

(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
2014 年 6 月 26 日 (26.06.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/094546 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/02 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/088671
- (22) 国际申请日: 2013 年 12 月 5 日 (05.12.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210553208.7 2012 年 12 月 18 日 (18.12.2012) CN
- (71) 申请人: 华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (72) 发明人: 刘昌胜 (LIU, Changsheng); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 刑万里 (XING, Wanli); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 王靖 (WANG, Jing); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 钱江潮 (QIAN, Jiangchao); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 梁婧 (LIANG, Jing); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958

号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (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, LT, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: USE OF FUSION PROTEIN

(54) 发明名称: 一种融合蛋白的应用

(57) Abstract: Disclosed is the use of a fusion protein in drugs for stimulating differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to hematopoietic stem/progenitor cells, or drugs for proliferation of granulocyte hematopoietic progenitor cells. The fusion protein has a sequence as shown in SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4. The drugs can be used for the prevention and/or treatment of (i) hematopoietic dysfunction caused by chemotherapy, (ii) hematopoietic dysfunction caused by radiotherapy, or (iii) leukopenia.

(57) 摘要: 一种融合蛋白的应用, 用于刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化的药物; 或粒系造血祖细胞增殖的药物, 所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示。且所述药物可以用于预防和/或治疗(i) 化疗引起的造血功能低下; (ii) 放疗引起的造血功能低下; 或(iii) 白细胞减少症。



WO 2014/094546 A1

一种融合蛋白的应用

技术领域

本发明涉及融合蛋白的应用，特别涉及融合蛋白在促进粒系造血祖细胞增殖方面的应用。

背景技术

血液具有运输物质、维持组织的兴奋性、调节机能、防御作用等功能，是构成人体和维持人类生命活动的基本物质之一，所以一旦血液的组成成分发生异常变化，就会引起严重的后果。引起血液病的因素很多，诸如：化学因素、物理因素、生物因素等，都可以成为血液病发病的诱因或直接原因，其中很多是近几十年现代工业的产物，从而使血液病的发病率有逐年增高的趋势。

骨髓抑制型贫血是较为常见的一类因化学、物理、生物因素及不明原因所致骨髓造血组织减少，引起造血功能衰竭而发生的贫血。骨髓抑制可引起骨髓微环境、造血干细胞、造血细胞生长因子等的损伤，粒、巨核系细胞系统也会受到抑制，粒细胞缺乏会引起严重感染。

目前放、化疗仍然是肿瘤治疗中最常用的手段，但大多数患者治疗后会产生恶心、呕吐等不良反应，其中最常见而且最为严重的不良反应就是骨髓抑制，不但致使机体造血功能下降，免疫力降低，使得化疗不能按正常剂量进行从而影响治疗的连续性，还可引起白细胞和血小板的减少，患者易并发感染和出血，甚至死亡。尽快促进患者造血功能的恢复成为提高肿瘤治愈率，降低感染发生率，提高患者生存质量的关键。

目前临床上主要用粒系集落刺激因子（G-CSF）、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）等集落刺激因子来促进造血功能的恢复。它们直接刺激粒系造血祖细胞的增殖，缩短白细胞和中性粒细胞的恢复时间，疗效快。但是由于CSF是直接刺激无自我更新能力的造血祖细胞的增殖，导致造血祖细胞的耗竭，不利于长期的造血功能的恢复，甚至导致骨髓储备不足；另外，一些肿瘤细胞，如白血病细胞具有CSF的正常受体，用药后可能通过提高宿主残余肿瘤细胞的增殖，提高肿瘤的复发率。同时，由于其作用稳定性差，往往导致外周血及骨髓象中充满大量幼稚白细胞，使白细胞计数呈现成倍增长、成倍下降的现象，患者为维持正常疗程不得不反复用药。因此，临床上需要开发出能有效促进造血细胞增殖而对肿瘤细胞无刺激增殖作用的药物。

发明内容

本发明的目的是提供一种促进粒系造血祖细胞增殖的融合蛋白的应用。

本发明的另一目的是提供一种用于促进以粒细胞为主的造血细胞增殖的药物组合物。

5 本发明的再一目的是提供一种能够在体外促进粒系细胞生长的方法。

本发明的第一方面，提供一种融合蛋白的用途，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，所述融合蛋白用于制备(i) 刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化的药物；或

10 (ii) 促进粒系造血祖细胞增殖的药物。

在另一优选例中，所述药物用于：

(1) 预防和/或治疗化疗引起的造血功能低下；

(2) 预防和/或治疗放疗引起的造血功能低下；或

(3) 预防和/或治疗白细胞减少症。

15 在另一优选例中，所述药物在放疗或化疗之前、之中、和/或之后使用。

本发明的第二方面，提供一种融合蛋白的用途，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，所述融合蛋白用于促进粒系造血祖细胞的增殖。

在另一优选例中，所述融合蛋白用于体外促进粒系造血祖细胞的增殖。

20

本发明的第三方面，提供一种融合蛋白的用途，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，所述融合蛋白用于制备预防和/或治疗白细胞减少症的药物。

25 本发明的第四方面，提供一种体外促进粒系祖细胞增殖的方法，在粒系祖细胞的培养基添加 100 ng/mL~5 μ g/mL 的融合蛋白，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示。

其中，所述粒系祖细胞为粒系造血祖细胞。

30 本发明的第五方面，提供一种药物组合物，包含：
融合蛋白，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示；以及
药学上可接受的载体或赋形剂。

本发明的药物组合物是无毒的，并且剂型稳定。

在另一优选例中，所述药物组合物在放疗或化疗之前、之中、和/或之后使用。

在另一优选例中，所述药物组合物还包括环磷酰胺。

本发明的第六方面，提供第五方面所述的药物组合物的用途，用于制备促进粒系造血祖细胞增殖的药物。

5

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

10

附图说明

图 1 为各组小鼠不同时间白细胞数 (WBC) 数的变化图。

图 2 显示化疗用药后第 10 天各组的骨髓有核细胞数。

图 3 显示化疗用药后第 10 天各组的脾系数。

图 4 显示化疗用药后第 10 天各组的细胞集落数。

15

图 5 显示化疗用药后第 10 天各组的骨髓有核细胞数中 CD34 比例。

图 6 显示化疗用药后第 10 天各组的骨髓有核细胞数中 CD45 比例。

具体实施方式

本申请的发明人经过广泛而深入的研究，首次意外发现本发明所用的融合蛋白具有促进粒系造血祖细胞增殖的作用，不仅能够有效预防而且能够有效治疗放疗、化疗等引起的造血功能下降及白细胞的减少。在此基础上，完成了本发明。

