

(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 10 月 26 日 (26.10.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/181934 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/675 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/080879

(22) 国际申请日: 2017 年 4 月 18 日 (18.04.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201610243342.5 2016 年 4 月 19 日 (19.04.2016) CN
201610459407.X 2016 年 6 月 22 日 (22.06.2016) CN

(71) 申请人: 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号, Jiangsu 210093 (CN)。

(72) 发明人: 薛斌 (XUE, Bin); 中国江苏省南京市
鼓楼区汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 李
朝军 (LI, Chaojun); 中国江苏省南京市鼓楼区
汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 赵丹丹

(ZHAO, Dandan); 中国江苏省南京市鼓楼区汉
口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。

(74) 代理人: 南京经纬专利商标代理有限公司
(NANJING JINGWEI PATENT & TRADEMARK
AGENCY CO., LTD); 中国江苏省南京市鼓楼区中
山路 179 号 12 楼 B 座, Jiangsu 210005 (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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,

(54) Title: USES OF ZOLEDRONIC ACID

(54) 发明名称: 唑来膦酸的用途

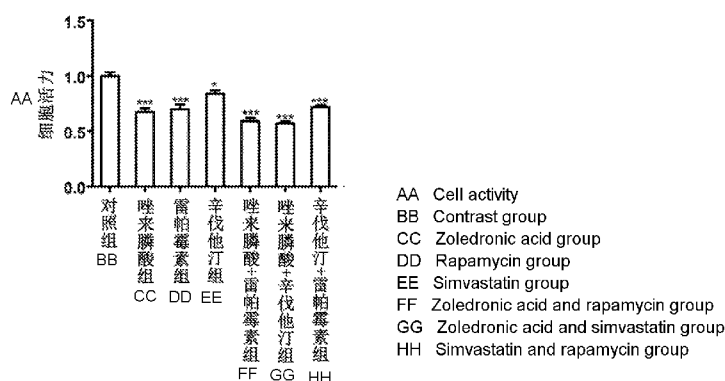


图 2

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are uses of zoledronic acid in the preparation of drugs related to pulmonary lymphangioma diseases. The present invention provides new uses of zoledronic acid in drugs for treating the pulmonary lymphangioma. The pulmonary lymphangioma comprises nodular hyperplasia and diffuse hyperplasia of lung tissues and smooth muscles in the hilum of the lung. The zoledronic acid according to the present invention can effectively treat pulmonary lymphangioma, and can effectively reduce recurrence of the pulmonary lymphangioma in combination with rapamycin.

(57) 摘要: 本发明公开了唑来膦酸在制备肺部淋巴管平滑肌瘤病药物中的用途。本发明提出了唑来膦酸用于治疗肺淋巴管平滑肌瘤病药物的新用途, 所述肺部淋巴管平滑肌瘤病包括肺组织以及肺门内的平滑肌结节性及弥漫性增生。根据本发明发明唑来膦酸可以有效的治疗肺部淋巴管平滑肌瘤, 并且联合雷帕霉素可以有效的减少肺部淋巴管平滑肌瘤的复发。

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))。

说明书

唑来膦酸的用途

技术领域

本发明属于唑来膦酸的用途领域，涉及唑来膦酸在制备肺淋巴管平滑肌瘤病药物中的用途，尤其涉及将唑来膦酸与雷帕霉素和/或辛伐他汀结合制备淋巴管平滑肌增多症中肺淋巴管平滑肌瘤病药物中的用途。

背景技术

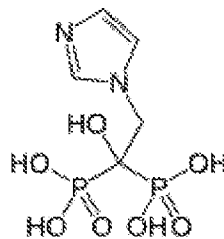
淋巴管平滑肌增多症（lymphangiomyomatosis, LAM）是一种罕见多系统的疾病，此病多发病于育龄期的妇女，可发病于肺部，胸导管，腹部，腹膜后腔，盆腔，子宫，卵巢等，肺部最易受累。肺淋巴管平滑肌瘤（pulmonary lymphangioleiomyomatosis, PLAM）是淋巴管平滑肌增多症中肺部病变，临床主要表现为渐进性的呼吸困难，反复发作性气胸，乳糜性胸腔积液。肺淋巴平滑肌瘤大多作为独立的病症发生，也有少数作为结节性硬化症（TSC）的继发性病症发生。肺淋巴管肌瘤病的发病特征是平滑肌样的肺淋巴管细胞的过多的增殖，迁移和分化，导致肺囊性结构的破坏，阻碍气管和淋巴管的功能，使得肺功能逐渐丧失。对于肺淋巴管肌瘤病病灶区 LAM 细胞的来源现阶段还是不清楚，多认为其来自于淋巴管或是血管。由于肺淋巴管平滑肌瘤和哮喘，慢性阻塞性肺病，以及肺气肿相似的临床症状，因此其病理诊断比较困难。HRCT 以肺部均匀分布的多个薄壁囊状影为特征，双肺出现边界清晰的圆形囊肿，分布均匀。肺组织活检是该病诊断的金标准，目前肺淋巴管平滑肌瘤病尚无成熟的病理诊断意见，除了与黑色素瘤相关的 HMB 45 抗体阳性，雌激素受体（ER）及孕激素受体（PR）阳性为 LAM 的标记性抗体，以及近几年新发现的 Cathepsin-k 也是作为其诊断的辅助分子标记之一。现阶段针对肺淋巴管平滑肌瘤的治疗无特别有效方法，主要是药物控制和肺移植。

