

(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:

2003年6月19日(19.06.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/049754 A1

- (51) 国际分类号⁷: A61K 38/10, C07K 7/08, C12N 5/08, A61P 7/00
- (21) 国际申请号: PCT/CN02/00772
- (22) 国际申请日: 2002年10月31日(31.10.2002)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
01132276.4 2001年11月23日(23.11.2001) CN
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海益众生物技术有限公司(SHANGHAI YIZHONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区李时珍路288号101室, Shanghai 201203 (CN).
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 程文英(CHENG, Wenyong) [CN/CN]; 陈红红(CHEN, Honghong) [CN/CN]; 中国上海市斜土路2094号, Shanghai 200032 (CN)。 陈统一(CHEN, Tongyi) [CN/CN]; 中国上海市枫林路180号, Shanghai 200032 (CN)。 施德源(SHI, Deyuan) [CN/CN]; 中国上海市斜土路2096弄6号2405室, Shanghai 200083 (CN)。 陆怡(LU, Yi) [CN/CN]; 中国上海市广中路368弄11号202室, Shanghai 200083 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE USE OF OSTEOGENIC GROWTH PEPTIDE IN THE ENHANCEMENT OF HAEMOPOIESIS

(54) 发明名称: 成骨生长肽在促进造血方面的应用

(57) Abstract: The osteogenic growth peptide (OGP) is a kind of polypeptide that has 14 amino acid residues and exists in the animal and human body. According to the present invention OGP has not only the function in the promotion of ossification but the proliferation of haemopoiesis cells as well. The present invention discloses the use of osteogenic growth peptide in the preparation of the pharmaceutical composition for enhancing the proliferation of haemopoietic cells such as granulocytes. It also provides a method for using the OGP in promoting the development of granulocyte progenitor cell in vitro. OGP is different from the granulocyte or granulocyte monocyte colony stimulating factor in that it does not have the function of stimulating leukemia cell such as human TF-1.

(57) 摘要

成骨生长肽(Osteogenic Growth Peptide, OGP)是在人和动物体内发现的一种含 14 个氨基酸的多肽, 它对成骨细胞生长呈双向调节作用。本发明研究结果表明, OGP 除增强成骨效应外, 还是一种有效的促进以粒细胞为主的造血细胞增殖的促造血因子。本发明提供了成骨生长肽在用于制备促进以粒细胞为主的造血细胞增殖的药物组合物方面的用途。还提供了利用 OGP 在体外促进粒系祖细胞生长的方法。与其他粒/粒-单集落刺激因子所不同的是, OGP 对人 TF-1 等白血病细胞无刺激增殖作用。



WO 03/049754 A1

成骨生长肽在促进造血方面的应用

技术领域

本发明涉及成骨生长肽(Osteogenic Growth Peptide, OGP)在促进造血
5 方面的应用。

背景技术

成骨生长肽(Osteogenic Growth Peptide)是1988年Bab等在人和动物
体内发现的一种能够促进骨细胞生长的14-氨基酸多肽。当机体骨折或骨髓
10 损伤后,除了在骨折或受损骨髓的局部有成骨反应外,还伴有全身的成骨反
应[Bab I, et al. (1985) Calcif Tissue Int. 37: 551-555; Foldes J, et
al. (1989) J Bone Miner Res. 4: 643-646]。经深入的实验研究表明,愈
合的骨髓组织能释放几种促进成骨的因子进入血循环而致全身成骨反应增强,
经研究证实并分离、提纯,有一种因子被称为成骨生长肽(Osteogenic Growth
15 Peptide, OGP) [Bab I, et al. (1988) Endocrinology 123: 345-352; Bab
I, et al. (1992) EMBO J 11: 1867-1873]。进一步的研究表明,OGP的氨
基酸序列为ALKRQRGTLYGFGG,与H4组蛋白C-末段的氨基酸序列相同,含有
T细胞受体 β 链v区和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) outB区的5个残基序
列[Kayne PS, et al., (1988) Cell 55:27-39; Bab I, et al. (1992) EMBO
20 J 11: 1867-1873],其进化高度保守,人、鼠同源且作用特性相同。

在生理状态下,OGP存在于人和哺乳动物的血清中,主要以结合的形式,
即OGP-OGP结合蛋白(OGPBP)复合物的形式存在,约占OGP总量的80%-
97%[Greenberg Z, et al. (1995) JCE & M. 80(8):2330-2335]。有关OGPBP
的分子结构目前尚未完全明确,从有关文献报道认为可能是 α_2 -巨球蛋白,与
25 其他多肽调节因子相类似,OGPBP的作用可能是保护血清中的OGP以免被降
解,因而能调节OGP活性部分在血清中的水平。

由于人和动物血清中天然OGP同源,进化高度保守,提示OGP可能具有
重要的生理功能,对其生物活性的研究主要集中在它的成骨活性方面。从OGP
与骨髓造血、骨形成之间的关系分析,OGP可能有促进骨髓造血的功能。现

有的实验认为，OGP 能促进正常小鼠的骨髓造血；对骨髓移植的小鼠，则能促进外源骨髓的植入和造血重建，起到辅助治疗作用。然而，这些研究还认为，OGP 主要是通过促进移植的干细胞的增殖，从而增加包括红细胞和血小板在内的造血细胞的可供量。

5 目前肿瘤发病率高，临床上采用放疗、化疗治疗恶性肿瘤，放、化疗剂量越大，对肿瘤细胞的杀伤力越强，治愈率越高。但同时伴有严重的副作用，主要导致骨髓抑制或损伤，造成造血功能低下，免疫力下降，限制了放、化疗剂量的提高。所以促进肿瘤患者造血功能恢复，对于提高肿瘤治愈率，降低感染发生率、肿瘤复发率和死亡率非常关键。

