中,测序为双脱氧测序、反向-终止测序、新一代测序、条码测序、配对末端测序、焦磷酸测序、多重测序、合成测序、杂交测序、连接测序、单分子测序、单分子实时合成测序、亚硫酸氢盐测序、全基因组测序和全外显子组测序。在另一些实施方案中,通过RNA-seq、全转录组鸟枪法测序和mRNA-Seq进行测序。在一些实施方案中,在乳房病症和微生物菌群失衡有关的情况下,优选16S RNA测序。在一些优选的实施方案中,测序为深度测序或超深度测序。

[0084] 本领域技术人员可以认识到,该筛查包括本文公开的方法的任意组合且包括本领域已知的其它方法是在本发明的范围内的。

[0085] 在一些优选的实施方案中,使用导管内流体样品的单个细胞、多个细胞、单个细胞核和多个细胞核进行筛查。在其它优选的实施方案中,对无细胞的导管内流体样品进行筛查。

[0086] 在一些实施方案中,利用亚硫酸氢盐测序、甲基化敏感性PCR、甲基化DNA免疫沉淀(MeDIP)、甲基敏感性单核苷酸引物延伸(MS-SNuPE)、全基因组甲基化概况分析、甲基化敏感性限制酶分析、联合亚硫酸氢盐限制性分析、甲基化特异性量子点荧光共振能量转移(MS-qFRET)、全基因组作图或其组合中的任意一种或多种进行对DNA甲基化的筛查或评估。在一些实施方案中,该DNA甲基化筛查进一步包括微阵列或多重杂交、基因表达、拷贝数分析、新一代测序或其组合。

[0087] 乳导管包含两种类型的上皮细胞,即内管腔细胞和外基底/肌上皮细胞。在一些实施方案中,利用生物标志物表达(例如,通过免疫组织化学染色、通过差异性基因表达、miRNA模式/特征和DNA甲基化模式/特征、组蛋白甲基化模式/特征,等等)、基因分型、确定包括基因突变(缺失、插入、复制和倒位)、SNP等遗传标志物的存在与否来区分管腔型乳腺癌与基底样乳腺癌,区分增生、癌前病变、非侵袭性及侵袭性癌症与转移癌。在一些优选的

实施方案中,利用生物标志物表达(例如,通过免疫组织化学染色、miRNA模式/标记的改变和DNA和/或组蛋白甲基化模式/标记)来区分常见类型的增生与非典型增生、CCL与增生、癌前病变与癌症、侵袭性与非侵袭性癌症,等等。肿瘤蛋白p63(或者转化相关蛋白63)是核转录因子p53家族的成员。p63的存在是基底上皮层的特征。在一些实施方案中,导管内流体样品中p63的存在表明乳腺癌为基底样乳腺癌。

[0088] 细胞角蛋白(CK)5和CK14的存在是基底上皮层的特征。在一些实施方案中,导管内流体样品中CK5和CK14的存在表明乳腺癌为基底样乳腺癌。另外,CK5和CK14的存在是祖细胞和肌上皮细胞的特征。在一些实施方案中,导管内流体样品中CK5和CK14的存在表明该细胞为肌上皮细胞或祖细胞。

[0089] CK7和CK18的存在是管腔上皮层的特征。在一些实施方案中,导管内流体样品中CK7和CK18的存在表明乳腺癌为管腔乳腺癌。

[0090] 普通型导管增生表现出具有CK5/14和CK7/18两者的表达的管腔染色模式。在肌上皮的细胞核中观察到残留的p63。在一些实施方案中,CK5、CK14、CK7和CK18的存在表明增生为普通型导管增生。

[0091] 非典型导管增生或原位导管癌表现出分化的腺体免疫表型(CK7/CK18阳性),但除肌上皮外为CK5/14-阴性。在一些实施方案中,CK7/CK18的存在及CK5/14的缺失表明增生为非典型导管增生。

[0092] 侵袭性乳腺病变根据肌上皮细胞(CK5/14和/或p63)的数目减少或缺失及腺上皮细胞(CK7/18)的存在来鉴定。在一些实施方案中,在疑似乳腺癌的情况下,减少的或应激下(under-stress)的肌上皮细胞的存在指示了向浸润性的(infiltrating)状态及可能侵袭性的(invasive)状态的转变。原发性乳腺癌表现出管腔(导管壁)细胞数目的增加和肌上皮细胞数目的减少。随着乳腺癌从原位的逐步发展成浸润性的,最后发展成侵袭性的,肌上皮细胞的相对数目减少。如果发现比管腔细胞的正常数目大,则提示肌上皮细胞的数目正在减少,并值得关注。在一些实施方案中,肌上皮细胞的缺失或数目减少及腺上皮细胞的存在表明病变是侵袭性的。

[0093] 在一些实施方案中,通过免疫组织化学来确定生物标志物表达。在一些实施方案中,该免疫组织化学法是直接法。在一些实施方案中,从结合乳房摄影术获得的导管内流体样品中分离出的细胞与能结合靶抗原(例如,p63、CK5、CK7、CK14、CK18、ER、PR、Her-2、Ki67、uPA、PAI-1和半乳糖-N-乙酰半乳糖胺(Gal-GalNAc))的标记抗体接触。任何合适的标记物均与本文所公开的方法结合使用。在一些实施方案中,该标记物为染料(或染色剂)。在一些实施方案中,针对各种抗体使用不同的染料。在一些实施方案中,对于能与存在于相同细胞类型中的生物标志物结合的抗体使用相同的染料。例如,对于能与存在于管腔乳腺癌细胞中的生物标志物(CK7/18)结合的抗体使用第一染料,而对于能与存在于基底乳腺癌细胞中的生物标志物(CK5/14和p63)结合的抗体使用第二染料。

[0094] 在一些实施方案中,所述免疫组织化学法是间接法。在一些实施方案中,从导管内流体样品中分离的细胞与未标记的第一抗体接触且与靶抗原(例如,p63、CK5、CK7、CK14、CK18)结合,并且被标记的第二抗体与该第一抗体结合。在一些实施方案中,第一抗体与生物标志物(例如,CK5、CK7、CK14、CK18或p63)结合。在一些实施方案中,辣根过氧化物酶(HRP)第二抗体与能结合CK5/14和p63的抗体结合。在一些实施方案中,碱性磷酸酶(AP)第

