

(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
2022 年 3 月 3 日 (03.03.2022)

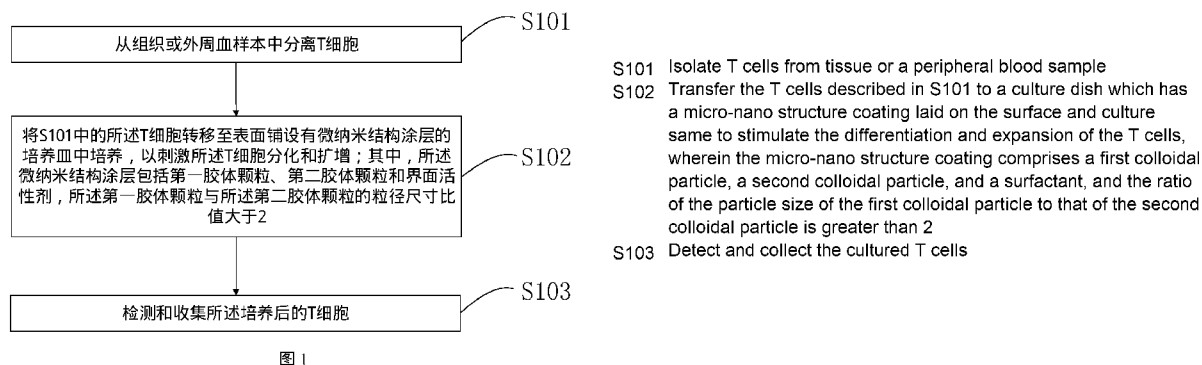


(10) 国际公布号
WO 2022/040979 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 9/16* (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/111376
- (22) 国际申请日: 2020 年 8 月 26 日 (26.08.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 王鹏元 (WANG, Pengyuan); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。
- (74) 代理人: 广州三环专利商标代理有限公司 (SCIHEAD IP LAW FIRM); 中国广东省广州市越秀区先烈中路 80 号汇华商贸大厦 1508 室, Guangdong 510070 (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, IT, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO DIFFERENTIATION AND EXPANSION OF T CELLS AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种体外分化和扩增T细胞的方法及其应用



(57) Abstract: Provided is a method for in vitro differentiation and expansion of T cells, the method comprising the following steps: isolating T cells from tissue or a peripheral blood sample; transferring the T cells to a culture dish which has a micro-nano structure coating laid on the surface and culturing same to stimulate the differentiation and expansion of the T cells, wherein the micro-nano structure coating comprises a first colloidal particle, a second colloidal particle, and a surfactant, and the ratio of the particle size of the first colloidal particle to that of the second colloidal particle is greater than 2; and detecting and collecting the cultured T cells. By means of the method for in vitro differentiation and expansion of T cells, the physical signals generated by bringing the micro-nano structure coating on the culture dish into contact with T cells can be converted into biochemical signals, and the in vitro differentiation and expansion of T cells are promoted.

(57) 摘要: 提供了一种体外分化和扩增T细胞的方法, 包括以下步骤: 从组织或外周血样本中分离T细胞; 将所述T细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养, 以刺激所述T细胞分化和扩增; 其中, 所述微纳米结构涂层包括第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂, 所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比值大于2; 检测和收集所述培养后的T细胞。该体外分化和扩增T细胞的方法, 能够将培养皿上微纳米结构涂层与T细胞接触所产生的物理信号转换成生化信号, 促进T细胞在体外的分化和扩增。

(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))。

一种体外分化和扩增 T 细胞的方法及其应用

技术领域

本申请涉及生物医学材料领域，具体涉及一种体外分化和扩增 T 细胞的方法及其应用。

背景技术

免疫系统有先天免疫系统和适应性免疫系统两个分支，由数量庞大以及类型非常丰富的免疫细胞或称淋巴细胞组成。人类的适应性免疫是一种针对新型外界病原的一种强大防御系统，其具有对抗原的记忆，使自身免疫细胞对下一次的抗原入侵产生辨识。免疫细胞包括不同亚群，不同亚群的免疫细胞具有不同的功能，在免疫应答过程中互相调控。例如，T 细胞分为若干亚群：按 T 细胞表面分化抗原(CD)的不同，主要可分为 CD4 和 CD8 两大亚群；按细胞表面受体(TCR)的不同，主要可分为 $\alpha\beta$ T 细胞 $\gamma\delta$ T 细胞；按功能可分为辅助性 T 细胞(Th 细胞)、调节性 T 细胞(Treg 细胞)、细胞毒 T 细胞(CTL 或 Tc 细胞)和迟发型超敏反应 T 细胞；按对抗原应答的不同，主要分为初始 T 细胞、活化的 T 细胞和记忆性 T 细胞等，其中每种又有更加细化的亚群划分。例如，辅助性 T 细胞中，Th1 细胞促进细胞免疫，Th2 细胞促进体液免疫；而 Th17 细胞被发现与自身免疫性疾病相关，如多发性硬化症、类风湿关节炎和牛皮癣。由于免疫细胞的亚型众多，彼此间互相作用复杂，且随着技术的日新月异持续会有新的细胞亚群被发现。研究不同亚型免疫细胞的出现以及新型亚型的出现，对生物医学研究和临床应用具有重要意义。

体内免疫细胞的激活需要透过不同的生物因子在精确的时间介入。例如，干扰素 γ (IFG-gamma) 是 Th1 细胞的主要分泌因子与分化因子，IL4 是 Th2 细胞的主要分泌因子与分化因子。因此，要在体外得到具有特定表型的免疫细胞，需要使用这些细胞因子与精确浓度。并且，体内有一群非常少数的 T 细胞，同时具有 CD4 与 CD8 表型，称为 CD4/CD8 双阳性(或双表型) T 细胞(DPTC)，只在特定条件下存在。有研究证实，DPTC 的存在与罗伊氏乳杆菌的分泌因子相关。此微生物因子刺激了 CD4 细胞，并且调降了转录因子 ThpOK 蛋白的表达，因此刺激了 DPTC 的生成。DPTC 的研究与其形成机制在生物医学具有重大意义。但由于 DPTC 数量极少，且存在时间短占，因此不易被发现且相关研究不多。

现有技术中，刺激体外免疫细胞的方法主要是依靠生物化学方法；例如，结合抗 CD3、抗 CD28 抗体用于体外 T 细胞活化；利用 IL4 刺激了 CD4 细胞的 Th2 细胞分化。但这些方法均使用细胞因子或受体抑制抗体，费用昂贵且操作过程复杂。

发明内容

为解决上述问题，本申请提供了一种体外分化和扩增 T 细胞的方法及其应用。该体外分化和扩增 T 细胞的方法，不需要透过生化因子，而是透过培养皿上的特殊微纳米结构涂层与 T 细胞短暂接触后所产生的生物物理信号，在细胞内部转换成生化信号，促进 T 细胞在体外的分化和扩增；解决现有方法中存在的成本高、操作过程复杂的问题。本方法将不限于 T 细胞，也适用于其他免疫细胞，例如嵌合抗原受体(CAR)-T 细胞与自然杀手(NK)细胞。

第一方面，本申请提供了一种体外分化和扩增 T 细胞的方法，包括以下步骤：

- (1) 从组织或外周血样本中分离 T 细胞；
- (2) 将步骤(1)中的所述 T 细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养，以刺激所述 T 细胞分化和扩增；其中，所述微纳米结构涂层包括第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比值大于 2；
- (3) 检测和收集所述培养后的 T 细胞。

本申请实施方式中，所述微纳米结构涂层远离所述培养皿的一侧表面具有凹凸起伏的结构形貌。

本申请实施方式中，所述步骤（1）中，所述分离T细胞的过程之后还包括对所述T细胞进行活化处理，所述活化处理的过程包括：将所述分离后的T细胞转移至涂布有活化剂的表面活化；所述活化剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种。

本申请实施方式中，所述活化处理的时间为6-72小时。

本申请实施方式中，所述活化剂的浓度为1-20mg/mL。

本申请实施方式中，所述步骤（3）中，所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为4-96小时。

本申请实施方式中，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒包括SiO₂颗粒、ZnO颗粒、TiO₂颗粒、Fe₂O₃颗粒、Ta₂O₅颗粒、Al₂O₃颗粒、PMMA（聚甲基丙烯酸甲酯）胶体颗粒和PS（聚甲基丙烯酸甲酯）胶体颗粒中的至少一种；所述第二胶体颗粒包括PMMA胶体颗粒、PS胶体颗粒、PLGA（聚乳酸-羟基乙酸共聚物）胶体颗粒、PCL（聚己内酯）胶体颗粒、PDMS（聚二甲基硅氧烷）胶体颗粒、AGS（褐藻酸钠）胶体颗粒和PNIPAM（聚（N-异丙基丙烯酰胺））胶体颗粒中的至少一种。

本申请实施方式中，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为0.5μm-10μm，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比例为(2-100):1。

本申请实施方式中，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距为0.001μm-5μm。

本申请实施方式中，所述微纳米结构涂层中，第一胶体颗粒表面修饰有第一官能基团，所述第一官能基团包括羟基、醛基、羧基、巯基和胺基中的至少一种；所述第二胶体颗粒表面修饰有第二官能基团，所述第二官能基团包括羟基、醛基、羧基、巯基和胺基中的至少一种。