研究表明抑癌基因 *TSC1/TSC2* 的基因突变是肺淋巴管肌瘤病发生的原因，其中 *TSC2* 基因的突变占大多数。*TSC2/TSC1* 所编码的蛋白 hamartin 和 tuberin 会调控 mTOR（mammalian target of rapamycin）信号通路的表达。哺乳动物的雷帕霉素靶(mammalian target of rapamycin,mTOR)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可整合细胞外信号,磷酸化下游靶蛋

白核糖体 p70S6 激酶,如 S6K1 及 4E-BP1,影响基因转录与蛋白质翻译,从而参与调控细胞生长、增殖等过程。据研究报道,大部分的肿瘤发生发展过程中都会有 mTOR 信号通路的过度激活。

在结节性硬化症相关的肺淋巴管肌瘤病的临床治疗方面,大环内酯类抗生素雷帕霉素(rapamycin)是近几年发现的可以有效控制肿瘤恶化的药物,其作用的靶点就是 mTOR 信号通路中的 mTORC1 蛋白复合物,但是病人停止使用雷帕霉素后,短期内肿瘤出现复发,并且在某些散发性的肺淋巴管肌瘤病人身上并无治疗效果。肺淋巴管平滑肌瘤与大部分的恶质瘤一样,单个的治疗靶点不利于该病的治疗。

唑来膦酸是一种二磷酸盐,其的分子式: $C_5H_{10}N_2O_7P_2$; 化学名称为: 1-羟基-2-(咪唑-1-基)-亚乙基-1,1-二磷酸; 英文名称为: zoledronic acid; 化学结构式如式 I 所示:



目前,唑来膦酸在临床上被广泛用于治疗骨代谢性疾病,如骨质疏松、变形性骨炎以及癌性骨转移等骨病,其对骨吸收有明显的抑制作用。唑来膦酸作为甲羟戊酸代谢途径下游的抑制剂,可以直接靶向破骨细胞的甲羟戊酸/异戊二烯通路的关键酶——法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FPPS)的活性,进而减少异戊二烯类化合物如法尼基焦磷酸(FPP)和香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)的形成,从而阻断 GTPase 参与的多种信号通路的传递。唑来膦酸与阿仑膦酸钠和利塞膦酸钠等是第三代二磷酸盐药物,其区别于第一代不含氮二磷酸盐,如依替膦酸钠与氯屈膦酸钠和第二代含氮二磷酸盐,如帕米膦酸钠与替鲁膦酸钠,其抗骨吸收作用最强而毒副作用更小。其重要分子结构包括 P-C-P 基团——活性基团和 R1 与 R2 侧链取代基,这些重要基团决定了唑来膦酸的生物活性与作用机理。临床上的唑来膦酸主要靶向破骨细胞,如阻挡破骨细胞对骨的破坏与吸收、干扰破骨细胞的生长和诱导破骨细胞的凋亡等。但目前尚无唑来膦酸用于治疗肺淋巴管平滑肌瘤的报道。

发明内容

解决的技术问题: 为了开发一种对肺淋巴管平滑肌瘤病治疗效果好,且能够有效防止肺部肿瘤复发的药物,本发明提供了唑来膦酸在制备肺淋巴管平滑肌瘤病中的用途。

技术方案:

唑来膦酸在制备肺淋巴管平滑肌瘤病药物中的用途。

优选的，所述药物还包括雷帕霉素和/或辛伐他汀。

优选的，所述肺淋巴管平滑肌瘤包括肺组织以及肺门内的平滑肌结节性及弥漫性增生。

优选的，所述唑来膦酸的剂型为针剂、溶液剂、片剂和胶囊剂。

优选的，所述唑来膦酸的给药方式为静脉滴注、口服和雾化吸入式给药。

所述的肺淋巴管平滑肌瘤病药物，包含唑来膦酸。

优选的，唑来膦酸的用药浓度为 200 μ g/kg~500 μ g/kg。

优选的，唑来膦酸与雷帕霉素联合使用时，唑来膦酸与雷帕霉素的用药比例为 1:5~1:1。

优选的，唑来膦酸与辛伐他汀联合使用时，唑来膦酸与化合物 X 的用药比例为 1:10~1:1。

优选的，唑来膦酸、雷帕霉素及辛伐他汀联合使用时，唑来膦酸、雷帕霉素及辛伐他汀的用药比例为 1:5:10~1:1:1。

有益效果：本发明提出了唑来膦酸用于治疗肺淋巴管平滑肌瘤的新用途，所述肺淋巴管平滑肌瘤包括肺组织以及肺门内的平滑肌结节性及弥漫性增生。本发明所述的药物可以有效的治疗淋巴管平滑肌增多症中的肺淋巴管平滑肌瘤，并且可以有效的较少该类疾病的复发。