二抗体与能结合CK7/18的抗体结合。在一些实施方案中,基于第一抗体的物种来源,产生可与该第一抗体反应的第二抗体,例如,如果第一抗体为小鼠抗体,则第二抗体将为,例如,兔抗小鼠抗体。在优选的实施方案中,使用缀合的山羊抗小鼠多聚碱性磷酸酶(AP)和缀合的山羊抗兔多聚辣根过氧化物酶(HRP)作为第二抗体,并与小鼠及兔IgG上的重链和轻链反应。

[0095] 在一些实施方案中,色原(例如,3,3'-二氨基联苯胺(DAB))与HRP结合并产生显色反应产物。在色原为DAB的情况下,色原反应产物为棕色。当色原为贝久紫(Ba joran Purple)时,色原反应产物为薰衣草紫。

[0096] 在一些实施方案中,色原(例如,固红(FR))与AP结合,并产生显色反应产物。在色原为FR的情况下,色原反应产物为红色或粉红色。在一些实施方案中,从导管内流体样品中分离的细胞在与第一抗体接触之前与过氧化物封闭剂接触。在色原为佛瑞吉蓝(Ferangi Blue)的情况下,色原反应产物为明亮的宝蓝色。

[0097] 在一些实施方案中,对细胞进行复染色。在一些实施方案中,采用苏木精、核固红、甲基绿或甲基蓝对细胞进行复染色。

[0098] 在某些实施方案中,本文公开了将乳腺癌分类为基底样乳腺癌的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7和CK18的抗体相接触;以及(b)如果CK5和CK14抗体与细胞结合,则将该癌症分类为基底样的。在一些实施方案中,将乳腺癌分类为基底样乳腺癌的方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的抗体相接触;以及(b)如果CK5、CK14及p63抗体与在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞结合,则将该癌症分类为基底样的。

[0099] 在某些实施方案中,本文公开了将乳腺癌分类为管腔型的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果(i)抗CK7和抗CK18第一抗体与所述多个细胞结合,并且(ii)抗CK5、抗CK14和抗p63第一抗体不与在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞结合,则将该癌症分类为管腔型。

[0100] 在某些实施方案中,本文公开了将增生分类为普通型导管增生的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果CK5、CK14、CK7、CK18和p63第一抗体与在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞结合,则将该增生分类为普通型导管增生。

[0101] 在某些实施方案中,本文公开了将增生分类为非典型导管增生的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果(i)CK7和CK18第一抗体与在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞结合,则将该增生分类为非典型导管增生。在一些实施方案中,本文公开了将增生分类为非典型导管增生的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果CK5、CK15和p63与在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞结合,则将该增生分类为非典型导管增生。

[0102] 在某些实施方案中,本文公开了将乳腺癌分类为侵袭性的方法,该方法包括:(a)

使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果结合CK5、CK14和p63第一抗体的细胞与结合CK7和CK18第一抗体的细胞的比值小于或等于侵袭性对照,则将该癌症分类为侵袭性的。在一些实施方案中,导管内流体样品中没有细胞结合CK5、CK14和p63。

[0103] 在某些实施方案中,本文公开了将乳腺癌分类为非侵袭性的方法,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的多个细胞与能结合CK5、CK14、CK7、CK18和p63的第一抗体相接触;以及(b)如果结合CK5、CK14和p63第一抗体的细胞与结合CK7和CK18第一抗体的细胞的比值大于或等于非侵袭性对照,则将该癌症分类为非侵袭性的。

[0104] 本文公开了检测乳房病症的方法,该方法包括使源自于在乳房摄影术期间从个体收集的导管内流体样品的细胞与能结合uPA、PAI-1及Gal-GalNAc的抗体相接触。在一些优选的实施方案中,检测乳房病症的方法包括使源自于在乳房摄影术期间从具有BI-RADS II、BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体收集的导管内流体样品的细胞与能结合uPA、PAI-1和Gal-GalNAc的抗体相接触。

[0105] 在一些实施方案中,所述方法包括使导管内流体样品与针对色氨酸降解酶如吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO-1)、吲哚胺2,3-双加氧酶-2(IDO-2)、酪氨酸2,3-双加氧酶(TDO)或其组合中的任意一种或多种的抗体相接触。IDO-1、IDO-2和TDO活性参与通过Tregs调节T细胞活性、调节癌症受试者中的免疫抑制以及赋予肿瘤免疫抗性。据称IDO-1、IDO-2和TDO有助于肿瘤逃逸。因此,本文所公开的方法可用于将乳腺癌分类为侵袭性的,该方法包括:(a)使在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品中的一个或多个细胞与能结合IDO-1、IDO-2、TDO或其组合的第一抗体相接触;以及(b)如果结合IDO-1、IDO-2、TDO或其组合的细胞的比例大于或等于非侵袭性对照,则将该癌症分类为侵袭性的。在一些优选的实施方案中,检测乳房病症的方法包括使源自于在乳房摄影术期间从具有BI-RADS II、BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体收集的导管内流体样品的细胞与能结合IDO-1、IDO-2、TDO或其组合的抗体相接触。

[0106] 在一些实施方案中,在收集导管内流体样品后,清洗吸收性纸,收集流出物,并评估流出物中的细胞数。在一些实施方案中,在样品无细胞的情况下,将患者鉴定为患乳腺癌的风险低。在一些实施方案中,在样品包含一个细胞的情况下,将患者鉴定为患乳腺癌的风险低,并且任选地分析细胞中的生物标志物表达。在一些实施方案中,在样品包含2个或更多多个细胞的情况下,将患者鉴定为存在患乳腺癌的风险,并且分析细胞中的生物标志物表达。

[0107] 在一些实施方案中,采用任何适当的方法分析所述样品中的细胞(如果有的话)的细胞学,该方法包括但不限于:显微术、流式细胞术、免疫组织化学或其组合。在一个非限制性的实例中,细胞样品可采用苏木精和曙红进行染色。

[0108] 在一些实施方案中,采用本文中描述的方法测量的蛋白质为样品中的总蛋白质含量。在一些实施方案中,使吸收性纸暴露于胶体金或胶体银,并采用任何适宜的方法来测定总蛋白质含量(浓度)。在一些实施方案中,在接触个体的乳房前,吸收性纸预负载或预涂覆有胶体金或胶体银。在此方面使用的术语“胶体金属颗粒”意在包括颗粒的分散体,优选溶胶,其由金属、金属化合物或涂覆有金属或金属化合物的核组成。本文中使用的术语“金胶体”和“胶体金组合物”是指亚微米大小的金颗粒均匀地分散在流体(例如,水或水性缓冲

