

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 5 日 (05.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/000079 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/565 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/000474
- (22) 国际申请日: 2015 年 6 月 30 日 (30.06.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 上海交通大学 (SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区华山路 1954 号, Shanghai 200030 (CN)。
- (72) 发明人: 师咏勇 (SHI, Yongyong); 中国上海市徐汇华山路 1954 号, Shanghai 200030 (CN)。 宋智健 (SONG, Zhijian); 中国上海市徐汇华山路 1954 号, Shanghai 200030 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台广安路 9 号 5 号楼 15A 层, Beijing 100055 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: APPLICATIONS OF ESTRADIOL IN PREPARATION OF PRODUCTS FOR RESISTING AGAINST SMALL CELL LUNG CANCER AND/OR OVARIAN CANCER AND/OR OSTEOSARCOMA

(54) 发明名称: ESTRADIOL 在制备抗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用

(57) Abstract: Applications of Estradiol in the preparation of products for resisting against small cell lung cancer and/or ovarian cancer and/or osteosarcoma, and products that comprise Estradiol and that are used for treating small cell lung cancer and/or ovarian cancer and/or osteosarcoma.

(57) 摘要: 雌二醇(Estradiol)在制备抗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用, 以及包含雌二醇的用于治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤的产品。



WO 2017/000079 A1

Estradiol 在制备抗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种 Estradiol 在制备抗小细胞
5 肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用。

背景技术

肿瘤是威胁人类健康的最常见也是最严重的一种疾病，研发高效抗肿瘤药物对延长患者的生存周期至关重要。近年来，随着肿瘤基因组学学和分子药理学的飞速发展，新型抗肿瘤药物的研发取得了不错的成果，但由于
10 于新药研发投入大，周期长等瓶颈无法克服，以及肿瘤个体遗传变异大等特征，导致许多传统抗肿瘤药物效果不加，新药价格昂贵，副作用未明。

Barabasi AL 等研究者在 2011 年发表于《Nature Reviews Genetics》的论文中指出，基于 GWAS 研究结果和互作组学（interactome）策略开展的分子网络分析有望揭示复杂疾病新的药物靶点和分子标志物，并最终形
15 成对疾病发病机制和治疗方案全新的认识。更值得注意的是，药物重定位（drug repositioning）研究发现，GWAS 研究锁定的易感基因及与其有蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction, PPI）的基因更容易成为药物间接的靶点，这一发现有助于解释现有药物的作用机制并指导新药的研发。2014 年，Okada Y 等研究者在《Nature》上发表的论文中显示
20 GWAS 研究结果整合分析得到的类风湿性关节炎的 101 个易感基因中有 98 个目前正用于治疗类风湿性关节炎药物的直接或间接靶标，而且还通过药物重定位研究，他们还发现了数十个已获批准用于其他适应症的药物也可用于治疗类风湿性关节炎。

发明公开

25 本研究正是通过整合癌症组学 Cosmic version72 数据库的癌症基因谱 Cancer Gene Census 以及蛋白质相互作用 STRING version 10 数据库和 DrugBankversion4.2 中 FDA 批准的药物数据库，获得的候选重定位药物，对肿瘤细胞系进行筛查实验，筛选出新的抗肿瘤药物。做肿瘤细胞系筛选的候选肿瘤抑制药物见如下：

30 Nicardipine, Promethazine, Estrone, Estradiol, Sunlidac, Estradiol, Etonogestrel, Levonorgestrel, Mesalazine, Indomethacin, Sulfasal

azine, Balsalazide, Irbesartan, Ibuprofen, Isoprenaline, Pentosan Polysulfate。

本发明的一个目的是提供 Estradiol 的新用途。

5 本发明提供的 Estradiol 在制备治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用。

本发明的第二个目的是提供 Estradiol 的新用途。

本发明提供了 Estradiol 在制备抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖产品中的应用。

本发明的第三个目的是提供 Estradiol 的新用途。

10 本发明提供了 Estradiol 在制备降低小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞 IC50 值产品中的应用。

Estradiol 在治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤中的应用也是本发明保护的范围；

15 Estradiol 在抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖中的应用也是本发明保护的范围。

Estradiol 在作为治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤药物中的应用也是本发明保护的范围；

