



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110592017 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201911029451.7

A61K 35/19(2015.01)

(22)申请日 2019.10.28

A61K 35/28(2015.01)

(66)本国优先权数据

A61P 7/06(2006.01)

201910629148.4 2019.07.12 CN

A61P 7/04(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

(71)申请人 中国医学科学院血液病医院(中国
医学科学院血液学研究所)

地址 300020 天津市和平区南京路288号

(72)发明人 周家喜 刘懿莹 刘翠翠 苏培
王洪涛

(74)专利代理机构 北京东岩跃扬知识产权代理
事务所(普通合伙) 11559

代理人 谷岳

(51)Int.Cl.

C12N 5/0786(2010.01)

C12N 5/078(2010.01)

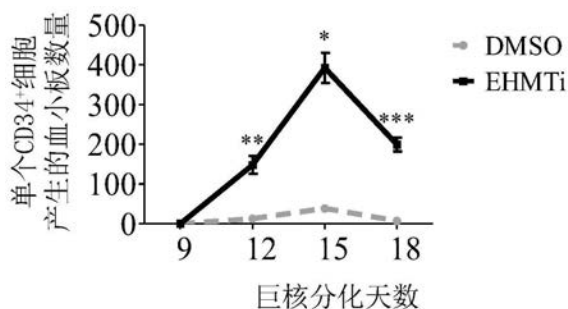
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核
细胞增殖或血小板产生的产品中的用途

(57)摘要

本发明公开了一种组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途,所述组蛋白甲基转移酶抑制剂为组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂。本发明中的组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂可促使单个CD34⁺造血干祖细胞分化产生约400个CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒,比对照组提高了10倍以上,其血小板生成效率显著也高于文献报道的一般范围,且处理时间短,可操作性和重复性强,显著降低了血小板的生产成本,为将来大规模生产用于临床治疗的功能性血小板奠定了基础。



1. 组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途, 其特征在于, 所述组蛋白甲基转移酶抑制剂为组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其特征在于, 所述巨核细胞或所述血小板来源于骨髓、外周血、脐带血或人多能干细胞中的CD34⁺细胞的分化, 优选为脐带血中的CD34⁺细胞的分化。

3. 根据权利要求1或2所述的用途, 其特征在于, 所述组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂为组蛋白甲基转移酶G9a的小分子抑制剂。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述组蛋白甲基转移酶G9a的小分子抑制剂为选自A-366、UNC0631或UNC0638中的一种或几种。

5. 根据权利要求1、2或4中所述的用途, 其特征在于, 所述促进巨核细胞增殖或血小板产生的方法为在CD34⁺细胞的分化阶段加入终浓度为100~500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂, 该方法为非治疗目的;

所述终浓度优选为200nM。

6. 根据权利要求5所述的用途, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

步骤1) 分离CD34⁺细胞;

步骤2) 用含有巨核细胞增殖诱导因子的无血清培养基重悬步骤1) 得到的分离后的CD34⁺细胞, 加入终浓度为100~500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂, 在37℃、5%CO₂条件下培养3天;

步骤3) 将细胞培养液更换为步骤2) 中所述含有巨核细胞增殖诱导因子的无血清培养基, 同时加入终浓度为100~500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂, 调整细胞密度至与步骤2) 的初始细胞密度相同, 在37℃、5%CO₂条件下培养至第6天;

步骤4) 将步骤3) 得到的细胞培养液更换为含有巨核细胞成熟诱导因子的无血清培养基, 调整细胞密度为步骤2) 或步骤3) 中初始细胞密度的5倍 ($2 \times 10^5/\text{mL} \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$), 继续培养至所需数量的血小板产生。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其特征在于, 步骤2) 或步骤3) 中所述的巨核细胞增殖诱导因子为终浓度为50ng/mL的人血小板生成素、终浓度为20ng/mL的干细胞因子和终浓度为20ng/mL的白介素-3;

步骤4) 中所述的巨核细胞成熟诱导因子为终浓度为50ng/mL的hTP0和终浓度为20ng/mL的IL-11。

8. 根据权利要求6所述的用途, 其特征在于, 步骤1)、步骤2) 或步骤3) 中所述的初始细胞密度为 1×10^5 个/mL。

9. 根据权利要求1、2或4中所述的用途, 其特征在于, 所述促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品用于治疗重度失血、贫血、免疫性血小板减少症、慢性肝病合并血小板减少症或其他原因导致的血小板低下。

10. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包含由权利要求5-8中任意一项所述的方法制得的巨核细胞或血小板。

组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途。

背景技术

[0002] 血小板是血液的有形成分之一,通过粘附、聚集、颗粒释放等功能在机体止血和血栓过程中扮演着重要角色。临床上各种病因如造血系统恶性肿瘤、再生障碍性贫血、恶性肿瘤、造血干细胞移植治疗以及放化疗,均有可能导致血小板减少或功能障碍,从而使机体发生不同程度的出血,严重时甚至危及生命。供者来源的浓缩血小板输注是目前临床上唯一治疗手段。据统计,中国每年需要输注血小板的病人数量有近一千万,血小板市场规模估计近1000亿人民币。当前临床输注的血小板尚无有效的替代品,只能从无偿献血者体内采集。而近年来,血荒所带来的临床用血和血小板制品的不足是临床实践中面临的重要难题[Yin YH,Li CQ,Liu Z.Blood donation in China:sustaining efforts and challenges in achieving safety and availability.Transfusion.2015;55(10):2523-30],体外获得血小板是解决这一难题的潜在有效途径。