液)中的悬浮液。在定量分析中使用的胶体金组合物含有高度浓缩的金颗粒。在一个实例中,该胶体金组合物具有 3.5×10^{12} 至 7.0×10^{12} 个颗粒/毫升,例如 $(3.5-5.25) \times 10^{12}$ 个颗粒/毫升的金颗粒浓度。

[0109] 在一些实施方案中,测定在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的总蛋白质浓度,并且如果该样品的总蛋白质浓度大于300ng,则将患者鉴定为需要进一步的乳腺癌评估。在一些实施方案中,测定在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的总蛋白质浓度,并且如果该样品的总蛋白质浓度等于或低于200ng蛋白质,则将患者鉴定为患乳腺癌的风险低。在一些实施方案中,测定在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的总蛋白质浓度,并且如果该样品的总蛋白质浓度为约300ng到约2ug,则将患者鉴定为患乳腺癌的风险升高。

[0110] 在一些实施方案中,如果在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品包含约50pg至约0.5ng蛋白质,并且不含细胞,则将患者鉴定为患乳腺癌的风险低。

[0111] 在一些实施方案中,如果在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品含有至少约300ng蛋白质以及两(2)个或更多个细胞,则将患者鉴定为需要进一步的乳腺癌评估或者诊断为患乳腺癌的风险中等或高。在一些实施方案中,在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的细胞部分包含约2个细胞到约50个细胞。在一些实施方案中,在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的细胞部分包含至少十(10)个细胞。

[0112] 在一些实施方案中,该导管内流体样品包含miRNA。在一些实施方案中,miRNA为无细胞的或外来体的。在一些实施方案中,对导管内流体样品进行筛查包括确定该导管内流体样品中一种或多种miRNA的存在和/或水平、对miRNA特征进行概况分析,或其组合。在一些实施方案中,miRNA包括oncomir、肿瘤抑制物miRNA或其组合。本领域技术人员将会认识到,miRNA模式或特征可包括oncomiR和肿瘤抑制物miRNA两者,并且相比于未患乳房病症的个体,此特征在患有乳房病症的个体中可能改变。在一些实施方案中,在患有乳房病症的个体的一只或两只乳房中miRNA特征可能改变。在某些实施方案中,对导管内流体样品进行筛查,以将包含至少一种能够与该导管内流体样品中的miRNA的至少一部分结合的寡核苷酸探针或引物的个体予以分层或分类。在其它实施方案中,对导管内流体样品进行筛查,以将包含多种能够与该导管内流体样品中的miRNA的至少一部分结合的寡核苷酸探针或引物的个体予以分层或分类。在其它实施方案中,对导管内流体样品进行筛查,以将具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体进一步分类。

[0113] 在一些实施方案中,本发明公开了用于将个体分类为患有乳房病症的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体样品;b)检测该导管内流体中一种或多种选自表3、表4、表5或其组合的miRNA的存在,其中在该miRNA具有高于miRNA阈值的测量值时检测到该miRNA的存在;以及c)如果所检测的miRNA具有高于所述阈值的测量值,则将该个体分类为患有乳房病症。

[0114] 在一些实施方案中,本发明公开了用于将个体分类为患有乳房病症的方法,该方法包括:a)从经历乳房摄影术的个体的乳头获取导管内流体样品;b)检测该导管内流体中一种或多种选自表3、表4、表5或其组合的miRNA的存在的减少,其中在miRNA具有低于miRNA阈值的测量值时检测到该miRNA的存在的减少;以及c)如果所检测的miRNA具有低于所述阈值的测量值,则将该个体分类为患有乳房病症。

[0115] 表3乳房病症中改变的miRNA

[0116]

柱状细胞增生	表达
上皮细胞	
Let-7c	下
miR-27a	下
miR-92a	下

	miR-383	下
	miR-202	下
	miR-107	下
	miR-141	下
	miR-183	上
	miR-454	上
	柱状细胞增生	表达
	基质细胞	
	miR-650	下
	miR-335	下
	miR-566	下
	miR-497	下
	miR-27a	下
[0117]	miR-204	下
	miR-20a	下
	miR-132	上
	miR-539	上
	miR-221	上
	非典型导管增生	表达
	miR-21	上
	miR-183	上
	miR-200c	上
	miR-200b	上
	miR-638	下
	miR-572	下
	miR-671-5p	下
	miR-30d	上

	miR-1275	下
	miR-15b	上
	miR-644	上
	miR-141	上
	DCIS	
	miR-195	下
	miR-557	下
	miR-1207-5p	下
	miR-874	下
	miR-556-3p	上
	IDC	
[0118]	miR-933	下
	miR-141	上
	miR-96	上?
	miR-638	下
	miR-575	下
	Let-7f	上
	miR-15a	上
	miR-671-5p	下
	miR-20a	上
	miR-1202	下
	miR-183	上
	miR-143	上
	miR-19b	上
	miR-1915	下
	miR-107	上
	miR-21	上

	miR-1274b	上
	miR-1268	下
	miR-200b	上
	miR-106b	上
	miR-634	下
	miR-129	下
	miR-572	下
	miR-933	下
	miR-17	上
	miR-29b	上
[0119]	miR-877	上
	miR-425	上
	miR-181a	下
	miR-193a	下
	miR-193b	下
	miR-145	下
	miR-17-5p	下
	miR-20a	下
	miR-30b	上
	miR-30d	上

[0120] 表4乳房病症中的肿瘤抑制物miRNA

细胞生长/增殖	侵袭/转移
miR-34a	miR-340
miR-17-5p	miR-34a
miR-125b	miR-145
miR-146a	miR-183
miR-128	miR-17
	miR-20

[0121]

	细胞存活	miR-26a
	miR34a	
[0122]	免疫识别	血管生成
	miR-322	miR-145
	miR-93	miR519c
	miR-181a	miR340

[0123] 在一些实施方案中,利用任何本领域已知的PCR方法来检测miRNA的存在。此类PCR方法包括但不限于RT-PCR、实时PCR、半定量PCR、qPCR、多重PCR或等温PCR。在其它实施方案中,可通过与可包含在微阵列或生物芯片上或杂交溶液中的一种或多种miRNA探针杂交来检测miRNA。在一些优选的实施方案中,可通过miRNA微阵列或多重杂交和分析来测定miRNA特征。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA探针可附接于固相样品收集介质(诸如多重中或微阵列上)。在一些实施方案中,该miRNA探针可附接至由诸如玻璃、改性或功能化玻璃、塑料、尼龙、纤维素或硝化纤维素纸、树脂、二氧化硅或硅基材料等材料制成的固相样品收集介质。该miRNA探针可共价地或非共价地附接至固相样品收集介质。