Estradiol 在作为抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖药物中的应用也是本发明保护的范围。

20 上述应用中，所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS。

上述应用中，所述产品为药物或试剂盒。

本发明的第四个目的是提供一种产品。

25 本发明提供的产品，其活性成分为 Estradiol；所述产品具有如下至少一种功能：

1) 治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤；

2) 抑制小细胞肺癌细胞和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖；

3) 降低小细胞肺癌细胞和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞 IC50 值。

30 上述产品中，所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS。

上述产品中，所述产品为药物或试剂盒。

附图说明

图 1 为 96 孔培养板药筛药物板型分布。

图 2 为 Estradiol 对卵巢癌敏感； $EC_{50}=3.0280$ ； $IC_{50}=3.0662$ ；
5 $R^2=0.9990$ 。

图 3 为 Estradiol 对小细胞肺癌敏感； $EC_{50}=15.2786$ ； $IC_{50}=16.2549$ ；
 $R^2=0.9971$ 。

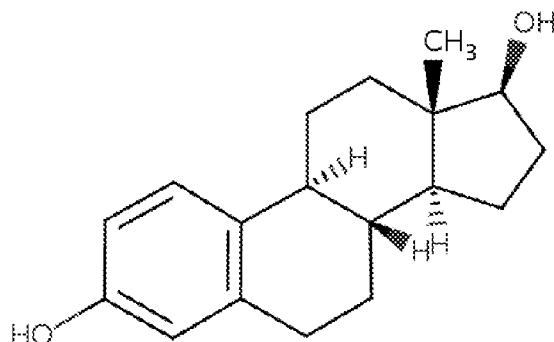
图 4 为 Estradiol 对骨肉瘤细胞敏感； $EC_{50}=28.7837$ ； $IC_{50}=32.6945$ ；
 $R^2=0.9983$ 。

10 实施发明的最佳方式

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

下述实施例中待测药物为 Estradiol，其化学结构式：



15 ；其为 drug bank 产品，产品目录号为 DB00783。

下面实施例中的小细胞肺癌细胞 NCI-H82、卵巢癌细胞 SKOV-3、人肝癌细胞 SNU-475、人肺癌细胞 NCI-H810 和骨肉瘤细胞 U2OS 的出处如下：

NCI-H810 ATCC CRL-5816
20 NCI-H82 ATCC HTB-175
SKOV-3 ATCC HTB-77
SNU-475 ATCC CRL-2236
U2OS ECACC 92022711

下面实施例中的主要的仪器及耗材
25 DMSO (from Sigma, Cat. No. D4540)

- 96-well 白色底透细胞培养板 (from Corning, Cat. No. 3610)
CellTiter Glo 试剂盒 (from Promega, Cat. No. G7573)
Doxorubicin 阳性药 (from MCE, Cat. No. HY-15142)
Fetal Bovine Serum (from Gibco, Cat# 10099141)
5 100 mm 培养皿 (from Corning, Cat# 430167)
RPMI-1640 medium (from Gibco, Cat# A1049101)
DMEM medium (from Gibco, Cat# 11995081)
DMEM/F12 medium (from Gibco, Cat# 11330057)
EMEM medium (from Gibco, Cat# 10370021)
10 Mutidrop 384 细胞分液器 (Thermo, Cat# 5840150)
EnSpire 多功能读板机 (Perkin Elmer, Cat# 2300-001M)
- 实施例 1、CELLTITER-GLO 检测 Estradiol 抗小细胞肺癌和/或卵巢癌
/骨肉瘤上皮细胞癌
- 一、待测孔板的制备
- 15 1、细胞铺板
- a) 配制各个细胞所需完全培养基。
- b) 实验开始前, 确认标记在 100 mm 培养皿上的药筛细胞名字, 培养基以及传代时间, 代次等信息, 确保实验无误。
- c) 贴壁细胞操作参考步骤 d) 到 i), 悬浮细胞操作参考步骤 j) 到
20 1)。
- d) 无菌操作时利用真空泵吸取细胞培养基。
- e) 用 2 ml 的无菌 PBS 溶液润洗细胞表层, 再用真空泵吸出 PBS 废液。
- f) 向培养皿轻轻加入 1 ml 0.25% (w/v) Trypsin-0.038% (w/v) EDTA
25 溶液消化细胞, 轻轻混匀几下, 溶液覆盖住细胞表层, 在倒置显微镜下观
察细胞消化情况, 在细胞将要脱落时终止胰酶消化作用。
- g) 向培养皿中加入 5 ml 37° C 预热好的完全培养基, 用移液管轻轻
吹打细胞, 使其从培养皿底部脱落下来。
- h) 将此细胞悬液转移到 15 ml 或 50 ml 无菌离心管中, 1000 rpm 离
心 5 min。