附图说明

图 1 是不同唑来膦酸浓度对 TSC2-null 细胞毒性的检测图；

图 2 是唑来膦酸联和雷帕霉素对 TSC2-null 细胞毒性的检测图；

图 3 是唑来膦酸引起 TSC2-null 细胞的凋亡，TUNEL 检测以及数据统计图；

图 4 是裸鼠皮下成瘤过程图和肺淋巴管平滑肌瘤的小鼠模型构建示意图；

图 5 唑来膦酸用药后检测皮下肿瘤大小以及细胞 Ki67 和 p-S6 免疫荧光图；

图 6 是唑来膦酸以及联合雷帕霉素用药后肺淋巴管平滑肌瘤肺部成瘤病理分析图(HE)。

具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改和替换，均属于本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

本发明采用的实验材料来源如下：MTT 检测试剂盒购买于南京建成公司，TUNEL 检测试剂盒购买于 Promiga 公司，DAPI、YAP、Ki67 抗体购买于 CST 公司，6~8 周龄的

STOCK-*Foxn1*^{nu}/Nju 雌性裸鼠购于南京大学模式动物研究所。小鼠正常维持饲料购于江苏省协同生物工程有限公司。唑来膦酸以及雷帕霉素购于 Selleck Chemicals 中国分公司。

由于大部分散发肺淋巴管平滑肌瘤和结节性硬化伴随症大部分的基因诊断都是依赖 TSC2 基因的突变,因此在以下实施例的细胞水平验证唑来膦酸药效时,选择 TSC2-null 小鼠胚胎成纤维细胞作为其检测的细胞。

实施例 1

96 孔板每孔 10^4 个 TSC2-null 细胞,贴壁 12-24 小时。按实验分组加入不同浓度的药物,每组都有至少 3 个重复孔,作用 24 小时。药物处理结束后每孔 100 μ L 的无血清培养基加入 10 μ L 的 MTT 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 4 小时,小心吸出培养基,每孔加入 100 μ L 的 DMSO,使结晶物充分的溶解,用酶标仪在 570nm 波长检测其吸光值。MTT 结晶的形成量与细胞增殖成正比,增殖更好的细胞其吸光值更高。

本实验共分为三组分别是对照组,唑来膦酸 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M 组,其中对照组为唑来膦酸的溶剂 NaOH,细胞为 TSC2-null 小鼠胚胎成纤维细胞,DMEM+10%FBS 正常培养条件下处理 24 小时。

由图 1 可知,随着唑来膦酸的浓度越来越高,细胞的增殖活力越来越低,并且相对于 25 μ M 的浓度,50 μ M 的唑来膦酸细胞增殖效率的下降更加明显,出现显著性的差异。因此唑来膦酸的不同浓度对细胞的增殖有很大的影响,存在唑来膦酸药物的浓度依赖性。

实施例 2

与实施例 1 相同的细胞实验方法,本次实验组共分为七组,分别是对照组,唑来膦酸组,雷帕霉素组,辛伐他汀组,唑来膦酸+雷帕霉素组,唑来膦酸+辛伐他汀组,辛伐他汀+雷帕霉素组。其中对照组为药物溶剂,唑来膦酸浓度为 50 μ M,雷帕霉素浓度为 20nM,辛伐他汀浓度为 0.5 μ M,唑来膦酸+雷帕霉素的浓度为 50 μ M+20 nM,唑来膦酸+辛伐他汀的浓度为 50 μ M+0.5 μ M,辛伐他汀+雷帕霉素的浓度为 0.5 μ M+20 nM。实验处理时间为 48 小时,与实施例 1 同样的处理方法。

由图 2 可知,唑来膦酸,雷帕霉素,辛伐他汀处理细胞 48 小时后,细胞活力明显下降。其中唑来膦酸的单独作用效果最为明显,细胞的活力下降约 30%。联合用药处理组中唑来膦酸联合雷帕霉素组和辛伐他汀组作用效果最为明显,下降约 35%。同时,由图 2 可知,联合用药对细胞活力的抑制效果强于单独用药组并且唑来膦酸联合用药组最强。

实施例 3

进一步,通过 TUNEL 试剂盒检测 25 μ M 和 50 μ M 浓度的唑来膦酸以及临床上使用的雷帕霉素,观察唑来膦酸是否引起细胞的凋亡。其中配制唑来膦酸的 NaOH 溶液作为对照组,细胞处理 24 小时。

结果如图 3 所示,唑来膦酸处理组相对于雷帕霉素处理组凋亡细胞明显增加,并且随着浓度的增加细胞凋亡增多,而唑来膦酸并未引起细胞的显著性的凋亡,因此细胞凋亡对唑来膦酸有浓度依赖性。

实施例 4

购买 6~8 周的雌性裸鼠,在其背部擦拭酒精后,0.45mm 的针头注射 10^7 个细胞,拔出针头时注意无细胞溢出。在小鼠背部肿瘤长至直径约为 3mm 时,进行尾静脉唑来膦酸给药。裸鼠尾静脉给药的剂量为 1mg/kg,每周两次,共给药六周 12 次。裸鼠皮下实质瘤的具体构建流程如图 4A 所示,调查给药后小鼠的肿瘤的生长速度,并以只注射 PBS 作为对照组,结果如图 5 所示。