本申请实施方式中，所述检测所述培养后的T细胞的过程包括：

先对所述培养后的T细胞进行免疫荧光染色，然后流式检测。

本申请实施方式中，所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞表达转录因子，所述转录因子包括白细胞介素4、趋化因子受体6、干扰素γ、L-选择素、肿瘤坏死因子、黄酸受体相关孤儿受体γ_t、CD44蛋白、CD25蛋白、芳香烃受体蛋白、Runx3蛋白和ThPOK蛋白中的一种或多种。

本申请实施方式中，所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞分化为CD4/CD8双阳性T细胞。

由于现有技术中，促进T细胞向不同亚群分化或扩增需要在培养T细胞的培养基中额外添加价格昂贵的细胞因子或其他刺激试剂，造成成本过高；并且添加细胞因子或其他刺激试剂的浓度与活性很难得到有效控制，造成得到特定的T细胞亚群的效率明显较低。而本申请所述体外分化和扩增T细胞的方法，工艺精简且稳定，原理是将培养皿上微纳米结构涂层与T细胞接触所产生的生物物理信号转换成生物化学信号，促进T细胞在体外的分化和扩增；该过程无需再添加额外细胞因子或其他刺激试剂，或仅需添加远低于现有试剂用量，就可以使T细胞朝向预设的分化方向发展或逆分化的扩增。该体外分化和扩增T细胞的方法大大降低了T细胞制备成本，也可以广泛适用于其他免疫细胞的培养。

本申请所述方法中，使用表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿培养T细胞，可望取代细胞因子（或生长因子）等试剂，用于刺激T细胞生长与特定细胞表型表达。所述方法中的步

骤过程,还可以为后续研究 T 细胞不同亚型的功能以及细胞如何被特定信号激活和调控,对生物医学研究和临床应用具有重要意义。

第二方面,本申请还提供了一种本申请第一方面所述体外分化和扩增 T 细胞的方法在调节 T 细胞表型与数量,作为制备抗肿瘤免疫药物中的应用。

本申请第二方面所述应用中,通过调节所述微纳米结构涂层在培养皿表面的具体结构,以及刺激所述 T 细胞的时间,可以用于调节 T 细胞的表型;例如 T 细胞胞内所发生的生物反应,或是 T 细胞表面的受体与细胞间相互反应等,其表型在免疫治疗具有重大意义。并且,作为免疫细胞, T 细胞在血液肿瘤与实体肿瘤的治疗方面也发挥着重要作用,具有巨大应用价值。例如,通过所述体外分化和扩增 T 细胞的方法所得到的 T 细胞、CAR-T 细胞或 NK 细胞,可以增加免疫治疗的效果与成功率。

本申请的优点将会在下方的说明书中部分阐明,一部分根据说明书是显而易见的,或者可以通过本申请实施例的实施而获知。

附图说明

为更清楚地阐述本申请的内容,下面结合附图与具体实施例来对其进行详细说明。

图 1 为本申请一实施例提供的体外分化和扩增 T 细胞的方法的工艺流程图;

图 2 为本申请一实施例提供的培养皿表面的微纳米结构涂层 BCC1-BCC10 的扫描电镜图;

图 3 为本申请一实施例提供的培养皿表面的微纳米结构涂层的 BCC4 沿水平成 50 度拍摄角度,细胞贴附于涂层表面的扫描电镜图;

图 4 为本申请一实施例提供的方法得到的活化 T 细胞的流式数据图;

图 5 为本申请一实施例提供的方法得到的活化 T 细胞表型的比例柱状图;

图 6 为本申请一实施例提供的方法刺激 CD4 细胞的表面抗原表达数据图;

图 7 为本申请一实施例提供的方法刺激 CD4 细胞表达 CCR6 和 IL-4 数据图;

图 8 为本申请一实施例提供的方法中经活化处理组和未活化处理细胞的细胞活性图;

图 9 为本申请一实施例提供的方法中经活化处理组和未活化处理组的 CD4/CD8 双阳性 T 细胞, CD4 细胞和 CD8 细胞含量组成图;

图 10 为本申请一实施例提供的方法刺激 T 细胞后,在涂层 BCC1-BCC10 细胞中 CCR6 与 TNF α 双表达细胞的比例;

图 11 为本申请一实施例提供的方法经过活化处理组和未活化处理组得到的 T 细胞的表面抗原比例热图与分离后 CD4 与 CD8 细胞的抗原表达。

具体实施方式

以下所述是本申请的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本申请的保护范围。

参见图1,本申请一实施方式中,提供了一种体外分化和扩增 T 细胞的方法,包括以下步骤:

S101、从组织或外周血样本中分离 T 细胞;

S102、将 S101 中的所述 T 细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养,以刺

激所述T细胞分化和扩增；其中，所述微纳米结构涂层包括所述第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比值大于2；

S103、检测和收集所述培养后的T细胞。

其中，所述S101步骤中，所述组织或外周血样本可以但不限于来源于包括哺乳动物。例如，一实施方式中，所述T细胞从老鼠脾脏或其他淋巴组织，或外周血中经分离收集得到。所述分离T细胞的过程还包括对T细胞进行纯化。

可选地，所述步骤（1）中，所述分离T细胞的过程之后还包括对所述T细胞进行活化处理，所述活化处理的过程包括：将所述分离后的T细胞转移至涂布有活化剂的表面活化；所述活化剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种以上。一实施方式中，将所述分离后的T细胞转移至涂布有活化剂的普通培养皿表面活化，所述活化剂由抗CD3抗体和抗CD28抗体组成。

可选地，所述活化处理的时间为6-72小时。一实施方式中，所述活化处理的时间为12-72小时。另一实施方式中，所述活化处理的时间为24-48小时；或者，所述活化处理的时间为20-24小时。例如，所述活化处理的时间可以但不限于为6小时，10小时，12小时，18小时，24小时，36小时，40小时，或48小时。

可选地，所述活化剂的浓度为0.5-10 mg/mL。例如，所述活化剂可以但不限于为含有抗CD3抗体和抗CD28抗体的缓冲溶液，其中，抗CD3抗体和抗CD28抗体的溶度均为2.5 mg/mL。所述缓冲溶液可以但不限于为PBS缓冲液。

本申请实施方式中，在将所述培养后的T细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养之前，既可以对分离的T细胞进行活化处理，也可以不对其进行活化处理。对T细胞进行活化，有利于延长细胞的存活时间，减小T细胞的死亡率。本申请实施方式中，可以对分离的T细胞进行一次、二次或者三次活化处理。经过活化处理和未活化处理的T细胞，在所述体外分化和扩增T细胞的方法下，获得相同或不同的分化和扩增效果。

其中，所述S102步骤中，所述微纳米结构涂层远离所述培养皿的一侧表面具有凹凸起伏的结构形貌。其中，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒和所述第二胶体颗粒均为球形或近球形形状。所述微纳米结构涂层一侧表面具有凹凸起伏的结构形貌是指其表面具有微米级和纳米级的凹凸起伏的结构。所述微纳米结构涂层铺由第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂组成，且铺设在培养皿表面；因此，所述微纳米结构涂层在远离培养皿的一侧表面就具有微纳米级的凹凸起伏的结构形貌。所述凹凸起伏的结构形貌一直延伸至所述微纳米结构涂层的四周边缘。

本申请实施方式中，所述凹凸起伏的结构形貌可以为规则型和/或非规则型。例如，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒均匀有序分布在所述微纳米结构涂层中，围绕每个所述第一胶体颗粒周围均匀分布有多个第二胶体颗粒，此时，所述微纳米结构涂层的表面形成规则型凹凸起伏的结构形貌。反之，当所述微纳米结构涂层中，第一胶体颗粒非均匀有序分布在所述微纳米结构涂层中，围绕每个所述第一胶体颗粒周围随机分布有多个第二胶体颗粒时，所述微纳米结构涂层的表面形成非规则型凹凸起伏的结构形貌。本申请所述微纳米结构涂层还可以但不限于部分区域为规则型凹凸起伏的结构形貌，部分区域为非规则型凹凸起伏的结构形貌。

可选地，所述第一胶体颗粒包括SiO₂颗粒、ZnO颗粒、TiO₂颗粒、Fe₂O₃颗粒、Ta₂O₅颗粒、Al₂O₃颗粒、PMMA胶体颗粒和PS胶体颗粒中的至少一种；所述第二胶体颗粒包括PMMA胶

体颗粒、PS胶体颗粒、PLGA胶体颗粒、PCL胶体颗粒、PDMS胶体颗粒、AGS胶体颗粒和PNIPAM胶体颗粒中的至少一种。

可选地，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为 $0.5\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ ，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比例为 $(2-100):1$ 。

可选地，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为 $1\mu\text{m}$ - $8\mu\text{m}$ 。

可选地，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为 $1\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$ 。

本申请一实施方式中，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为 $0.5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $4\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 、 $7\mu\text{m}$ 、 $8\mu\text{m}$ 、 $9\mu\text{m}$ 或 $10\mu\text{m}$ 。

可选地，所述第二胶体颗粒的粒径尺寸为 $0.01\mu\text{m}$ - $0.7\mu\text{m}$ 。

可选地，所述第二胶体颗粒的粒径尺寸为 $0.1\mu\text{m}$ - $0.4\mu\text{m}$ 。

本申请一实施方式中，所述第二胶体颗粒的粒径尺寸为 $0.01\mu\text{m}$ ，或为 $0.1\mu\text{m}$ ，或为 $0.2\mu\text{m}$ ，或为 $0.3\mu\text{m}$ ，或为 $0.4\mu\text{m}$ ，或为 $0.5\mu\text{m}$ ，或为 $0.6\mu\text{m}$ ，或为 $0.7\mu\text{m}$ 。