10 临床上主要应用重组人粒系集落刺激因子(rhG-CSF, 惠尔血)和/或重组人粒单系集落刺激因子(rhGM-CSF, 升白能)促进造血功能的恢复。它们直接刺激粒系造血祖细胞增殖，缩短了白细胞和中性粒细胞恢复的时间，疗效高，但价格昂贵，工薪阶层不胜负担。

此外，rhG-CSF 和 rhGM-CSF 的临床使用还存在一些问题：(1)肿瘤和白血病细胞具有 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增加肿瘤的复发率；(2)CSF 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；(3)选择性促进粒系祖细胞的增殖，对红系和巨核细胞系无促进作用；(4)临床使用需密切监测白细胞的变化，严防幼稚细胞增生。

15 因此，本领域迫切需要开发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

本发明的目的就是提供一种促进以粒系为主的造血细胞增殖的新的促造血因子，而对部分肿瘤细胞无刺激增殖作用。

25 本发明的另一目的就是提供一种用于促进以粒系为主的造血细胞增殖的药物组合物。

在本发明的第一方面，提供了一种成骨生长肽(OGP)的用途，它被用于制备促进以粒细胞为主的造血细胞增殖的药物组合物。

在一优选例中，所述的药物组合物治疗以下病症或状况：

- (1)治疗放射损伤引起的造血功能低下；
- (2)治疗化疗药物引起的造血功能低下；
- (3)促进人骨髓粒系造血祖细胞的增殖；
- 5 (4)治疗白细胞减少症。

在另一优选例中，所述的药物组合物含有成骨生长肽和选自下组的促造血因子：G-CSF、GM-CSF、TPO 或其混合物。

在另一优选例中，OGP 被用于制备促进粒细胞增殖的药物组合物。

在另一优选例中，所述的药物组合物在放疗、化疗的之前、之中、或之后使用。

在本发明的第二方面，提供了一种体外促进粒系祖细胞生长的方法，它包括步骤：在适合粒系祖细胞生长的培养基中培养粒系祖细胞，其中所述的培养基含有 10^{-14} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽。

在本发明的优选例中，所述的培养基含有 10^{-13} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽，更佳地所述的培养基含有 10^{-12} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽。

附图说明

图 1 显示了 sOGP 对小鼠 4Gy 照射后不同时间白细胞(WBC)数的影响。

图 2 显示了不同剂量 sOGP 对小鼠 4Gy 照射后第 8 天白细胞(WBC)数的影响。

图 3 显示了不同剂量 sOGP 对小鼠 4Gy 照射后第 8 天骨髓有核细胞数的影响。

图 4 显示了不同剂量 sOGP 对小鼠 7.5Gy 照射后 CFU-S 和脾系数的影响。

图 5 显示了不同剂量 sOGP 对正常小鼠白细胞(WBC)数的影响

图 6 显示了不同剂量 sOGP 对正常小鼠骨髓有核细胞数的影响。

图 7 显示了不同剂量 sOGP 对离体正常人骨髓粒系祖细胞集落形成的作用。

图 8 显示了不同剂量 sOGP 对红白血病 TF-1 细胞增殖的影响。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过体外试验研究显示，sOGP 能促进正常人骨髓粒系祖细胞的增殖，体外培养粒系祖细胞集落形成率在一定浓度范围内随 sOGP 浓度的增加而增高，呈现明显的剂量效应关系。

5 此外，本发明的体内实验研究也显示，sOGP 能促进放射损伤和化疗药物导致的造血功能低下的恢复，小鼠 4Gy 照射后皮下注射 sOGP 能加快外周血白细胞数和骨髓有核细胞数的恢复，显著高于照射对照组，在一定剂量范围内呈剂量-效应关系；sOGP 还能使 7.5Gy 照射小鼠的 CFU-S 和相应的脾系数显著高于照射对照组，促进髓外造血。而且，sOGP 能促进注射化疗药物环磷酰胺小鼠的骨髓有核细胞数和外周血白细胞数的恢复，与环磷酰胺对照组相比
10 差别显著。

本发明的动物实验研究还发现，sOGP 能促进正常小鼠的骨髓有核细胞数增加 15~20%，使外周血 WBC 数增加 30~40%，血小板和红细胞增加约 10%，表明 sOGP 以促进粒系造血为主，红系和血小板系亦有增加趋势。本发明的这些研究表明，OGP
15 可认为是一种有效的促造血因子，可以有临床的应用前景。

此外，恢复正常造血及骨髓移植成功的先决条件之一是存在组成造血微环境的功能性基质细胞和组织，它决定了残余造血干细胞的增殖和注入的造血干细胞从外周血循环植入到骨髓组织，并支持造血。在体外骨髓长期培养中，包含基质组织的骨髓能够维持造血干细胞存活。在此培养体系中加入
20 量有促进造血作用的 sOGP 则有助于造血干细胞在体外的扩增，为移植提供更多的造血干细胞。将体内、体外方法相结合将为骨髓移植提供更为有效的解决办法。

研究认为，sOGP 在体内通过刺激骨髓间质干细胞增殖，改善造血微环境（主要包括纤维组织、骨和骨细胞），促进自然发生或诱发的骨髓抑制或损伤
25 的造血功能恢复，并能刺激骨髓移植后的造血重建。

本文所用的 OGP 定义包括 OGP 的天然多肽、人工合成多肽、所有同系物、同分异构体或遗传变异体和所有其它变异体。

实验数据表明，OGP 是一种有确定序列的单一多肽(Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly)。OGP 的同系物，同分异构体