[0003] 目前,可从骨髓、外周血、脐带血、人多能干细胞等不同来源的造血干祖细胞起始,诱导其分化为巨核细胞和血小板。1995年Choi等从人外周血中分离出CD34⁺细胞,与患再障的狗血清共培养,获得的巨核细胞产生的血小板样碎片可产生凝集反应,这是有关人功能性血小板产生的首次报道[Choi ES,Nichol JL,Hokom MM,et al.Platelets generated in vitro from proplatelet displaying human megakaryocytes are functional.Blood 1995;85(2):402-413]。随着TPO的发现和广泛应用,不同研究组相继报道了体外培养不同来源CD34⁺细胞,在包含TPO的不同细胞因子组合条件下,可获得具有与体内血小板类似超微结构和部分生理功能的血小板[Matsunaga T,Tanaka I,Kobune M,et al.Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34⁺ cells.Stem Cells2006;24(12):2877-2887][Norol F,Vitrat N,Cramer E,et al.Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34⁺ cells.Blood.1998;91(3):830-843][Lu SJ,Li F,Yin H,et al.Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice.Cell Res.2011,21(3):530-545]。虽然干细胞体外诱导产生血小板的研究取得了很大进展,但目前体外巨核分化效率较低,且分化产生的巨核细胞产生血小板的效率也远远低于体内的产生效率,难以满足临床需求。而且,高昂的体外生产成本也限制了血小板的规模化生产。

[0004] 小分子化合物具有低价、高效、可控的特点,可以对靶标信号进行准确的时序调节,探寻有效促进巨核分化和血小板生成的小分子化合物为获得大量的可供临床所需的功能性血小板开辟了新途径。众所周知,转录因子芳烃受体拮抗剂StemRegenin 1(SR1)特异

性促进人HS/PCs扩增[Boitano AE,Wang J,Romeo R,et al.Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells.Science.2010;329(5997):1345-8],而在巨核分化过程中,SR1通过维持产板能力更强的CD34+CD41low巨核前体细胞亚群促进巨核细胞成熟和产板[Strassel C,Brouard N,Mallo L,et al.Aryl hydrocarbon receptor-dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets.Blood.2016;127(18):2231-40]。小分子iBET-151通过抑制c-MYC的活性选择性扩增人多能干细胞来源的巨核前体细胞,同时抑制其他髓系细胞扩增,从而促进后期血小板生成[Feng Q,Shabrani N,Thon JN,et al.Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells.Stem Cell Rep.2014.3(5):817-831]。NIP-004是人TP0受体c-MPL的非肽基激活剂,据报道,添加NIP-004可显著促进后期巨核成熟和血小板生成[Nakamura T,Miyakawa Y,Miyamura A,et al.A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis.Blood.2006;107(11):4300-7]。同样,Src酪氨酸激酶的选择性抑制剂SU6656[Kaminska J,Klimczak-Jajor E,Skierski J,Bany-Laszewicz U.Effects of inhibitor of Src kinases,SU6656,on differentiation of megakaryocytic progenitors and activity of alpha1,6-fucosyltransferase.Acta Biochim Pol.2008;55(3):499-506]和Rho激酶抑制剂Y-27632[Avanzi MP,Goldberg F,Davila J,et al.Rho kinase inhibition drives megakaryocyte polyploidization and proplatelet formation through MYC and NFE2downregulation.Br J Haematol,2014;164(6):867-876]也可作为巨核分化的诱导剂,促进巨核细胞后期多倍体化过程以及功能性血小板颗粒的释放。但上述小分子化合物仅在巨核分化的特定阶段发挥作用,很难同时促进细胞增殖、巨核分化和血小板生成,对血小板的最终产量促进作用有限。

[0005] 因此急需找到一种化合物来解决上述问题。

发明内容

[0006] 本发明的一个方面,是针对现有技术中缺少同时促进细胞增殖、巨核分化和血小板生成的化合物和方法,并且现有技术中的化合物促进血小板生成的水平低的问题,提供了组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途。

[0007] 本发明提供的技术方案为:

[0008] 组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途,所述组蛋白甲基转移酶抑制剂为组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂。

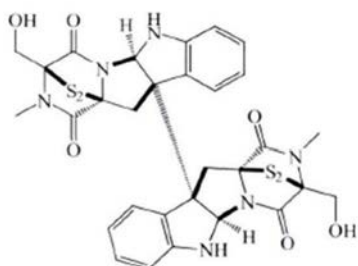
[0009] 本发明的发明人通过创造性劳动发现,利用组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂(EHMTi)对造血干细胞进行早期短暂处理,可持续促进分化后得到的巨核细胞增殖和成熟,并高效获得活性血小板。与现有技术相比,本发明所获得的血小板数量更多,应用成本低,可操作性和重复性更强,可实现体外高效、持续生成功能性血小板。