可选地，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距为 $0.001\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$ 。本申请中，所述任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距是指相邻两个所述第一胶体颗粒的外表面之间的最短距离。

可选地，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距为 $0.001\mu\text{m}$ - $5\mu\text{m}$ 。

可选地，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距为 $0.1\mu\text{m}$ - $1\mu\text{m}$ 。

本申请一具体实施方式中，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距可以但不限于为 $0.001\mu\text{m}$ ，或为 $0.01\mu\text{m}$ ，或为 $0.1\mu\text{m}$ ，或为 $0.15\mu\text{m}$ ，或为 $0.2\mu\text{m}$ ，或为 $0.5\mu\text{m}$ ，或为 $0.6\mu\text{m}$ ，或为 $0.8\mu\text{m}$ ，或为 $1\mu\text{m}$ ，或为 $1.5\mu\text{m}$ ，或为 $2\mu\text{m}$ ，或为 $2.5\mu\text{m}$ ，或为 $3\mu\text{m}$ ，或为 $4\mu\text{m}$ ，或为 $5\mu\text{m}$ 。

本申请实施方式中，任意相邻两个所述第二胶体颗粒之间的间距很小，可以近似认为其相互接触。

可选地，任意相邻两个所述第二胶体颗粒之间的间距为 $0.0001-200\text{nm}$ 。

进一步地，可选地，任意相邻两个所述第二胶体颗粒之间的间距为 $1-10\text{nm}$ 。

本申请实施方式中，所述第二胶体颗粒围绕所述第一胶体颗粒紧密排布，所述第二胶体颗粒和所述第一胶体颗粒的间距为 $0.1-100\text{nm}$ 。

可选地，所述第二胶体颗粒和所述第一胶体颗粒的间距为 $1-10\text{nm}$ 。

可选地，所述微纳米结构涂层中，第一胶体颗粒表面修饰有第一官能基团，所述第一官能基团包括羟基、醛基、羧基、硫基和胺基中的至少一种；所述第二胶体颗粒表面修饰有第二官能基团，所述第二官能基团包括羟基、醛基、羧基、硫基和胺基中的至少一种。

一实施方式中，所述第一官能基团为羟基，或为醛基，或为羧基，或为硫基，或为胺基；所述第二官能基团为羟基，或为醛基，或为羧基，或为硫基或为胺基。本申请中所述第一胶体或所述第二胶体表面修饰的第一官能基团或第二官能基团一方面能影响其与接触物体表面之间的固定强度；另一方面，所述第一官能基团或第二官能基团还可以对应改变第一胶体或所述第二胶体表面电荷，影响细胞贴附，以及调节第一胶体或所述第二胶体的分布间距。

可选地，所述界面活性剂在所述微纳米结构涂层中的质量分数为 0.0001% - 1% 。

可选地，所述界面活性剂在所述微纳米结构涂层中的质量分数为 0.001% - 0.1% 。本申请一具体实施方式中，所述界面活性剂在所述微纳米结构涂层中的质量分数可以但不限于为 0.0001% ，或为 0.0005% ，或为 0.001% ，或为 0.01% ，或为 0.005% ，或为 0.008% ，或为 0.01% ，或为 0.05% ，或为 0.08% ，或为 0.1% ，或为 0.5% ，或为 1% 。

本申请实施方式中,所述界面活性剂包括阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂或非离子表面活性剂。本申请所述界面活性剂可以用于进一步调节第一胶体颗粒和第二胶体颗粒表面的电荷分布量,从而使所述微纳米结构涂层中任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距,以及第二胶体颗粒之间的间距在一定范围内,并形成相应结构的微纳米结构涂层。

可选地,所述普通培养皿或所述铺设有微纳米结构涂层的培养皿的材质包括玻璃或塑料,所述塑料的材质包括PS、PMMA、PLGA或PCL中的一种或多种。可选地,所述培养皿的形状、尺寸可以根据实际的需求进行调整,例如,所述培养皿为孔板结构。一实施方式中,所述培养皿为6孔板或24孔板或96孔板。当所述培养皿为孔板结构中,所述微纳米结构涂层可以但不限于铺设在所述孔板孔洞的底部表面。

本申请实施方式中,培养皿表面铺设的微纳米结构涂层与T细胞接触所产生的生物物理信号能转换成促进T细胞在体外的分化和扩增的生物化学信号;不同具体结构的所述微纳米结构涂层促进T细胞在体外的分化和扩增会存在一定的差异;通过调节铺设在培养皿表面的微纳米结构涂层的具体形貌以及培养时间,可以定向促进T细胞在体外的分化和扩增。

可选地,所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为4-96小时。一实施方式中,所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为12-96小时。另一实施方式中,所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为24-72小时;或者,所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为48-72小时。例如,所述培养时间可以但不限于为4小时,6小时,10小时,12小时,20小时,24小时,36小时,40小时,48小时,56小时,72小时,80小时,或96小时。

可选地,所述检测和收集所述培养后的T细胞的步骤中,采用先对所述培养后的T细胞进行免疫荧光染色,然后流式检测的方式。例如,所述先对T细胞的表面或内部蛋白进行免疫荧光染色,然后使用流式细胞仪进行对所述T细胞进行检测。这里的检测可以是指随机抽取部分培养后的T细胞进行检测。

本申请实施方式中,所述T细胞在表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中使用的培养液未添加有细胞因子或生长因子。所述培养液可以是常规T细胞培养液,所述培养液包括基本培养基、胎牛血清和抗生素。其中,所述细胞因子是免疫细胞和非免疫细胞能合成和分泌小分子的多肽类因子,它们可以调节多种细胞生理功能。但在实际应用,细胞因子或其他刺激试剂容易超出成本过高。

一实施方式中,所述培养液包括RPMI-1640基本培养基,10%胎牛血清,10 mM HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸),1×非必需氨基酸溶液,1 mM丙酮酸钠,2 mM L-谷氨酰胺,100 U/mL青霉素,100 µg/mL链霉素和55µM 2-巯基乙醇。

本申请实施方式中,所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞表达转录因子,所述转录因子包括白细胞介素4 (IL-4)、趋化因子受体6 (CCR6)、干扰素γ (IFNγ)、L-选择素 (CD62L)、肿瘤坏死因子 (TNFα)、黄酸受体相关孤儿受体γt (RORγt)、CD44蛋白、CD25蛋白、芳香烃受体蛋白 (Ahr)、Runx3蛋白和ThPOK蛋白中的一种或多种。例如,所述转录因子为CCR6和IL-4。

可选地,所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞形成CD4/CD8双阳性T细胞。从组织或外周血样本中分离T细胞绝大部分是CD4细胞和CD8细胞。本申请所述方法可以增加所述T细胞中CD4/CD8双阳性T细胞在所述T细胞中的占比。并且,本申请所述方法可以刺激CD4细胞的特异表面抗原,几乎不改变所述T细胞之中CD4细胞和CD8细胞之间

的比例与细胞活性。

本申请另一实施方式中，还提供了一种体外分化和扩增 T 细胞的方法，包括以下步骤：

S201、从组织或外周血样本中分离T细胞，对所述分离后的T细胞在传统方法下进行活化处理；

S202、将所述活化处理后的T细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养，以刺激所述T细胞分化和扩增；其中，所述微纳米结构涂层包括所述第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比值大于2；

S203、检测和收集所述培养后的T细胞。

本实施方式中，除S201步骤中，对所述分离后的T细胞进行活化处理外，其余的步骤与上述实施例的描述一致，本实施方式中不做再次赘述。

本申请所述方法中，使用表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿培养 T 细胞，可以取代细胞因子（或生长因子）等试剂，用于刺激 T 细胞生长与特定表型表达。所述方法中的步骤过程，还可以为后续研究 T 细胞不同亚型的功能以及它们是如何被特定信号激活和调控的，对生物医学研究和临床应用具有重要意义。

本申请一实施方式中，提供了一种表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿的制备方法，用于培养T细胞，包括以下步骤：

S301、使用模具制备培养皿本体；

S302、分别配制第一胶体颗粒溶液和第二胶体颗粒溶液，然后按预设比例混合形成混合溶液，并添加适量界面活性剂，混合均匀后，将所述混合溶液使用自动化设备加入至培养皿本体的一表面上，且至少覆盖所述表面；颗粒加入的顺序可以是第一颗粒然后第二颗粒，也可以是第二颗粒然后第一颗粒，也可以是第一颗粒与第二颗粒先混合再加入培养皿中；静置干燥直至所述混合溶液的溶剂蒸发完，然后于80-100℃下加热，加入有机溶剂，待所述有机溶剂挥发后，形成固定在所述培养皿本体的一表面上的微纳米结构涂层，得到所述培养皿；

其中，所述第一胶体颗粒包括SiO₂颗粒、ZnO颗粒、TiO₂颗粒、Fe₂O₃颗粒、Ta₂O₅颗粒、Al₂O₃颗粒、PMMA胶体颗粒和PS胶体颗粒中的至少一种；所述第二胶体颗粒包括PMMA胶体颗粒、PS胶体颗粒、PLGA胶体颗粒、PCL胶体颗粒、PDMS胶体颗粒、AGS胶体颗粒和PNIPAM胶体颗粒中的至少一种。

可选地，所述S301中，所述培养皿本体可以但不限于包括至少一个凹槽，所述培养皿本体的一表面可以但不限于为所述凹槽的底部表面。一实施方式中，所述培养皿本体可以为6孔、12孔、24孔、96孔培养皿，每个孔对应一个凹槽。