[0124] 诊断或预后可基于与来自患有乳房病症的受试者的样品相比,来自正常受试者的导管内流体样品中的miRNA的差异性表达。

[0125] 在一些实施方案中,用于将个体分类为处于患CCH、ADH、DCIS或IDC的风险中或具有CCH、ADH、DCIS或IDC的方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体,以及b)检测至少一种选自表3的miRNA的改变的表达。

[0126] 在一些实施方案中,用于将个体分类为具有柱状细胞增生的方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体,以及b)检测选自表3的miRNA的改变的表达。将个体分类为具有CCH的优选实施方案包括对在乳房摄影术期间从具有BI-RADS II、BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的该个体的导管内流体样品中选自Let-7c、miR-27a、miR-92a、miR-383、miR-202、miR-107、miR-141、miR-183、miR-454、miR-650、miR-335、miR-566、miR497、miR-27a、miR-204、miR-20a、miR-132、miR-539和miR-221的至少一种或多种miRNA进行筛查。Let-7c、miR-27a、miR-92a、miR-383、miR-202、miR-107、miR-141、miR-183和/或miR-454的改变的表达将指示上皮细胞的CCH,而miR-650、miR-335、miR-566、miR497、miR-27a、miR-204、miR-20a、miR-132、miR-539和/或miR-221的改变的表达将指示基质来源的CCH。

[0127] 在一些实施方案中,用于将个体分类为具有非典型导管增生的方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体,以及b)检测至少一种选自表3的miRNA的改变的表达。将个体分类为具有ADH的优选实施方案包括对在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的该个体的导管内流体样品中选自miR-21、miR-183、miR-200c、miR-200b、miR-638、miR-572、miR-671-5p、miR-30d、miR-1275、miR-15b和miR-644的至少一种或多种miRNA进行筛查。

[0128] 在一些实施方案中,用于将个体分类为具有DCIS的方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体,以及b)检测至少一种选自表3的miRNA的改变的表达。将个体分类为具有DCIS的优选实施方案包括对在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的该个体的导管内流体样品中选自miR-195、miR-557、miR-554、miR-1207-5p、miR-874、miR-556-3p和miR-556-3p的至少一种或多种miRNA进行筛查。

[0129] 在一些实施方案中,用于将个体分类为具有IDC的方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体,以及b)检测至少一种选自表3的miRNA的改变的表达。将个体分类为具有IDC的优选实施方案包括对在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的该个体的导管内流体样品中选自miR-933、miR-141、miR-96、miR638、miR-575、Let-7f、miR-15a、miR-671-5p、miR-20a、miR-1202、miR-183、miR-141、miR-19b、miR-1915、miR-107、miR-21、miR-1274b、miR-1268、miR-200b、miR-106b、miR-634、miR-129、miR-572、miR-933、miR-17、miR-29b、miR-877、miR-425、miR-23b、miR-193a、miR-193b、miR-181a、miR-143、miR-145、miR-17-5p、miR-20a、miR-30b和miR-30d的至少一种或多种miRNA进行筛查。

[0130] 公开于表4中的肿瘤抑制物miRNA的靶标与乳腺癌有关,并且是本领域已知的(*Modulation of Cancer Traits by tumor Suppressor microRNAs*. Grammatikakis, I. 等人. *Int.J.Mol.Sci.* 2013, Vol 14, 第1822-1842页; *microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling*. Yu等人. *Proc.Natl.Acad.Sciences.* 2010, vol. 107 (18), 第8231-8236页, 每一篇均全文并入本文)。本领域技术人员将会认识到,此类靶标落入本发明的范围内,并且本文公开的方法包括此类靶标作为乳房病症的生物标志物。

[0131] 表5与侵袭性乳腺癌中改变的靶标表达相关的miRNA

	uPA	PAI-1	GalNAc 转移酶	IDO-1
[0132]	miR-23b (下)	miR-143	miR-30b (上)	miR-181a (下)
	miR-193a (下)	miR-145	miR-30d (上)	
	miR-193b (下)	miR-17-5p (下)	miR-548a-3p	
	miR-181a (下)	miR-20a (下)	miR-183*	
			miR-124	
			miR-29a*	
			miR-506	
			miR-3143	
			miR-4324	
			miR-569	

[0133]		miR-548e	
		miR-491-3p	
		miR-3672	
		miR-544b	
		miR-135b	
		miR-2117	
		miR-590-3p	
		miR-378*	
		miR-135a	

[0134] 在一些实施方案中,将经历乳房摄影术的个体分类为处于患乳腺癌(CCH、ADH、DCIS、IDC或LCIS)的风险中或患有乳腺癌(CCH、ADH、DCIS、IDC或LCIS)的方法包括在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体样品,并对个体中调节uPA、PAI-1和Gal-GalNAc表达的、列于表5中的miRNA的改变的表达进行筛查。在一些优选实施方案中,还对列于表5中的调节IDO1表达的miRNA的表达进行了筛查。优选的实施方案包括对在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的该个体的导管内流体样品中调节uPA、PAI-1和Gal-GalNAc转移酶表达的选自miR-23b、miR193a、miR193b、miR181a、miR143、miR145、miR-17-5p、miR-20a、miR30b和miR-30d的miRNA的改变的表达进行筛查。在一些优选实施方案中,还对调节IDO-1的miRNA 181a进行筛查。在一些实施方案中,用于将受试者分类为患有管腔A型乳腺癌的方法包括:a)从经历乳房摄影的受试者的乳头获取导管内流体样品,以及b)检测至少一种选自miR-29a、miR181a和miR-652的miRNA的改变的表达。