或遗传变异体是指含有天然 OGP 氨基酸序列至少约 40%的保守序列，含至少约 60%的保守序列的多肽优先受到保护，含至少约 75%的保守序列的更为优先。较佳地，用于本发明的成骨生长肽具有如下氨基酸序列：Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly。

5 需要说明的是，OGP 的其它变异体也包括在本发明的范围内。尤其包括仅通过取代保守氨基酸而获得的不同于天然 OGP 的任何变异体。本发明还包括各种 OGP 及其片段，只要纯化的多肽在体内外显现促成骨作用和促进造血作用。OGP 片段可能是含有 6 个或多于 6 个氨基酸的小的肽类。比 OGP 大的、具有促进成骨和造血作用的多肽，也包括在本发明范围内。

10 OGP 可以通过分离、重组、和人工合成的方法制备。在本发明的优选例中，采用生化方法人工合成的 sOGP 与血清中天然存在的 OGP 结构相一致，具有促进成骨和造血的作用。

在本发明的另一方面提供了包含上述 OGP 多肽的药物组合物，所说的药物组合物含有作为基本活性成分的 OGP 多肽和药学上可接受的载体或赋形剂。该 OGP 多肽的药物组合物宜是无毒和剂型稳定的。

15 本发明所述的药物组合物具有提高人和哺乳动物造血干/祖细胞的增殖活性，促进造血重建，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，促进骨髓移植中外源性造血细胞的植入，缩短恢复时间，并且对部分肿瘤细胞无刺激增殖作用。

20 与目前临床上普遍使用的重组人粒系集落刺激因子 rhG-CSF，rhGM-CSF 相比较，本发明的 OGP 药物组合物通过促进骨髓间质干细胞增生，改善造血微环境，以利造血干/祖细胞的增殖，加快外周血细胞恢复，具有作用缓和，双向调节，易于控制等优点，且对人 TF-1 等白血病细胞无促进增殖作用。另外，本发明的 OGP 的药物组合物中发挥药效作用的主要成分具有与天然存在的人 OGP 相同的结构，从而显著避免了长期使用后可能造成的免疫原性。

25 此外，生化合成或用重组 DNA 技术制得的 OGP 肽还可用各种已知方法制成其药学上可接受的盐，特别是碱加成盐。例如，可按本领域技术人员熟知的方法，用适当的碱处理这些肽，制得酸性氨基酸的碱加成盐。

可按制药领域已知的常规方法，将 OGP 多肽制成适合临床上特定给药方

式的药物组合物。例如可在 OGP 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胃肠道以外途径给药的溶液剂、注射剂、乳剂、滴鼻剂、滴眼剂。也可加入淀粉、乳糖、滑石粉、蔗糖、葡萄糖或甘油、液体石蜡、脂质体或明胶等赋形剂或载体，将 OGP 制成可经胃肠道途径给药的栓剂、片剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂或脂质体包裹剂。这些制剂中除含有活性成分和适当的载体或赋形剂外，还可根据需要添加其他一些辅助成分，例如一种或多种稀释剂、填充剂、乳化剂、防腐剂、表面活性剂、吸收促进剂、缓冲剂、香味剂及着色剂。

本发明的 OGP 药物组合物可通过各种常规给药途径给药，例如可经胃肠道内、皮下、皮内、鼻内、静脉内、肌肉内、直肠内、眼内等途径给药，但其中优选的给药途径是肌肉内注射、皮下注射、鼻喷雾或口服给药。此外，本发明的 OGP 药物组合物还可以在任何时候给药，例如在放疗、化疗的之前、之中、或之后使用。

综上所述，基于本发明的新发现，预期可将本发明的 OGP 肽或其盐或含有这些肽或其盐的药物组合物用于治疗放、化疗引起或自然发生的骨髓损伤造成的造血功能低下，加快骨髓移植的植入，促进造血重建。具体而言，OGP 可应用于以下方面：

1. 加快放射损伤致造血功能低下时以粒系为主的血细胞的恢复。
2. 促进化疗药物引起造血功能低下时以粒系为主的血细胞的恢复。
3. 促进人骨髓粒系造血祖细胞的增殖。
4. 加快骨髓移植后的造血重建。
5. 通过刺激骨髓间质干细胞、基质细胞增生，发挥造血重建的作用；
6. 增加供者外周血造血干细胞和造血祖细胞的数量。
7. 促进长期体外骨髓培养的造血干细胞的增殖，以利于骨髓移植。
8. 与其他促进造血的因子(如 G-CSF, GM-CSF, TPO 等)联用或配合使用，提高疗效。
9. 在血液病基因治疗中起协同作用；
10. 在治疗骨质疏松，促骨折愈合和软骨修复的同时促进造血。

此外，随着社会的进步和经济的发展，人的寿命延长，世界正在进入老龄化社会，骨质疏松症在老年人中占有很高比例，且老年人的造血机能减退。OGP 在治疗骨质疏松症，促进骨折愈合和软骨修复的同时又能促进造血，提高免疫力，改善患者的生存质量。

5

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，例如 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，
10 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

成骨生长肽在放射损伤动物模型中的促造血作用

该实施例的目的是观察 sOGP 对白细胞减少症的治疗作用，为治疗肿瘤患者放、化疗后骨髓损伤造成造血功能低下，找到安全有效的药物。
15

方法：

采用清洁级 ICR 小鼠，♂，体重 18~20g，随机分组，每组 10 只。采用 2 种照射剂量，分 2 批实验进行。实验分组如下：

20 A 组：正常对照组，未经照射；

B 组：照射对照组；

C 组：惠尔血阳性药对照组，100 μ g/kg/天；

D 组：OGP 用药组，分为 9 个剂量点，

25 (1)0.00078 nmol/鼠/天；(2) 0.00156 nmol/鼠/天；(3)0.00625 nmol/鼠/天；(4) 0.025 nmol/鼠/天；(5) 0.10 nmol/鼠/天；(6)0.40 nmol/鼠/天；(7) 1.60 nmol/鼠/天；(8)6.40 nmol/鼠/天；(9)12.80 nmol/鼠/天。

实验 1.