20

融合蛋白

25

本发明所用的融合蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示。蛋白单链分子量约 13-15 kD，经复性后该活性蛋白为二聚体，分子量约为 25-30 kD。本发明所用的融合蛋白，具有良好的活性和稳定性，并提高其表达，促进蛋白复性时正确折叠，延长生物半衰期，增加其在体内的使用效果，且易复性、易分离、活性高及适宜产业化生产和应用。

30

融合蛋白的应用

本发明的融合蛋白 (氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示) 的用途，能够用于制备(i) 刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化的药物；或 (ii) 促进粒系造血祖细胞增殖的药物。

所述药物用于：

- (1) 预防和/或治疗化疗引起的造血功能低下；
- (2) 预防和/或治疗放疗引起的造血功能低下；或
- (3) 预防和/或治疗白细胞减少症。

5 在另一优选例中，所述药物用于预防和/或治疗白细胞减少症。

所述药物在放疗或化疗之前、之中、和/或之后使用。

实验研究显示，本发明的融合蛋白能促进化疗药物/放疗导致的造血功能低下的恢复。

10 该融合蛋白对化疗引起的造血损伤有有效的治疗作用。融合蛋白的促造血作用，主要是作用于骨髓基质细胞，改善造血微环境，从而影响造血干/祖细胞的增殖和分化。骨髓有核细胞数、骨髓粒系集落的检测是最直接反映骨髓增生的证据。CD34 细胞和 CD45 细胞检测则是最直接反映造血干/祖细胞增殖和分化的证据。

15 经腹腔注射本发明的融合蛋白后，能促进注射化疗药物环磷酰胺造成的小鼠骨髓有核细胞数和外周血白细胞数的恢复，并且与环磷酰胺对照组相比差别显著，表明本发明的融合蛋白以促进粒系造血为主。因此，本发明的融合蛋白可认为是一种有效的促造血因子，在促进粒细胞造血方面具有临床应用前景。

此外，造血微环境是恢复正常造血的先决条件之一，本发明的融合蛋白在体内通过刺激骨髓间充质干细胞增殖，改善造血微环境，促进自然发生或诱发的骨髓抑制或损伤的造血功能恢复，并能刺激骨髓移植后的造血重建。

20 本发明为造血功能低下、白细胞减少症等提供了一种有效的预防/治疗的药物。

药物组合物

本发明的药物组合物包括本发明的融合蛋白。

25 本发明所述的药物组合物具有提高造血干/祖细胞的增殖活性、促进造血功能恢复的功能，可用于治疗放、化疗引起或自然发生的骨髓损伤造成的造血功能低下。

30 与目前临床上普遍使用的重组人粒系集落刺激因子 rhG-CSF 和 rhGM-CSF 相比较，本发明的融合蛋白促增殖作用温和，加快外周血细胞恢复，因而有临床应用的广泛前景。另外融合蛋白不易造成免疫原性。

可按制药领域已知的常规方法，将本发明的融合蛋白或药物组合物制成适合临床上特定给药方式的药物。例如可在本发明的融合蛋白或药物组合物中加入适当的载体或稀释剂，如水、生理盐水、等渗葡萄糖溶液以制成可经肠胃道

以外途径给药的注射剂。也可加入淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘油、脂质体、明胶、甘露醇等赋形剂或载体。

本发明的融合蛋白或药物组合物可通过静脉注射、腹腔注射、肌肉注射等常规途径给药。

5

本发明提到的上述特征，或实施例提到的特征可以任意组合。本案说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用，说明书中所揭示的各个特征，可以被任何提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明，所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

10

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

15

实施例 1

融合蛋白的制备

1. 重组载体的构建

20

用全基因合成方式合成 DNA 序列(SEQ ID NO:1)。通过酶切后将其插入载体 pBV220 中。得到优化的表达质粒，经酶切和测序验证插入片段与设计一致。

2. 工程菌的构建、验证和保存：

25

采用分子克隆操作技术，以常规的氯化钙法制备感受态表达系统后，用步骤 2 所得的表达质粒进行转化大肠杆菌 JM109，在抗性平板中挑取单菌落，经培养后抽提质粒，进行酶切验证，最后测序，证实表达载体序列正确。挑取重组子，接种于装有含葡萄糖和抗生素的 LB 培养液的摇瓶中，在 30℃ 的条件下以 180 rpm 的转速在气浴振荡器中培养 15 小时，在冰浴条件下加入无菌甘油，使之达到 15% 的浓度，分装后在 -80℃ 冰箱保存。

3. 工程菌的培养：

30

从转化后含有正确表达质粒的大肠杆菌抗性平板中挑取单菌落，接种于装有含氨苄青霉素的 LB 培养液的摇瓶中，LB 培养基为 10 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母浸出粉，5 g/L NaCl；氨苄青霉素含量为 100 μg/mL；在 30℃ 的条件下以 180 rpm 的转速在摇床中培养 8 小时，再按体积比为 1：10 的比例将培养物接种到 LB 培养基中，pH

7.0±0.2, 培养温度为 30℃, 搅拌速度 180 rpm, 培养 4 小时。然后, 升温至 42℃进行诱导, 继续培养 6 小时, 培养结束后, 在 7500 rpm 4±2℃条件下, 离心分离, 收集菌体, 菌体裂解后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 15 KD 分子量处, 与诱导前的重组菌及不含质粒的出发菌相比, 有清晰条带增加, 说明已经表达产生了目标蛋白质。

4. 包涵体的提取和洗涤

将步骤 4 收集的菌体, 与 TE 溶液, 按 1g: 10 mL 的比例混合, 再按 1g: 1 mg 的比例, 与溶菌酶混合, 采用高压均质法进行菌体破碎, 然后在 10000 rpm 离心, 收集沉淀, 以 1g 沉淀物: 20 mL 洗涤液的比例加入 1 M 尿素水溶液洗涤, 搅拌 2h 后, 4±2℃离心收集沉淀物, 再用 0.5% 曲拉通水溶液进行二次洗涤, 之后, 以 1 g 沉淀物: 20 ml Tris 的比例, 加入 10 mM 的 Tris(pH7.5), 清洗, 收集沉淀, 得包涵体;

5. 包涵体的裂解、复性

以 1g 包涵体: 10 mL 裂解液的比例加入裂解液, 裂解液为 6 M Gu-HCl、20 mM PBS、10 mM DTT。在 4±2℃下, 搅拌裂解 8 小时, 离心, 离心转速 10000 rpm, 离心温度为 4±2℃, 离心时间为 30 分钟, 弃沉淀, 取离心上清液加入复性液中, 稀释至蛋白含量为 0.1 mg/mL, 复性 10 天, 复性液为 20 mM Na₂HPO₄·12H₂O、1.5 mM NaH₂PO₄·2H₂O、140 mM NaCl、5 mM EDTA、1 mM 谷胱甘肽等。