由图 5A 可知,在皮下成瘤的裸鼠尾静脉连续注射唑来膦酸,一周两次,剂量为 1mg/kg。相对于打 PBS 的对照组,唑来膦酸治疗组裸鼠皮下的肿瘤的生长速度明显减缓,肿瘤体积的增长从药物治疗 15 天后出现明显的差异,但两组鼠之间没有明显的体重差异。可以得出结论唑来膦酸能有效的抑制 TSC2-null 细胞皮下实质瘤的生长。

为了进一步检测唑来膦酸对裸鼠皮下肿瘤生长的抑制作用,本实施例进一步利用免疫荧光技术检测了皮下肿瘤细胞的增殖,以及 p-S6 蛋白的表达。p-S6 是 mTOR 信号通路下游的信号分子,mTOR 信号通路激活时,其表达的增加。细胞进入周期进行细胞增殖会有 Ki67 蛋白表达。从图 5C 中可见,唑来膦酸处理组 Ki67 蛋白的表达明显减少,说明唑来膦酸能够有效的抑制 TSC2-null 细胞的增殖。检测 p-S6 蛋白在细胞的表达,结果如图 5B 所示,经过唑来膦酸治疗的裸鼠,其皮下肿瘤细胞中 p-S6 的表达量明显减少,表明唑来膦酸有效的抑制了 mTOR 信号通路的表达。因此从动物模型的唑来膦酸治疗中进一步得出结论:唑来膦酸在动物体内可以有效的控制皮下肿瘤的生长。

实施例 5

为了进一步说明唑来膦酸可以更加有效的治疗肺淋巴管平滑肌瘤,本实施例构建了肺淋巴管平滑肌瘤的模型。购买 6~8 周龄的雌性裸鼠,在其两侧腋下血管丰富处擦拭 75%的酒精后用孔径 0.45mm 的注射针头注射 10^7 个 TSC2-null 细胞,同时注意针头拔出时无细胞溢出。

1~1.5 个月以后裸鼠两侧长出皮下实质瘤。待实质瘤长到直径为 1cm 时，牺牲裸鼠，在超净台中取出其皮下瘤，将其剪碎。利用胶原酶消化剪碎的皮下瘤，并放在 37℃ 摇床消化半个小时，之后用 100 目的筛子过滤后，1000rpm 离心原代肿瘤细胞，去除上清，加入新的培养基重新悬浮。将细胞接入培养皿中重新贴壁培养两天。皮下成瘤的细胞相对于之前的细胞增加了细胞的成瘤性。将贴壁较好的细胞重新消化悬浮，每只裸鼠尾静脉注射 10^5 个分出的原代肿瘤细胞，三天以后可以进行小鼠尾静脉和腹腔给药。小鼠肺淋巴管平滑肌瘤的具体构建流程如图 4B 所示。

在肺淋巴管平滑肌瘤的裸鼠模型的构建过程中，TSC2-null 细胞并非是原发性的肿瘤细胞，为增加 TSC2-null 细胞的成瘤性，需要在皮下成瘤以增加细胞的成瘤性，之后再尾静脉注入到裸鼠体内会在裸鼠肺部特异的形成病灶区，因此可能肺部的微环境更加有利于 TSC2-null 细胞的生长。具体结果如图 6 所示。如图所示，在裸鼠的肺部的大体形态上出现肺部乳糜，在肺部 HE 染色片上肺泡减小，肺空间间距增大，并且大部分的 TSC2-null 细胞聚集在动脉血管，静脉，以及气管附近。

本实施例中给药组共分为五组，对照组即小鼠成瘤后注射安慰剂，唑来膦酸 200μg/kg 组，唑来膦酸 500mg/kg 组，雷帕霉素组，雷帕霉素联合唑来膦酸组。唑来膦酸组 200μg/kg 每周三次尾静脉注射，唑来膦酸组 500mg/kg 每周两次尾静脉注射，雷帕霉素 1mg/kg 每周三次，雷帕霉素联合唑来膦酸组，唑来膦酸 200μg/kg 加上雷帕霉素 1mg/kg 腹腔注射每周三次。实验组的小鼠肺部糜烂泛白，在分组给予药物治疗后，全部小鼠的肺部出现明显的改善，血管清晰，肺部表面光滑。为了进一步观察药物治疗效果，对小鼠的肺部进行了石蜡的包埋切片，进行病理诊断，结果如图 6A 所示，实验组的小鼠肺部出现大量的肿瘤细胞的聚集，但是在唑来膦酸 200μg/kg，500μg/kg 给药六周后，200μg/kg 给药浓度的小鼠肺部的肿瘤明显减少，500μg/kg 的小鼠的肺部几乎未出现肿瘤，同时雷帕霉素以及雷帕霉素联合唑来膦酸治疗的小鼠的肺部在给药一个月后均未出现肿瘤。为了进一步观察药物治疗的作用，停药一个月后两组：实验组+雷帕霉素组，实验组+唑来膦酸+雷帕霉素组，观察小鼠肺部病灶区有没有复发。具体结果如图 6B 所示，雷帕霉素停药后小鼠的肺部表面出现白色的实质瘤，雷帕霉素治疗组停药后小鼠的肺部出现明显的肿瘤细胞的快速增殖，肺部的动脉附近肿瘤细胞出现富集。但是，唑来膦酸联合雷帕霉素治疗组，小鼠的肺部未出现肿瘤的复发，小鼠肺部表面光滑无病灶点，并且病理诊断方面小鼠的肺部也是未出现肿瘤，无病灶区。另外其他器官的病理检测也显示未出现肿瘤细胞的转移，结果如图 6C 所示。