[0135] 在一些实施方案中,将受试者分类为处于患侵袭性乳腺癌的风险中或患有侵袭性乳腺癌的方法包括从经历乳房摄影术的受试者处获取导管内流体样品,并对调节uPA、PAI-1和Gal-GalNAc转移酶的miRNA的改变的特征进行筛查。GalNac转移酶3、6和7为优选的GalNAc转移酶。更优选的GalNac转移酶为 β 1→3半乳糖基转移酶,诸如B3GALT1和B3GALT5。此类方法包括对上调uPA、PAI-1和Gal-GalNac表达的改变的miRNA特征进行筛查。在一些实施方案中,该方法包括对调节IDO-1、IDO-2、TDO或其组合的miRNA的改变的特征进行筛查。已知IDO1和IDO-2及TDO有助于肿瘤逃逸并且与癌症相关的免疫抑制有关。在一些实施方案中,该方法包括对调节uPA、PAI-1、GalNac转移酶和IDO-1的miRNA的改变的特征进行筛查。相应地,在一些优选的实施方案中,用于将受试者分类为处于患侵袭性乳腺癌的风险中或患有侵袭性乳腺癌的方法包括:a)从经历乳房摄影术的受试者处获取导管内流体样品,以及b)检测miR-23b、miR193a、miR-193b、miR-181a、miR-143、miR-145、miR-17-5p、miR-20a、miR-548a-3p、miR-183*、miR-124、miR-29a*、miR-506、miR-3143、miR-4324、miR-569、miR-548e、miR-491-3p、miR-3672、miR-544b、miR-135b、miR-2117、miR-590-3p、miR-378*、miR-135a、miR30b和miR-30d的改变的水平。miR193a、miR-193b和miR-181a水平的降低以及miR30b和miR-30d水平的升高会指示升高的侵袭性乳腺癌风险。

[0136] 在一些实施方案中,miR-21、miR-494和miR-183的存在增加或上调会指示癌症转移或癌症进展的风险升高和/或不良预后。在其它实施方案中,let-7a、let-7b和let-7c及miR-1308的上调会指示乳房病症的转移潜能。在一些优选的实施方案中,miR-200家族的miRNA成员如miR-200b和miR-200c是优选的诊断、预后和/或预测性转移疾病标志物。

[0137] 在一些实施方案中,本文公开了将个体分类为具有乳房病症的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从个体的乳头获取导管内流体样品;b)利用该导管内流体样品评估该个体的DNA甲基化特征;以及c)根据该个体的DNA甲基化特征将个体分类为具有乳房病症。在一些实施方案中,根据导管内液体样品中的DNA甲基化特征将个体分类为具有管腔A型、管腔B型或基底样乳腺癌的乳房病症。在其它实施方案中,根据特定基因的DNA甲基化特征,可将个体诊断或预后为具有低存活率和/或复发的风险或具有低存活率和/或复发。

[0138] 在一些实施方案中,个体具有至少一种或多种列于表6中的基因的DNA过甲基化。

[0139] 在一些实施方案中,个体具有至少一种或多种易于DNA甲基化的基因的DNA低甲基化。例如,但不限于,诸如uPA和PAI-1的基因的低甲基化或脱甲基化将指示升高的乳腺癌风险。

[0140] 在一些优选的实施方案中,是对具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体样品;以及b)利用该导管内流体样品评估该个体的DNA甲基化特征。

[0141] 可用于本发明目的的全基因组和特定基因DNA甲基化概况分析的方法是本领域已知的,包括以上提供的此类方法的非穷尽列举。在一些实施方案中,对DNA甲基化的筛查或评估通过亚硫酸氢盐测序、甲基化敏感性PCR、甲基化DNA免疫沉淀(MeDIP)、甲基化敏感性单核苷酸引物延伸(MS-SNuPE)、全基因组甲基化概况分析、甲基化敏感性限制酶分析、联合亚硫酸氢盐限制分析、甲基化特异性量子点荧光共振能量转移(MS-qFRET)、全基因组作图或其组合来进行。在一些实施方案中,优选的评估方法为全基因组DNA甲基化概况分析。DNA甲基化概况分析方法是本领域已知的(Dedeurwaerder等人.EMBO Molecular Medicine, 2011)。此类分析的商业资源是可得的,例如 Illumina Infinium Human Methylation27Bead芯片(Illumina)。

[0142] 表6用于DNA甲基化模式/特征分析的靶基因

	ABCA3	GSTP1	UAP1L1	RASSF1	FZD9	PTGS2
[0143]	COX7A1	PTPRO	SYDE1	B3GALT5	B4GALT3	B4GALT7
	SST	RECK	UGT3A2	SCGB3A1	FGFP3	GAS7
	CDKL2	ACADL	TNFRSF10D	HDAC9	HOXA11	MME

[0144]	ZNF154	SFRP2	C1orfF114	POMC	RBP1	BCR
	APC	ITR	COL1A2	C4B	DAB21P	MEST
	CCND2	UGT3A1	SIT1	RARA	SEPT5	TFF1
	LAX1	HCLS1	CD3D	THY1	SERPINA5	ASCL2
	ICOS	CD6	CD79B	DLK1	EYA4	HOXA5
	LCK	CCL5	UBASH3A	HOXA9	HOXB13	IHH
	CD3G	Gal-NAc 转 移酶	B3GALT1	IPF1	ISL1	PAV6
	B3GALT5	uPA	PAI-1	TBX1	SOX1	SOX17
	MUC1	P16	FABP3	CDH17	EWPHX1	B3GALT1
	APC	BIN1	BRCA1	B3GALT5	B4GALT3	B4GALT7
	BRCA2	CST6	GSTP1	TIMP3	P21	PTEN

[0145] 在某些实施方案中,本文公开了将个体分类为乳腺CpG岛甲基化表型(B-CIMP)的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体;以及b)表征该个体的CpG岛甲基化表型;其中如果将该个体表征为B-CIMP,则认为该个体具有较低的乳腺癌转移风险和/或提升的存活率。将个体的表型表征为B-CIMP的方法是本领域已知的(Fang,F等人,Sci Transl Med. 2011,3:75ra25)。

[0146] 在一些实施方案中,本文公开了将个体分类为具有乳房病症的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体样品;并且b)利用该导管内流体样品确定该个体的DNA甲基化表型;以及c)将该个体的DNA甲基化特征表征为乳腺CpG岛甲基化表型,其中如果将该个体分类为具有乳腺CpG岛甲基化表型,则认为该个体具有较低的乳腺癌转移风险和/或提升的存活率。

[0147] 在一些实施方案中,是用于将个体分类为处于患管腔型乳腺癌的风险中或患有管腔型乳腺癌的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体样品;以及b)确定一种或多种选自RASSF1、FZD9、PTGS2、MME、HOXA9、PAX6、SCGB3A1、FABP3、FGFP3、GAS7、HDAC9、HOXA11、MME、PAX6、POMC和RBP1的基因的DNA甲基化状态,其中如果该基因是过甲基化的,则将该个体表征为处于患管腔型乳腺癌的风险中或患有管腔型乳腺癌。