4. 0Gy¹³⁷Cs γ 射线一次照射小鼠后，连续 14 天皮下注射(sc)不同剂量的

sOGP, 检测如下指标:

- ①骨髓有核细胞数 (BMNC);
- ②白细胞 (WBC) 计数: 于照射后第 5, 8, 12 和 15 天检测;

5 实验 2.

7. 5Gy¹³⁷Cs γ 射线一次照射小鼠后, 连续 7 天 sc 不同剂量的 sOGP, 检测指标如下:

- ①内源性脾结节 (CFU-S);
- ②脾系数;

10

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。

15 结果:

1. sOGP 对小鼠 4Gy 照射后不同时间外周血白细胞数的影响

由图 1 可见, 照射后第 5 天, 100 μ g/kg 惠尔血 (即 rhG-CSF) 仅使小鼠 WBC 数比照射对照组略有增加, 无显著差别, sOGP0.10 和 0.50nmol/鼠/天 2 个剂量组无作用; 照射后第 8 天, sOGP0.10 和 0.50nmol/鼠剂量组和惠尔血组作用相近, 均使外周血 WBC 数显著高于照射对照 ($P < 0.001$); 照射后第 12 天, 惠尔血的作用仍非常显著 ($P < 0.001$), sOGP 也有明显的效果 ($P < 0.05$); 照射后第 15 天, sOGP 使 WBC 数增加虽仍高于照射对照, 但差别不够显著。

由此可见, 采用小鼠 4Gy 照射后第 8 天检测外周血白细胞数, 能较好的反映 sOGP 促进造血的作用。

25

2. 不同剂量的 sOGP 对 4Gy 照射小鼠外周血白细胞数的影响

从图 2 可以看出, 小鼠 4.0Gy 照射后第 8 天, 外周血中 WBC 显著下降 ($P < 0.001$)。连续皮下注射 0.00078~12.80 nmol/鼠/天不同剂量的 sOGP 后第 8 天, 从 0.00156nmol/鼠/天剂量组开始, 随着 sOGP 剂量的增加, 外周血 WBC

恢复明显加快($P<0.01\sim 0.001$),且在一定的剂量范围内呈剂量-效应关系。

3. sOGP 对 4Gy 受照小鼠骨髓有核细胞数的影响

5 由图 3 可见,小鼠 4Gy 照射后皮下注射 sOGP14 天,0.025~12.80 nmol/鼠剂量组使骨髓有核细胞数增加显著高于照射对照($P<0.01\sim 0.001$),与惠尔血的作用相近。

4. sOGP 对 7.5Gy 照射小鼠 CFU-S 和脾系数的影响

10 如图 4 所示,亚致死剂量 7.5Gy 照射小鼠后第 8 天的脾结节测定表明,照射对照组 CFU-S 数较正常对照组明显增加,脾系数则显著降低。连续 7 天给予不同剂量的 sOGP,0.02~2.5nmol/鼠/天剂量组的 CFU-S 显著高于照射对照组($P<0.05\sim 0.01$),脾系数相应也有显著增加($P<0.05$),与惠尔血的效果相近似。

15 该结果提示,sOGP 能保护残存的造血干细胞,促进髓外造血。

实施例 2

sOGP 对正常小鼠造血系统的作用

本实施例的目的是观察 sOGP 能否促进正常小鼠的造血功能,为今后临床上在治疗骨质疏松症和骨折的同时提高造血功能提供依据,以利于增强免疫力,增进治疗效果。

20

方法:

采用清洁级 ICR 小鼠,♂,体重 18~20g,随机分组,每组 10 只。实验

25 分组如下:

A 组:空白对照组;

B 组:sOGP 用药组,分为 3 个剂量点,

(1)0.02 nmol/鼠/天;

(2)0.10 nmol/鼠/天;

(3) 0.50 nmol/鼠/天。

正常小鼠连续 sc sOGP 14 天，检测以下指标：①外周血象：WBC, Plt, RBC
②BMNC 数，③骨髓细胞分类计数。

5 结果：

1. sOGP 对正常小鼠外周血白细胞、红细胞和血小板数的影响

正常小鼠 sc sOGP 3 个不同剂量 0.02、0.10 和 0.50nmol/鼠 14 天后，3 个剂量组使外周血 WBC 数比空白对照组显著增加 30~40%(图 5)，血小板和红细胞增加约 5~10%，表明 sOGP 以促进粒系造血为主，红系和血小板系亦有增加趋势。

10 2. sOGP 对正常小鼠骨髓有核细胞数及分类的影响

如图 6 所示，sOGP 3 个剂量组的 BMNC 数比空白对照组显著增加 15~20%。骨髓细胞分类计数表明，sOGP 组骨髓细胞 3 系分类比例与空白对照小鼠相同，但 sOGP 组分裂指数 $2/6 \geq 2$ ，表明 OGP 组骨髓细胞增生较空白对照组活跃。用药组粒红比值与对照组相比，前者 $5/6 > 1$ ，后者 $3/6 > 1$ ，粒系增生较显著。OGP 使骨髓的变化与外
15 周血象相一致，促进以粒系为主的造血。