i) 利用真空泵无菌操作吸出上清培养基。加入 5ml 37° C 预热好的完全培养基重悬细胞沉淀，轻轻吹打混匀。

j) 用移液管轻轻吹打细胞，使其从培养皿底部完全脱落下来。

k) 将此细胞悬液转移到 15 ml 或 50 ml 无菌离心管中，1000 rpm 离心 5 min。

l) 利用真空泵无菌操作吸出上清培养基。加入 5ml 37° C 预热好的完全培养基重悬细胞沉淀，轻轻吹打混匀。

m) 用细胞计数仪对细胞悬液进行计数，调整细胞悬液至合适密度接板进行细胞铺板实验。

10 将 NCI-H82 细胞和 SKOV-3 细胞按照上述方法进行，分别得到 NCI-H82 96 孔细胞培养板和 SKOV-396 孔细胞培养板。

NCI-H82 细胞，完全培养基为 RPMI-1640，为 life 产品，A1049101，接板密度(cells/well)为 12000。

SKOV-3 细胞，完全培养基为 McCoy's 5A，为 life 产品，16600082，15 接板密度(cells/well)为 12000。

2、待测药物 Estradiol 配制和加药 (200 X 终浓度):

1) 待测药物 Estradiol 母板配制

a) 用 DMSO 将待测药物 Estradiol 稀释到 20 mM 待用。

20 b) 取 a) 步骤中配置好的 20 mM 待测药物 79 μ L 加入稀释板第一行第一孔中，随后加入 54 μ L 的 DMSO 溶剂到第一行第二孔至第九孔中，从第一孔中取 25 μ L 溶液到第二孔中，混匀后从第二孔中取 25 μ L 溶液到第三孔中，依次类推到第九孔，保证药物逐次进行 3.16 倍倍比梯度稀释。

2) 阳性药 Doxorubicin(MCE, Cat. No. HY-15142) 母板配制

a) 用 DMSO 将阳性药 Doxorubicin 稀释到 6 mM 待用。

25 b) 将 6 mM 阳性药 Doxorubicin 溶液加入稀释板中，DMSO 溶液 1:3.16 倍倍比梯度稀释该待测药物。

3、药物工作板配制及加药

a) 待测药物及阳性药加样模板如下图 1 所示，其中，S1208: 阳性药 Doxorubicin, DMSO: 阳性对照孔, Cpd 1, 2, 3: 待测药物, DMSO 终浓度为 30 0.5% (DMSO 兼容性)。

b) 向工作板中加入 95 μ l 细胞特定的完全培养基, 每个药物对应 9 个孔, 用多道排枪从待测药物和阳性药 doxorubicin 母板中分别依次转移 5 μ l 一系列 (9 个孔) 倍比稀释好的溶液 (10 X 终浓度), 得到含有不同浓度药物的细胞培养基。

5 c) 从培养箱中取出步骤 1 制备 NCI-H82 96 孔细胞培养板和 SKOV-396 孔细胞培养板, 按图 1 加药板型排列方式 (图 1) 分别向 NCI-H82 96 孔细胞培养板和 SKOV-396 孔细胞培养板中加入 10 μ l 上述 b) 制备的含有不同浓度药物的细胞培养基 (10 X 终浓度), 放入到 CO₂ 培养箱 37° C 培养 72h, 得到 NCI-H82 的 96 孔药筛板和 SKOV-3 的 96 孔药筛板。

10 以不加任何药物的作为对照孔。

上述待测药物、阳性药 Doxorubicin 和对照孔在 96 孔板中的终浓度及加药情况如下:

待测药物在图 1 的 2-10 孔中的终浓度 (μ M) 依次为: 100、31.64557、10.01442、3.16912、1.002886、0.317369、0.100433、0.031783、0.010058;

15 阳性药 Doxorubicin 在图 1 的 2-10 孔中的终浓度 (μ M) 依次为: 30、9.493671、3.004326、0.950736、0.300866、0.095211、0.03013、0.009535、0.003017;

此外, 96 孔板中 S1208 孔 (E1-H1 和 A12-D12): 10 μ l 终浓度 100 μ M Doxorubicin 溶液 (溶剂为包含 0.5% DMSO 的完全培养基溶液), DMSO
20 孔 (A1-D1, E12-H12 和 A11-H11): 10 μ l 包含 0.5% DMSO 的完全培养基溶液。

二、CELLTITER-GLO 荧光细胞活性检测系统检测

1、CellTiter-Glo 试剂配制

a) 使用前, 将 CellTiter-Glo 试剂 Buffer 融化, 平衡到室温使用。
25 b) 使用前, 将 CellTiter-Glo 试剂冻粉底物融化, 平衡到室温使用。
c) 取 100 ml 平衡好的 CellTiter-Glo Buffer 加入到瓶装 CellTiter-Glo 试剂冻粉底物中, 使其充分重悬形成酶/底物混合物, 也就是所谓的 CellTiter-Glo 检测试剂。

d) 轻轻混匀涡旋，并反复倒置获得均匀的溶液。一般来说，1 分钟内 CellTiter-Glo 底物试剂就会充分溶解，分装，避光保存在 -20°C 备用，避免反复冻融。

2、检测

5 a) 检测前，将上述一的 3 得到的 NCI-H82 的 96 孔药筛板和 SKOV-3 的 96 孔药筛板在室温中平衡 20-30 分钟。

b) 倒置显微镜观察每块培养板的细胞形态及死亡情况，标记出异常情况并复测一次。

10 c) 向所有药筛孔中加入 $100\ \mu\text{l}$ 上述 1 制备的 CellTiter-Glo 试剂，混匀。

d) 在 96 孔微孔板振荡器上充分震荡混匀 2 分钟，使细胞完全裂解。

e) 避光室温放置 15 分钟后进行冷光信号检测，保证信号的稳定性。

f) 使用 EnSpire 多功能读板机 570 nm 时读取冷光信号。

g) 分析处理数据。

15 NCI-H82 的 96 孔药筛板结果如图 2 所示。

SKOV-3 的 96 孔药筛板结果如图 3 所示。

计算 IC50 值，结果如表 1 所示。

20 采用同样的方法检测 Estradiol 作用骨肉瘤细胞 U2OS，细胞的 IC50 值，结果如表 1 和图 4。U2OS 细胞，完全培养基为 DMEM，为 life 产品，11995081，接板密度(cells/well)为 3000。

采用同样的方法检测 Estradiol 作用人肝癌细胞 SNU-475 和人肺癌细胞 NCI-H810，细胞的 IC50 值，结果如表 1。

25 可以看出，Estradiol 对小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤增殖具有特异抑制作用，可以用来作为治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤的药物。

表 1 为不同细胞在 Estradiol 药物作用下的 IC50 值

细胞	IC50 值
SKOV-3	3.0662
SNU-475	100
NCI-H82	16.2549

NCI-H810	100
U20S	32.6945

工业应用

- 5 本发明的实验证明，本发明对 FDA, CFDA 已获批准的药物 Estradiol 进行肿瘤药物重定位，根据肿瘤不同的细胞系（组织类型）以及突变位点对适应症不是抗肿瘤的药物进行筛选，发现 Estradiol 抗小细胞肺癌和/或卵巢癌/骨肉瘤上皮细胞癌这种新用途，实现旧药新用。

权利要求

1、Estradiol 在制备治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤产品中的应用；

5 或 Estradiol 在制备抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖产品中的应用。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS；所述产品为药物或试剂盒。

10 3、Estradiol 在治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤中的应用；
 或 Estradiol 在抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖中的应用。

4、根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于：所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS。