可选地，所述培养皿本体的表面在铺设微纳米结构涂层之前还可以进行包被处理。

一实施方式中，可以但不限于使用蛋白质溶液对培养皿本体的表面进行包被处理，所述蛋白质溶液包括明胶溶液和/或聚多巴胺溶液。经过包被处理后的培养皿本体的表面与微纳米结构涂层的结合力更强。

可选地，所述 S302 中，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为 0.5μm-10μm，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比例为(2-100):1。

可选地，所述有机溶剂包括体积为 1:(1-10) 比例的乙醇和甲苯。本申请一具体实施方式中，所述有机溶剂包括体积为 1:3 比例的乙醇和甲苯。可选地，所述加热温度可以为 80℃、84℃、88℃、92℃、96℃、或 100℃。可选地，加热时间为 0.5-48h。进一步地，可选地，加热时间可以但不限于为 1-24h。

本申请所述制备过程中,所述混合溶液中的第一胶体颗粒和第二胶体颗粒形成所述微纳米结构涂层的过程,具体包括以下三个阶段:第一阶段,沉降过程,所述第一胶体颗粒和第二胶体颗粒在混合溶液中是一种无序状态,静置后在重力作用下所述第一胶体颗粒先沉降到底部排列,随着混合溶液溶剂的减少,所述第二胶体颗粒与所述第一胶体颗粒接触,在颗粒表面电荷相互作用下,所述第二胶体颗粒会填充在第一胶体颗粒周围,形成微纳米结构涂层;第二阶段,所述混合溶液完全蒸发后,利用有机溶液使所述由第一胶体颗粒和第二胶体颗粒组成的微纳米结构涂层更加贴合于所述培养皿本体的表面;第三阶段,将所述培养皿本体置于烘箱中加热,冷却后得到铺设微纳米结构涂层的所述培养皿。上述过程中,当第一胶体颗粒均匀排布在培养皿表面,第二胶体可以规则有序填充在第一胶体颗粒周围时,最后得到的微纳米结构涂层表面具有凹凸起伏的结构形貌。

本申请实施方式中,所述制备方法中,制备得到表面上设有微纳米结构涂层的细胞培养皿后,可以对所述细胞培养皿进行清洗和杀菌处理。例如,可以用缓冲液或去离子水进行清洗,通过紫外光照的方式对其进行杀菌处理。由于微纳米结构涂层制作完成后,第一胶体颗粒和第二胶体颗粒的位置相对固定;因此,经清洗处理后,微纳米结构涂层表面的结构不会改变。

本申请实施方式中,通过改变第一胶体颗粒与第二胶体颗粒的种类、粒径尺寸、体积或质量比例,以及表面修饰的第一官能基团或第二官能基团的种类或数目,调节界面活性剂的含量及种类,可以获得多种凹凸起伏的结构形貌的微纳米结构涂层。例如,通过利用扫描电子显微镜(SEM)检测可以获得其具体形貌。上述第一胶体颗粒、第二胶体颗粒、界面活性剂和制备工艺的具体限定与前文的论述一致,本实施方式中不做再次赘述。

下面分多个实施例对本申请实施例进行进一步的说明。

实施例

基于上述实施例提供的培养皿制备方法,分别按照表1所述的第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂等参数,制备实施例1-10组表面铺设微纳米结构涂层的培养皿,对应的微纳米结构涂层分别命名为BCC1-BCC10。

表1 实施例1-10中的制备微纳米结构涂层的材料选择

组别	微纳米结构 涂层名称	第一胶 体颗粒	粒径 (μm)	第二胶体 颗粒	粒径(μm)	体积比 (10%溶液)	界面活性剂种类 和含量
实施例1	BCC1	SiO_2	4.8	PMMA	0.49	3:1	0.1%SDS
实施例2	BCC2	SiO_2	4.9	PMMA	0.11	4:1	0.1%SDS
实施例3	BCC3	$\text{SiO}_{2.5}$	4.8	PMMA	0.068	5:1	0.1%SDS
实施例4	BCC4	SiO_2	5.0	PS	0.39	3:1	0.1%SDS
实施例5	BCC5	SiO_2	5.1	PS	0.2	2.8:1	0.1%SDS
实施例6	BCC6	TiO_2	4.7	PS/PMMA	0.13	3:1	0.01%SDS
实施例7	BCC7	Ta_2O_5	4.7	PS/PMMA	0.065	4:1	0.01%SDS
实施例8	BCC8	SiO_2	5.0	PSC	0.1	2.5:1	0.01%SDS
实施例9	BCC9	SiO_2	2.0	PMMA	0.11	2.4:1	0.1%SDS
实施例10	BCC10	SiO_2	1.9	PS	0.13	2.9:1	0.1%SDS

基于上述实施例1-10制备得到的分别铺设有微纳米结构涂层BCC1-10的培养板，并以没有微纳米结构涂层的培养板为空白对照组，分别对其进行喷金处理后（形成约10nm厚的薄膜），使用场发射扫描电子显微镜（FE-SEM）在20keV下分析所述细胞培养板中的微纳米结构涂层的具体表面结构，如图2所示。为了更直观地观察微纳米结构涂层表面的凹凸起伏的结构形貌，通过放大倍数与调整角度拍摄，结果如图3所示。从图3中（A）和（B）数据中可以看出，纳米结构涂层表面实施例4的表面为凹凸起伏的非平面形貌；其中，细胞边缘与涂层接触的细节清晰可见。

其中，实施例1的BCC1中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.5\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $2\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例2的BCC2中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.2\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $1.7\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例3的BCC3中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.2\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $1.85\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例4的BCC4中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.3\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $1.8\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例5的BCC5中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.2\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $1.8\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例6的BCC6中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.3\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $1.9\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例7的BCC7中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.0\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $2.05\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例8的BCC8中，相邻第一胶体颗粒间距为 $1.0\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $2.05\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例9的BCC9中，相邻第一胶体颗粒间距为 $0.2\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $0.85\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形；实施例10的BCC10中，相邻第一胶体颗粒间距为 $0.2\mu\text{m}$ ，第一胶体颗粒的球径约 $0.9\mu\text{m}$ ，其排布形体为六边形，具体结构参见图2。

效果实施例

1、检测体外分化和扩增T细胞的方法对CD4和CD8细胞的细胞表型影响

先将分离纯化的T细胞加入到添加了抗CD3抗体和抗CD28抗体的普通96孔板培养皿，每孔约50,000细胞/200 μL 培养液，培养24-48小时；将培养得到的T细胞转移到含有实施例1-10的微纳米结构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿中，培养6-72小时。其中，培养液组成为：RPMI-1640基板培养基，其中包括10%FBS，10 mM HEPES，1x非必需氨基酸溶液，1 mM丙酮酸钠，2 mM L-谷氨酰胺，100 U/mL青霉素，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和55 μM 2-巯基乙醇；将培养得到的T细胞进行免疫荧光染色，然后使用流式细胞仪进行流式检测。图4为T细胞活化后的细胞流式结果，包含空白对照组和实施例BCC2、BCC6与BCC10。在其中一组实例中，结果显示，CD4/CD8双表型T细胞在空白对照组中的比例为2.7%，而在实验组中，CD4/CD8双表型细胞的比例为3.51%，2.62%与7.95%均高于空白对照组。CCR6+/CD62L+双阳性细胞在空白对照组中比例为6.77%，而在实验组中，CCR6+/CD62L+双阳性细胞比例为9.49%，7.32%与22.2%均高于空白对照组，图中DP为CD4/CD8双阳性细胞群，CCR6，CD62L subset为CCR6+/CD62L+双阳性细胞群。图5为统计结果，结果显示细胞受BCC10刺激后无论是CD4/CD8双表型T细胞与CCR6+/CD62L+双阳性细胞比例都较空白对照高，图中的#2、#6和#10分别对应BCC2、BCC6和BCC10实验组。

2、检测实施例提供的方法刺激T细胞的分化和扩增

先将分离的T细胞加入到添加了抗CD3抗体和抗CD28抗体的普通96孔板培养皿，每孔约50,000细胞/200 μL 培养液，培养24-48小时；将培养得到的T细胞转移到含有实施例1-10的微纳米结构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿中，培养6-72小时。其中，培养液组成为：

RPMI-1640基板培养基，其中包括10%FBS，10 mM HEPES，1x非必需氨基酸溶液，1 mM丙酮酸钠，2 mM L-谷氨酰胺，100 U / mL青霉素，100 μ g/ mL链霉素和55 μ M2-巯基乙醇；将培养得到的T细胞进行免疫荧光染色，然后使用流式细胞仪进行流式检测。分别检测TNF α 、CXCR5蛋白（C-X-C chemokine receptor type 5，CXCR5）、CD44蛋白、CD25蛋白、白细胞介素17A（IL-17A）、CD62L、CCR6、IL-4和IFN γ 的表达情况，结果如图6和图7所示，图中的1-10分别指T细胞在含BCC1-BCC10的培养皿中培养的实验组。

从图6所示内容可以看出CD4⁺ T细胞表面表达TNF α 、CXCR5、CD44、CD25、IL-17A、CD62L、CCR6、IL-4、IFN γ 的表达强度。根据图7可以看出，本申请所述方法与材料可以刺激CD4⁺ T细胞表面的CCR6与IL-4表达。