实施例 3

成骨生长肽的体外促进造血活性

本实施例的目的是观察 sOGP 能否在体外促进人骨髓粒系祖细胞的集落
20 形成，为 sOGP 促进造血细胞增殖提供依据。

方法：

采用骨髓细胞半固体集落培养法。先制备骨髓细胞悬液，用 RPMI-1640 调节细胞浓度为 1×10^6 个/ml，在培养体系中加入不同浓度的 sOGP 和惠尔血，
25 在 37℃，5%CO₂ 条件下培养 11 天，显微镜下计数 CFU-G 集落数(50 个细胞以上为 1 个集落)。实验分为三组，即阴性对照组(不含 sOGP 和 G-CSF)、惠尔血(G-CSF)阳性对照组和不同浓度的 sOGP 实验组，每实验点重复 3-4 皿。

结果：

由图 7 可见, sOGP 各浓度梯度组使体外培养骨髓细胞形成的 CFU-G 集落数均明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 且集落数随着浓度的升高而增加 ($P < 0.05$), 呈明显的剂量效应关系。惠尔血在 $1.33 \times 10^{-4} \text{nmol/ml}$ 浓度时, 粒系祖细胞集落形成数为 60 个左右, 作用较强, 与体内实验结果相对应, 表明两者作用机制可能不同, 惠尔血直接刺激粒系祖细胞增殖, 而 OGP 可能通过刺激骨髓间质干细胞、改善造血微环境以及其他机制而发挥其促进造血活性。

实施例 4

成骨生长肽对 GM-CSF(升白能)依赖性人红白血病骨髓瘤细胞增殖的影响

本实施例的目的是观察 sOGP 对 GM-CSF 依赖性红白血病骨髓瘤细胞 (TF-1 细胞株) 有无增殖作用。

方法:

采用 MTT 比色法, 设置阴性对照组 (不含 sOGP 和 GM-CSF)、升白能阳性对照和 sOGP 实验组, 具体步骤如下:

1. 细胞悬液制备: 细胞清洗后, 以 1640 + 20%FBS 调整浓度为 4×10^5 个/ml, 备用;
2. 96 孔板加药: 适当稀释的 sOGP 和生白能对半稀释法依次加入各孔, 体积 $50 \mu\text{l}$;
3. 96 孔板加细胞: 细胞悬液 $50 \mu\text{l}$ 加入各孔;
4. 阴性对照孔: 加入 1640+20%FBS, $100 \mu\text{l}$ 。
5. 培养 48 小时;
6. MTT 溶液: 各孔加 5mg/ml 的 MTT 液 $10 \mu\text{l}$, 继续培养 4-6 小时;
7. 各孔加入细胞裂解液, 孵育过夜;
8. 比色: 以空白孔调零, 570nm 波长测 A 值。

结果:

如图 8 所示, 升白能阳性对照组的 OD 值随其浓度的增加而明显升高, 而在升白能低浓度段, OD 值与阴性对照组极为接近, 表明升白能在一定的浓度范围内, 能明显促进人红白血病 TF-1 细胞的增殖且有明显的剂量效应关系。

而 sOGP 各浓度梯度组的 OD 值与阴性对照组相近,表明在此浓度范围内, sOGP 对 CSF 依赖性 TF-1 红白血病细胞无促进增殖作用。

5 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文章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. 成骨生长肽的用途，其特征在于，用于制备促进以粒细胞为主的造血细胞增殖的药物组合物。

5 2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的药物组合物治疗以下病症或状况：

(1)治疗放射损伤引起的造血功能低下；

(2)治疗化疗药物引起的造血功能低下；

(3)促进人骨髓粒系造血祖细胞的增殖；

10 (4)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，所述的药物组合物含有成骨生长肽和选自下组的促造血因子：G-CSF、GM-CSF、TPO 或其混合物。

4. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，用于制备促进粒细胞增殖的药物组合物。

15 5.如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的药物组合物在放疗、化疗的之前、之中、或之后使用。

6.如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的成骨生长肽具有如下氨基酸序列：

Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly。

20 7. 一种体外促进粒系祖细胞生长的方法，其特征在于，在适合粒系祖细胞生长的培养基中培养粒系祖细胞，其中所述的培养基含有 10^{-14} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的培养基含有 10^{-13} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽。

25 9. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的培养基含有 10^{-12} - 10^{-5} mol/L 的成骨生长肽。