6. 蛋白纯化

采用阴离子交换层析、阳离子交换层析、分子排阻层析的方法, 按常规的洗脱方法从复性液中回收有活性的融合蛋白二倍体。后在 -30~7℃下冻干, 得到融合蛋白, 序列如 SEQ ID NO:2 所示。

经非还原电泳 SDS-PAGE 检测产品纯度超过 95%, 分子量约为 30 KD; HPLC 鉴定其纯度超过 95%。经测定, N 末端与 C 末端测定均与理论值一致。

每批培养物的得率为 7.02 mg/L 融合蛋白。

实施例 2

融合蛋白在化疗损伤模型中的促进造血作用

2.1 本实施例的目的是观察融合蛋白对化疗引起的白细胞减少症的治疗作用, 为治疗肿瘤患者化疗后骨髓损伤造血功能低下寻找安全有效的药物。其中, 本实施例中实施使用实施例 1 制备的融合蛋白, 序列如 SEQ ID NO:2 所示。

本实施例采用清洁级 BALB/c 小鼠, 雄性, 体重 18~20 g, 随机分组, 每组 10 只。小鼠共分为五组, 如下:

CTX 组: 单独给予环磷酰胺 (CTX), 剂量为 100 mg/kg 体重/天, 注射体积为 100 μL, 连续给药 3 天; 第 4 天起每天注射 100 μL 磷酸缓冲溶液 (PBS), 连

续注射 6 天;

50 μ g 组: 在连续 3 天给予环磷酰胺(100 mg/kg 体重/天, 注射体积为 100 μ L) 后, 连续 6 天给予融合蛋白, 剂量为 50 μ g/鼠/天, 注射体积为 100 μ L;

25 μ g 组: 在连续 3 天给予环磷酰胺(100 mg/kg 体重/天, 注射体积为 100 μ L) 后, 连续 6 天给予融合蛋白, 剂量为 25 μ g/鼠/天, 注射体积为 100 μ L;

10 μ g 组: 在连续 3 天给予环磷酰胺(100 mg/kg 体重/天, 注射体积为 100 μ L) 后, 连续 6 天给予融合蛋白, 剂量为 10 μ g/鼠/天, 注射体积为 100 μ L。

正常组: 每天注射 100 μ L 磷酸缓冲溶液(PBS), 连续注射 9 天;

检测指标如下:

(1) 各组分别于第 1 天(未给药时), 第 2-10 天, 连续检测外周血白细胞(WBC)数。步骤如下: 用毛细管在小鼠右眼眼眶取血, 每次取 50 μ L, 放在含有抗凝剂的试管中, 然后用血细胞分析仪采用全血模式测试血液中白细胞数。

(2) 第 10 天检测各组小鼠骨髓有核细胞数(BMNC)。步骤如下: 无菌环境下处死小鼠, 在 75%的酒精浸泡 5 min。剥开小鼠大腿的肌肉, 取出股骨, 用剪刀把股骨两端剪断, 用 5 mL 的注射器吸取 PBS, 从股骨一端冲洗, 然后用 400 目的无菌纱布过滤冲洗液, 过滤后调整细胞浓度, 然后用计数板在显微镜下计数。

(3) 第 10 天检测各组小鼠胸骨和股骨骨髓中粒系细胞的变化, 步骤如下: 处死小鼠, 取出股骨和胸骨, 在 10%的甲醛溶液中浸泡 48h 后, 做 HE 染色的石蜡切片, 然后在显微镜下观察粒系细胞的变化。

(4) 第 10 天检测各组小鼠脾系数的变化, 步骤如下: 处死小鼠前, 先测量每只小鼠的体重。处死后, 取出脾脏称重, 脾重与体重的比值即为脾系数。

(5) 第 10 天检测各组小鼠骨髓细胞中 CD34⁺细胞比例的变化;
步骤: 按检测指标(2)的方法取出骨髓细胞, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL, 用抗体稀释液洗涤, 离心弃上清液, 加 10 μ L CD34 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵化半小时, 加抗体稀释液洗去多余的抗体, 离心弃上清液, 加抗体保存液调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 采用流式细胞仪检测。

(6) 第 10 天检测各组小鼠骨髓细胞中 CD45⁺细胞比例的变化;
步骤: 按检测指标(2)的方法取出骨髓细胞, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL。用抗体稀释液洗涤, 离心弃上清液, 加 10 μ L CD45 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵化半小时, 加抗体稀释液洗去多余的抗体, 离心弃上清液, 加抗体保存液调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 采用流式细胞仪检测。

(7) 第 11 天检测 CFU-GM 集落数的变化

步骤：在无菌环境下处死小鼠，在 75% 的酒精浸泡 5 min。剥开小鼠大腿的肌肉，取出股骨，用剪刀把股骨两端剪断，用注射器吸取 5mL PBS，从股骨一端冲洗，然后用 400 目的无菌纱布过滤冲洗液，过滤后的液体调整浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。在无菌环境下，离心 1mL 冲洗液，加入 100 μL 的 DMEM 培养基，吹打均匀成细胞悬浮液。取一个细胞冻存瓶，里面加入 1mL 甲基纤维素培养基，再加入 10 μL 细胞悬浮液，用移液枪吹打均匀。在 24 孔细胞培养板中每孔加入 500 μL 均匀混合的含细胞的甲基纤维素培养基。然后放到恒温培养箱中培养两周，显微镜下数 CFU-GM 集落的个数（50 个细胞以上为一个集落）。

2.2 本实施例研究融合蛋白对化疗损伤的预防治疗作用，其中使用实施例 1 制备的融合蛋白。

实验分组如下：

CTX 组：连续注射 6 天 PBS，注射体积为 100 μL ，然后再注射 3 天 CTX，剂量为 100 mg/kg 体重/天，注射体积为 100 μL ；

联合用药组：先连续 6 天腹腔注射融合蛋白，剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{鼠}/\text{天}$ ，注射体积为 100 μL ，随后再连续注射 3 天环磷酰胺，剂量为 100 mg/kg 体重/天，注射体积为 100 μL ；

对照组：每天注射 100 μL PBS 溶液，连续注射 9 天。

各组小鼠于第 10 天处死。

检测指标：

各组小鼠与第 1 天，第 8 天，第 10 天检测外周血白细胞数，方法同实施例 2.1。

2.3 本实施例研究融合蛋白与化疗药联合使用时对化疗引起的白细胞损伤的促恢复作用，其中使用实施例 1 制备的融合蛋白。实验分组如下：

CTX 组：连续 3 天注射 CTX，剂量为 100 mg/kg 体重/天，注射体积为 100 μL 。然后再连续 3 天注射与 CTX 等体积的 PBS 溶液；