[0010] 组蛋白甲基转移酶G9a又称作常染色质组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶2(euchromatin histone-lysine N-methyltransferase 2,EHMT2),可以催化组蛋白H3第9位赖氨酸(H3K9)和p53的赖氨酸373(K373)的甲基化。G9a介导的组蛋白甲基化与肿瘤的发生发展密切相

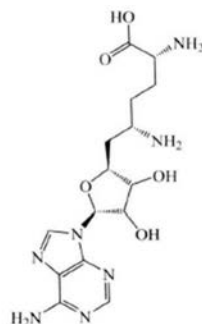
关,被认为是一个具有广泛前景的新型抗肿瘤靶点,其抑制剂的开发与受到越来越多的关注。

[0011] 组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂主要分为天然产物抑制剂和小分子抑制剂。所述天然产物抑制剂包括但不限于,例如,毛壳素 (chaetocin) 及其衍生物(如式1所示),西奈芬净(如式2所示) 及其类似物。

[0012]



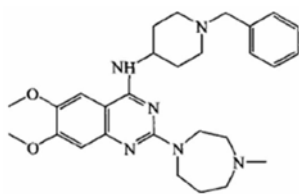
式 1



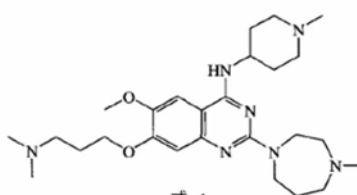
式 2

[0013] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,所述组蛋白甲基转移酶G9a的抑制剂为组蛋白甲基转移酶G9a的小分子抑制剂。

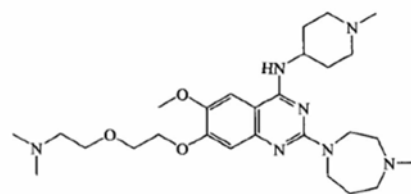
[0014] 所述组蛋白甲基转移酶G9a的小分子抑制剂可以包括但不限于,例如,BIX01294(如式3所示)、UNC0224(如式4所示)、UNC0321(如式5所示)、UNC0638(如式6所示)、UNC0631(如式7所示)、UNC0646(如式8所示)、UNC0737(如式9所示)、UNC0642(如式10所示)、UNC0965(如式11所示)、E67(如式12所示)、E70(如式13所示)、E72(如式14所示)、TM2-115(如式15所示)、867750(如式16所示)、867751(如式17所示)、BIX01338(如式18所示)、BRD9539(如式19所示)、BRD4770(如式20所示)、A-366(如式21所示)、HKMTI-1-247(如式22所示)、HKMTI-1-248(如式23所示)、CPUY074001(如式24所示)、CPUY074020(如式25所示)、DCG066(如式26所示)、CBC-12(如式27所示)。