3、检测经过活化处理和未活化处理的体外分化和扩增T细胞的方法对T细胞的活性影响

按上述实施例提供的方法，使用实施例1-5的微纳米结构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿；分别得到活化处理组1-5、未活化处理组1-5，以及对应的空白对照组。然后分别对各组的T细胞活性进行检测，结果如图8所述。

从图8的结果显示，经过活化处理的T细胞活性约90%，且BCC1-BCC5组与空白对照组间没有差异；未活化处理的T细胞其活性约70%，且BCC1-BCC5组与空白对照组间没有明显差异；其中，材料不影响未激活T细胞中CD4细胞的活性，但对CD8细胞的活性会有抑制作用，代表材料对CD4细胞有选择性。

其次，检测上述经过活化处理组1-5和未活化处理组1-3中CD4细胞和CD8细胞的表型组成。结果如图9所示，其中，图9中的（A）为经过活化处理的细胞在材料组1-5的组成，图9中的（B）为未活化处理细胞在材料组1-3的组成，图中的柱状图自上至下依次为CD4/CD8双阳性T细胞、CD8细胞和CD4细胞占比。结果显示，经过活化处理组1-5中的CD8细胞占比约80%，CD4细胞不到10%，CD4/CD8双阳性T细胞比例相比于空白对照组没有显著提高；但是，未活化处理组1-3中的CD4/CD8双阳性T细胞比例相比于空白对照组与4-5号材料有些微的提高，且CD4细胞比例有显著提高约占30%，CD8细胞比例约占60%。

由于研究CD4/CD8双阳性T细胞对于肠道免疫和老化方面具有重要意义，因此，本申请所述方法对于获得更多CD4/CD8双阳性T细胞数量具有潜力。

4、检测本申请所述实施例提供的方法刺激T细胞的CCR6和TNF α 表达

先将分离纯化的T细胞加入到添加了抗CD3抗体和抗CD28抗体的普通96孔板培养皿，每孔约50,000细胞/200 μ L培养液，培养24-48小时；将培养得到的T细胞转移到含有实施例1-10的微纳米结构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿中，培养6-72小时；得到经过活化处理组1-10和空白对照组。然后对各组T细胞的CCR6和TNF α 标志物进行免疫荧光染色，然后使用流式细胞仪进行单细胞检测，结果如图10。

从图10所示内容可以看出，由所述方法得到活化处理组1-10的T细胞均表达CCR6和TNF α 。相比于空白对照组，材料1-10的T细胞表达CCR6和TNF α 量均不低于空白对照组。其中，材料组BCC4、BCC10与BCC12上，CCR6和TNF α 双表达细胞的数量皆显著高于空白组对照组；因此，本申请实施例提供的所述方法能够刺激T细胞同时表达CCR6和TNF α 。其中，CCR6对于细胞迁移，以及在记忆T细胞中发挥重要作用；TNF α 对于杀死自身反应性T细胞方面具有重要作用。

5、检测实施例提供的方法刺激活化处理组和未活化处理组T细胞的表达

将分离纯化的T细胞，以每孔约50,000细胞/200 μ L培养液转移到含有实施例1-5的微纳米结

构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿中，培养6-72小时；得到未活化处理组的T细胞。先将分离纯化的T细胞加入到添加了抗CD3抗体和抗CD28抗体的普通96孔板培养皿，每孔约50,000细胞/200 μ L培养液，培养24-48小时；将培养得到的T细胞转移到含有实施例1-5的微纳米结构涂层的培养皿和空白对照的96孔板培养皿中，培养6-72小时；得到活化处理组的T细胞。然后分别进行免疫荧光染色，使用流式细胞仪进行单细胞检测，检测TNFa、CCR6、CD62L、IL-17A、CD44、IL-4、IFNg的表达情况，参见图11所示。

从图11的数据中可以得知，活化处理组和未活化处理组的T细胞的TNFa、CCR6、CD62L、IL-17A、CD44、IL-4、IFNg在不同材料上均有不同程度的表达。本申请实施例提供的方法中的微纳米结构涂层，材料组BCC2与BCC3可以刺激活化后的T细胞，其中CD4细胞表达TNFa、CCR6、CD62L、IL-17A、CD44、IL-4、IFNg蛋白，其中，CD8细胞表达TNFa、CCR6、IL-17A、CD44、IL-4、IFNg蛋白；在未活化T细胞中，CD4细胞表达CCR6，CD8细胞表达CD44与IFNg。并且从图11的数据中可以得知，在未活化的CD4细胞(未受CD8影响)，BCC3依然可以刺激CCR6与IFNg表达，未活化的CD8细胞(未受CD4影响)则一定程度的刺激TNFa、CCR6、IL-17A、CD44、IL-4、IFNg蛋白表达。

以上所述实施例仅表达了本申请的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本申请专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本申请构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本申请的保护范围。因此，本申请专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权 利 要 求

1、一种体外分化和扩增T细胞的方法，其中，包括以下步骤：

(1) 从组织或外周血样本中分离T细胞；

(2) 将步骤(1)中的所述T细胞转移至表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中培养，以刺激所述T细胞分化和扩增；其中，所述微纳米结构涂层包括第一胶体颗粒、第二胶体颗粒和界面活性剂，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比值大于2；

(3) 检测和收集所述培养后的T细胞。

2、如权利要求1所述的方法，其中，所述微纳米结构涂层远离所述培养皿的一侧表面具有凹凸起伏的结构形貌。

3、如权利要求1所述的方法，其中，所述步骤(1)中，所述分离T细胞的过程之后还包括对所述T细胞进行活化处理，所述活化处理的过程包括：将所述分离后的T细胞转移至涂布有活化剂的表面活化；所述活化剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种。

4、如权利要求3所述的方法，其中，所述活化处理的时间为6-72小时。

5、如权利要求3所述的方法，其中，所述活化剂的浓度为1-20mg/mL。

6、如权利要求1所述的方法，其中，所述步骤(3)中，所述T细胞在所述表面铺设有微纳米结构涂层的培养皿中的培养时间为4-96小时。

7、如权利要求1-6任一项所述的方法，其中，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒包括SiO₂颗粒、ZnO颗粒、TiO₂颗粒、Fe₂O₃颗粒、Ta₂O₅颗粒、Al₂O₃颗粒、PMMA胶体颗粒和PS胶体颗粒中的至少一种；所述第二胶体颗粒包括PMMA胶体颗粒、PS胶体颗粒、PLGA胶体颗粒、PCL胶体颗粒、PDMS胶体颗粒、AGS胶体颗粒和PNIPAM胶体颗粒中的至少一种。

8、如权利要求1-6任一项所述的方法，其中，所述微纳米结构涂层中，所述第一胶体颗粒的粒径尺寸为0.5μm-10μm，所述第一胶体颗粒与所述第二胶体颗粒的粒径尺寸比例为(2-100):1；

9、如权利要求8所述的方法，其中，任意相邻两个所述第一胶体颗粒之间的间距为0.001μm-5μm。

10、如权利要求1-6任一项所述的方法，其中，所述微纳米结构涂层中，第一胶体颗粒表面修饰有第一官能基团，所述第一官能基团包括羟基、醛基、羧基、巯基和胺基中的至少一种；所述第二胶体颗粒表面修饰有第二官能基团，所述第二官能基团包括羟基、醛基、羧基、巯基和胺基中的至少一种。

11、如权利要求1所述的方法，其中，所述检测所述培养后的T细胞的过程包括：

先对所述培养后的T细胞进行免疫荧光染色，然后流式检测。

12、如权利要求1-11任一项所述的方法，其中，所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞表达转录因子，所述转录因子包括白细胞介素4、趋化因子受体6、干扰素γ、L-选择素、肿瘤坏死因子、黄酸受体相关孤儿受体γ_t、CD44蛋白、CD25蛋白、芳香烃受体蛋白、Runx3蛋白和ThPOK蛋白中的一种或多种。