联合用药组：从第 1 天起同时给予融合蛋白（剂量为 50 $\mu\text{g}/\text{鼠}/\text{天}$ ）和 CTX（剂量为 100 mg/kg 体重/天），注射体积均为 100 μL ；三天后停用 CTX，融合蛋白再继续注射 3 天，注射体积为 100 μL ；

对照组：每天注射 100 μL PBS 溶液，连续注射六天。

各组小鼠于第 7 天处死。

检测指标：各组小鼠与第 1 天，第 4 天，第 7 天检测外周血白细胞数，方

法同实施例 2.1。

统计学处理

各项数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验数据经方差齐性检验后，采用方差分析或 t 检验。

结果：

表 1 显示了实施例 2.1 自实验开始第 10 天，各组小鼠胸骨骨髓细胞中粒系细胞的变化情况。

表 1

组别	粒系细胞 (%)
正常组	44.3±3.55
CTX 组	22.7±2.18
50 μg 组	42.6±4.13
25 μg 组	38.3±3.26
10 μg 组	35.2±2.28

表 2 显示了实施例 2.1 自实验开始第 10 天，各组小鼠股骨骨髓细胞中粒系细胞的变化情况。

表 2

组别	粒系细胞 (%)
正常组	46.9±4.13
CTX 组	26.5±3.27
50 μg 组	43.5±3.88
25 μg 组	37.5±2.98
10 μg 组	34.5±3.56

由表 1 和表 2 的结果可以看出，小鼠腹腔注射 CTX 后，成熟粒系细胞减少，表现为轻度骨髓抑制，特别是粒系细胞的抑制作用比较明显。而给予融合蛋白后，粒系细胞数有上升的趋势，在胸骨中，50 μg 组的粒系细胞数约为 CTX 组的 1.8 倍，在股骨中，50 μg 组的粒系细胞数约为 CTX 组的 1.6 倍。可见该融合蛋白表现出恢复粒系细胞增生的作用，特别是高剂量注射组，使粒系细胞和正常对照组已无显著差别。

从图 1 可见,在未给予融合蛋白前,实验组的外周血白细胞与对照组相比均显著下降,从第 4 天开始腹腔注射融合蛋白后,可以看到融合蛋白组比单纯 CTX 组外周血白细胞上升快。第 10 天时,注射融合蛋白的各组的外周血白细胞已经恢复到正常值或以上,而单纯 CTX 组的外周血白细胞仍比正常对照组的外周血白细胞值低。

5 注射不同剂量的融合蛋白对外周血中白细胞的恢复也有剂量依赖性。由此可以看出,该融合蛋白可以恢复化疗损伤引起的外周血中白细胞减少的症状,缩短其恢复时间,表现出促进造血作用。

由图 2 可以看出,小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后,50 μg 组的骨髓有核细胞数约是 CTX 组的 2 倍 ($P<0.01$),其余注射剂量组骨髓有核
10 细胞数增加也显著高于单纯 CTX 实验组 ($P<0.01$),并且不同的注射剂量组效果也有差别,表现出剂量依赖性。结合表 2 可以看出,融合蛋白组骨髓细胞增加以粒系为主。从而有望将该融合蛋白用于治疗骨髓抑制引起的血液病。

由图 3 可以看出小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后,10 μg 组、25 μg 组、50 μg 组使脾系数增加高于单纯 CTX 组,且脾系数随着融合蛋白浓度的
15 的升高而增加 ($P<0.05\sim 0.01$),呈明显的剂量效应关系。说明该融合蛋白能保护残存的造血干细胞,促进髓外造血。

由图 4 可以看出小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后,50 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 2.8 倍 ($P<0.01$),10 μg 组的 CD34 阳性细胞
20 数约是 CTX 组的 2 倍 ($P<0.01$),且 CD34 阳性细胞随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.05$),呈明显的剂量效应关系。CD34 细胞数高说明造血旺盛一般是进入恢复阶段,表明该融合蛋白可能刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化,改善造血微环境,从而促进造血的恢复。

由图 5 可以看出小鼠经环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后,50 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 1.8 倍 ($P<0.001$),10 μg 组的 CD34 阳性细胞数
25 约是 CTX 组的 1.5 倍 ($P<0.001$),且 CD45 细胞随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.001$),呈明显的剂量效应关系。这与外周血中白细胞的变化相吻合。CD45 细胞的变化进一步表明该融合蛋白可能刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化,改善造血微环境,从而促进造血的恢复。

由图 6 可以看出小鼠经环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后,50 μg 组的粒系祖细胞集落数约是 CTX 组的 1.5 倍 ($P<0.05$),其余注射剂量组粒系祖细胞
30 集落数增加也高于单纯 CTX 实验组,且集落数随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.05$),呈明显的剂量效应关系。表明该融合蛋白可能通过刺激骨髓间充质干细胞、改善造血微环境以及其他机制而发挥其促造血活性。

表 3 显示了实施例 2.2 中各组不同时间外周血白细胞（WBC）的变化情况。

表 3

组别	WBC ($10^9/L$)		
	1 天	8 天	10 天
对照组	8.31 ± 0.23	8.62 ± 0.31	8.53 ± 0.56
CTX 组	8.28 ± 0.52	2.13 ± 0.27	1.21 ± 0.19
联合用药组	8.19 ± 0.43	7.12 ± 0.36	5.32 ± 0.25

由表 3 可以看出提前注射一定量的融合蛋白可以有效减轻化疗引起的外周血白细胞下降，在第 10 天时，联合用药组外周血白细胞数约为 CTX 组的 4.3 倍，说明通过提前给予该融合蛋白可预防化疗引起的白细胞减少。

表 4 显示了实施例 2.3 中各组不同时间外周血白细胞（WBC）的变化情况

表 4

组别	WBC ($10^9/L$)		
	1 天	4 天	7 天
对照组	8.36 ± 0.61	8.12 ± 0.58	8.25 ± 0.73
CTX 组	7.98 ± 0.38	0.97 ± 0.17	2.52 ± 0.21
联合用药组	8.19 ± 0.53	2.82 ± 0.29	6.83 ± 0.32

由表 4 的结果可以看出融合蛋白与 CTX 联用时能减轻 CTX 对外周血白细胞的损伤，在第 4 天时，联合用药组外周血白细胞数量约为 CTX 组的 3 倍。在停用 CTX 后，联合用药组外周血白细胞的恢复又比 CTX 组要快，说明融合蛋白可以用于修复化疗引起的白细胞下降。由以上结果可看出化疗过程中同时给予该融合蛋白，可预防化疗中或化疗后引起的白细胞减少。