[0148] 在一些实施方案中,是用于将个体分类为处于患基底样乳腺癌的风险中或患有基底样乳腺癌的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体样品;以及b)确定一种或多种选自CDH17、EWPHX1、TFF1、RARA、MEST、BCR、C4B、SEPT5、SERPINA5和THY1的基因的DNA甲基化状态,其中如果该基因是过甲基化的,则将该个体表征为处于患管腔型乳腺癌的风险中或患有管腔型乳腺癌。

[0149] 在一些实施方案中,是用于将个体分类为处于患管腔型乳腺癌的风险中或患有管腔型乳腺癌的方法,该方法包括:a)在乳房摄影术期间从该个体的乳头获取导管内流体样品;以及b)确定uPA和PAI-1的DNA甲基化状态,其中如果这些基因是低甲基化的,则将该个

体表征为处于患管腔型乳腺癌的风险中或患有管腔型乳腺癌。

[0150] 其它优选的实施方案包括利用在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的导管内流体样品对该个体中的ACADL、RECK和SFR2的改变的DNA甲基化进行评估。个体中一种或多种ACADL、RECK和SFR2基因的增加的DNA甲基化会指示升高的复发风险和/或较差的存活率。在一些优选的实施方案中包括利用在乳房摄影术期间从具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的乳头获取的导管内流体样品对该个体中的uPA和PAI-1基因的改变的DNA甲基化进行评估。uPA和PAI-1基因的低甲基化会指示升高的乳腺癌风险。

[0151] 治疗方法

[0152] 在某些实施方案中,本文公开了对有需要的个体的乳房病症进行诊断或预后的方法,该方法包括对在乳房摄影术期间获得的该个体的乳房的导管内流体样品进行针对乳房病症标志物的筛查。在一些实施方案中,该方法进一步包括根据筛查结果来确定针对受试者的治疗疗程。在一些实施方案中,该方法包括确定针对具有BI-RADS III或BI-RADS IV病变的个体的治疗疗程。在一些实施方案中,医疗人员根据筛查结果为个体制定治疗方案。在一些实施方案中,该治疗方案包括治疗剂、放射疗法和/或手术切除乳房组织。在一些实施方案中,该治疗方案包括多种治疗剂。

[0153] 在一些实施方案中,该治疗剂为蒽环类(例如,多柔比星或表柔比星)、铂剂、紫杉烷(例如,紫杉醇或多烯紫杉醇)或其组合。在一些实施方案中,该治疗剂为ado-曲妥珠单抗emtansine、白蛋白结合型紫杉醇、阿那曲唑、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、多烯紫杉醇、盐酸多柔比星、盐酸表柔比星、艾立布林、依维莫司、依西美坦、氟尿嘧啶、氟维司群、盐酸吉西他滨、醋酸戈舍瑞林、伊沙匹隆、二甲苯磺酸拉帕替尼、来曲唑、脂质体多柔比星、醋酸甲地孕酮、氨甲喋呤、米托蒽醌、紫杉醇、帕米膦酸二钠、培妥珠单抗、雷洛昔芬、他莫昔芬、托瑞米芬、曲妥珠单抗、长春瑞滨或其组合。

[0154] 在一些实施方案中,该治疗剂为SERM、SERD、AI、其药用盐或其组合。在一些实施方案中,该SERM选自他莫昔芬、顺式他莫昔芬、4-羟基他莫昔芬(4-OHT)、内昔芬(endoxifen)、去甲基他莫昔芬(desmethyltamoxifen)、拉索昔芬(lasofoxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、苯并噻吩(benzothiophene)、苯卓昔芬(bazedoxifene)、阿佐昔芬(arzoxifene)、米波昔芬(miproxifene)、左美洛昔芬(levormeloxifene)、屈洛昔芬(droloxiifene)、氯米芬(clomifene)、艾多昔芬(idoxifene)、托瑞米芬(toremifene)、EM652和ERA-92。优选地,在一些实施方案中,该治疗剂为他莫昔芬或他莫昔芬衍生物(诸如4-羟基他莫昔芬、N-去甲基他莫昔芬、内昔芬和顺式他莫昔芬)。在一些实施方案中,该SERD包括氟维司群(fulvestrant)、ARN-810或CH4986399。在一些实施方案中,该AI选自阿那曲唑(anastrozole)、依西美坦(exemestane)和来曲唑(letrozole)。在一些实施方案中,所述多种治疗剂包括SERD、SERM、AI、其药用盐或其组合。在一些实施方案中,该治疗剂包括至少一种ω-3脂肪酸和至少一种维生素D化合物。

[0155] 在一些实施方案中,该治疗剂为丁酸。在一些实施方案中,该治疗剂为多柔比星。在一些实施方案中,该治疗剂为表柔比星。在一些实施方案中,该治疗剂为紫杉醇。在一些实施方案中,该治疗剂为多烯紫杉醇。

[0156] 在一些实施方案中,该治疗剂为本文公开于表3、表4、表5或其组合中的抗肿瘤抑

制物miRNA的沉默剂(silencer)。此类抗肿瘤抑制物miRNA的非限制性实例为p63。在其它实施方案中,该治疗剂为本文公开于表3、表4、表5或其组合中的oncomiR的激活剂。在一些实施方案中,该治疗剂基于本文公开的miRNA的人类或非人类序列。在一些实施方案中,miRNA的抑制剂为反义寡核苷酸。反义寡核苷酸可包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或其组合。反义核苷酸可具有一种或多种化学修饰,例如,糖修饰或骨架修饰。

[0157] 在一些实施方案中,该治疗剂为如本文所公开的乳房病症中过甲基化的基因的DNA过甲基化抑制剂。本领域技术人员将认识到,DNA过甲基化的抑制将降低与乳房病症有关的某些基因的基因沉默效应。在其它实施方案中,该治疗剂为DNA甲基化激活剂或DNA甲基化剂。在这样的情况下,参与细胞增殖和肿瘤形成的基因将沉默或表达减少。

[0158] 在一些实施方案中,该治疗剂为联合疗法。当施用联合疗法时,每种药剂可与其它任何药剂联合(例如,同时)施用或单独施用。进一步地,所有药剂均可根据请求保护的方法予以施用。或者,一些药剂可根据请求保护的方法予以施用,而其它药剂则全身施用。