13、如权利要求1-11任一项所述的方法，其中，所述培养皿表面铺设的所述微纳米结构涂层刺激所述T细胞分化为CD4/CD8双阳性T细胞。

14、一种如权利要求1-13任一项所述体外分化和扩增T细胞的方法在调节T细胞反应和制备抗肿瘤药物中的应用。

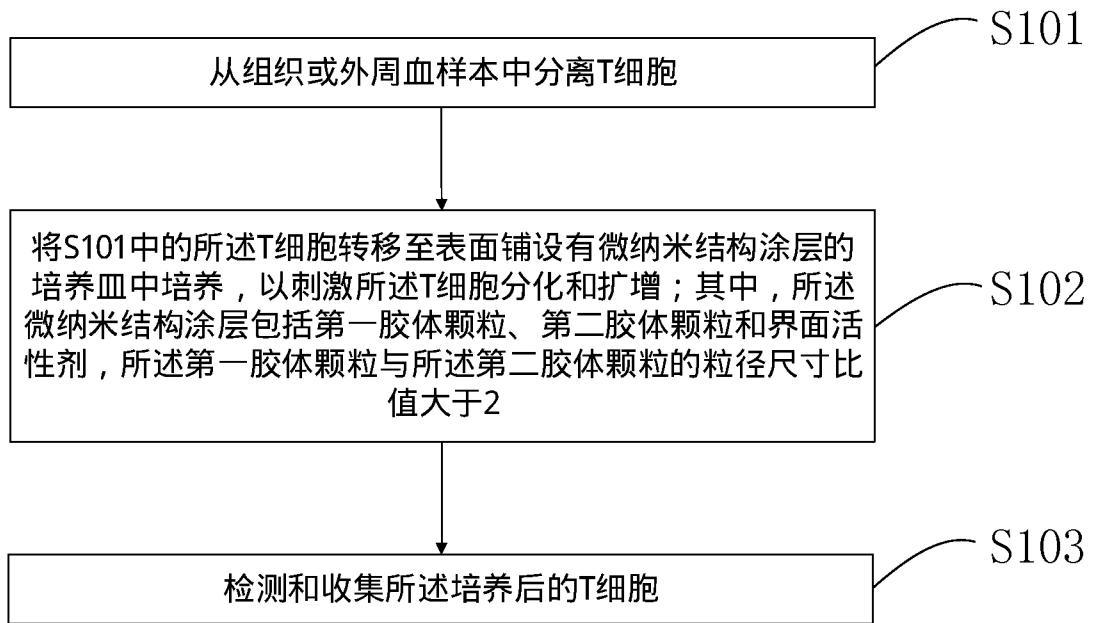


图 1

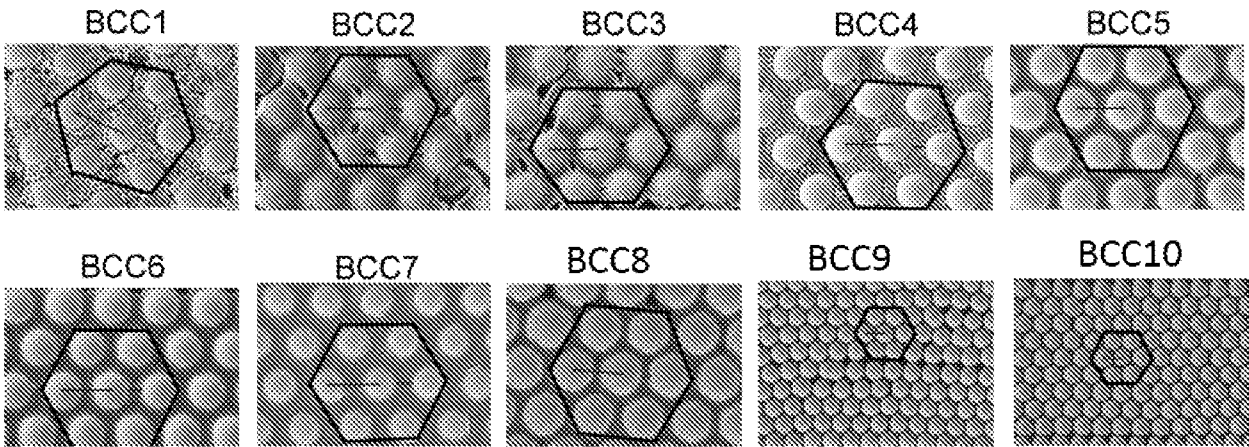


图 2

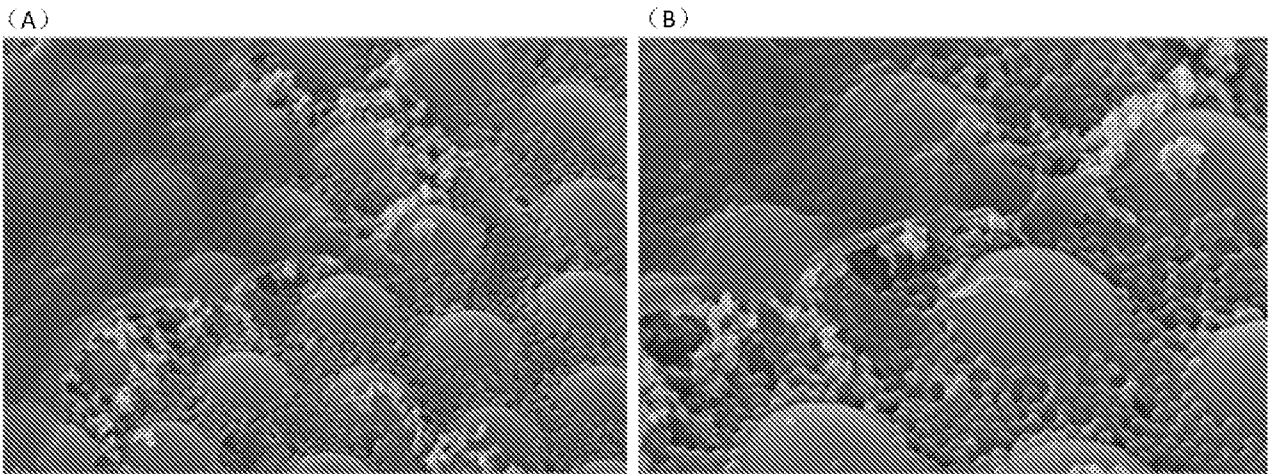


图 3

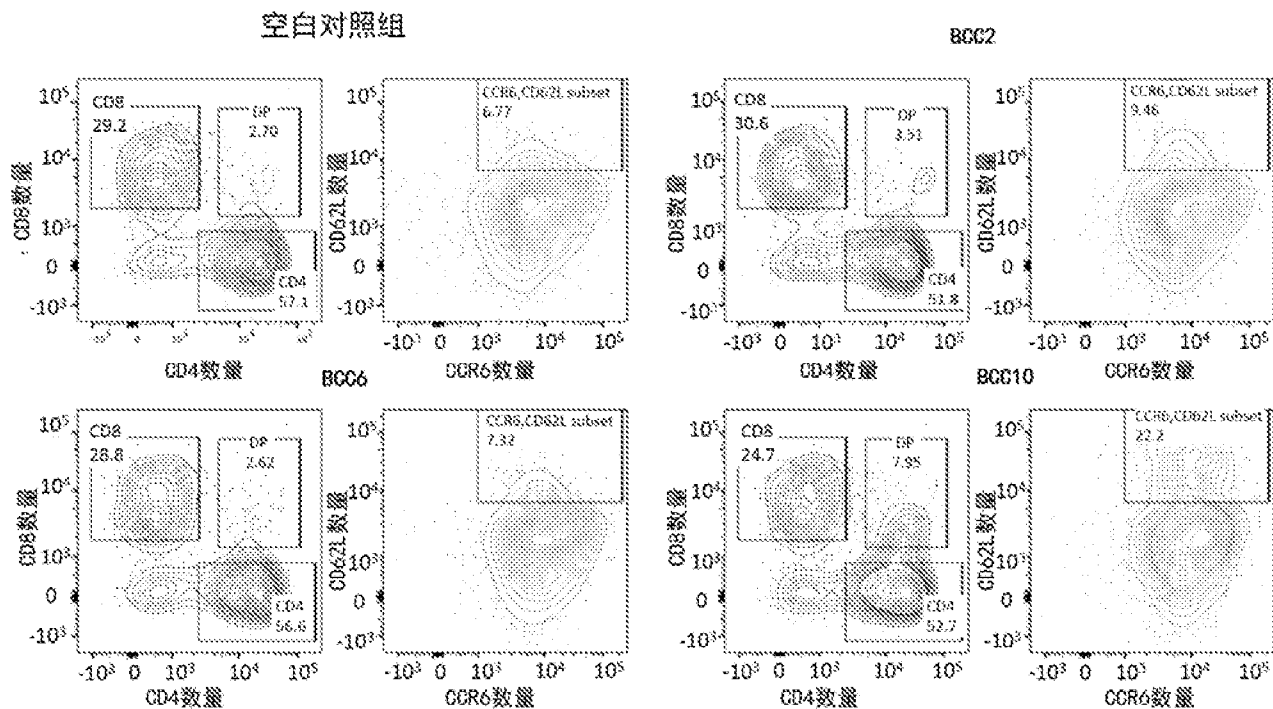


图 4

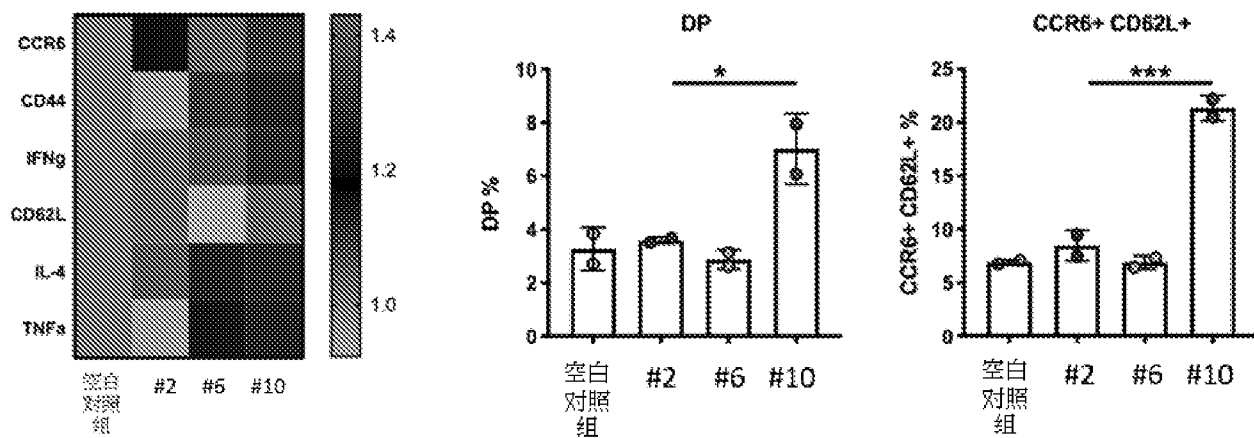


图 5

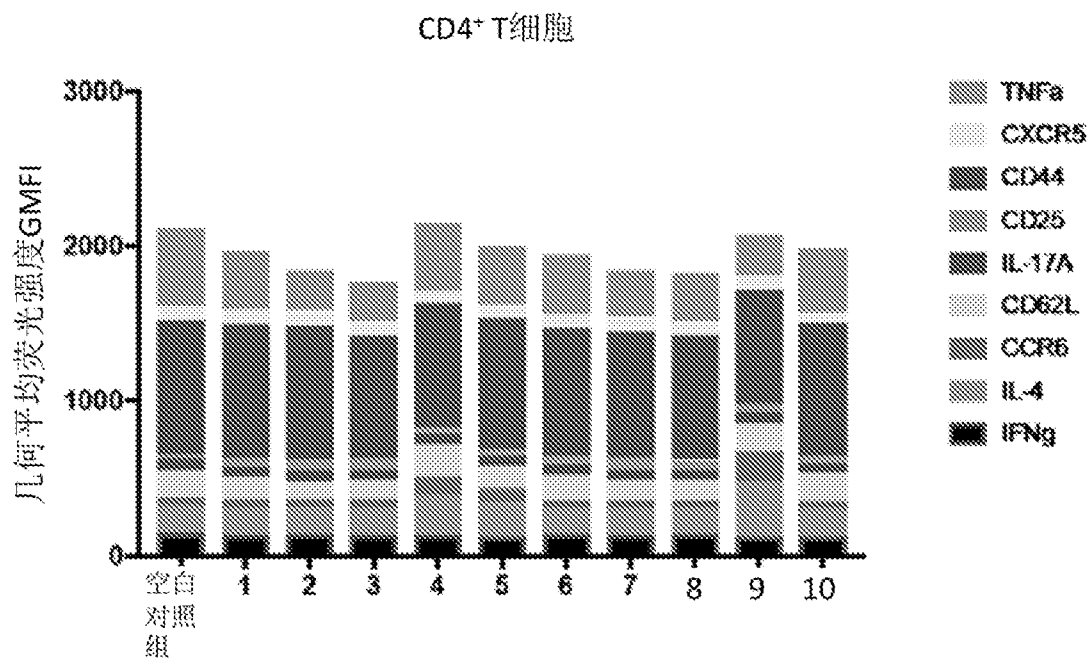


图 6

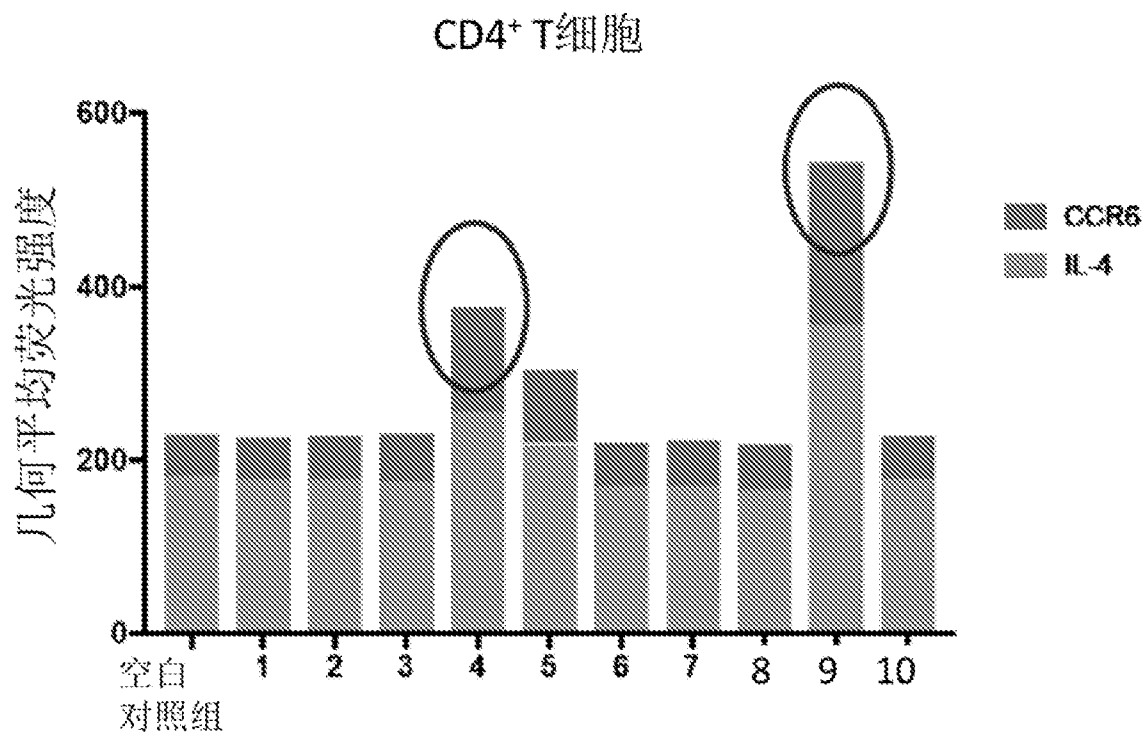


图 7

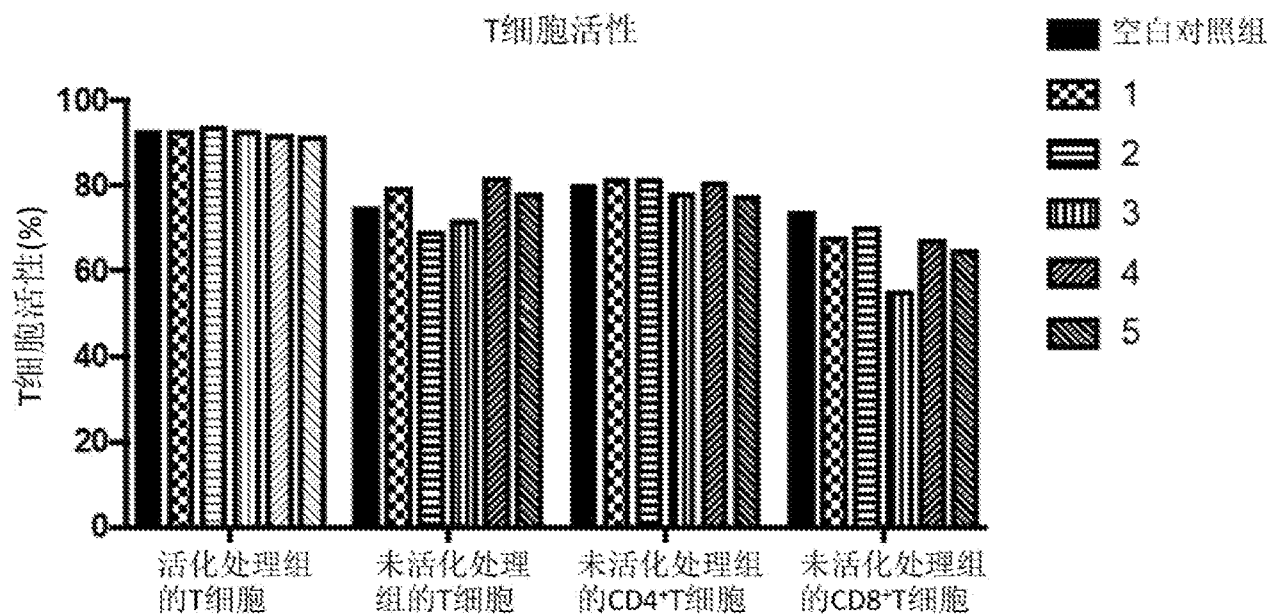


图 8

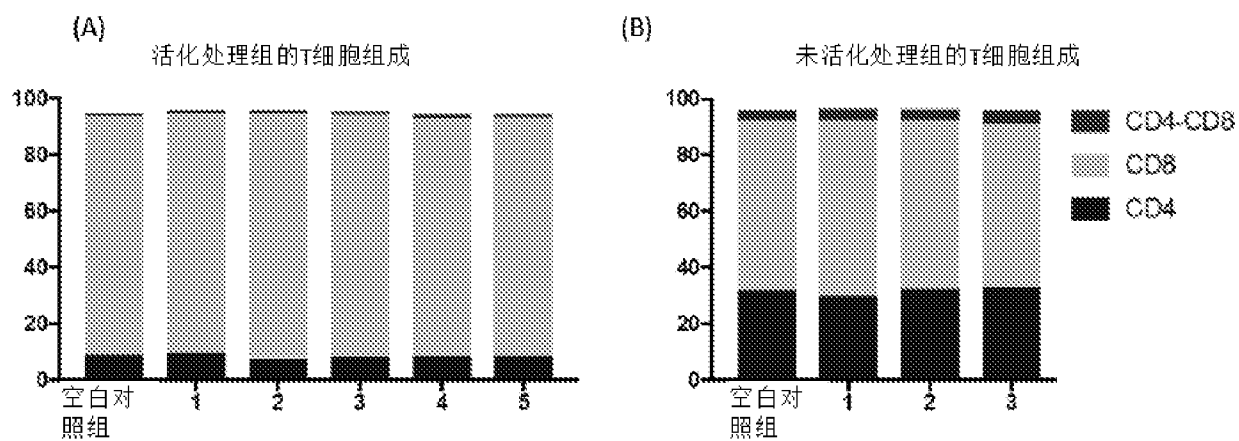


图 9

CCR6与TNFa双表达细胞的比例

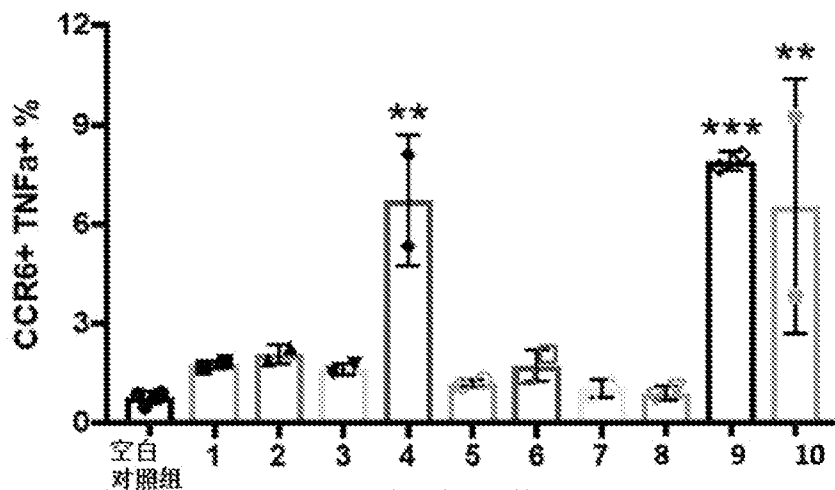


图 10

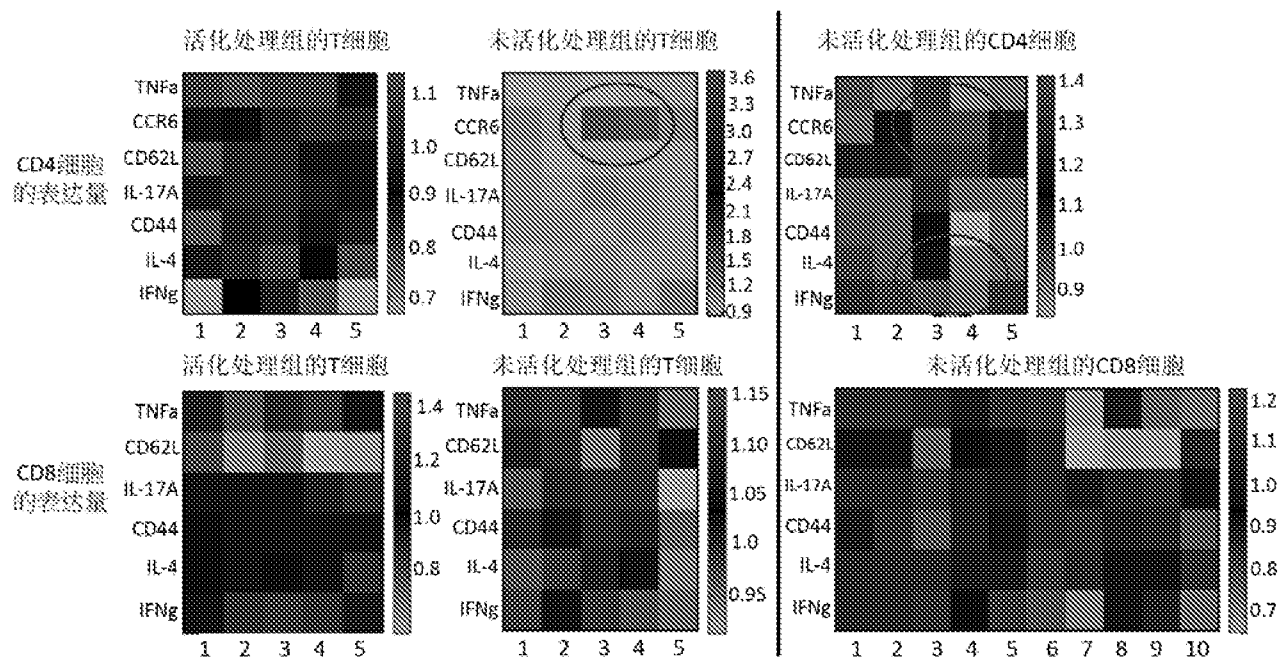


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/111376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/078(2010.01)i; A61K 9/16(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)

C12N; A61K

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)

CNABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 百度学术, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ISI Web of Knowledge: 申请人/发明人, T细胞, 免疫细胞, NK细胞, T cell?, NK cell?, immune cell?, 拓扑结构, topological structure, 二氧化钛, TiO₂, 二氧化硅, SiO₂, 表面活性剂, surfactant, 物理接触, 纳米胶粒, nanomicelle, 分化, differentiation, 增殖, proliferation, 活化, activation, PMMA, PSC, SDS, 自组装, self-assembly, 细胞因子, cytokine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010062561 A1 (UNIVERSITY OF ARKANSAS) 03 June 2010 (2010-06-03) claims 1, 4, 11, 12, description paragraph 0043	1-14
A	CN 109153976 A (HONG KONG BAPTIST UNIVERSITY) 04 January 2019 (2019-01-04) claims 1, 4, 11, 12, description paragraph 0043	1-14
A	LI, J.A. et al. "Controlling mesenchymal stem cells differentiate into contractile smooth muscle cells on a TiO ₂ micro/nano interface: Towards benign pericytes environment for endothelialization" <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , Vol. 145, 11 May 2016 (2016-05-11), pp. 410-419	1-14
A	LI, J.A. et al. "Preparation of SiO ₂ /TiO ₂ and TiO ₂ /TiO ₂ micropattern and their effects on platelet adhesion and endothelial cell regulation" <i>Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B</i> , Vol. no. 307, 01 February 2013 (2013-02-01), pp. 575-579	1-14