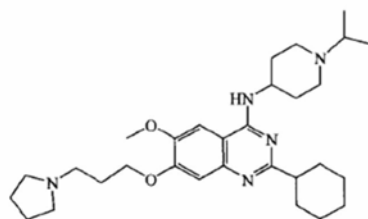
式 3



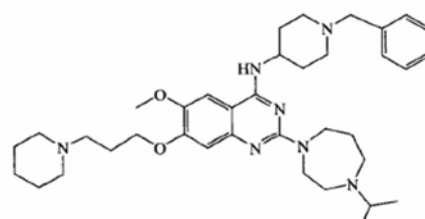
式 4



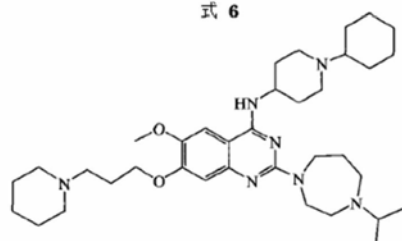
式 5



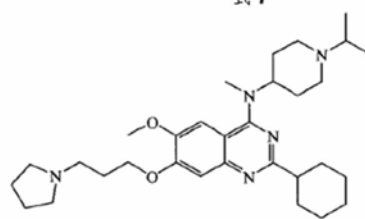
式 6



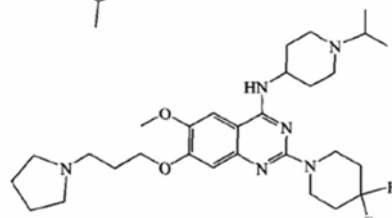
式 7



式 8

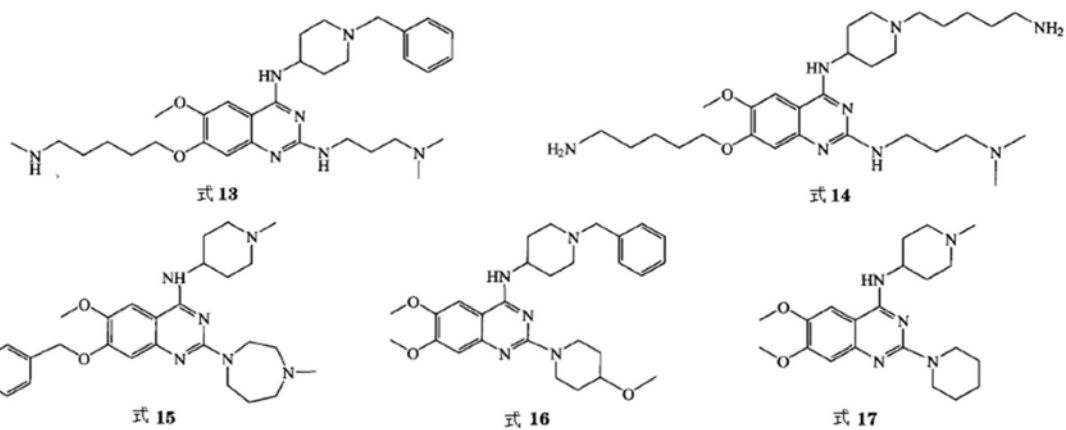
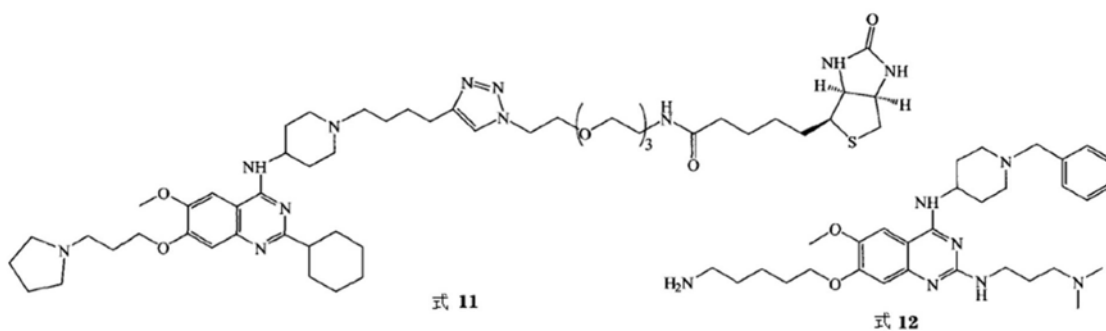


式 9

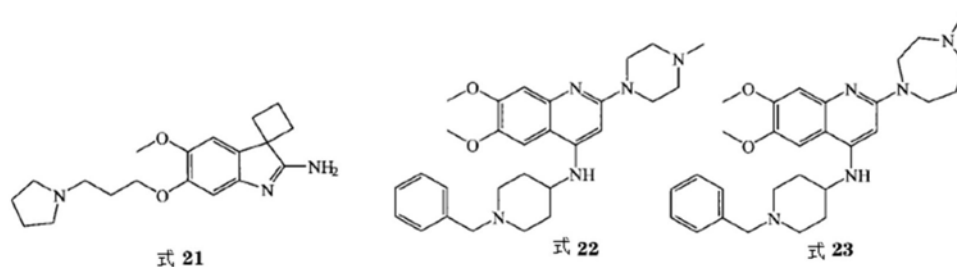
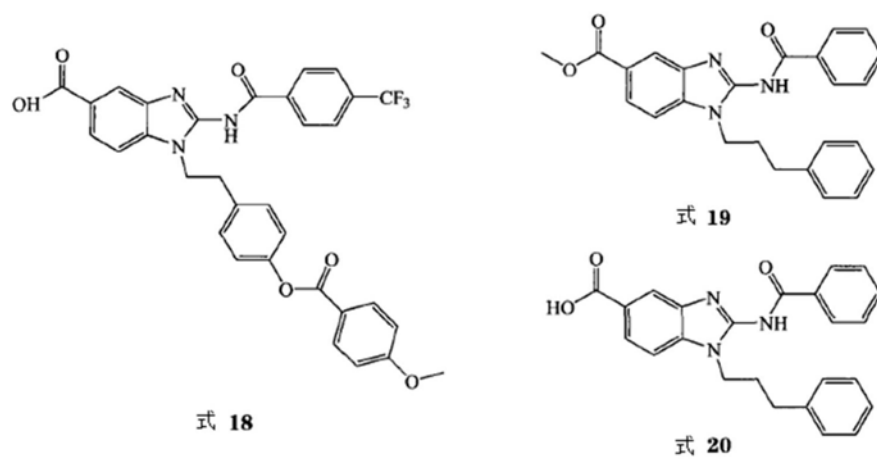


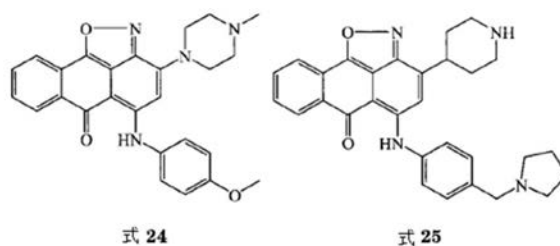
式 10

[0015]

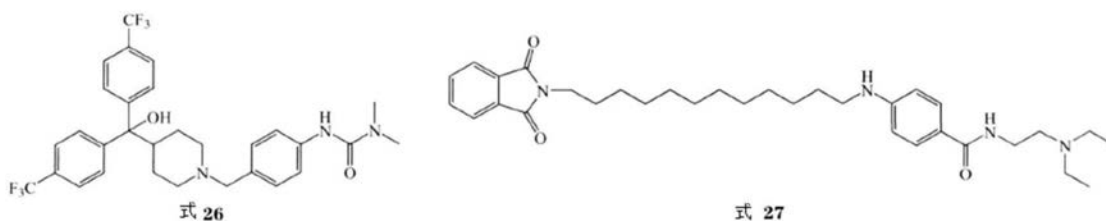


[0016]