综上所述，相比较皮下肿瘤的治疗效果，唑来膦酸在小鼠的肺淋巴管平滑肌瘤模型中的

治疗效果更加。唑来膦酸在干预皮下肿瘤的治疗中发现，其能有效的抑制肿瘤的生长，但是并未会使肿瘤缩小或是消失。而在肺部的淋巴管平滑肌瘤中，唑来膦酸能够有效的抑制肿瘤的形成，并且在联合雷帕霉素的治疗中能够有效的抑制肿瘤的复发，因此唑来膦酸对肺淋巴管平滑肌瘤的治疗效果更佳。

根据本发明唑来膦酸能够有效的淋巴管平滑肌增多症中的肺淋巴管平滑肌瘤，在联合雷帕霉素治疗可以效果更佳，并且在停药后肿瘤不易出现复发。根据对小鼠皮下瘤的治疗效果，唑来膦酸对于肾血管平滑肌脂肪瘤等结节性硬化症的伴随症也是有一定的疗效。

权利要求书

1. 唑来膦酸在制备肺淋巴管平滑肌瘤病药物中的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述药物还包括雷帕霉素和/或辛伐他汀。
3. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述肺淋巴管平滑肌瘤病包括肺组织以及肺门内的平滑肌结节性及弥漫性增生。
4. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述唑来膦酸的剂型为针剂、溶液剂、片剂和胶囊剂。
5. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述唑来膦酸的给药方式为静脉滴注、口服和雾化吸入式给药。
6. 权利要求1所述的肺淋巴管平滑肌瘤病药物，其特征在于，包含唑来膦酸。
7. 根据权利要求6所述的药物，其特征在于，唑来膦酸的用药浓度为 $200\mu\text{g/kg}\sim 500\mu\text{g/kg}$ 。
8. 根据权利要求6所述的药物，其特征在于，唑来膦酸与雷帕霉素联合使用时，唑来膦酸与雷帕霉素的用药比例为 1:5~1:1。
9. 根据权利要求6所述的药物，其特征在于，唑来膦酸与辛伐他汀联合使用时，唑来膦酸与化合物 X 的用药比例为 1:10~1:1。
10. 根据权利要求6所述的药物，其特征在于，唑来膦酸、雷帕霉素及辛伐他汀联合使用时，唑来膦酸、雷帕霉素及辛伐他汀的用药比例为 1:5:10~1:1:1。