A	WO 2013109078 A1 (OSSTEMIM-IMPLANT CO., LTD.) 25 July 2013 (2013-07-25) entire document	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"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
 "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)
 "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

"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
 "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
 "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
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 May 2021

Date of mailing of the international search report

26 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/111376

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAN, J.P. et al. "Bio-functional electrospun nanomaterials: From topology design to biological applications" <i>Progress in Polymer Science</i> , Vol. 91, 16 February 2019 (2019-02-16), pp. 1-28	1-14
A	孟洁 等 (MENG, Jie et al.). "纳米拓扑结构的构建以及对细胞行为的影响 (Effects of Nanotopography for Biomaterials on Cell Behaviors)" <i>生物医学工程学杂志 (Journal of Biomedical Engineering)</i> , Vol. 24, No. 3, 31 December 2007 (2007-12-31), pp. 685-689	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/111376

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2010062561	A1	03 June 2010	US	2010104652	A1	29 April 2010
CN	109153976	A	04 January 2019	US	2017335279	A1	23 November 2017
				EP	3464568	A4	25 December 2019
				US	10619135	B2	14 April 2020
				EP	3464568	A1	10 April 2019
				WO	2017202286	A1	30 November 2017
WO	2013109078	A1	25 July 2013	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/111376

A. 主题的分类

C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/078(2010.01)i; A61K 9/16(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)

C12N; A61K

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))

CNABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 百度学术, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ISI Web of Knowledge; 申请人/发明人, T细胞, 免疫细胞, NK细胞, T cell?, NK cell?, immune cell?, 拓扑结构, topological structure, 二氧化钛, TiO₂, 二氧化硅, SiO₂, 表面活性剂, surfactant, 物理接触, 纳米胶粒, nanomicle, 分化, differentiation, 增殖, proliferation, 活化, activation, PMMA, PSC, SDS, 自组装, self-assembly, 细胞因子, cytokine

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	WO 2010062561 A1 (UNIVERSITY OF ARKANSAS) 2010年 6月 3日 (2010 - 06 - 03) 权利要求1、4、11、12, 说明书第0043段	1-14
A	CN 109153976 A (香港浸会大学) 2019年 1月 4日 (2019 - 01 - 04) 权利要求1、4、11、12, 说明书第0043段	1-14
A	LI, J.A. 等. "Controlling mesenchymal stem cells differentiate into contractile smooth muscle cells on a TiO ₂ micro/nano interface: Towards benign pericytes environment for endothelialization" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 第145卷, 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11), 第410-419页	1-14
A	LI, J.A. 等. "Preparation of SiO ₂ /TiO ₂ and TiO ₂ /TiO ₂ micropattern and their effects on platelet adhesion and endothelial cell regulation" Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 第307卷, 2013年 2月 1日 (2013 - 02 - 01), 第575-579页	1-14

☒ 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

2021年 5月 7日

国际检索报告邮寄日期

2021年 5月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(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

授权官员

杨佳倩

电话号码 86-(10)-53961939

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	W0 2013109078 A1 (OSSTEMIM-IMPLANT CO., LTD.) 2013年 7月 25日 (2013 - 07 - 25) 全文	1-14
A	HAN, J.P. 等. "Bio-functional electrospun nanomaterials: From topology design to biological applications" Progress in Polymer Science, 第91卷, 2019年 2月 16日 (2019 - 02 - 16), 第1-28页	1-14
A	孟洁等. "纳米拓扑结构的构建以及对细胞行为的影响" 生物医学工程学杂志, 第24卷, 第3期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 第685-689页	1-14

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/111376

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	2010062561	A1	2010年 6月 3日	US	2010104652	A1	2010年 4月 29日
CN	109153976	A	2019年 1月 4日	US	2017335279	A1	2017年 11月 23日
				EP	3464568	A4	2019年 12月 25日
				US	10619135	B2	2020年 4月 14日
				EP	3464568	A1	2019年 4月 10日
				WO	2017202286	A1	2017年 11月 30日
WO	2013109078	A1	2013年 7月 25日	无			