实施例 3

融合蛋白在放疗损伤模型中的促进造血作用

本实施例的目的是观察融合蛋白对放疗引起的造血损伤的治疗作用，为治疗肿瘤患者放疗后骨髓损伤造血功能低下寻找安全有效的药物。其中，使用实施例 1 制备的融合蛋白。

方法：

采用清洁级 BALB/c 小鼠，雄性，体重 18~20 g，随机分组，每组 30 只。实验分组如下：

放疗组：小鼠经 6.0Gy 一次性照射后，连续两周注射 100 μ L PBS 溶液；

融合蛋白组：小鼠经 6.0Gy 一次性照射后，连续两周注射融合蛋白溶液，剂量为 50 μ g/鼠/天，注射体积为 100 μ L；

正常组：小鼠不做任何处理，连续两周注射 100 μ L PBS 溶液。

- 5 各组小鼠于给药结束后检测外周血白细胞数，然后处死，检测小鼠骨髓有核细胞数 (BMNC)；小鼠脾系数，方法同实施例 2。计算小鼠存活率。

统计学处理

10 各项数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验数据经方差齐性检验后，采用方差分析或 t 检验。

结果：

15 放疗组的外周血白细胞与正常组相比显著下降，连续两周注射融合蛋白的融合蛋白组的外周血白细胞已经恢复到正常值或以上。由此可以看出，该融合蛋白可以恢复放疗损伤引起的外周血中白细胞减少的症状，缩短其恢复时间，表现出促进造血作用。

表 5 显示了放疗 2 周后各组小鼠粒细胞、骨髓有核细胞数、脾系数及小鼠存活率情况。

表 5

组别	粒细胞 (%)	骨髓有核细胞数 (10^6 个/股骨)	脾系数 (mg/g)	存活率
正常组	42.1 $\pm$ 2.56	35.3 $\pm$ 1.1031	5.69 $\pm$ 0.23	96.7%
放疗组	11.8 $\pm$ 2.13	7.6 $\pm$ 0.1065	1.12 $\pm$ 0.11	43.3%
融合蛋白组	20.3 $\pm$ 3.12	15.3 $\pm$ 0.9863	3.32 $\pm$ 0.18	73.3%

20 由表 5 可以看出放疗小鼠在注射融合蛋白两周后，骨髓粒细胞数、有核细胞数、脾系数和存活率都明显高于放疗组，其中骨髓粒细胞数、有核细胞数和脾系数都比放疗组提高了约两倍，存活率提高了约 1.7 倍，从而有望将该融合蛋白用于治疗放疗后骨髓抑制所引起的疾病。

实施例 4

25 采用与实施例 1 相类似的方法，不同之处在于，用全基因合成方式合成 DNA 序列 (SEQ ID NO:3)，得到的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

实施例 5

采用与实施例 2 相同的方法，分组方式相同，检测实施例 4 制备的融合蛋白在对化疗引起的白细胞减少症、化疗后骨髓损伤造血功能低下等的预防和/或治疗作用。

结果表明，给予实施例 4 制备的融合蛋白后，粒系细胞数有上升的趋势，在胸骨中，50 μg 组的粒系细胞数约为 CTX 组的 1.9 倍，在股骨中，50 μg 组的粒系细胞数约为 CTX 组的 1.7 倍。可见该融合蛋白表现出恢复粒系细胞增生的作用，特别是高剂量注射组，使粒系细胞和正常对照组已无显著差别。

从第 4 天开始腹腔注射融合蛋白后，可以看到融合蛋白组比单纯 CTX 组外周血白细胞上升快。第 10 天时，注射融合蛋白的各组的外周血白细胞已经恢复到正常值或以上，而单纯 CTX 组的外周血白细胞仍比正常对照组的外周血白细胞值要低。该融合蛋白可以恢复化疗损伤引起的外周血中白细胞减少的症状，缩短其恢复时间，表现出促进造血作用。

小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后，50 μg 组的骨髓有核细胞数约是 CTX 组的 2.2 倍 ($P<0.01$)，其余注射剂量组骨髓有核细胞数增加也显著高于单纯 CTX 实验组 ($P<0.01$)，并且不同的注射剂量组效果也有差别，表现出剂量依赖性。融合蛋白组骨髓细胞增加以粒系为主。从而有望将该融合蛋白用于治疗骨髓抑制引起的血液病。

小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后，10 μg 组、25 μg 组、50 μg 组使脾系数增加高于单纯 CTX 组，且脾系数随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.05\sim 0.01$)，呈明显的剂量效应关系。说明该融合蛋白能保护残存的造血干细胞，促进髓外造血。

小鼠经给予环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后，50 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 2.9 倍 ($P<0.01$)，10 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 2.1 倍 ($P<0.01$)，且 CD34 阳性细胞随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.05$)，呈明显的剂量效应关系。CD34 细胞数高说明造血旺盛一般是进入恢复阶段，表明该融合蛋白可能刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化，改善造血微环境，从而促进造血的恢复。

小鼠经环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后，50 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 1.9 倍 ($P<0.001$)，10 μg 组的 CD34 阳性细胞数约是 CTX 组的 1.6 倍 ($P<0.001$)，且 CD45 细胞随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.001$)，呈明显的剂量效应关系。这与外周血中白细胞的变化相吻合。CD45 细胞的变化进一步表

明该融合蛋白可能刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化，改善造血微环境，从而促进造血的恢复。

由图 6 可以看出小鼠经环磷酰胺化疗 3 天再腹腔注射融合蛋白 6 天后，50 μg 组的粒系祖细胞集落数约是 CTX 组的 1.7 倍 ($P<0.05$)，其余注射剂量组粒系祖细胞集落数增加也高于单纯 CTX 实验组，且集落数随着融合蛋白浓度的升高而增加 ($P<0.05$)，呈明显的剂量效应关系。表明该融合蛋白可能通过刺激骨髓间充质干细胞、改善造血微环境以及其他机制而发挥其促进造血活性。

此外，提前注射一定量的融合蛋白可以有效减轻化疗引起的外周血白细胞下降，在第 10 天时，联合用药组外周血白细胞数约为 CTX 组的 4.5 倍，说明通过提前给予该融合蛋白可预防化疗引起的白细胞减少。

融合蛋白与 CTX 联用时能减轻 CTX 对外周血白细胞的损伤，在第 4 天时，联合用药组外周血白细胞数量约为 CTX 组的 3.5 倍。在停用 CTX 后，联合用药组外周血白细胞的恢复又比 CTX 组要快，说明融合蛋白可以用于修复化疗引起的白细胞下降。由以上结果可看出化疗过程中同时给予该融合蛋白，可预防化疗中或化疗后引起的白细胞减少。