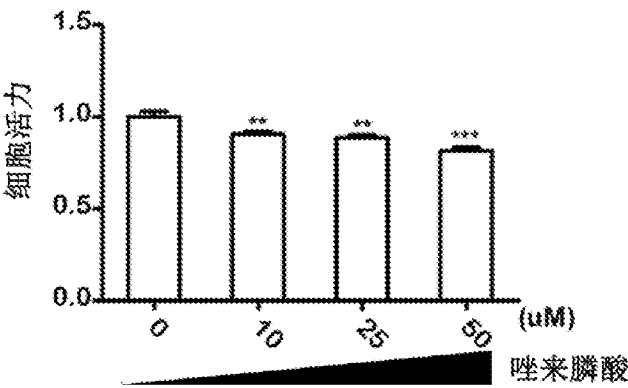


图 1

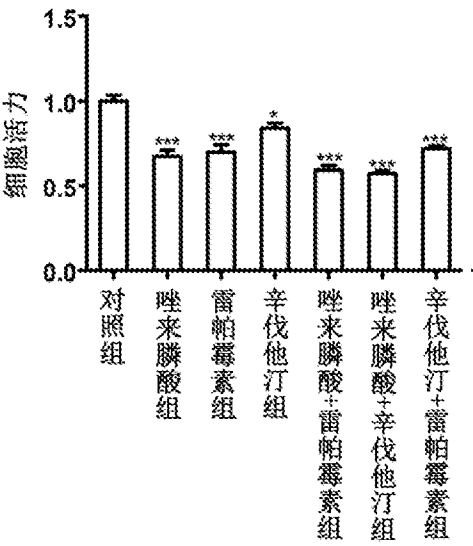


图 2

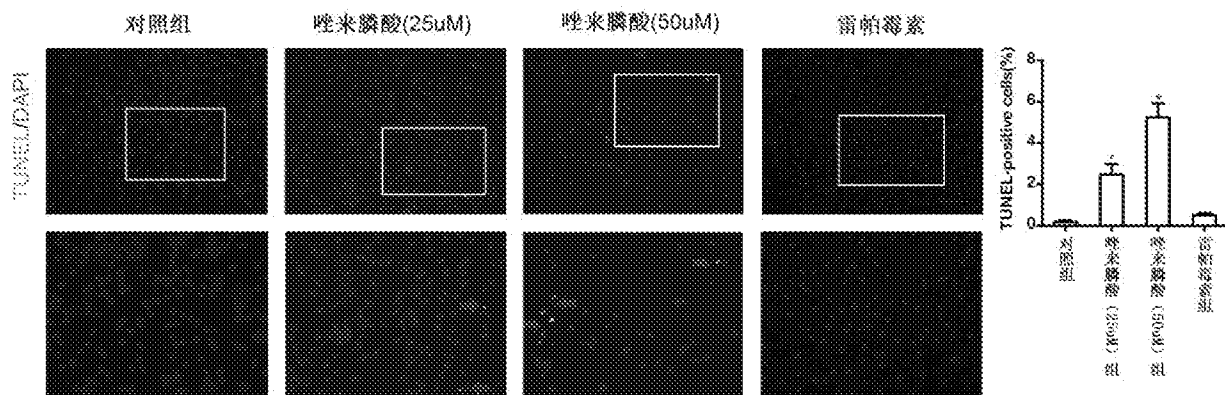
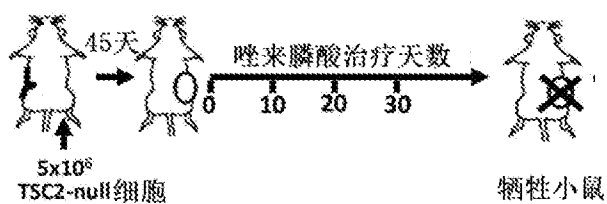