[0159] 在一些实施方案中,该联合疗法为CAF:环磷酰胺、多柔比星和5-FU。在一些实施方案中,该联合疗法为TAC:多烯紫杉醇、多柔比星和环磷酰胺。在一些实施方案中,该联合疗法为AC→T:多柔比星和环磷酰胺,继以紫杉醇或多烯紫杉醇。在一些实施方案中,该联合疗法为FEC:→T:5-FU、表柔比星和环磷酰胺,继以多烯紫杉醇或紫杉醇。在一些实施方案中,该联合疗法为TC:多烯紫杉醇和环磷酰胺。在一些实施方案中,该联合疗法为TCH:多烯紫杉醇、卡铂和曲妥珠单抗,其用于HER2/neu阳性肿瘤。在一些实施方案中,该联合疗法为CMF:环磷酰胺、氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶。在一些实施方案中,该联合疗法为A→CMF:多柔比星继以CMF。在一些实施方案中,该联合疗法为EC:表柔比星和环磷酰胺。在一些实施方案中,该联合疗法为AC:多柔比星和环磷酰胺。

[0160] 实施例

[0161] 通过参考以下实施例可以更好地理解本发明。列入这些实施例仅仅是为了描述示例性实施方案,而不应解释为包含本发明的整个范围。

[0162] 实施例1

[0163] 在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的评估

[0164] 使用吸收性纸作为固相收集介质。在乳房摄影前对个体施用催产素。清洁两只乳房的乳头并去除角蛋白栓。将硝化纤维素滤器附接至两个乳头上。将每只乳房置于乳房摄影装置中并进行乳房摄影术。

[0165] 在收集到乳房摄影术期间获得的导管内流体样品后,采用任何适宜的缓冲洗液(例如,磷酸盐缓冲盐水)清洗该硝化纤维素滤器。将流出物收集在改进的细胞学小瓶中,并进行离心分离。将细胞从流出物中分离,并转移到干净的显微镜载玻片的中心区域,并施加盖玻片。使该载玻片风干,然后例如在无水酒精中进行固定。

[0166] 单克隆抗体CK5、CK14、p63和兔单克隆抗体CK7和CK18采用单一抗体稀释剂进行复用(multiplexed),并施加到显微镜载玻片上。然后再施加由山羊抗小鼠-HRP和山羊抗兔-AP的混合物组成的无生物素多染(multistain)检测试剂。依次施加DAB和固红色原。采用苏木精对细胞进行复染色。

抗体	色原	细胞类型
[0167]	CK5	DAB 棕色 祖细胞 肌上皮/管腔的 基底表型
	CK14	DAB 棕色 祖细胞 肌上皮/管腔的 基底表型
	P63	DAB 棕色 基底肌上皮 基底表型
	CK7	FR 红色 正常乳腺细胞 腺上皮 管腔上皮
	CK18	FR 红色 正常乳腺细胞 腺上皮 腔上皮

[0168] 分析结果与乳房摄影结果进行比较。如果结果一致，则不进行附加的分析。如果结果不一致，则进行附加的分析或测试。

[0169] 实施例2

[0170] 在乳房摄影术期间获得的导管内流体样品的处理

[0171] 使用吸收性纸作为固相收集介质。在乳房X摄影术前对个体施用催产素。清洁两只乳房的乳头并去除角蛋白栓。将硝化纤维素滤器附接至两个乳头上。将每只乳房置于乳房摄影装置中并进行乳房摄影术。

[0172] 在收集到乳房摄影术期间获得的导管内流体样品后，采用任何适宜的缓冲洗液（例如，磷酸盐缓冲盐水）清洗该硝化纤维素滤器。将流出物收集在改进的细胞学小瓶中，并进行离心分离。将细胞从流出物中分离，并转移到干净的显微镜载玻片的中心区域，并施加盖玻片。使该载玻片风干，然后例如在无水酒精中进行固定。

[0173] 预处理

[0174] 使细胞与过氧化物封闭剂(Biocare的Peroxidized 1)接触。

[0175] 接下来，进行热恢复(heat retrieval)预处理。将Diva溶液在Biocare的Decloaking Chamber中预热至95°C保持30分钟。然后，将载玻片放入已预热的溶液中并在95°C及压力下恢复40分钟。或者，将组织切片蒸45–60分钟，或使用95°C水浴40分钟。使溶液冷却20分钟，然后在蒸馏水中清洗。

[0176] 施加蛋白质封闭剂—采用Biocare的Background Sniper在室温(RT)下温育10–15

分钟。

[0177] 将载玻片与第一抗体(即,针对CK5、CK14、CK7、CK18和p63的抗体)在室温下温育30-60分钟。

[0178] 采用Biocare的MACH 2Double Stain 2将载玻片在室温下温育30分钟。

[0179] 当使用Biocare的Betazoid DAB时,在室温下温育5分钟。

[0180] 采用Biocare的Vulcan固红在室温下温育10-20分钟。在去离子水中冲洗。

[0181] 用去离子水冲洗。与苏木精温育30-60秒。用去离子水冲洗。施加Tacha的Bluing溶液1分钟。

[0182] 采用光学显微镜对细胞进行可视化。

[0183] 实施例3

[0184] 导管内流体的评估

[0185] 本试验是涉及三(3)名健康的、非妊娠的、非哺乳的女性受试者的单中心研究。受试者按来诊所的顺序而加入。

[0186] 主要试验目的是确定在乳房摄影术步骤过程中产生导管内流体的30到65岁女性的百分比,如根据蛋白质在硝化纤维素滤器上的存在而确定的。

[0187] 次要目的是在细胞学上评价导管内流体中细胞(如果有的话)的存在和类型。

[0188] 方法:

[0189] 简言之,通过将配衡的(tared)硝化纤维素滤器附接至每个乳头(每只乳房一个),采用该硝化纤维素滤器来收集在乳房摄影术期间挤出的导管内流体。在一组受试者中进行乳房摄影术。在第二组受试者中未进行乳房摄影术(对照组)。对通过清洗含有导管内流体样本的滤器而收集的细胞进行细胞学检查。

[0190] 评估:

[0191] 该试验的主要终点是如根据在经历乳房摄影术时蛋白质在硝化纤维素滤器上的存在所确定的,完成产生导管内流体的试验的女性的百分比。

[0192] 次要终点是如通过细胞学评价所确定的,细胞在导管内流体样品中的存在。

[0193] 结果:

[0194] 对于使用从这些受试者组获得的滤器完成的蛋白质检测,在从对照组获得的样品上都没有显示出蛋白质的存在。来自经历过乳房摄影的组的所有滤器均显示出蛋白质的存在。