实施例 6

采用与实施例 3 相同的方法，分组方式相同，检测实施例 4 制备的融合蛋白对放疗引起的造血损伤等的预防和/或治疗作用。

结果表明，放疗组的外周血白细胞与正常组相比显著下降，连续两周注射融合蛋白的融合蛋白组的外周血白细胞已经恢复到正常值或以上。骨髓粒系细胞数、有核细胞数、脾系数和存活率都明显高于放疗组，其中骨髓粒系细胞数、有核细胞数和脾系数都比放疗组提高了约两倍，存活率提高了约 2 倍。由此可以看出，该融合蛋白可以恢复放疗损伤引起的外周血中白细胞减少的症状，缩短其恢复时间，表现出促进造血作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1、一种融合蛋白的用途，其特征在于，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，用于制备：

(i) 刺激骨髓间充质干细胞向造血干/祖细胞分化的药物；或

(ii) 促进粒系造血祖细胞增殖的药物。

2、如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物用于：

(1) 预防和/或治疗化疗引起的造血功能低下；

(2) 预防和/或治疗放疗引起的造血功能低下；或

(3) 预防和/或治疗白细胞减少症。

3、如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述药物在放疗或化疗之前、之中、和/或之后使用。

4、一种融合蛋白的用途，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，其特征在于，用于促进粒系造血祖细胞的增殖。

5、一种融合蛋白的用途，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示，其特征在于，用于制备预防和/或治疗白细胞减少症的药物。

6、一种体外促进粒系祖细胞增殖的方法，其特征在于，在粒系祖细胞的培养基添加 100 ng/mL~5 μ g/mL 的融合蛋白，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示。

7、一种药物组合物，其特征在于，包含：

融合蛋白，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示；以及药学上可接受的载体或赋形剂。

8、如权利要求 7 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物在放疗或化疗之前、之中、和/或之后使用。