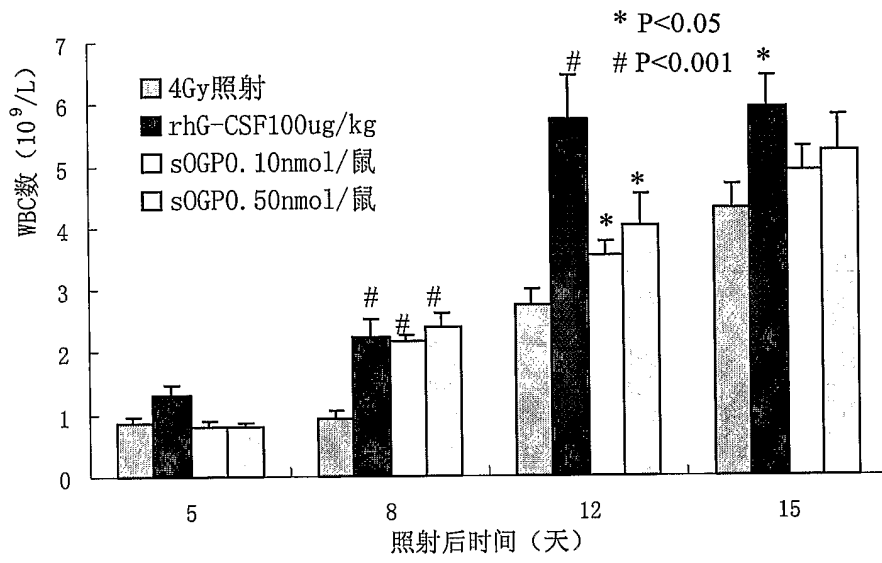


图 1

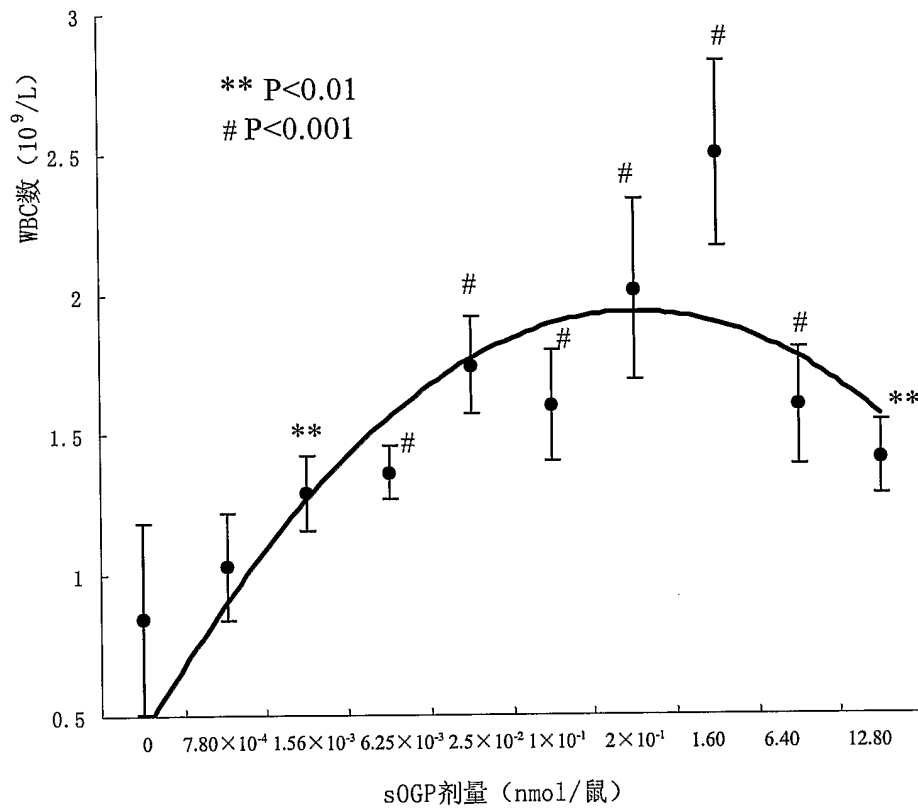


图 2

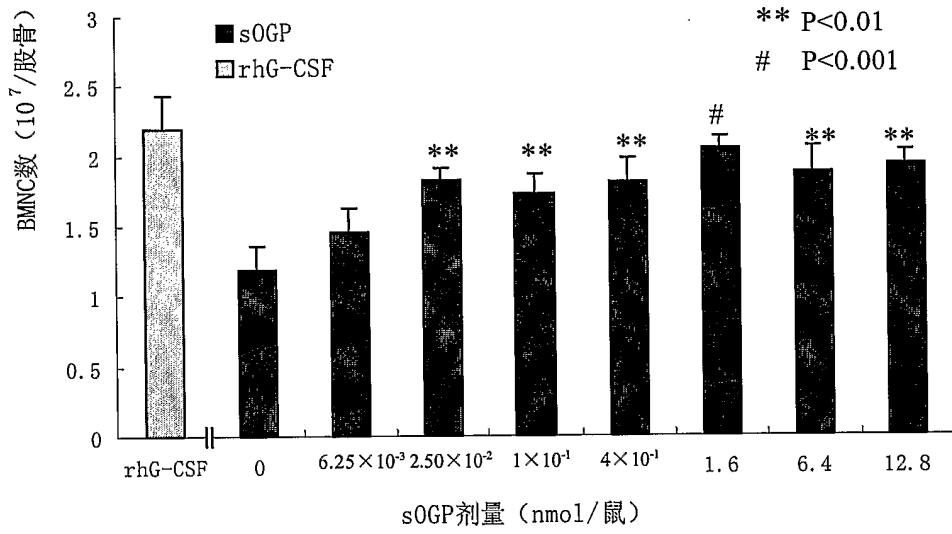


图 3

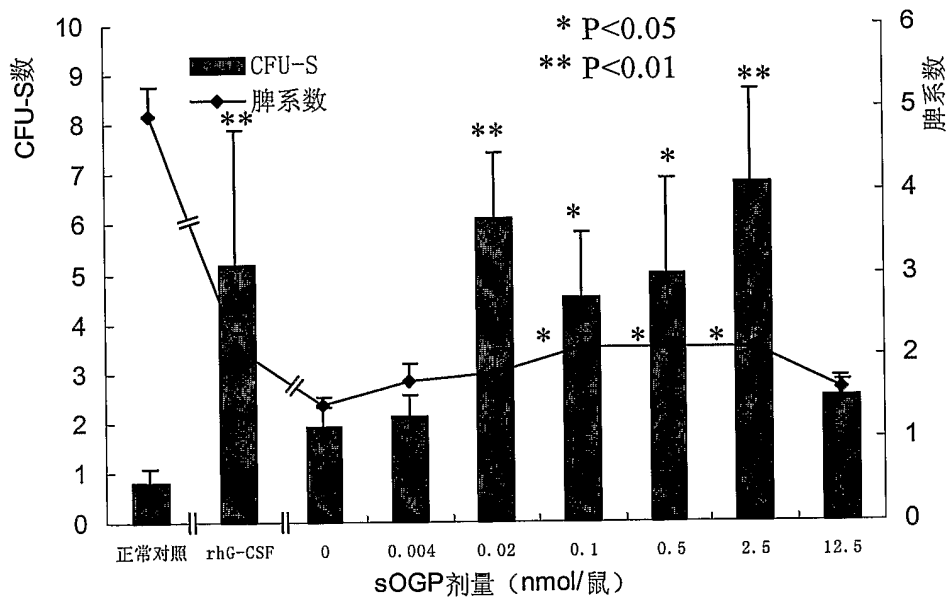


图 4

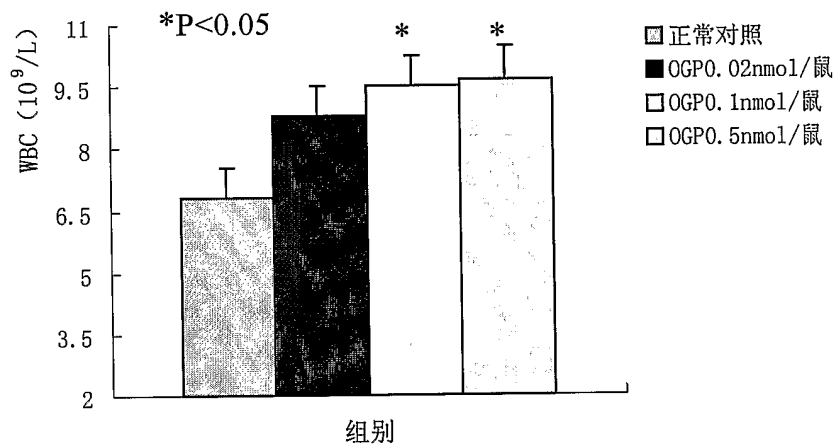


图 5

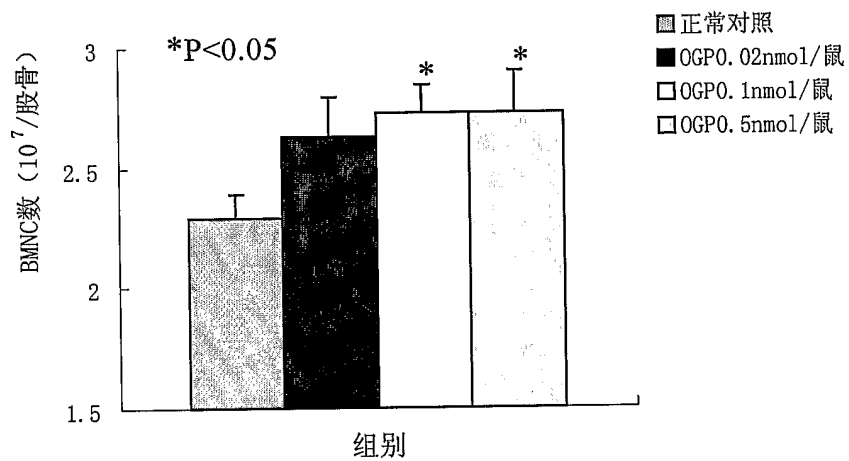


图 6

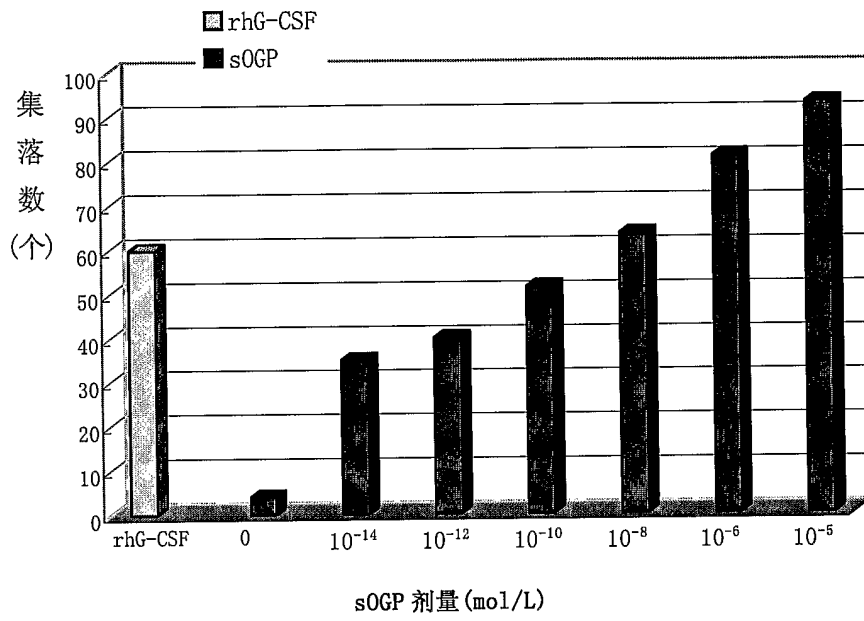


图 7

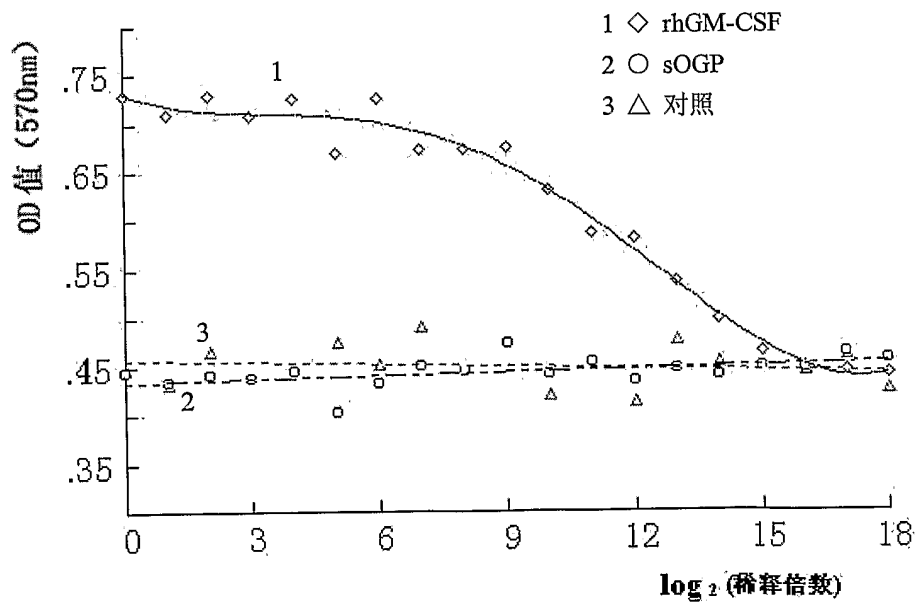


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ : A61K38/10, C07K/08, C12N5/08, A61P7/00

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)

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)


WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO9500166A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY [IL/IL]) 5 January 1995, See the whole document.	1, 3, 4, 6-9
A	WO9420529A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY [IL/IL]) 15 September 1994, See the whole document.	1, 3, 4, 6-9
A	WO9209697A (CELTRIX LABORATORIES, INC. [US/US]) 11 June 1992 (11.06.92), See the whole document.	1, 3, 4, 6-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
--	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">21 February 2003 (21.02.03)</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">03 APR 2003 (03.04.03)</p>
<p>Name and mailing address of the ISA/CN</p> <p>6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China</p> <p>Facsimile No. 86-10-62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: right;">CHANG, mao</p> <p>Telephone No. 86-10-62093906</p> 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00772

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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: 2, 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The method for the treatment and diagnosis of diseases.

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members


International application No.