[0017]



[0018] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,所述组蛋白甲基转移酶G9a的小分子抑制剂为选自A-366、UNC0631或UNC0638中的一种或几种。

[0019] 在上述用途中,所述巨核细胞或所述血小板可以来源于骨髓、外周血、脐带血或人多能干细胞中的CD34⁺细胞的分化,作为优选,在本发明的一个实施方式中,所述巨核细胞或所述血小板来源于脐带血中的CD34⁺细胞的分化。

[0020] 本发明还提供了一种促进巨核细胞增殖或血小板产生的方法,即在CD34⁺细胞的分化阶段加入终浓度为100-500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂。

[0021] 本发明中所述的方法均为非治疗目的的。

[0022] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,加入所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂的终浓度为200nM。

[0023] 上述CD34⁺细胞的分化阶段可以为任意合适的分化阶段。在本发明的一个实施方式中,发明人研究了在不同阶段添加组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂后对巨核细胞增殖或血小板产生的影响,结果发现,组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂不仅在分化前期会产生作用,其在分化的各个阶段均产生作用。

[0024] 作为优选,所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂在巨核分化的早期加入,即第0-6天巨核细胞的增殖阶段加入。

[0025] 作为优选,上述方法包括以下步骤:

[0026] 步骤1) 分离CD34⁺细胞;

[0027] 步骤2) 用含有巨核细胞增殖诱导因子的无血清培养基重悬步骤1) 得到的分离后的CD34⁺细胞,加入终浓度为100-500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂,在37℃、5%CO₂条件下培养3天;

[0028] 步骤3) 将细胞培养液更换为步骤2) 中所述含有巨核细胞增殖诱导因子的无血清培养基,同时加入终浓度为100-500nM的所述组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂,调整细胞密度至与步骤2) 的初始细胞密度相同,在37℃、5%CO₂条件下培养至第6天;

[0029] 步骤4) 将细胞培养液更换为含有巨核细胞成熟诱导因子的无血清培养基,调整细胞密度为步骤2) 或步骤3) 中初始细胞密度的5倍 ($2 \times 10^5/\text{mL} \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$),继续培养至所需数量的血小板产生。

[0030] 上述方法中的步骤1) 为CD34⁺细胞的分离步骤,任意合适的方法均可实现本发明

的目的。作为优选,在本发明的一个实施方式中,步骤1)可具体为:

[0031] 首先使用Ficoll分离液分离脐带血单个核细胞,之后利用CD34免疫磁珠进行两次阳性分选,获得高纯度($\geq 90\%$) CD34⁺细胞,并进行细胞计数。

[0032] 更优选地,在本发明的一个实施方式中,步骤1)可具体为:

[0033] A.利用Ficoll分离液分离脐血单个核细胞,并进行细胞计数,每 1×10^8 个细胞加300 μ l分选buffer重悬,避光加入100 μ l FcR阻断剂和100 μ l CD34磁珠,4℃冰箱静置30min;

[0034] B.取出样品,加10ml分选buffer洗去未结合的细胞,1200rpm,5min;完全去上清,加1ml分选buffer重悬;

[0035] C.将MS分选柱放置在MACS分选器对应的磁场中,用500 μ l分选buffer充分润湿分选柱,将细胞悬液透过滤膜(200目)加入分选柱,并用buffer冲洗3次,尽量收集所有细胞;

[0036] D.将MS分选柱移出磁场,放在15ml的离心管上,在分选柱内加入分选buffer,用MS分选柱配备的活塞加压迅速推出磁性标记细胞;

[0037] E.重复上述分选步骤,用新的MS分选柱分选洗脱出来的CD34⁺细胞,进行二次分选,获得高纯度($\geq 90\%$) CD34⁺细胞,并进行细胞计数。

[0038] 上述方法中的步骤2)~步骤4)为细胞分化步骤。

[0039] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,步骤2)或步骤3)中所述的巨核细胞诱导因子为终浓度为50ng/mL的人血小板生成素、终浓度为20ng/mL的干细胞因子和终浓度为20ng/mL的白介素-3;

[0040] 步骤4)中所述的巨核细胞成熟诱导因子为终浓度为50ng/mL的hTP0和终浓度为20ng/mL的IL-11。

[0041] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,步骤1)、步骤2)或步骤3)中所述的初始细胞密度为 1×10^5 个/mL。

[0042] 作为优选,在本发明的一个实施方式中,上述步骤2)~步骤4)可具体为:

[0043] a.用添加人血小板生成素(hTP0)、干细胞因子(SCF)和白介素-3(IL-3)的无血清培养基StemSpan SFEM重悬CD34⁺细胞,并在原有培养基中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂,以 1×10^5 /mL起始密度接种于12孔板,在37℃、5%CO₂孵箱中静置培养3天;