9、如权利要求 7 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还包括环磷酸胺。

10、如权利要求 7 所述的药物组合物的用途，其特征在于，用于制备促进粒系造血祖细胞增殖的药物。

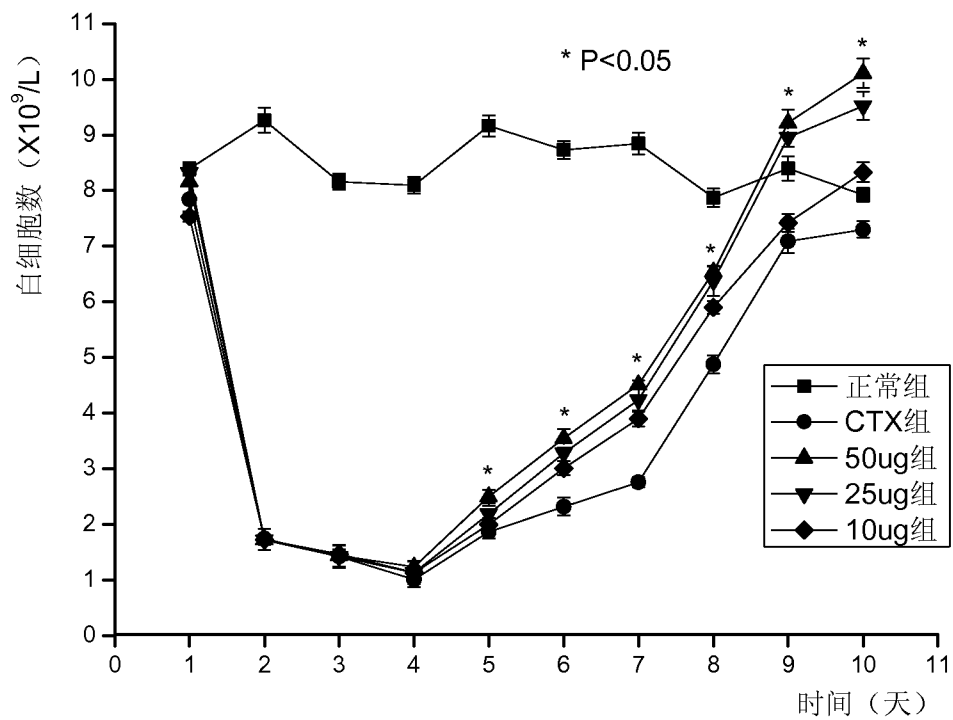


图 1

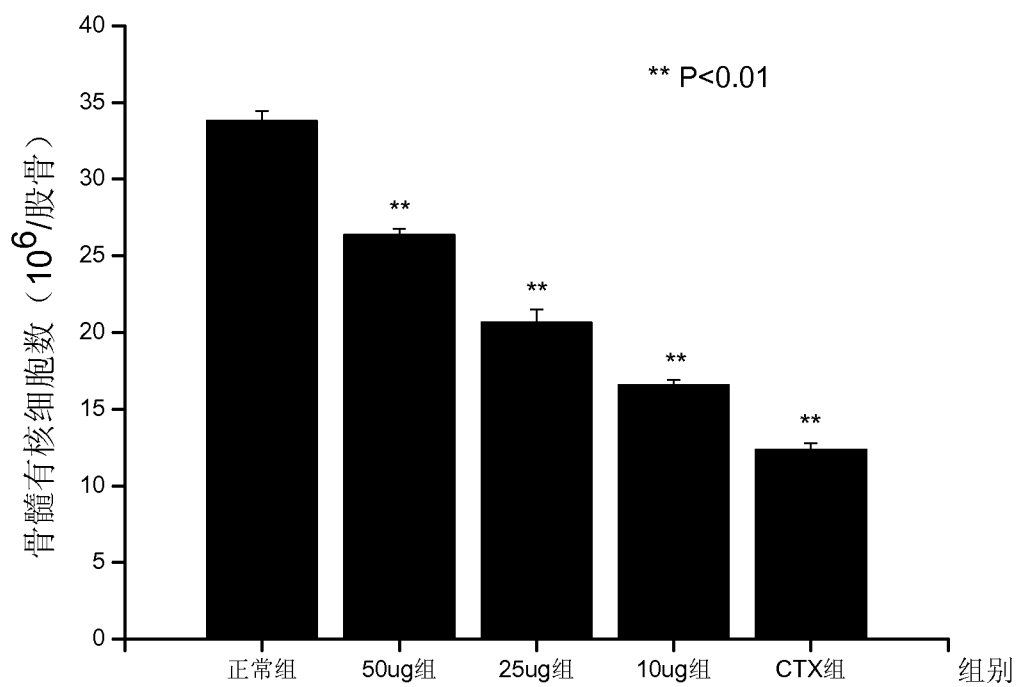


图 2

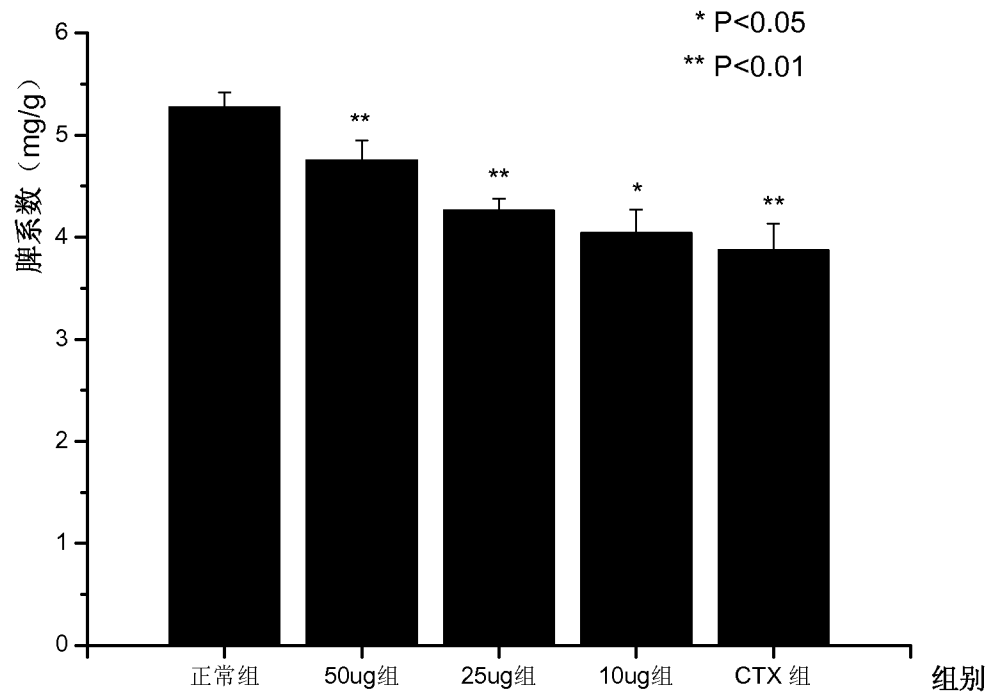


图 3

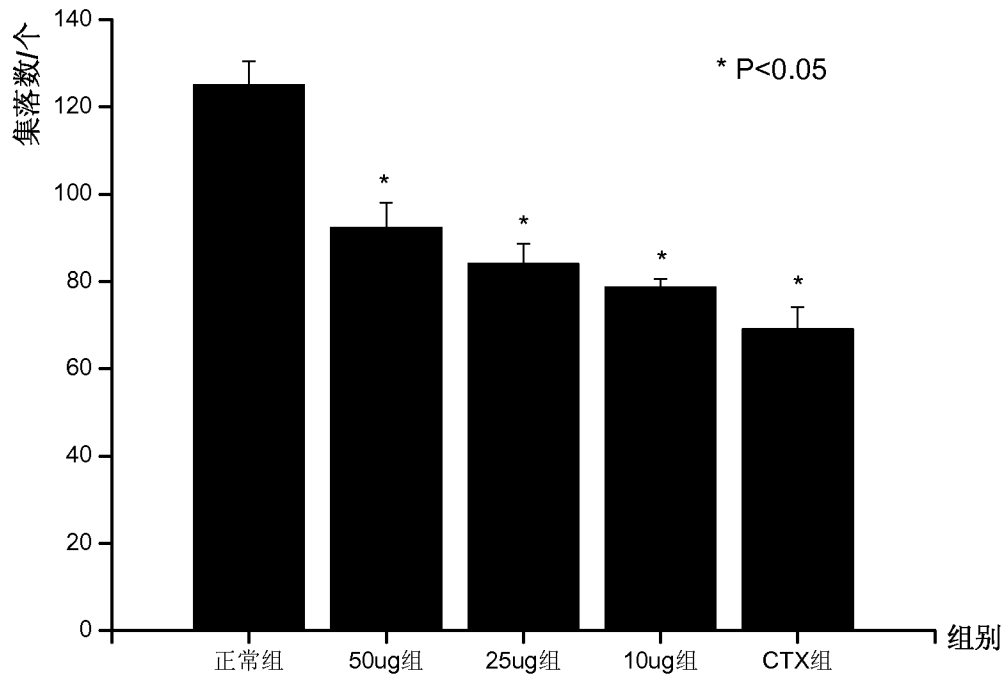


图 4

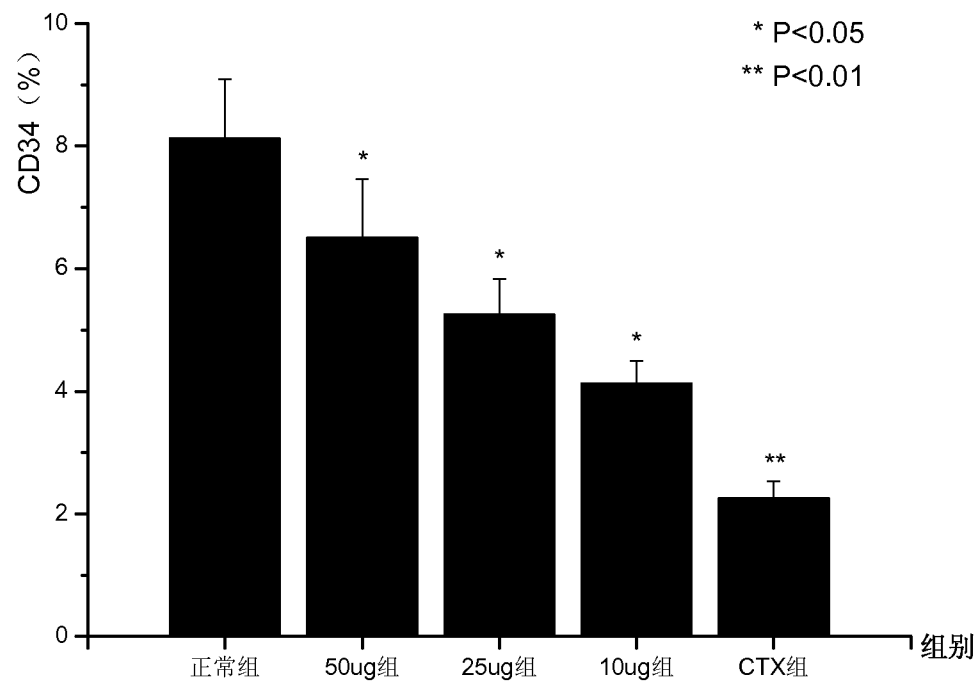


图 5

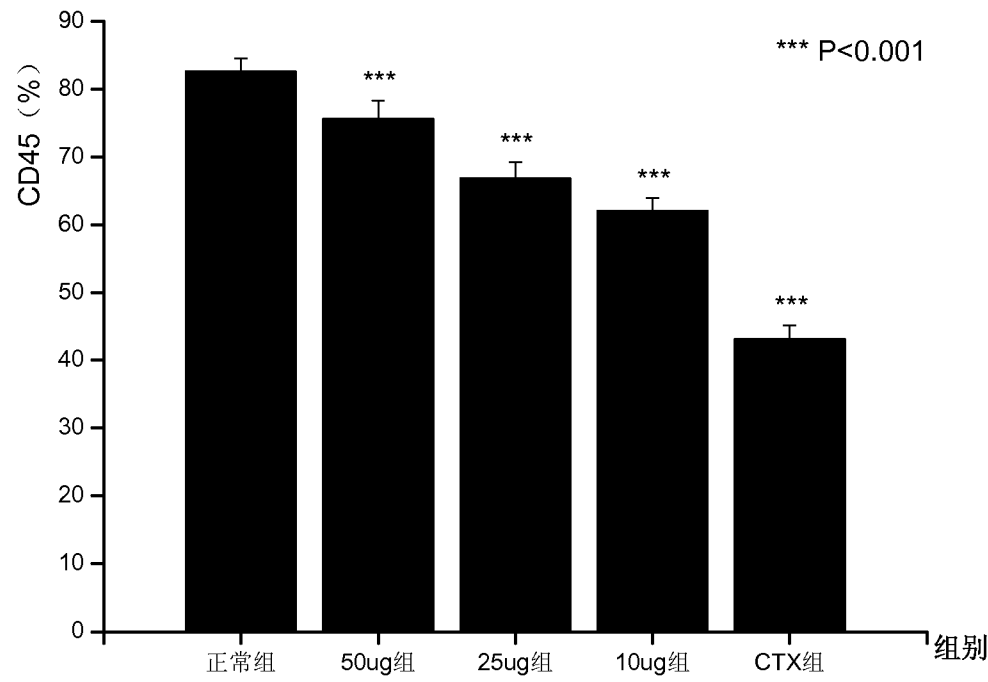


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/088671

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.:4

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

the subject matter of this claim is directed to a use of fusion protein for promoting the proliferation of granulocyte hematopoietic progenitor cells. According to the common knowledge in the art, promoting the proliferation of granulocyte hematopoietic progenitor cells could be a treatment for diseases such as medulla-suppressed anemia, and the subject matter of this claim in fact is a method for treatment of diseases, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39. 1.

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. ☐ 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

International application No.
PCT/CN2013/088671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: 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, CNABS, CNKI, PubMed, BIOSOS, GenBank

bone morphogenetic protein-2, BMP-2, fusion, hematopoietic, hematopoiesis, mesenchymal stem cell, MSC, differentiation, proliferation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101787369 A (SHANGHAI REBONE BIOMATERIALS CO., LTD.) 28 July 2010 (28.07.2010) , see description, pages 5 and 8, and embodiments 3 and 6	7-8
Y		1-3, 5, 6, 9, 10
Y	LIU, Shuibing. The rescue mechanism of recombination human bone morphogenetic protein-2 for acute hematopoietic injury in mice. China Doctoral Dissertations Full-text Database Medicine & Public Health, 2009, no.1, E079-14, pages 8-9, 27, 46, 53, 68, and 74	1-3, 5, 6, 9, 10
Y	CN 1951964 A (SHANGHAI REBONE BIOMATERIALS CO., LTD.) 25 April 2007 (25.04.2007) , see description, pages 5 and 6	1-3, 5, 6
PX	CN 102973922 A (EAST-CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 March 2013 (20.03.2013) , see claims 1-10	1-3, 5-10

☐ 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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"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	"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 01 March 2014 (01.03.2014)	Date of mailing of the international search report 20 March 2014 (20.03.2014)