15 5、Estradiol 在作为治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤药物中的应用；

 或 Estradiol 在作为抑制小细胞肺癌和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖药物中的应用。

20 6、根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于：所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS。

7、一种产品，其活性成分为 Estradiol；所述产品具有如下 1) 和/或 2) 功能：

1) 治疗小细胞肺癌和/或卵巢癌和/或骨肉瘤；

2) 抑制小细胞肺癌细胞和/或卵巢癌细胞和/或骨肉瘤细胞增殖。

25 8、根据权利要求 7 所述的产品，其特征在于：所述小细胞肺癌细胞为 NCI-H82，所述卵巢癌细胞为 SKOV-3，所述骨肉瘤细胞为 U2OS。

9、根据权利要求 7 所述的产品，其特征在于：所述产品为药物或试剂盒。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	S1208(→)									DMSO	S1208
B		Cpd1(→)										
C		Cpd2(→)										DMSO
D	S1208	Cpd3(→)										
E		S1208(→)										
F												
G												
H												

图 1

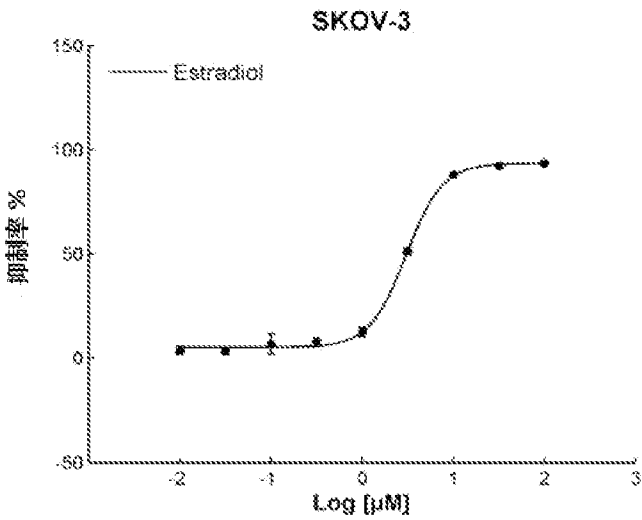


图 2

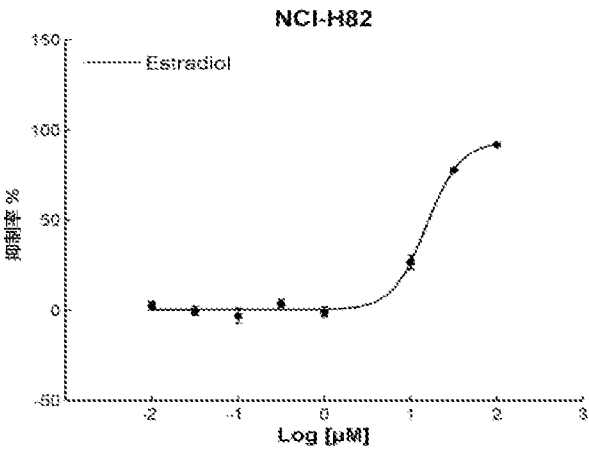


图 3

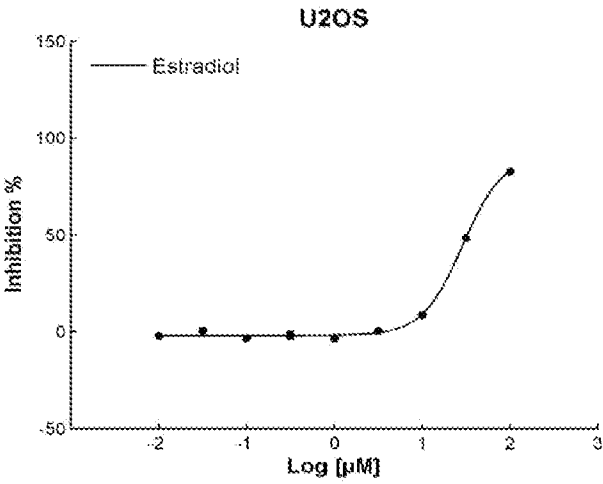


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/000474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/565 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, EPOQUE, SIPOABS, CNKI, WANFANG, GOOGLE SCHOLAR: tumour, estradiol, carcinoma, cancer, ovarian, oophoroma, osteosarcoma, osteogenic, osteosarcoma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1660437 A (SHANDONG LANJIN PHARMACEUTICALS CO., LTD.), 31 August 2005 (31.08.2005), claims 1 and 10	1-2, 7-9
X	WO 2010136604 A1 (DSM IP ASSETS B.V.), 02 December 2010 (02.12.2010), description, page 4, lines 25-29 and page 8, line 20 to page 9, line 5	1-2, 7-9
X	LI, Haifeng et al. "Inhibition of Estradiol on Tumorigenesis of Benzo(a)pyrene Induced Lung Tumors in Male Kunming Mice", CHINESE JOURNAL OF PUBLIC HEALTH, vol. 24, no. 5, 31 May 2008 (31.05.2008), pages 548-549	1-2, 7-9
X	CHEN, Xueqiu et al. "Protection Effects and Mechanism of 17 β -Estradiol in High Homocysteine Induced Injury of Human Osteosarcoma MG63 Cells in Vitro", ACTA ANATOMICA SINICA, vol. 42, no. 5, 31 October 2011 (31.10.2011), pages 635-639	1-2, 7-9
A	ZHU, Jing. "Effects of Estrogen Receptor α and β on the Proliferation and Invasion of Ovarian Carcinomas", MEDICINE & PUBLIC HEALTH, CHINA DOCTORAL DISSERTATIONS FULL-TEXT DATABASE (ELECTRONIC JOURNALS), 28 February 2007 (28.02.2007), E072-137	1-2, 7-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 March 2016 (04.03.2016)	Date of mailing of the international search report 21 March 2016 (21.03.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XU, Lei Telephone No.: (86-10) 62411134