[0044] b.第3天全量更换上述培养液和细胞因子,并在原有培养基中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂,调整细胞培养密度为 1×10^5 /mL,继续静置培养3天;

[0045] c.第6天全量更换培养液和细胞因子(hTP0, IL-11),调整细胞培养密度为 5×10^5 /mL,培养至第18天,每3天换一次液;从第12到第18天,每3天检测CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒。

[0046] 本发明还提供了一种所述促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品用于制备治疗重度失血、贫血、免疫性血小板减少症、慢性肝病合并血小板减少症或其他原因导致的血小板低下的产品中的用途。

[0047] 本发明的另一个方面,是提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含由上述方法制得的巨核细胞或血小板。

[0048] 本发明的有益效果为:

[0049] 本发明中的组蛋白甲基转移酶G9a抑制剂可促使单个CD34⁺造血干祖细胞分化产生约400个CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒,比对照组提高了10倍以上,其血小板生成效率显著也高于文献报道的一般范围,且处理时间短,可操作性和重复性强,显著降低了血小板的生产

成本,为将来大规模生产用于临床治疗的功能性血小板奠定了基础。

附图说明

[0050] 图1为本发明实施例中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理后单个CD34⁺接种细胞的细胞增殖曲线图;

[0051] 图2为本发明实施例中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理后单个CD34⁺接种细胞的产生巨核细胞数量的动态图;

[0052] 图3为本发明实施例中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理后单个CD34⁺接种细胞的产生血小板颗粒数量的动态图;

[0053] 图4为本发明实施例中不同窗口添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理后的血小板数量比率图。

具体实施方式

[0054] 本发明公开了组蛋白甲基转移酶抑制剂在制备促进巨核细胞增殖或血小板产生的产品中的用途,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。需要特别指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明,并且相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围的基础上对本文所述内容进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0055] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。以下就本发明中出现的主要术语加以解释。

[0056] 术语“巨核细胞”是骨髓中的一种从造血干细胞分化而来的细胞,是正常骨髓中的一种能生成血小板的成熟细胞,前身为颗粒巨核细胞。该细胞体积巨大,成熟的巨核细胞边缘部分破裂脱落后形成血小板。每个巨核细胞平均能生成2000个左右的血小板。

[0057] 术语“血小板”是从骨髓成熟的巨核细胞胞浆解脱落下来的小块胞质。当因血管创伤而失血时,血小板在生理止血过程中的功能活动大致可以分为两个阶段:第一阶段主要是创伤发生后,血小板迅速黏附于创伤处,并聚集成团,形成较松软的止血栓子;第二段主要是促进血凝并形成坚实的止血栓子。

[0058] 术语“组蛋白甲基转移酶G9a”又称作常染质组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶2(euchromatin histone-lysine N-methyltransferase 2,EHMT2),可以催化组蛋白H3第9位赖氨酸(H3K9)和p53的赖氨酸373(K373)的甲基化。G9a介导的组蛋白甲基化与肿瘤的发生发展密切相关,被认为是一个具有广泛前景的新型抗肿瘤靶点,其抑制剂的开发与受到越来越多的关注。

[0059] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0060] 实施例1:

[0061] 1) 脐血CD34⁺细胞的分离

[0062] a. 将脐血倒入血浆瓶或50ml离心管内,按照 $V_{\text{脐带血}}:V_{\text{分选buffer}}=1:1$ 加入分选buffer(配方如下),再加上上述混合体积1/4的羟乙基淀粉混匀,室温静置45min;

[0063] 分选buffer配方:磷酸盐缓冲液(PBS)、0.5%牛血清蛋白(BSA)、0.4%500mM乙二

胺四乙酸(EDTA)、1%青链霉素混合液(P/S)

[0064] b. 将上清转至50ml离心管, 室温, 1500rpm离心10min; 弃上清, 加分选buffer重悬细胞; 取15ml离心管, 每管先各加4.5ml Ficoll分离液 ($V_{\text{Ficoll}}:V_{\text{分选buffer}}=1:1$), 把上述重悬液缓慢加到Ficoll分离液上, 避免破坏液面分层, 1800rpm, 15min (离心机设定为0升0降);

[0065] c. 弃去上层水样, 小心吸取白膜层(单个核细胞层), 加分选buffer稀释, 1200rpm, 5min; 弃上清, 加分选buffer重悬细胞, 取10 μ l (稀释10-100倍) 用于细胞计数, 其余悬液1200rpm离心5min;

[0066] d. 弃上清, 每 1×10^8 个细胞加300 μ l分选buffer重悬, 避光加入100 μ l FcR阻断剂和100 μ l CD34磁珠, 4℃冰箱静置30min;

[0067] e. 取出样品, 加10ml分选buffer洗去未结合的细胞, 1200rpm, 5min; 完全去上清, 加1ml分选buffer重悬;

[0068] f. 将MS分选柱放置在MACS分选器对应的磁场中, 用500 μ l分选buffer充分润湿分选柱, 将细胞悬液透过滤膜(200目)加入分选柱, 并用分选buffer冲洗3次, 尽量收集所有细胞;

[0069] g. 将MS分选柱移出磁场, 放在15ml的离心管上, 在分选柱内加入分选buffer用MS分选柱配备的活塞加压迅速推出磁性标记细胞;