PCT/CN02/00772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO9500166A	1995-01-05	AU6974994A US5461034A	1995-01-17 1995-10-24
WO9420529A	1994-09-15	AU6146794A EP0687270A JP8509960T	1994-09-26 1995-12-20 1996-10-22
WO9209697A	1992-06-11	AU9141991A EP0513334A JP5505404T US5393739A	1992-06-25 1992-11-19 1993-08-12 1995-02-28

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN02/00772

<p>A. 主题的分类</p> <p>IPC⁷: A61K38/10, C07K7/08, C12N5/08, A61P7/00</p> <p>按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)</p> <p>WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求编号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO9500166A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1995年1月5日 见全文</td> <td>1, 3, 4, 6-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO9420529A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1994年12月15日 见全文</td> <td>1, 3, 4, 6-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO9209697A(CELTRIX LABORATORIES, INC. [美国/美国]) 1992年6月11日 见全文</td> <td>1, 3, 4, 6-9</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的专用类型: "A" 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 "L" 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 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 "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的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 "X" 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是具有创造性 "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, 权利要求记载的发明不具有创造性 "&" 同族专利成员的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号	X	WO9500166A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1995年1月5日 见全文	1, 3, 4, 6-9	A	WO9420529A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1994年12月15日 见全文	1, 3, 4, 6-9	A	WO9209697A(CELTRIX LABORATORIES, INC. [美国/美国]) 1992年6月11日 见全文	1, 3, 4, 6-9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号												