图 3

A, 皮下瘤模型



B, 肺淋巴管平滑肌瘤模型

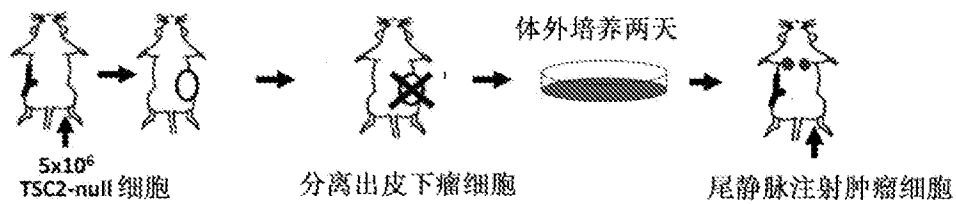


图 4

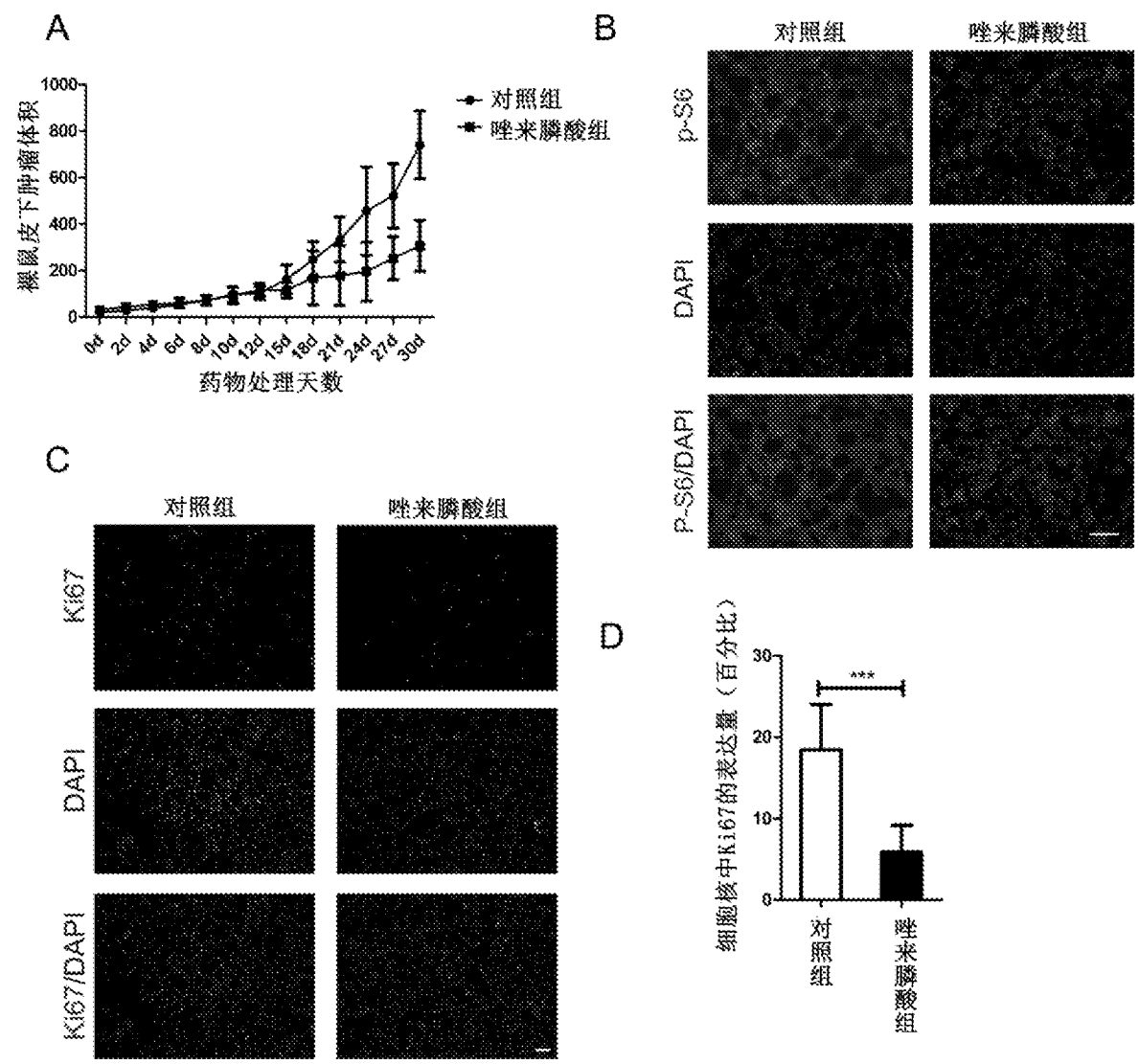


图 5

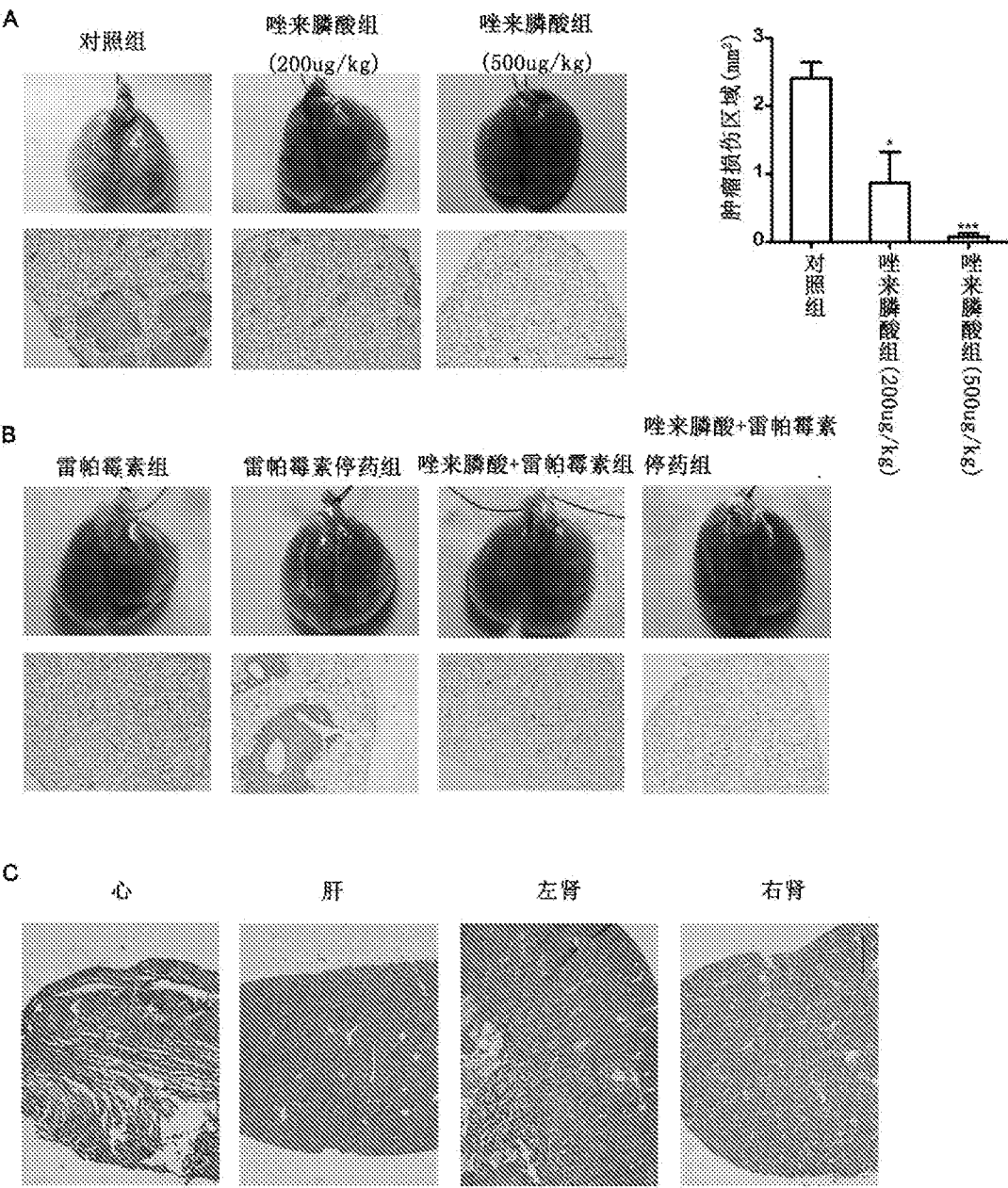


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/080879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/675 (2006.01) i; A61K 31/436 (2006.01) i; A61K 31/366 (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)
DWPI, SIPOABS, CNABS (CN), CPRSABS, CNMED, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, CHINESE NATIONAL KNOWLEDGE INFRASTRUCTURE (CNKI), CHINESE PHARMACEUTICAL PATENT DATABASE, CHINESE PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, REGISTRY, CAPLUS, PUBMED: Zoledronic acid, GP 42446, Zoledronate, Zometa, Sirolimus, Rapamycin, Simvastatin, Bisphosphonate, pulmonary, lymphangioleiomyomatosis, lymphangiomyomatosis, lymphangioleiomyoma, lymphangiomatosis, lymphangiomatosis, tuberous sclerosis, TSC1, TSC2 etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014137978 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL), 12 September 2014 (12.09.2014), claims 1, 3, 17, 34 and 35, and description, paragraphs [0004], [0005], [0076], [0330], [0338] and [0339]	1-10
Y	WO 2014137978 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL), 12 September 2014 (12.09.2014), claims 1, 3, 17, 34 and 35, and description, paragraphs [0004], [0005], [0076], [0330], [0338] and [0339]	2
Y	US 2005119330 A1 (FAUL-I et al.), 02 June 2005 (02.06.2005), claims 1, 2 and 5	2
A	TAVEIRA-DASILVA, A.M. et al., "Bone Mineral Density in Lymphangioleiomyomatosis", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 171, 01 October 2004 (01.10.2004), ISSN: 1535-4970, pages 61-67	1-10

☒ 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 29 June 2017 (29.06.2017)	Date of mailing of the international search report 20 July 2017 (20.07.2017)
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 ZHOU, Wen Telephone No.: (86-10) 62411222

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/080879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAJKUMAR, V. et al., "Gorham's Disease and Diffuse Lymphangiomatosis in Children and Adolescents", PEDIATR BLOOD CANCER, vol. 56, 22 December 2010 (22.12.2010), ISSN: 1545-5017, pages 667-670	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/080879