[0070] h. 重复上述分选步骤, 用新的MS分选柱分选洗脱出来的CD34⁺细胞, 进行二次分选, 获得高纯度($\geq 90\%$)的CD34⁺细胞, 并进行细胞计数。

[0071] 2) 细胞培养

[0072] a. 用添加人血小板生成素(hTPO, 终浓度为50ng/mL)、干细胞因子(SCF, 终浓度为20ng/mL)和白介素-3(IL-3, 终浓度为20ng/mL)的无血清培养基StemSpan SFEM重悬CD34⁺细胞, 并在原有培养基中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂(选自A-366、UNC0631或UNC0638中的一种或几种, 浓度为200nM), 以 1×10^5 /mL起始密度接种于12孔板, 在37℃、5%CO₂孵箱中静置培养3天;

[0073] b. 第3天全量更换上述培养液和细胞因子, 并在原有培养基中添加组蛋白甲基转移酶抑制剂(选自A-366、UNC0631或UNC0638中的一种或几种, 浓度为200nM), 调整细胞培养密度为 1×10^5 /mL, 继续静置培养3天。

[0074] c. 第6天全量更换培养液和细胞因子(hTPO, 终浓度为50ng/mL; IL-11, 终浓度为20ng/mL), 调整细胞培养密度为 5×10^5 /mL, 培养至第18天, 每3天换一次液; 从第12到第18天, 每3天检测CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒。

[0075] 实验例1: 细胞增殖检测

[0076] 对实施例1中各阶段的细胞计数, 同时设不同的对照组。

[0077] a. 将对照组(DMSO)与实验组(EHMTi)在相同条件下培养, 每三天进行细胞计数, 检测小分子化合物对细胞增殖的作用。

[0078] b. 结果如图1所示, 与DMSO对照组相比, 在培养第0-3天或第3-6天添加组蛋白甲基转移酶抑制剂(A366)处理, 可以显著促进细胞增殖, 细胞扩增倍数提高15倍以上。

[0079] 图1中巨核分化第9-18天, 对照组(DMSO组)细胞总数呈现下降趋势; 添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理后, 巨核分化第9-12天, 细胞总数仍呈现上升趋势, 巨核分化第12天, 实验组细胞总数比对照组增加了约15倍, 一直到巨核分化第15-18天, 细胞总数才开始下

降,但仍高于对照组。

[0080] 实验例2:巨核细胞流式检测

[0081] 对实施例1中的巨核细胞进行检测。

[0082] a.在巨核诱导分化第3、6、9、12天收集约 1×10^5 细胞悬液,300g离心5min,用100 μ L 0.2%BSA重悬细胞沉淀。

[0083] b.每组加1 μ L anti-CD41a-APC (BD) 和1 μ L anti-CD42b-PE (BD) 流式抗体,避光孵育30min后,流式细胞仪 (FACS Canto II;BD Biosciences) 检测CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞的比例。

[0084] 实验例3:血小板颗粒流式检测

[0085] 对实施例1中的血小板颗粒进行检测。

[0086] a.在培养的第12、15、18天收集细胞悬液,300g离心5min,取200 μ L上清液。

[0087] b.每组加1 μ L anti-CD41a-APC (BD) 和1 μ L anti-CD42b-PE (BD) 流式抗体,避光孵育30min后,上机 (FACS Canto II;BD Biosciences) 检测。

[0088] c.以正常外周血来源的血小板做阳性对照圈门,进行流式结果分析。

[0089] 实验例4:巨核细胞和血小板定量

[0090] a.根据流式分析结果计算单个人多能干细胞产生巨核细胞和血小板的数量,其计算公式为:巨核细胞产量=day (t) 细胞数/day (0) 细胞数 $\times$ CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞百分比;血小板产量=day (t) 颗粒数 $\times$ CD41a⁺CD42b⁺血小板百分比/day (t) 巨核细胞数 $\times$ CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞产量。

[0091] b.结果如图2所示,与添加DMSO组相比,添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 可显著促进CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞生成。

[0092] 动态监测显示,巨核分化第12天,巨核细胞总数达到峰值;与对照组 (DMSO组) 相比,添加组蛋白甲基转移酶抑制剂处理促使巨核细胞总数增加了约6倍。

[0093] c.结果如图3所示,在血小板产生阶段,添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 可以显著提高CD41a⁺CD42b⁺活性血小板的产量。

[0094] 动态监测显示,巨核分化第12-18天,组蛋白甲基转移酶抑制剂处理组血小板产量维持在较高水平;与对照组 (DMSO组) 相比,巨核分化第15天,血小板产量增加了近10倍。

[0095] 实验例5:作用窗口实验

[0096] 对实施例1中的血小板颗粒进行检测。

[0097] a.在培养的第0-3天、第3-6天、第6-9天、第9-12天、第12-15天、第0-15天分别添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 处理,并设置对照组 (DMSO),巨核分化第18天,检测各组血小板产量。