X	WO9500166A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1995年1月5日 见全文	1, 3, 4, 6-9												
A	WO9420529A(YISSUM 研究开发公司[以色列/以色列]) 1994年12月15日 见全文	1, 3, 4, 6-9												
A	WO9209697A(CELTRIX LABORATORIES, INC. [美国/美国]) 1992年6月11日 见全文	1, 3, 4, 6-9												
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>21. 2 月 2003 (21.02.03)</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>03. 4月 2003 (03. 04. 03)</p>													
<p>国际检索单位名称和邮寄地址</p> <p>ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)</p> <p>传真号: 86-10-62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>常 矛</p> <p>电话号码: 86-10-62093906</p> 													

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN02/00772

第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第1项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求(编号): 2, 5
因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即:
疾病的诊断和治疗方法

2. 权利要求(编号):
因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. 权利要求(编号):
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II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第2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所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对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都进行检索, 本国际检索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所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(编号):
4. 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明; 包含该发明的权利要求是(编号):

关于异议的说明: 申请人的异议书随附加检索费同时提交。
 支付附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN02/00772

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO9500166A	1995-01-05	AU6974994A	1995-01-17
		US5461034A	1995-10-24
WO9420529A	1994-09-15	AU6146794A	1994-09-26
		EP0687270A	1995-12-20
		JP8509960T	1996-10-22
		US5814610A	1998-08-29
WO9209697A	1992-06-11	AU9141991A	1992-06-25
		EP0513334A	1992-11-19
		JP5505404T	1993-08-12
		US5393739A	1995-02-28