Name and mailing address of the ISA 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 YANG, Yingyue Telephone No. (86-10) 62412184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/088671

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101787369 A	28.07.2010	US 2010190209 A1	29.07.2010
		US 7947821 B2	24.05.2011
		CN 101787369 B	19.06.2013
CN 1951964 A	25.04.2007	CN 1951964 B	12.05.2010
CN 102973922 A	20.03.2013	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/088671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/02 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i

A61P 7/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: 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, CNABS, CNKI, PubMed, BIOSIS, GenBank

骨形态发生蛋白-2, 骨形成蛋白-2, 融合, 造血, 间充质干细胞, 分化, 增殖, bone morphogenetic protein-2, BMP-2, fusion, hematopoietic, hematopoiesis, mesenchymal stem cell, MSC, differentiation, proliferation

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	CN101787369A (上海瑞邦生物材料有限公司) 28.7 月 2010 (28.07.2010) 参见说明书第 5、8 页, 实施例 3、6	7-8
Y		1-3, 5, 6, 9, 10
Y	刘水冰, 重组人骨形成蛋白-2 治疗小鼠急性造血损伤的机制研究. 中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 2009 年, 第 1 期, E079-14. 第 8-9、27、46、53、68、74 页	1-3, 5, 6, 9, 10
Y	CN1951964A (上海瑞邦生物材料有限公司) 25.4 月 2007 (25.04.2007) 参见说明书第 5-6 页	1-3, 5, 6
PX	CN102973922A (华东理工大学) 20.3 月.2013 (20.03.2013) 参见权利要求 1-10	1-3, 5-10



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

01.3 月 2014 (01.03.2014)

国际检索报告邮寄日期

20.3 月 2014 (20.03.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

杨莹跃

电话号码: (86-10) 62412184

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：4

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：该权利要求所请求保护的主体是融合蛋白用于促进粒系造血祖细胞的增殖，根据本领域的公知常识，促进粒系造血祖细胞增殖可以治疗骨髓抑制性贫血等疾病，即该权利要求所请求保护的主体实质上是一种疾病的治疗方法，涉及细则39.1定义的不要求检索的主题。

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. ☐ 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附加费。

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：

关于异议的说明：☐ 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/CN2013/088671

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101787369 A	28.07.2010	US 2010190209 A1	29.07.2010
		US 7947821 B2	24.05.2011
		CN 101787369 B	19.06.2013
CN 1951964 A	25.04.2007	CN 1951964 B	12.05.2010
CN102973922A	20.03.2013	无	

A. 主题的分类

A61K38/02(2006.01) i

A61P7/06(2006.01) i

A61P7/00(2006.01) i