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/000474

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Said claims relate to a method for the treatment of a human or animal body, which falls within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv), for which a search is not required.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] The solutions of a known active component, namely, estradiol, being specifically applied to the treatment of three different kinds of cancers belong to three groups of different inventions, and these inventions do not share the same or corresponding specific technical feature therebetween.
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/000474

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1660437 A	31 August 2005	CN 1304054 C	14 March 2007
WO 2010136604 A1	02 December 2010	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/000474

A. 主题的分类		
A61K 31/565(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CPRS, EPOQUE, SIPOABS, CNKI, 万方, GOOGLE SCHOLAR: 雌二醇, 癌, 瘤, estradiol, carcinoma, cancer, ovarian, oophoroma, osteosarcoma, osteogenic, osteosarcoma,		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1660437 A (山东蓝金生物工程有限公司) 2005年 8月 31日 (2005 - 08 - 31) 权利要求1, 10	1-2, 7-9
X	WO 2010136604 A1 (DSM IP ASSETS B. V.) 2010年 12月 2日 (2010 - 12 - 02) 说明书第4页第25-29行, 第8页第20行-第9页第5行	1-2, 7-9
X	李海峰等. "雌二醇对苯并(a)芘致雄性小鼠肺癌抑制作用" 中国公共卫生, 第24卷, 第5期, 2008年 5月 31日 (2008 - 05 - 31), 第548-549页	1-2, 7-9
X	陈学秋等. "17β-雌二醇对高同型半胱氨酸诱导人成骨肉瘤MG63细胞损伤的保护作用及机制" 解剖学报, 第42卷, 第5期, 2011年 10月 31日 (2011 - 10 - 31), 第635-639页	1-2, 7-9
A	朱静. "雌激素受体亚型对卵巢癌增殖和侵袭的影响" 中国博士学位论文全文数据库(电子期刊)(医药卫生科技辑), 2007年 2月 28日 (2007 - 02 - 28), E072-137	1-2, 7-9
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 3月 4日		2016年 3月 21日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		许磊
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62411134

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 3-6
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 它们涉及人或动物体的治疗方法，属于PCT细则第39.1(iv)规定的无需进行检索的情形。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 已知活性成分雌二醇具体适用于治疗三种不同类型癌症的方案属于三组不同的发明，这些发明之间没有相同或相应的特定技术特征。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/000474

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	1660437	A	2005年 8月 31日	CN	1304054 C
WO	2010136604	A1	2010年 12月 2日	无	