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014137978 A1	12 September 2014	US 2016022706 A1	28 January 2016
US 2005119330 A1	02 June 2005	None	

A. 主题的分类 A61K 31/675(2006.01)i; A61K 31/436(2006.01)i; A61K 31/366(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)) DWPI, SIPOABS, CNABS(CN), CPRSABS, CNMED, CNTXT, USTXT, WOTXT, EPTXT, 中国期刊网(CNKI), 中国药物专利数据库, 中国药文摘, REGISTRY, CAPLUS, PUBMED: 唑来膦酸酯, 唑来膦酸, 佐来双膦酸, 佐来膦酸盐, 佐美塔, 西罗莫司, 雷帕霉素, 辛伐他汀, 双膦酸, 二膦酸, 肺, 淋巴管平滑肌瘤, 淋巴管平滑肌增多症, 淋巴管瘤病, 结节性硬化症 Zoledronic acid, GP 42446, Zoledronate, Zometa, Sirolimus, Rapamycin, Simvastatin, Bisphosphonate, pulmonary, lymphangioleiomyomatosis, lymphangiomyomatosis, lymphangioleiomyoma, lymphangiomatosis, lymphangiomatosis, tuberous sclerosis, TSC1, TSC2等		
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	WO 2014137978 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 2014年 9月 12日 (2014 - 09 - 12) 权利要求1、3、17、34、35, 说明书第[0004]、[0005]、[0076]、[0330]、[0338]、[0339]段	1-10
Y	WO 2014137978 A1 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 2014年 9月 12日 (2014 - 09 - 12) 权利要求1、3、17、34、35, 说明书第[0004]、[0005]、[0076]、[0330]、[0338]、[0339]段	2
Y	US 2005119330 A1 (FAUL-I等) 2005年 6月 2日 (2005 - 06 - 02) 权利要求1、2、5	2
A	Angelo M. Taveira-DaSilva等. "Bone Mineral Density in Lymphangioleiomyomatosis" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, 第171卷, 2004年 10月 1日 (2004 - 10 - 01), ISSN: 1535-4970, 第61-67页	1-10
☒ 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
2017年 6月 29日		2017年 7月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
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 传真号 (86-10)62019451		周文 电话号码 (86-10)62411222

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
A	Rajkumar Venkatramani等. "Gorham' s Disease and Diffuse Lymphangiomatosis in Children and Adolescents" Pediatr Blood Cancer, 第56卷, 2010年 12月 22日 (2010 - 12 - 22), ISSN: 1545-5017, 第667-670页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/080879

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)
WO	2014137978	A1	2014年 9月 12日	US	2016022706	A1	2016年 1月 28日
US	2005119330	A1	2005年 6月 2日	无			