[0195] 实施例4

[0196] 导管内流体样品中miRNA的检测

[0197] 利用包含使装置附接至乳房的乳房接合部件的收集装置,从经历乳房摄影术的女性受试者的两只乳房的乳头抽吸出导管内流体样品。将该导管内流体样品收集到固相样品收集介质如吸收性纸上。清洗吸附在吸收性纸上的导管内流体样品,并且如下分离总RNA(包括miRNA)。

[0198] 将400 μ L TrizolTM(Invitrogen[®],Carlsbad,CA)添加至2mL微量离心管中,该微量离心管含有1cm×1cm和1英寸×1英寸大小的具有导管内流体样品的吸收性纸。该管在旋涡震荡器上在4°C下以2000rpm涡旋30分钟。在进一步添加1.2mL TrizolTM然后添加0.24mL氯仿后,该管在室温下再涡旋5分钟,并在另一个2分钟后在4°C下以14000g离心15分钟。收集顶

部的水相,与等体积的75%乙醇混合,并按照制造商的使用方案在PureLinkTM RNA旋柱(spin column) (Invitrogen[®],QIAvac[™],用于24Plus设备(Qiagen[®],Valencia,CA)上进行处理。采用100μL水从旋柱上洗脱RNA,并在-80℃下储存备用。

[0199] 含有200μL BAN和10μL聚丙烯载体的冷却的TRIzol试剂可与一些样品一起使用来提高RNA的回收和收率。任选地,也可在此相分离期间向混合物中添加溴苯甲醚以改善分离的RNA的可视化,并且去除分离方案中的氯仿和溴氯丙烷。

[0200] 含有来自其它样品的miRNA的RNA将采用NanoDrop分光光度法或Agilent定量法进行定量。利用采用Agilent Bioanalyzer的RNA6000nano LabChip Series II Assay,确证至少一些样品中的miRNA的浓度和完整性。

[0201] 根据标准步骤和条件,利用对每种miRNA靶标特异性的茎环RT引物对RNA进行逆转录,并且用无核酸酶水稀释以产生每次反应50μM的浓度。随后DNA可在约-20℃下保存备用。miRNA表达水平的相对定量可通过实时PCR来进行,其中使用miR-16和/或另一种稳定表达的小RNA的表达水平,以对靶miRNA的表达水平进行归一化。所有反应均一式三份进行,并采用试验间对照。可采用2-delta deltaCT来分析数据,以确定靶miRNA的相对量。

[0202] 对于一些样品,将采用TaqManTM miRNA分析(Applied Biosystems[®],foster City,CA)测定成熟miRNA的水平。TaqMan miRNA逆转录试剂盒将用于利用miRNA特异性寡核苷酸在42℃下使15μL中的9.9μL RNA逆转录30分钟。miRNA特异性引物和1.33μL的RT反应将在一式三份的40-或42-循环定量PCR中使用,并且使用SDSTM软件(2.3版本,Applied Biosystems[®])量化循环(Cq)值确定为从重复三次的PCR反应中获得的平均值。

[0203] 待筛查的导管内流体样品中循环的靶miRNA列于表3、表4和表5中。例如,循环miR-195是早期乳腺癌以及心肌梗死(MI)的标志物(Long等人.PLOS ONE.2012,vol.7(12)e50926)。在乳腺癌患者和MI患者中观察到血液miR-195水平的升高。作为另一个实例,高miR-26a与减少的EZH2表达相关,并且与他莫昔芬在转移性乳腺癌中的有利结果相关(Jansen等人.Breast Cancer Res.Treat.2012,133:937-947)。然而,NAF中的循环miR-195水平或miR26a未知。测定NAF中的循环miR-195和miR26a。

[0204] 使用PrismTM(GraphPad软件,La Jolla CA)和excel软件(Microsoft)进行统计分析和图形绘制。所有t检验和Mann-Whitney U检验都将是双尾检验。

[0205] 本领域技术人员将容易认识到,本发明的范围包括本文公开的方法,该方法包括针对miRNA的筛查,以及基于miRNA表达和特征预测个体对诸如他莫昔芬的药物治疗的响应和由于他莫昔芬治疗而引起的诸如MI等副作用的可能性的能力。

[0206] 实施例5

[0207] 导管内流体样品中DNA甲基化特征的检测

[0208] 利用包含使装置附接至乳房的乳房接合部件的收集装置,从经历乳房摄影术的女性受试者的两只乳房的乳头抽吸出导管内流体样品。将该导管内流体样品收集到固相样品收集介质如吸收性纸上。清洗吸附在吸收性纸上的导管内流体样品,并且根据供应商的使用说明(Qiagen,Valencia,CA)采用Qiagen-DNAeasy Blood&Tissue Kit[®]从清洗流出物中提取DNA。按照制造商的使用说明采用QIAamp DNA Mini Kit[®](Qiagen)提取DNA。使用NanoDrop ND-1000UV-is分光光度计(NanoDrop[®] Technologies,Wilmington,DE)对DNA进

行定量。采用基于 Illumina Infinium® Human Methylation 27 Bead Chips 的技术 (Illumina) 来分析位点特异性 CpG 甲基化。开发出该阵列以分析选自多于 14000 种基因的 27578 个 CpG 位点。这允许在单个核苷酸的分辨率下对每个样品的所有位点进行探询。根据制造商的使用方案利用 Zymo EX DNA 甲基化试剂盒 (Zymo Research, Orange, CA) 用亚硫酸氢钠处理基因组 DNA，并且采用制造商的使用方案进行芯片处理和数据分析。用 GenomeStudio® Methylation Module 软件核查微珠阵列数据的质量。

[0209] 以上具体实施方案的描述将充分揭示本发明的一般性质，从而他人在无须过多实验且不脱离总体概念的情况下，可通过应用现有的知识容易地修改和/或针对各种应用调整此类具体实施方案，因此此类调整和修改应当并且旨在被包含在所公开的实施方案的等同物的含义及范围之内。尽管已结合其具体实施方案描述了本发明，但显然很多改变、修改和变动对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此，旨在包含落入随附的权利要求的精神及宽泛范围中的所有此类改变、修改和变化形式。

[0210] 应当理解，详细描述和具体实例仅以说明的方式给出，因为基于该详细描述，在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对本领域技术人员而言将是显而易见的。本领域技术人员也将理解，本发明的某些特征，尽管为了清楚起见以单独的实施方案的形式予以描述，但它们也可在单个实施方案中以组合方式来提供。相反，本发明为了简洁起见而以单一实施方案描述的各种特征也可单独提供或者以任何适当的子组合形式提供。