[0098] b.结果如图4所示,与DMSO对照组相比,在培养第0-3天或第3-6天添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 处理,血小板产量提高了近30倍,与全程 (第0-15天) 添加效果基本一致;在培养第6-9天添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 处理,血小板产量也提高了10倍以上;在培养第9-12和12-15天添加组蛋白甲基转移酶抑制剂 (A366) 处理,对血小板产量无显著促进作用。

[0099] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应

视为本发明的保护范围。

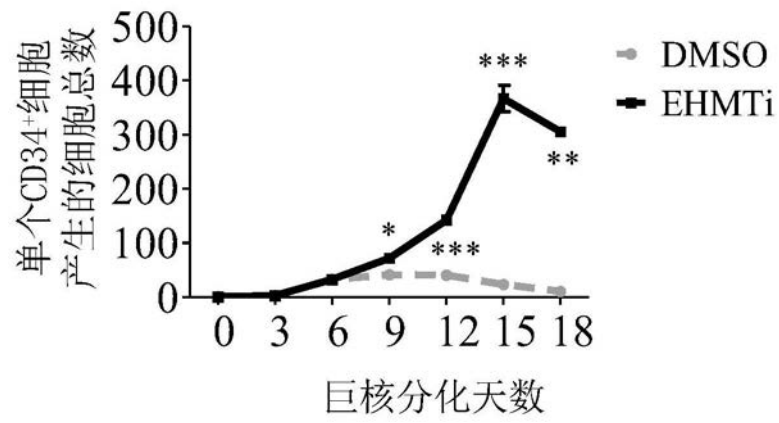


图1

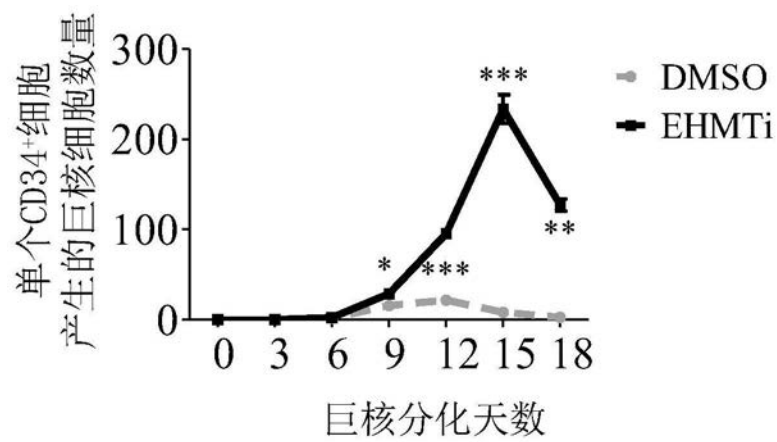


图2

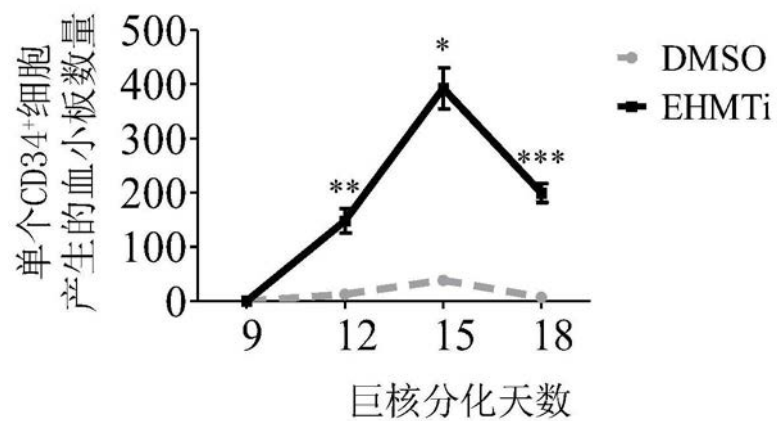


图3

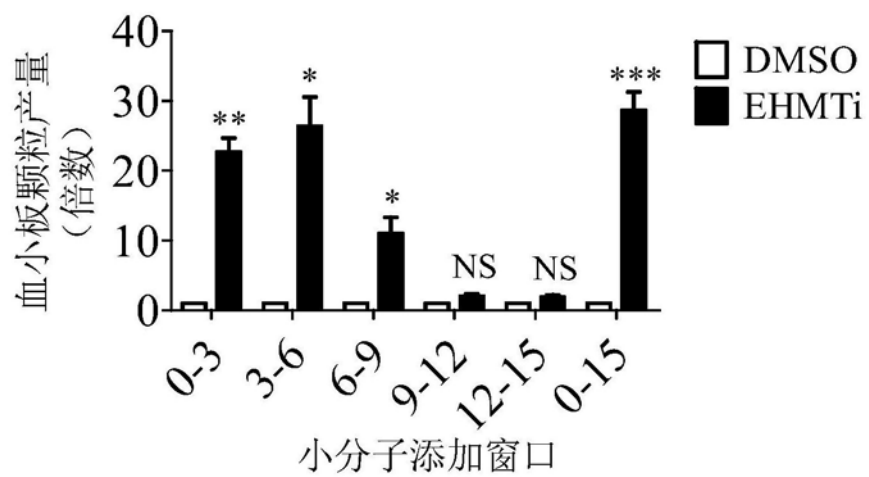


图4